



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Caracterización morfo-molecular del complejo *Oudemansiella platensis-canarii* en el sur del Ecuador

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Eguiguren Palacios, Juan Sebastián

DIRECTOR: Cruz Sarmiento, Darío Javier, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, “Caracterización morfo-molecular del complejo *Oudemansiella platensis-canarii* en el sur del Ecuador” realizado por Juan Sebastián Eguiguren Palacios; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Agosto de 2016

f).....

Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Juan Sebastián Eguiguren Palacios declaro ser el autor del presente trabajo de titulación: “Caracterización morfo-molecular del complejo *Oudemansiella platensis-canarii* en el sur del Ecuador”, de la titulación Biología siendo Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autor: Eguiguren Palacios, Juan Sebastián

Cédula: 1103536478

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A mis padres, quienes me han apoyado durante toda mi vida en cada paso y en cada sueño que me he propuesto, y que gracias a su buen ejemplo me han enseñado a perseverar y trabajar duro para conseguir lo que me proponga.

A mi hermano, mis abuelitos, tíos, primos y a toda mi familia, quienes siempre me han demostrado su afecto y se han alegrado por cada paso y meta que he ido logrando.

Juan Sebastián Eguiguren Palacios

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Darío Cruz, por todo el apoyo que me ha dado desde que empezamos a trabajar en el fungario, por la confianza que ha tenido en mí en todos los proyectos en los que hemos trabajado, y por compartir su conocimiento.

A mi Profesora Meike Piepenbring, que me ayudó y guió durante mis estudios en Alemania.

A Hermine Lotz-Winter y Pablo Pérez Daniëls, quienes me han enseñado muchísimo sobre micología, permitiéndome entender más al complejo reino de los hongos.

Al Dr. Juan Pablo Suárez, por permitirme entrar a su grupo de trabajo cuando inicié mis estudios, y me ha respaldado durante mis años de estudiante.

A mi tribunal de tesis, por todos los comentarios y sugerencias que me permitieron mejorarla.

Al equipo del fungario, en especial a Andrés Chamba y Oscar Flores, por su ayuda en el trabajo de campo y laboratorio.

A todos los profesores que me han ayudado a formarme como Biólogo.

A mi abuelito Augusto, que me apoyó cuando tuve la oportunidad de hacer mis cursos en el exterior.

A mis amigos, que han estado conmigo en todo momento.

Juan Sebastián Eguiguren Palacios

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
2.1. Área de estudio	7
2.2. Métodos	7
2.3. Análisis de datos moleculares	8
3. RESULTADOS.....	10
3.1. Macromorfología de <i>Oudemansiella platensis</i>	10
3.2. Micromorfología de <i>Oudemansiella platensis</i>	12
3.3. Macromorfología de <i>Oudemansiella aff. canarii</i>	14
3.4. Micromorfología de <i>Oudemansiella aff. canarii</i>	15
3.5. Datos moleculares	17
4. DISCUSIÓN	21
4.1. Morfología	21
4.2. Filogenia	22
CONCLUSIONES	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXOS.....	30

RESUMEN

Algunas especies del género *Oudemansiella* (Physalacriaceae, Basidiomycota) han sido reclasificadas últimamente debido a la similitud de sus basidiomas, a la complejidad de su micromorfología y a la falta de datos moleculares que contribuyan a su clasificación sistemática. En este trabajo revisamos 12 especímenes del complejo *Oudemansiella platensis-canarii* colectados en el sur del Ecuador con el objetivo de proponer el mejor método para su identificación taxonómica. Los especímenes fueron comparados con fotografías macroscópicas e ilustraciones micromorfológicas de organismos tipo presentes en la literatura revisada. Se obtuvieron secuencias de la región ITS-5.8S + LSU parcial de ADNrn a partir de los basidiomas colectados en Ecuador y se las comparó mediante análisis filogenéticos con secuencias similares disponibles en bases de datos. La estructura del pileipellis fue la característica micromorfológica que aportó con mayor valor taxonómico, presentando rasgos distintivos entre estas dos especies. El análisis filogenético multigénico permitió definir molecularmente a las especies examinadas dentro de este complejo. La correlación morfológica y filogenética nos permitió identificar a las especies *Oudemansiella platensis* y *Oudemansiella* aff. *canarii*, siendo esta última un nuevo registro para Ecuador.

Palabras clave: región ITS-5.8S, filogenia multigénica, basidiomas.

ABSTRACT

Some species of the genus *Oudemansiella* (Physalacriaceae, Basidiomycota) have been reclassified lately due to the similarity of their basidiomata, the complexity of their micromorphology and lack of molecular data that contribute to their systematic classification. Here we review 12 specimens of the *Oudemansiella platensis-canarii* complex collected in southern Ecuador and we try to propose the best method to facilitate their taxonomic identification. The specimens were compared with macroscopic photographs and micro morphological illustrations from type organisms present in the revised literature. Sequences from the ITS-5.8S + partial LSU nrDNA were obtained from basidiomata collected in Ecuador and they were compared by phylogenetic analyzes with similar sequences available in databases. The micromorphological feature that contributed with greater taxonomic value was the pileipellis structure, which is very distinctive between these two species. Multigene phylogenetic analysis allowed us to define the examined species within this species complex via molecular methods. Morphological and phylogenetic correlation was used to identify the species *Oudemansiella platensis* and *Oudemansiella* aff. *canarii*, the latter being a new record for Ecuador.

Key words: ITS-5.8S region, multigene phylogeny, basidiomata.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotas muy diversos en el planeta, estimándose 1.5 millones de especies basados en la relación hongos-plantas vasculares de 6:1 según Hawksworth (1991). No obstante la estimación de Hawksworth (1991) ha cambiado durante la actualidad gracias a procedimientos de secuenciación de nueva generación donde el número de especies de hongos se estima en 5.1 millones (O'Brien *et al.*, 2005; Blackwell, 2011). El Ecuador es considerado un país megadiverso donde actualmente se encuentran confirmadas 17.748 especies nativas de plantas vasculares y con la probabilidad de poseer 25.000 especies de plantas en total (Neill, 2012). Se estima que podemos encontrar entre 100.000 y 150.000 especies de hongos aplicando la relación de Hawksworth (1991). Este número representaría el 10% de las especies de hongos del mundo. A pesar de esta gran diversidad de especies de hongos que puede poseer Ecuador, solamente un pequeño porcentaje ha sido estudiado hasta la fecha. Según la revisión bibliográfica de Læssøe & Petersen (2008), se encuentran reportadas solamente 3.766 especies de hongos en el país, esto puede significar que aún el 97.5% de la diversidad de hongos está por ser descubierta.

En este contexto, nuestros esfuerzos de investigación se centran en la caracterización morfológica y molecular de las especies de hongos que se pueden encontrar principalmente en el Sur del Ecuador. Así por ejemplo, nos introducimos a la familia Physalacriaceae, la cual fue nombrada por primera vez por Corner (1970), en la que se agrupó un conjunto de géneros que según Corner no encajaban dentro del orden Agaricales ni "Aphylllophorales", pero que sí pertenecían a algún orden de los Homobasidiomycetes. Dentro de esta familia se incluyeron algunos géneros como por ejemplo *Armillaria* (Fr.) Staude, *Dactylosporina* (Cléménçon) Dörfelt, *Hymenopellis* R.H. Petersen, *Mucidula* Pat., *Oudemansiella* Speg., *Physalacria* Peck (género tipo de la familia), *Strobilurus* Singer, *Xerula* Maire. Moncalvo *et al.* (2002) comparó un set de secuencias de la subunidad ribosomal grande (LSU) de ADNrn pertenecientes a 877 secuencias de Agaricales en un intento por clasificar filogenéticamente a este orden. Este análisis de Moncalvo *et al.* (2002) permitió determinar que

Physalacriaceae formaba un grupo monofilético bien soportado. Posteriormente, Petersen & Hughes (2010) reconstruyeron una filogenia basada en la región ITS-5.8S de ADNrn usando secuencias de algunas especies pertenecientes a esta familia, con esto concluyeron que existen diferencias suficientes como para mantener separados los géneros *Strobilurus*, *Xerula*, *Paraxerula*, *Oudemansiella*, *Dactylosporina*, *Protoxerula* y *Ponticulomyces* de Agaricales.

Siguiendo este contexto dentro la familia Physalacriaceae damos énfasis al género *Oudemansiella*, que comprende morfológicamente un grupo de hongos agaricoides con distribución tropical a templada del sur (Yang *et al.*, 2009). Según Pegler & Young (1986), los basidiomas de este género se caracterizan por su morfología collybioide, con un pileipellis hymenodérmico, el cual puede llegar a ser ampliamente desorganizado a través de gelatinización o puede generar cistidias setoides conspicuas y amontonadas; sus esporas son hialinas, inamiloides, subglobosas a elipsoides cortas, usualmente voluminosas, produciendo una esporada blanquecina a color crema.

Cléménçon (1979) reconoce 18 especies dentro de cinco grupos (= subgéneros) principales dentro del género *Oudemansiella* basados en caracteres morfológicos como el píleo, estipe, esporas, basidios, pleurocistidios, queilocistidios, además de su ecología incluyendo el sustrato en donde crecen. Sin embargo, esta clasificación es muy antigua y contiene un género que no está reconocido en la taxonomía actual (i.e. *Pseudomycenella*), u otro que está reclasificado dentro de otra familia (i.e. *Megacollybia*), que actualmente se encuentra en la familia Marasmiaceae (revisado en Index Fungorum Jul/2016, www.indexfungorum.org). Este género *Oudemansiella* ha sido extensamente discutido por varios autores como Yang *et al.* (2009), demostrando su complejidad y ambigüedad morfológica en especial al analizar sus basidiomas, la estructura del pileipellis y la ornamentación de las basidiosporas. En el trabajo de Yang *et al.* (2009) se revisaron morfológicamente varios taxones de *Oudemansiella* s.str., dejando una reclasificación en cuatro secciones, así tenemos: *Dactylosporina*, *Mucidula*, *Oudemansiella* y *Radicatae*.

Dentro de la sección *Oudemansiella* se encuentra *O. platensis* (Speg.) Speg., cuya distribución está restringida al nuevo mundo, específicamente a América Central y América del Sur (Petersen *et al.*, 2008; Petersen & Hughes, 2010). *O. platensis* actualmente presenta una compleja clasificación taxonómica morfológica (Yang *et al.*, 2009) y molecular (Petersen & Hughes, 2010), además está estrechamente relacionada con *O. canarii*. Esta última

especie fue descrita por primera vez en la isla de Java, Indonesia (Jünghuhn, 1838) y tiene una distribución pantropical (Piepenbring, 2008) extendiéndose en algunos países de América Central, Norte América (Petersen & Hughes, 2010) y países de Asia, África y Europa (Pegler & Young, 1986; Yang *et al.*, 2009). Estas dos especies han sido reportadas con un elevado potencial alimenticio y son fácilmente cultivables (Franco-Molano *et al.*, 2000; Ruegger *et al.*, 2001; Piepenbring, 2008).

En la taxonomía morfológica se analizan diversas características, como las macroscópicas o visibles incluyendo el hábito, superficie del píleo, estipe, textura o el color y olor dados naturalmente o por reacciones con diferentes químicos (Garnica *et al.*, 2003). Por otra parte las características microscópicas pueden ser, pileipellis, contexto, estructura lamelar, basidiosporas, coloración de las hifas variante según reactivos químicos (Garnica *et al.*, 2003). Sin embargo, estas características macro y micro pueden resultar ambiguas para diferenciar *Oudemansiella platensis* y *O. canarii*, lo cual es común entre especies de hongos similares llevando a la inclusión de varias especies como un mismo taxón (Cruz *et al.* 2014).

Los datos moleculares pueden facilitar la identificación de taxones morfológicamente idénticos o difíciles de distinguir (Cruz *et al.* 2014). No obstante, los datos moleculares actualmente disponibles en bases de datos como secuencias de las regiones ITS-5.8S y LSU para *Oudemansiella platensis* y *O. canarii* son escasos y algunos provienen de estudios que carecen de datos morfológicos de los basidiomas o que no han sido validados desde material de herbario, lo que causa un desafío al momento de interpretar claramente las filogenias generadas con esas secuencias. Petersen & Hughes (2010) muestra una filogenia con dos clados donde en uno de ellos se agrupan secuencias para *O. platensis* y *O. canarii* dejando ambigüedad en la distinción de estas dos especies.

Bajo estos antecedentes, siguiendo lineamientos de taxonomía clásica (características morfológicas) y molecular, usando secuencias de ADNrn ITS-5.8S junto con LSU parcial (D1/D2), buscamos llegar a un mejor concepto de especie entre *Oudemansiella platensis* y *O. canarii*, partiendo de material colectado en la región Sur del Ecuador.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

Especímenes de *Oudemansiella* spp. fueron colectados durante Marzo/2014 – Julio/2015 en el bosque tropical montano lluvioso de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), en la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador (para detalles del sitio de colecta ver Beck *et al.* 2008). Los especímenes fueron secados a 50°C durante 24 horas y posteriormente depositados en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (HUTPL), Loja, Ecuador. Además se revisaron especímenes de *Oudemansiella* depositados en el HUTPL (ver listado de especímenes para este estudio en Anexo 1).

2.2. Métodos

2.1.1. Análisis morfológico de basidiomas

Los basidiomas fueron descritos en el campo según sus características macroscópicas usando a Largent (1986) como referencia. Secciones finas del himenóforo de las muestras secas fueron cortadas a mano y rehidratadas usando KOH al 3%. Las secciones fueron examinadas microscópicamente a diferentes magnificaciones (100-1000X) usando el microscopio óptico Zeiss Axioskop 2 equipado con contraste de fases. Se midió el largo y ancho de 20 basidiosporas y por lo menos 10 unidades por cada tipo de estructura microscópica encontrada. La forma de las basidiosporas fue asignada acorde a Largent *et al.* (1977) y usando los valores de Q para su simetría según la clasificación establecida por Bas (1969). Las estructuras observadas fueron dibujadas a escala con la ayuda de un tubo de dibujo. La micromorfología de los especímenes fue clasificada siguiendo a Largent *et al.* (1977).

2.1.2. PCR directa y secuenciación

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific). Fragmentos pequeños ($\leq 1 \text{ mm}^3$ por cada espécimen) del himenóforo de los

basidiomas secos fueron colocados en tubos con 20 μ L del Buffer de dilución incluido en el kit. Las muestras de herbario disponibles y almacenadas durante más de 10 años en el HUTPL fueron tratadas con Proteinasa K (Ambion) a una concentración de 200 μ g/mL e incubadas a 50°C por 30 minutos, después de destruir el tejido en el Buffer de Dilución. La región ITS-5.8S y LSU parcial (dominios D1/D2) de ADNrn fue amplificada usando los primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; White *et al.* (1990) y NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'; O'Donnell 1993). Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 20 μ L y se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante; la temperatura de anillamiento de los primers fue de 55°C. La correcta amplificación del fragmento de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ Safe Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA). Los productos de PCR fueron purificados utilizando 1.1 volúmenes de PEG (20% Polietilenglicol 8000, 2.5 M NaCl) e incubados a 37°C por 15 min, los pellet fueron colectados centrifugando a máxima velocidad (14000 rpm) por 15 min. Los pellet recuperados se lavaron usando etanol (frío) al 80%. Después de que los pellet se secaron completamente, el ADN se resuspendió en ddH₂O desionizada. Los amplicones se secuenciaron usando el mismo set de primers en la empresa Macrogen (Seoul, Korea).

2.3. Análisis de datos moleculares

Se usó el software CodonCode Aligner 5.1.4 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA) para generar secuencias consenso. La región ITS-5.8S fue extraída de las secuencias consenso utilizando el software ITSx versión 1.0.11 (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013). Las secuencias fueron alineadas separadamente en dos alineamientos de secuencias múltiples usando MAFFT Versión 7 (Kato & Standley, 2013) mediante la estrategia G-INS-i. El primer alineamiento incluyó un consenso de ITS-5.8S + LSU parcial únicamente con las secuencias generadas en este estudio. Para el segundo alineamiento se usó solamente la región ITS-5.8S de nuestras secuencias de *Oudemansiella* incluyendo las más similares disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los árboles filogenéticos se realizaron en el software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), usando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+I+G con cinco categorías discretas y seguido de 1000 réplicas de bootstrap (MLB) para el análisis de Máxima Verosimilitud (Nei & Kumar, 2000); y MRBAYES v3.2.5 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) donde se calculó la probabilidad posterior Bayesiana (PPB) usando el modelo más complejo de sustitución disponible (GTR+I+G), siguiendo a Whelan *et al.* (2001), Douady *et al.* (2003), y Huelsenbeck & Rannala (2004).

Los porcentajes de variabilidad entre secuencias se determinaron con el modelo Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) usando delección de gaps por pares en el software MEGA6. Como umbral de referencia para la determinación de especies se usó el 3% de variabilidad intra-específica según Nilsson *et al.* (2008). Los porcentajes superiores al 3% y correspondientes a un buen soporte filogenético fueron considerados como variación entre especies.

3. RESULTADOS

Oudemansiella platensis (Speg.) Speg., An. Soc. Cient. Argen. 12: 24. (1881)
[MB#179000].

Basionym *Agaricus platensis* Speg., An. Soc. Cient. Argen. 9: 161 (1880)
[MB#243873].

≡ *Oudemansia platensis* Speg. [*nom. illeg.*] An. Soc. Cient. Argen. 10: 280 (1880)
[MB#507736].

≡ *Psalliota platensis* (Speg.) Herter, Est. Bot. Reg. Uruguay, III Florula Uruguay. Pl. Avasculares (Montevideo): 43 (1933) [MB#321068].

Holotipo (design. Spegazzini, 1880): ARGENTINA, Dist. Federal, Palermo, X.1880. (LPS!)

Epitipo ARGENTINA, Misiones Prov., Parque Nacional Iguazú, Isla San Martin, TFB 10746 (TENN 58954)

3.1. Macromorfología de *Oudemansiella platensis*

Basidiomas en forma de sombrilla, pluteoides (Figura. 1). *Píleo* plano, orbicular, 27 - 63 mm de diámetro, color ligeramente plata o grisáceo, margen crenado, superficie del píleo viscoso, escumuloso. *Lamelas* adnatas a emarginadas, subdistantes a cercanas, moderadamente anchas, 6 mm de alto, blancas, margen de lamelas liso, lamélulas presentes. *Estipe* central, 36 - 70 mm, cilíndrico, usualmente hinchado en la base, escabroso, fibroso. *Hábito* lignícola, creciendo en tronco de madera.



Figura 1. Basidiomas de *Oudemansiella platensis*. a) Vista superior e inferior de los basidiomas. b) Hábito lignícola característico de la especie. Las barras representan 10 mm.

3.2. Micromorfología de *Oudemansiella platensis*

Pileipellis (Figs. 2a, 3b) conformado por dos capas diferenciadas, el suprapellis siendo un ixotricodermis desarticulado en empalizada compuesto por hifas largas cilíndricas hialinas (30 - 54 μm), el subpellis compuesto por una dermis pigmentada en empalizada; los parches del píleo (Figura. 3a) formados por un policistodermio 18 - 39 \times 17 - 38 μm con aproximadamente seis (o más) células por cadena. *Trama del himenóforo* compuesta por dos tipos de hifas hialinas paralelas: hifas cilíndricas anchas, con pared celular gruesa y sin fíbulas, e hifas con pared celular fina, usualmente con fíbulas. *Queilocistidios* (Figura. 3d) con formas muy variables, siendo cilíndricos o hinchados en la base y dicotómicos en el ápice, raramente con fíbulas. *Pleurocistidios* (Figura. 3e), ampuliformes, (151-) 198 - 295 (-319) \times (24-) 29 - 43 (-47) μm , con una pared celular gruesa (1.5 - 2 μm) en la parte media y más delgada (1 μm) hacia el ápice, con un cuello cilíndrico y ápice obtuso, hialinas, distribuidas en todo el himenóforo, fácilmente distinguibles con la ayuda de una lupa o estereomicroscopio sobre la superficie de las lamelas pero sin alcanzar el margen lamelar. *Basidios* (Figura. 3c) claviformes, (71-) 74 - 88 (-90) \times (20) 21 - 29 (-32) μm , cada uno con cuatro basidiosporas, raramente con 2 basidiosporas, refringentes, con fíbulas, pared celular fina, esterigmas anchos y curvos. *Basidiosporas* (Figura. 3c) globosas a subglobosas, (18-) 19 - 22 (-23) \times (17-) 18 - 21 (-23) μm , valor-Q (1.00-) 1.02 (-1.10); refringente, gutulados, con pared celular gruesa (0.5-) 1 (-1.5).

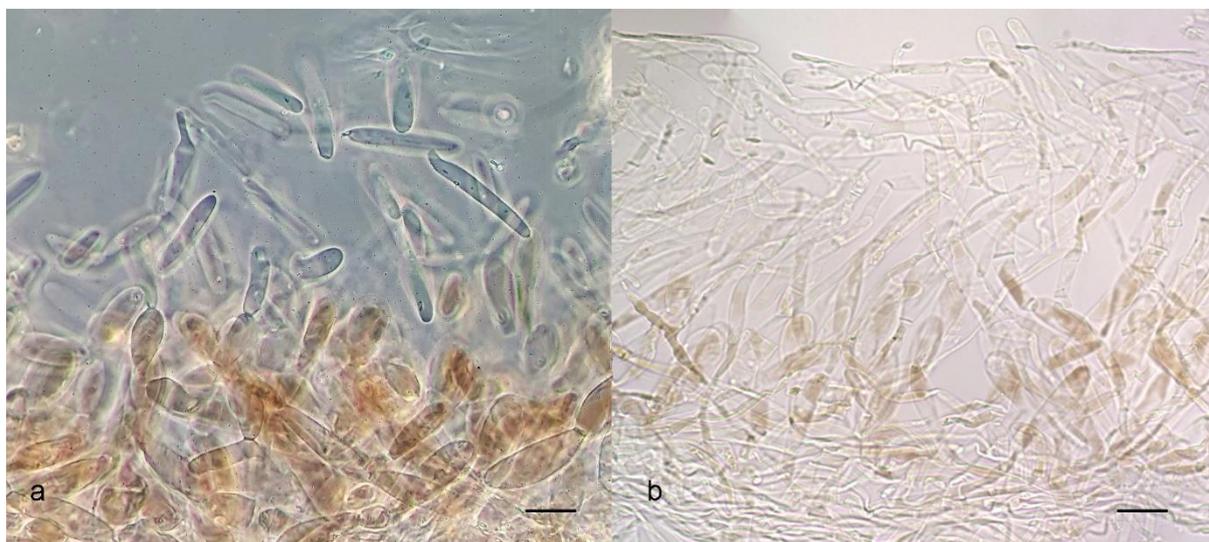


Figura 2. Microfotografía de la estructura del pileipellis de a) *Oudemansiella platensis* (usando contraste de fases), y de b) *Oudemansiella* aff. *canarii*. Las barras representan 20 μm .

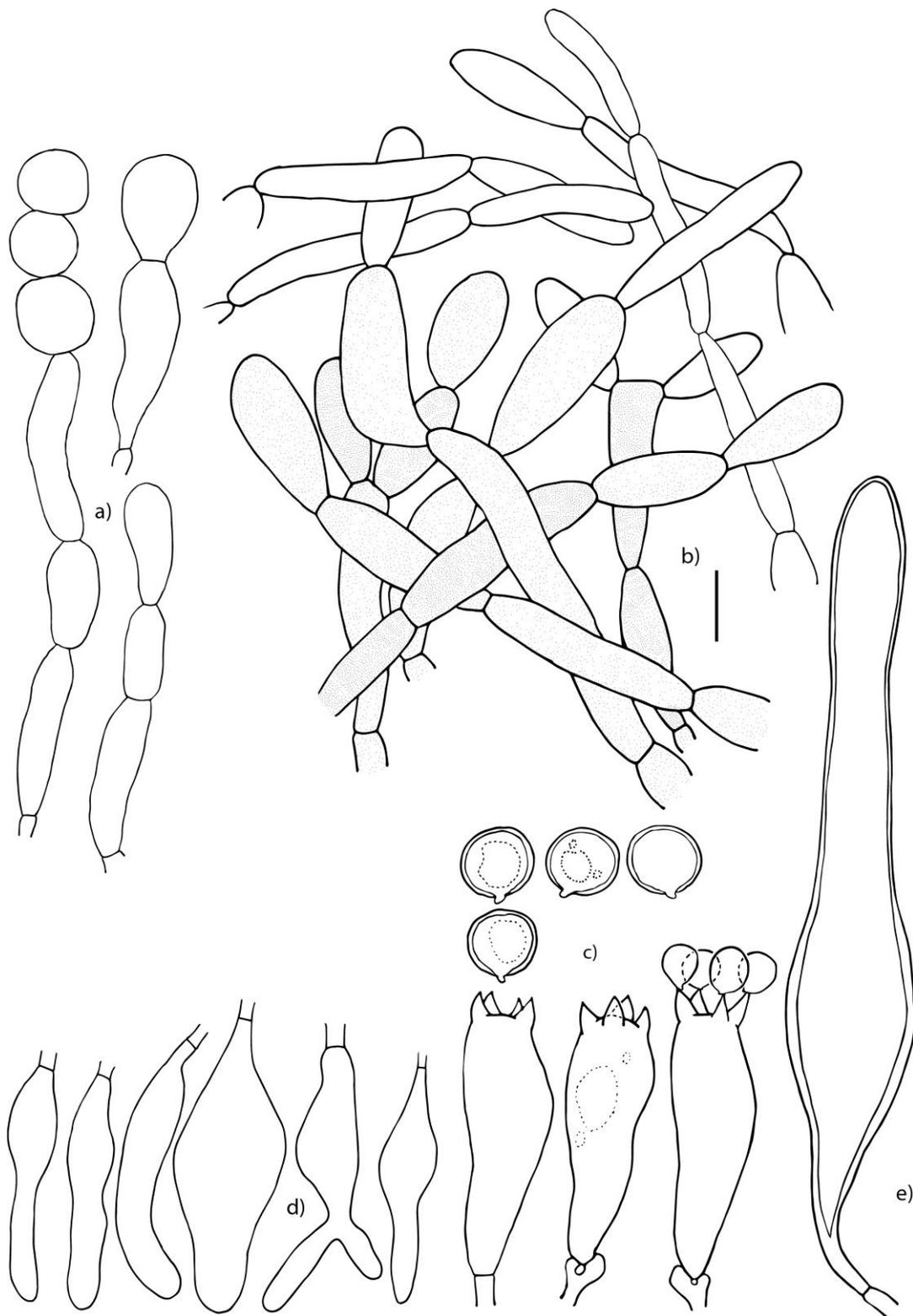


Figura 3. Micromorfología de *Oudemansiella platensis*. a) Hifas y policistodermio de los parches del pileo. b) Sección vertical del pileipellis. c) Basidios y basidiosporas. d) Queilocistidios. e) Pleurocistidios. La barra representa 20 μm .

Oudemansiella aff. canarii (Jüngh.) Höhn., Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Math.-naturw. Klasse Abt. I 118: 276 [2 repr.] (1909) [MB#178851

≡ *Agaricus canarii* Jüngh., Praemissa in floram cryptogamicam Javae insulae: 82-83 (1838) [MB#246167]

≡ *Amanitopsis canarii* (Jüngh.) Sacc., Sylloge Fungorum 5:27 (1887) [MB#166861]

3.3. Macromorfología de *Oudemansiella aff. canarii*

Basidiomas en forma de sombrilla, pluteoides (Figura. 4). *Píleo* plano, orbicular, color crema, margen plegado hacia arriba, rizado, superficie del píleo viscosa, escamosa. *Lamelas* libres a adnexas, subdistantes, moderadamente anchas, blancas a crema, margen lamelar liso, lamélulas presentes. *Estipe* central, con poco tomento basal, cilíndrico, cónico desde la base hacia el ápice, bulboso, escabroso, fibroso. *Hábito* lignícola, cespitoso.



Figura 4. *Oudemansiella canarii*. a) Basidiomas de HUTPL(F)-497. b) Basidiomas de BC02.

3.4. Micromorfología de *Oudemansiella aff. canarii*

Pileipellis (Figs. 2b, 5b) formado por dos capas, un suprapellis compuesto por un ixocutis hialino y el subpellis siendo un dermis en empalizada suelto y pigmentado; los parches del píleo (Figura. 5a) formados por cadenas de células globosas, moniliformes. *Queilocistidios* (Figura. 5d) muy variables, sus hifas son largas y cilíndricas, hinchadas en la base y en la porción media de los cistidios, usualmente con ápice dicotómico, con fíbulas abundantes. *Pleurocistidios* (Figura. 5e) ampuliformes con pared celular gruesa (1.5-2 μm) en la porción media y más delgada (1 μm) hacia el ápice, con un cuello cilíndrico y un ápice obtuso, hialinos, distribuidos sobre el himenóforo. *Basidios* (Figura. 5c) claviformes, 57 - 67 \times 19 - 21 μm , con contenidos refringentes, esterigmas anchos y curvos. *Basidiosporas* (Figura. 5c) globosas a subglobosas, (16) 17 - 21 (23) \times (16) 16 - 21 (23) μm , valor-Q 1.00 - 1.07; refringentes, gutuladas, pared celular gruesa.

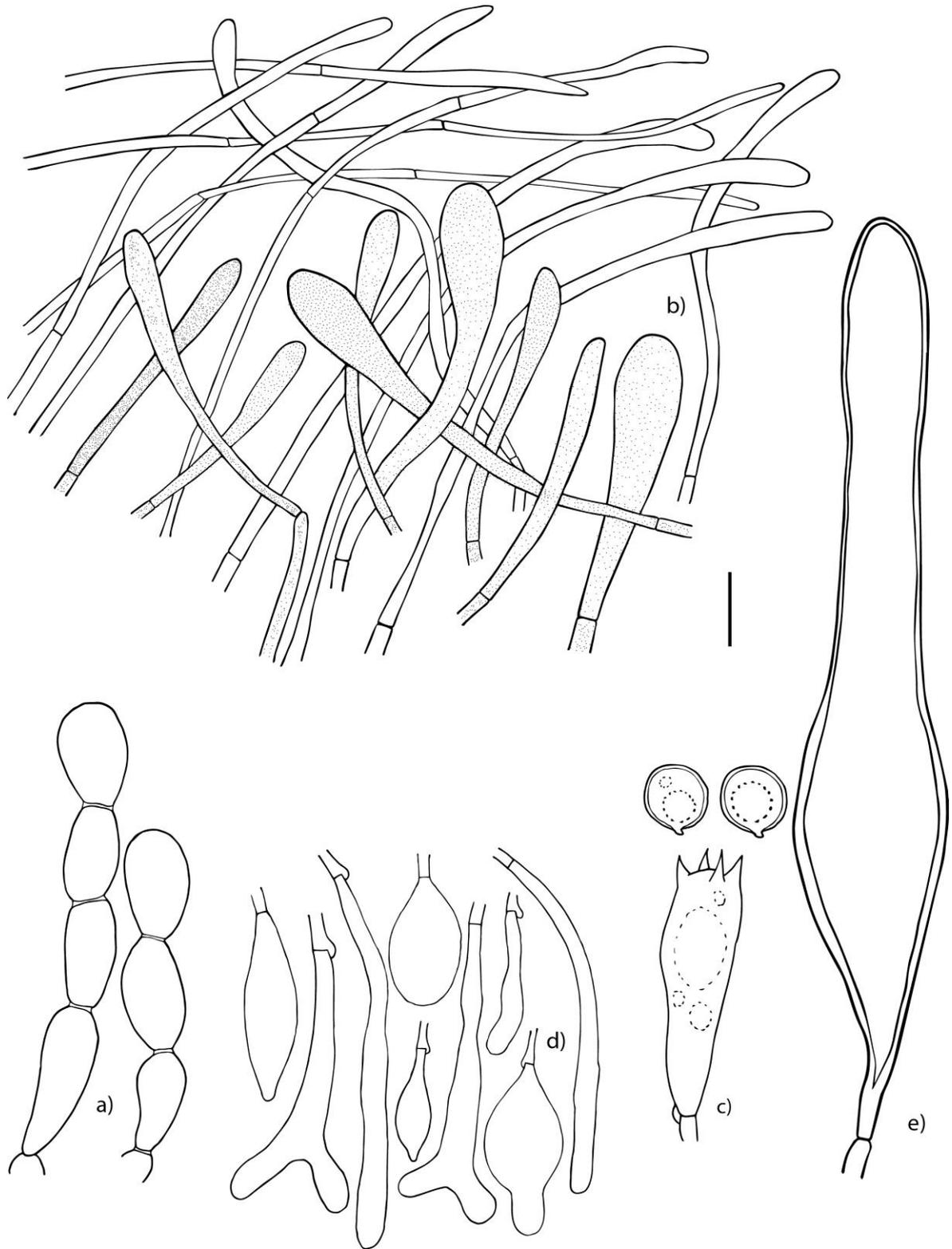


Figura 5. Micromorfología de *Oudemansiella* aff. *canarii*. a) Células moniliformes de los parches del píleo. b) Sección vertical del pileipellis. c) Basidio y basidiosporas. d) Queilocistidios. e) Pleurocistidios. La barra representa 20 μ m.

3.5. Datos moleculares

Las secuencias obtenidas, 13 en total de entre 1349 a 1361 pares de bases, corresponden a *Oudemansiella platensis* y *O. canarii s. lat.* Estas secuencias consenso ITS-5.8S + LSU parcial, filogenéticamente (Figura. 6) forman dos clados denominados 1 y 2 altamente soportados (100% para MLB y PPB), correlacionados con la morfología.

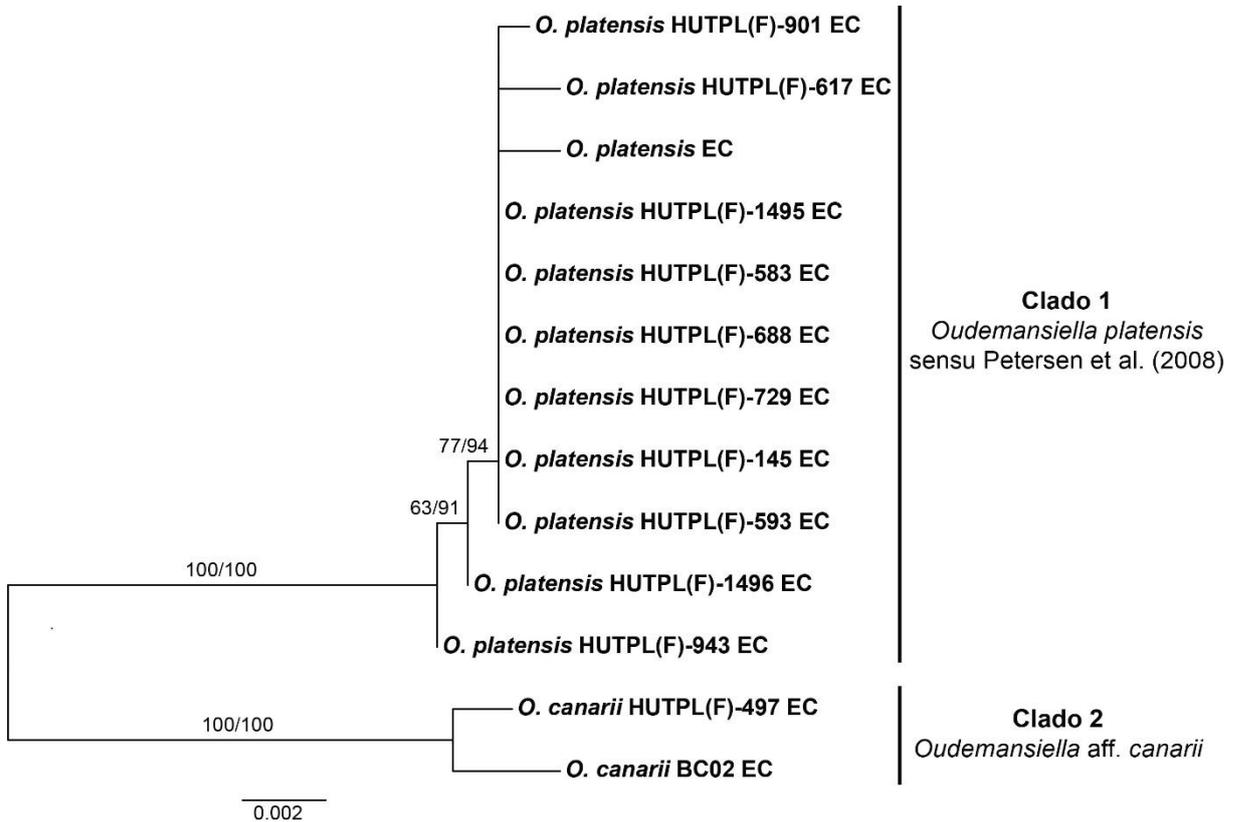


Figura 6. Filogenia multigénica de las secuencias generadas en este estudio combinando las regiones ITS-5.8S+LSU parcial de ADNrn. Los valores de bootstrap del análisis de máxima verosimilitud y probabilidades posteriores bayesianas (transformadas a porcentajes) se encuentran sobre las ramas (MLB/PPB). Solamente se muestran los valores superiores a 50%.

La filogenia (Figura. 7) de la región ITS-5.8S permite la distinción de tres clados altamente soportados por valores de 100% para MLB y PPB, donde el clado 1 y 2 son los correspondientes a la filogenia desde secuencias consenso (Figura. 6) y el clado 3 corresponde a secuencias provenientes de China y Sri Lanka obtenidas desde el GenBank.

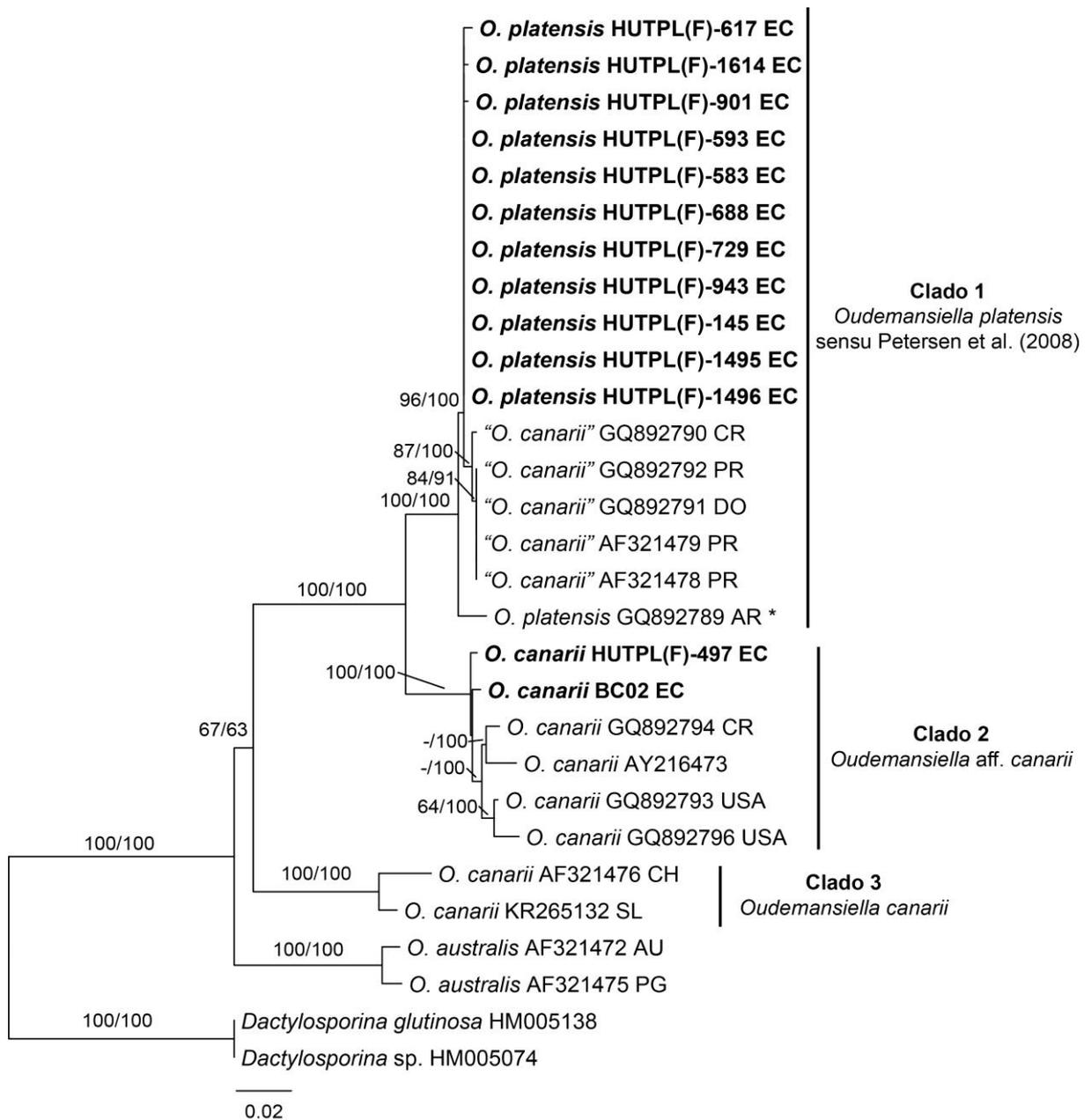


Figura 7. Árbol filogenético de la región ITS-5.8S de ADNrn. Las secuencias generadas en este trabajo se encuentran resaltadas en negrita. El epítipo de *O. platensis* designado por Petersen *et al.* (2008) está señalado por *. Los valores de bootstrap del análisis de máxima verosimilitud y probabilidades posteriores bayesianas (transformadas a porcentajes) se encuentran sobre las ramas (MLB/PPB). Solamente se muestran los valores superiores a 50%. El árbol está enraizado con *Dactylosporina* como grupo externo. Los códigos de países corresponden a: AR, Argentina; AU, Australia; CH, China; CR, Costa Rica; EC, Ecuador; DO, República Dominicana; PG, Papúa Nueva Guinea; PR, Puerto Rico; SL, Sri Lanka; USA, Estados Unidos.

El clado 1 (Figs. 6 y 7) lo hemos denominado *Oudemansiella platensis* sensu Petersen *et al.* (2008) el cual contiene los especímenes colectados en Ecuador y secuencias publicadas de América Central y Argentina (Figura. 7). La variación intra-especie de las secuencias presentes en este clado varía entre 0 a 1.69% (Tabla 1). La secuencia del epitipo de *O. platensis* con número de accesión GQ892789 (Petersen *et al.*, 2008) colectado en Argentina se incluye dentro de este clado.

Tabla 1. Variabilidad intra e inter-específica de las secuencias entre los especímenes de *Oudemansiella platensis* y *O. aff. canarii* de Ecuador y secuencias de *O. canarii* disponibles en el GenBank. Los parámetros de distancias se detallan en metodología.

Clado	Nombre del clado	Número de especímenes* en cada clado	Tamaño de ITS-5.8S en pares de bases	Diferencias intra-específicas	Diferencias inter-específicas
1	<i>Oudemansiella platensis</i> sensu Petersen <i>et al.</i> (2008)	11	699-703	0 – 1.69%	
2	<i>Oudemansiella aff. canarii</i>	2	707-708	0.57 – 2.31%	3.71 – 12.37%
3	<i>O. canarii</i>	—	688-690	2.40%	

*Los especímenes corresponden a las secuencias obtenidas de las colecciones de Ecuador.

El clado 2 (Figs. 6 y 7) contiene dos especímenes de Ecuador, uno colectado cerca de Tena, Napo (HUTPL(F)-497), y otro colectado en Zamora, Zamora Chinchipe (BC02, cuya secuencia fue obtenida a partir de un cultivo puro mantenido en el cepario de la UTPL ya que su basidioma no fue ingresado al HUTPL porque se encontraba muy deteriorado y su micromorfología no podía ser analizada); además contiene secuencias de América Central y América del Norte. También contiene una secuencia publicada en el GenBank identificada como “*O. canarii*” (AY216473); sin embargo, esta pertenece a un documento no publicado por lo que no se puede obtener más información sobre esta secuencia (Figura. 7). La variación intra-especie entre las secuencias del clado 2 varía entre 0.57 a 2.31% (Tabla 1). La distancia entre las hipotéticas especies (clado 1 y clado 2) varía entre 3.71% y 5.56% (Tabla 1).

El clado 3 (Figs. 6 y 7) incluye una secuencia depositada en el GenBank identificada como “*O. canarii*” proveniente de China (AF321476). Además, otra secuencia (KR265132), aparentemente proveniente de Sri Lanka, ha sido ingresada recientemente al GenBank; estas dos secuencias forman un tercer clado (soporte del 100% MLP y PPB) cuya asignación taxonómica es incierta (Figura. 7). La variación inter-específica de estas

secuencias del clado 3 comparado con las presentes los clados 1 y 2 indican diferencias del 9.98 – 12.37% (Tabla 1).

4. DISCUSIÓN

4.1. Morfología

Las características morfológicas macroscópicas de los basidiomas asignados a *O. platensis* y *O. aff. canarii* coinciden con los especímenes tipo descritos y asignados por Petersen *et al.* (2008). Sin embargo, Petersen *et al.* (2008) describió el tipo de basidioma de *O. platensis* como armillarioide, lo cual para nuestra apreciación es incorrecto ya que el tipo de basidiomas armillarioides siempre tienen anillo en el estipe tal como lo define Largent (1986). Por el contrario, ninguno de los basidiomas de *O. platensis* revisados y/o presentados por Petersen *et al.* (2008) muestran rastros de un anillo o velo parcial. Por otra parte, la micromorfología de *O. platensis* y *O. aff. canarii* es altamente similar a los basidiomas revisados, descritos y reportados por Petersen *et al.* (2008). Sin embargo, nuestro espécimen de Ecuador correspondiente a *O. aff. canarii* presenta ligeras diferencias en el tamaño de basidios (57-67 × 19-21 µm; Figura. 5c) y basidiosporas (17 - 21 × 16 - 21 µm; Figura. 5c) con respecto del epítipo de *O. canarii* de Indonesia descrito por Petersen *et al.* (2008) donde los basidios (78-90 × 25-30 µm) y las basidiosporas (19-25 × 18-23 µm) son más grandes. Probablemente *O. canarii* presente demasiada variabilidad morfológica como en muchos basidiomicetes (Oberwinkler, 2012) o simplemente son varios taxones agrupados erróneamente como una sola especie (Cruz *et al.*, 2014). Otras características como la forma de los queilocistidios se presentan altamente variables en nuestros especímenes y en *Oudemansiella* por lo que sería una característica ambigua y probablemente sin valor taxonómico para diferenciar *O. platensis* de *O. aff. canarii*.

Claramente la similitud macroscópica entre las especies del complejo *O. platensis-canarii* causa confusión al momento de su clasificación, ya que la mayoría de secuencias están identificadas en el GenBank como *O. canarii*, y estas son inconsistentes entre los dos clados. La diferencia morfológica más significativa entre las especies *O. platensis* y *O. canarii* a nuestro parecer es la estructura del pileipellis. Tal como lo mencionan Baroni &

Ortiz (2002) y Yang *et al.* (2009) esta estructura es muy diversa y distintiva en *Oudemansiella* y permite identificar y confirmar especies de este género. Al comparar la estructura del pileipellis de nuestros especímenes de *O. platensis* con las ilustraciones del pileipellis del epítipo de *O. platensis* de Argentina asignado por Petersen *et al.* (2008) encontramos una alta similitud entre ellos; es por esto que asignamos la especie *Oudemansiella platensis* a los especímenes que presentaban la micromorfología demostrada en la Figura. 3b. Así mismo, nuestro único espécimen de *O. aff. canarii* de Ecuador al ser comparado con las ilustraciones del pileipellis del neotipo de *O. canarii* colectado en Indonesia, revisado y asignado por Petersen *et al.* (2008) demuestran tener una estructura de pileipellis muy similar (ver pileipellis de *O. aff. canarii* Figura. 5b). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existen diferencias en el tamaño de los basidios y basidiosporas de nuestro espécimen de *O. aff. canarii* en comparación al neotipo de Indonesia. Por este motivo, y como no hemos revisado material de herbario (tipos) de *O. canarii*, no podemos concluir que nuestro espécimen de Ecuador corresponde a *O. canarii*. Con el fin de evitar mayores conflictos taxonómicos hemos propuesto el nombre *O. aff. canarii*, ya que también hay datos moleculares que apoyan esta sugerencia (Figura. 7) como se discute más adelante.

4.2. Filogenia

La definición molecular de especies se basa en las diferencias genéticas entre las diferentes secuencias obtenidas. Nilsson *et al.* (2008) propuso un umbral del 3% de variabilidad genética para la delimitación de especies fúngicas usando la región ITS-5.8S. En nuestro estudio encontramos que la divergencia mínima entre especies correspondientes al clado 1 y 2 es de 3.71% (Figura. 7) correspondientes para *Oudemansiella platensis* y *O. aff. canarii* respectivamente lo cual supera el umbral antes mencionado. Adicionalmente las máximas variaciones intra-específicas dentro de estos clados es de 1.69% (clado 1) y 2.31% (clado 2), los mismos que pueden incrementar o reducirse si es que analizamos un set más grande de datos ya que la tasa de cambio de nucleótidos de una región de ADN no es universal y puede variar entre diferentes taxones de hongos (Bruns *et al.*, 1991; Nilsson *et al.*, 2008). Para trabajar con tasas de variación más bajas y confirmar certeramente las especies de preferencia se debería hacer análisis filogenéticos multigénicos (Taylor *et al.*, 2000; Bridge *et al.*, 2005). Al analizar estos genes combinando la región ITS-5.8S + LSU parcial (Figura. 6) los clados se mantuvieron separados. Estos datos moleculares para el clado 1 y 2 (Figs. 6 y 7) están sustentados por la separación morfológica según ciertas características como por

ejemplo el pileipellis que difiere entre los especímenes revisados del clado 1 y 2 como se muestra en las figuras 3b y 5b.

A pesar de que hemos podido distinguir morfológica y molecularmente nuestros especímenes, aún sigue en discusión si las especies *O. platensis* y *O. canarii* son distintas. Parte de la problemática es la informalidad (secuencias desde medio ambiente o sin evidencia morfológica) del depósito de secuencias en bases de datos como el GenBank, tal como lo menciona Petersen & Hughes (2010). En estas bases de datos existen varias secuencias que actualmente están identificadas como *O. canarii* y que se agrupan en el clado 1 de nuestra filogenia, el cual incluye una secuencia del epítipo de *O. platensis* colectado en Argentina, GQ892789, y determinado por Petersen *et al.* (2008). Además estas secuencias no son congruentes con la evidencia morfológica y molecular de los especímenes revisados en este estudio y la variación de las secuencias no supera el 3%. Bajo estos antecedentes proponemos los nombres de estas secuencias como dudosos, las hemos marcado como "*Oudemansiella canarii*" y sugerimos al clado 1 como el clado correcto para *Oudemansiella platensis*.

Queda la incertidumbre de establecer si las secuencias de los especímenes del clado 2 corresponden a *Oudemansiella canarii* s.str., porque a pesar de que la morfología del pileipellis de los especímenes colectados en Ecuador coincide con la morfología del neotipo colectado en Indonesia (Petersen *et al.*, 2008), las secuencias con las que se relaciona pertenecen únicamente a especímenes colectados en el nuevo mundo, formando un clado separado al de las secuencias de China y Sri Lanka, sugiriendo que puede existir un tipo de especiación alopátrica a nivel filogenético (Kohn, 2005; Giraud *et al.*, 2008) pero que la similitud en la morfología del espécimen de *O. aff. canarii* de Ecuador en comparación con el neotipo de *O. canarii* puede darse debido a una stasis morfológica (i.e. un estado de ausencia de cambios morfológicos o cambios mínimos poco perceptibles) de estas dos especies (Mueller *et al.*, 2001), a pesar de la presencia de cambios notables a nivel molecular (Wiley, 1978; Wake *et al.*, 1983). Ninguna de estas secuencias se encuentra asociada con alguna morfología publicada hasta el momento. La pregunta ¿el clado 2 corresponde a *O. canarii* s.str.? nos queda aún sin respuesta debido a que otras secuencias de *O. canarii* que forman el clado 3 pertenecen a especímenes colectados en China (AF321476) y Sri Lanka (KR265132) según las referencias dadas en la base de datos GenBank. Sin embargo podría ser probable que las secuencias para los especímenes de estas localidades sean las más adecuadas para la especie *O. canarii*, ya que están más

cercanas al sitio de colección de los especímenes tipo de *Oudemansiella canarii* (Jünghuhn, 1838; Petersen *et al.*, 2008). No obstante, el espécimen de China asociado a la secuencia AF321476 fue reportado como no disponible por Petersen *et al.* (2008) así que su identidad no puede ser confirmada y la de Sri Lanka (KR265132) pertenece a un manuscrito no publicado por lo que su identidad tampoco puede verificarse. Sin embargo no es nada inusual en distintos continentes se encuentren las mismas morfo-especies, pero que estas tengan diferente ubicación en la filogenia, como lo indicado por Cruz *et al.* (2014) para especies de *Tulasnella* (Tulasnellaceae, Basidiomycota). O el caso de *Armillaria mellea* (que pertenece a la misma familia que *Oudemansiella*, Physalacriaceae, Basidiomycota), donde se ha demostrado que las cepas presentes en América del Norte y Europa comparten similitudes en su morfología pero pertenecen a especies biológicas y filogenéticas diferentes (Anderson *et al.*, 1980, 1989).

Nuestros datos son alentadores con respecto de la correlación morfológica y molecular ya que nos permitieron identificar estas dos especies hipotéticas; además contribuimos con un nuevo reporte de *O. aff canarii* para Ecuador, que parecía estar restringido en países centrales y del norte del continente.

CONCLUSIONES

La característica micromorfológica con mayor valor taxonómico dentro del complejo *Oudemansiella platensis-canarii* es la estructura del pileipellis, ya que esta es muy distintiva y permite identificar fácilmente a las dos especies de este complejo.

Existe suficiente distancia entre la máxima variabilidad intra-específica y la mínima divergencia inter-específica entre las secuencias analizadas, manteniendo a nuestras hipotéticas especies filogenéticas dentro del umbral del 3% de delimitación de especies definido por Nilsson *et al.* (2008).

El análisis filogenético multigénico fue congruente con la filogenia de la región ITS-5.8S, aportando a nuestra hipótesis de que los especímenes de *Oudemansiella platensis* difieren filogenéticamente con los de *Oudemansiella aff. canarii*.

La correlación de datos morfológicos y moleculares nos permitió identificar a las especies *Oudemansiella platensis* y *Oudemansiella aff. canarii*, siendo esta última un nuevo registro para Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.B., S.S. BAILEY, and P.J. PUKKILA. 1989. Variation in Ribosomal DNA Among Biological Species of *Armillaria*, a Genus of Root-Infecting Fungi. *Evolution* 43: 1652. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2409381?origin=crossref>.
- ANDERSON, J.B., K. KORHONEN, and R.C. ULLRICH. 1980. Relationships between European and North American biological species of *Armillaria mellea*. *Experimental mycology* 4: 87–95. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801368453>.
- BARONI, T.J., and B. ORTIZ. 2002. New Species of *Oudemansiella* and *Pouzarella* (Basidiomycetes: Agaricales) From Puerto Rico. *Mycotaxon* LXXXII: 269–279.
- BAS, C. 1969. Morphology and subdivision of *Amanita* and a monograph of its section *Lepidella*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 5: 285–573. Available at: <http://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai%3Anaturalis.nl%3A531781> [Accessed September 4, 2015].
- BECK, E., F. MAKESCHIN, F. HAUBRICH, M. RICHTER, J. BENDIX, and C. VALAREZO. 2008. The ecosystem (Reserva Biológica San Francisco). In E. Beck, J. Bendix, I. Kottke, F. Makeschin, and R. Mosandl [eds.], *Gradients in a tropical mountain ecosystem of Ecuador*, 1–14. Ecological studies No. 198. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- BENGTSSON-PALME, J., M. RYBERG, M. HARTMANN, S. BRANCO, Z. WANG, A. GODHE, P. DE WIT, ET AL. 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data M. Bunce [ed.], *Methods in Ecology and Evolution* 4: 1–6. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/2041-210X.12073>.
- BLACKWELL, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426–438. Available at: <http://www.amjbot.org/cgi/doi/10.3732/ajb.1000298>.
- BRIDGE, P.D., B.M. SPOONER, and P.J. ROBERTS. 2005. The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. *Advances in Botanical Research* 42: 33–67.
- BRUNS, T.D., T.J. WHITE, and J.W. TAYLOR. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525–564.
- CLÉMENÇON, H. 1979. Taxonomic structure of the genus *Oudemansiella* (Agaricales). *Sydowia* 32: 74–80.
- CORNER, E.J.H. 1970. Supplement to “A monograph of *Clavaria* and allied genera.” *Beihefte zur Nova Hedwigia* 33: 1–299.
- CRUZ, D., J.P. SUÁREZ, I. KOTTKE, and M. PIEPENBRING. 2014. Cryptic species revealed by

- molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia* 106: 708–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24874921> [Accessed December 23, 2014].
- DOUADY, C.J., F. DELSUC, Y. BOUCHER, W.F. DOOLITTLE, and E.J.P. DOUZERY. 2003. Comparison of Bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Molecular Biology and Evolution* 20: 248–254.
- FRANCO-MOLANO, A.E., R. ALDANA-GÓMEZ, and R.E. HALLING. 2000. Setas de Colombia (Agaricales, Boletales y otros hongos) - Guía de campo. Multimpresos, Medellín, Colombia.
- GARNICA, S., M. WEIß, B. OERTEL, and F. OBERWINKLER. 2003. Phylogenetic relationships of European *Phlegmacium* species (*Cortinarius*, Agaricales). *Mycologia* 95: 1155–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149018>.
- GIRAUD, T., G. REFRÉGIER, M. LE GAC, D.M. DE VIENNE, and M.E. HOOD. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 45: 791–802.
- HAWKSWORTH, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641–655. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1).
- HUELSENBECK, J., and B. RANNALA. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic biology* 53: 904–913.
- HUELSENBECK, J.P., and F. RONQUIST. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17: 754–5. Available at: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bioinformatics/17.8.754>.
- JÜNGHUHN, F.W. 1838. Praemissa in floram cryptogamicam Javae insulae. Batavia.
- KATOH, K., and D.M. STANDLEY. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111–120.
- KOHN, L.M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annual review of phytopathology* 43: 279–308. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16078886>.
- LÆSSØE, T., and J.H. PETERSEN. 2008. Fungi of Ecuador. Available at: <http://www.mycology.com/Ecuador.html> [Accessed January 6, 2016].
- LARGENT, D. 1986. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. Eureka, California: Mad River Press.
- LARGENT, D., D. JOHNSON, and R. WATLING. 1977. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Eureka, California: Mad River Press.
- MONCALVO, J.M., R. VILGALYS, S. A. REDHEAD, J.E. JOHNSON, T.Y. JAMES, M. CATHERINE AIME, V. HOFSTETTER, ET AL. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357–400.

- MUELLER, G.M., Q.X. WU, Y.Q. HUANG, S.Y. GUO, R. ALDANA-GOMEZ, and R. VILGALYS. 2001. Assessing biogeographic relationships between North American and Chinese macrofungi. *In Journal of Biogeography*, 271–281.
- NEI, M., and S. KUMAR. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NEILL, D. 2012. ¿Cuántas especies nativas de plantas vasculares hay en Ecuador? *Revista Amazónica. Ciencia y Tecnología* 1: .
- NILSSON, R.H., E. KRISTIANSSON, M. RYBERG, N. HALLENBERG, and K.H. LARSSON. 2008. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 2008: 193–201.
- O'BRIEN, H.E., J.L. PARRENT, J.A. JACKSON, J. MONCALVO, and R. VILGALYS. 2005. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544–5550. Available at: <http://aem.asm.org.ezproxy.leidenuniv.nl:2048/content/71/9/5544>.
- O'DONNELL, K. 1993. *Fusarium and its near relatives*. *In* D. Reynolds, and J. Taylor [eds.], *The Fungal Holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*, 225–233. CAB International, Wallingford.
- OBBERWINKLER, F. 2012. Evolutionary trends in Basidiomycota. *Stapfia* 96: 45–104. Available at: http://www.researchgate.net/publication/230646485_Evolutionary_trends_in_Basidiomycota/file/d912f502610c7955f5.pdf.
- PEGLER, D.N., and T.W.K. YOUNG. 1986. Classification of *Oudemansiella* (Basidiomycota: Tricholomataceae), with special reference to spore structure. *Transactions of the British Mycological Society* 87: 583–602. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80099-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80099-7).
- PETERSEN, R.H., D.E. DESJARDIN, and D. KRUGER. 2008. Three type specimens designated in *Oudemansiella*. *Fungal Diversity* 32: 81–96. Available at: <Go to ISI>://WOS:000261793600006.
- PETERSEN, R.H., and K.W. HUGHES. 2010. The *Xerula/Oudemansiella* Complex (Agaricales). Nova Hedwigia, Stuttgart, Germany. Available at: http://www.schweizerbart.de/publications/detail/isbn/9783443510596/Nova_Hedwigia_Beiheft_137.
- PIEPENBRING, M. 2008. Reportes nuevos de agaricales para panamá. *Acta Biologica Panamensis* 1: 22–38.
- RUEGGER, M.J.S., S.M.T. TORNISIELO, V.L.R. BONONI, and M. CAPELARI. 2001. CULTIVATION OF THE EDIBLE MUSHROOM *OUDEMANSIELLA CANARII* (JUNGH.) HÖHN. IN LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 211–214. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822001000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- STIELOW, B., Z. BRATEK, A.K.I. ORCZÁN, S. RUDNOY, G. HENSEL, P. HOFFMANN, H.-P. KLENK, and M. GÖKER. 2011. Species Delimitation in Taxonomically Difficult Fungi: The Case of *Hymenogaster* A. Litvintseva [ed.]. *PLoS ONE* 6: e15614. Available at:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015614>.

- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI, and S. KUMAR. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- TAYLOR, J.W., D.J. JACOBSON, S. KROKEN, T. KASUGA, D.M. GEISER, D.S. HIBBETT, and M.C. FISHER. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal genetics and biology : FG & B* 31: 21–32.
- WAKE, D.B., G. ROTH, and M.H. WAKE. 1983. On the problem of stasis in organismal evolution. *Journal of Theoretical Biology* 101: 211–224.
- WHELAN, S., P. LIÒ, and N. GOLDMAN. 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in Genetics* 17: 262–272. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952501022727>.
- WHITE, T., T. BRUNS, S. LEE, and J. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, H. Gelfand, J. Sninsky, and T. White [eds.], *PCR-protocols and applications: a laboratory manual*, 315–322. New York: Academic Press.
- WILEY, E.O. 1978. The evolutionary species concept. *Systematic Zoology* 27: 17–26.
- YANG, Z.-L., L.-F. ZHANG, G.M. MUELLER, G.W. KOST, and K.-H. REXER. 2009. A new systematic arrangement of the genus *Oudemansiella* s. str. (Physalacriaceae, Agaricales). *Mycosystema* 28: 1–13.

ANEXOS

Anexo 1. Listado de especímenes revisados en este estudio.

Número Herbario	Especie	Fecha	País	Provincia	Cantón	Localidad	Paraje
HUTPL(F)-145	<i>Oudemansiella platensis</i>	8/2/2000	Ecuador	Zamora Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-497	<i>Oudemansiella aff. canarii</i>	8/2/2013	Ecuador	Napo	Tena		Liana Lodge
HUTPL(F)-583	<i>Oudemansiella platensis</i>	4/3/2014	Ecuador	Zamora Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-593	<i>Oudemansiella platensis</i>	4/3/2014	Ecuador	Zamora Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-617	<i>Oudemansiella platensis</i>	4/24/2014	Ecuador	Zamora Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-688	<i>Oudemansiella platensis</i>	7/3/2014	Ecuador	Zamora Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-729	<i>Oudemansiella platensis</i>	8/6/2014	Ecuador	Zamora Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-901	<i>Oudemansiella platensis</i>	2/6/2015	Ecuador	Zamora-Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco
HUTPL(F)-943	<i>Oudemansiella platensis</i>	2/12/2015	Ecuador	Zamora-Chinchipe	Zamora	Zamora	La Pituca
HUTPL(F)-1495	<i>Oudemansiella platensis</i>	6/4/2015	Ecuador	Loja	Loja	Zamora Huayco	Quebrada Pizarros
HUTPL(F)-1496	<i>Oudemansiella platensis</i>	6/4/2015	Ecuador	Loja	Loja	Zamora Huayco	Quebrada Pizarros
HUTPL(F)-1614	<i>Oudemansiella platensis</i>	7/7/2015	Ecuador	Zamora-Chinchipe	Zamora	El Tambo	Reserva Biológica San Francisco