



Universidad Técnica Particular de Loja.

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.

“Caracterización morfo–molecular de hongos corticioides desde la colección micológica en el herbario HUTPL”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORES: Granda Aguirre, Sergio Patricio

DIRECTOR: Cruz Sarmiento Darío Javier, Bqf.

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

BQF.

Darío Javier Cruz Sarmiento.

TUTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Caracterización morfo–molecular de hongos corticioides desde la colección micológica en el herbario HUTPL” realizado por Sergio Patricio Granda Aguirre, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 18 de octubre de 2013.

Bqf. Darío Javier Cruz Sarmiento.

DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

C.I:

AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

“Yo, SERGIO PATRICIO GRANDA AGUIRRE declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: “caracterización morfo–molecular de hongos corticioides desde la colección micológica en el herbario hutpl” de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo DARÍO JAVIER CRUZ SARMIENTO director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y 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. 67 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 investigadores, 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”

Sergio Patricio Granda Aguirre.

AUTOR

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios, por haberme dado luz y fortaleza para alcanzar mis metas.

A mis padres, Sergio y Olga, por su sacrificio y constancia en forjar mi personalidad y por brindarme siempre todo su amor y comprensión.

A mi hermanita Ana Paula, por su apoyo incondicional y por ser la persona que ha iluminado mi vida, que ha sido mi principal motivación en todos estos años de estudio.

A mis maestros, por sus amplios conocimientos impartidos; y a mis compañeros, por su amistad, respeto y gratitud.

Sergio

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento, al Bqf. Darío Javier Cruz Sarmiento, Tutor del presente trabajo investigativo, ya que gracias a su sabia dirección y vocación educativa, hizo posible la culminación de ésta mi tesis.

A todos y a cada uno de los docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Técnica Particular de Loja, ya que con sus conocimientos coadyuvaron todos a mi formación, hasta la culminación de mis estudios.

Al Departamento de Biología, por permitirme realizar mi trabajo investigativo y por darme la oportunidad de formarme y prepararme profesionalmente.

Sergio Patricio Granda Aguirre

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
I Capítulo	
ASPECTOS GENERALES.	6
Morfología de los hongos.	6
Clasificación molecular de los hongos.	7
Importancia de los hongos.	7
Identificación de hongos	8
Clásica	8
Hongos de herbario	8
Molecular	9
DNA mitocondrial	9
DNA ribosomal	9
II Capítulo	
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Especímenes examinados	11
Morfología e identificación taxonómica	11
DNA, PCR y Secuenciación	11
Extracción de DNA	11
Amplificación de DNA	11
PCR DIRECTA “Kit Phire® Plant Direct PCR”	11
Electroforesis	11

Análisis e Identificación molecular	12
III Capítulo	
RESULTADOS	14
Taxonomía clásica	14
Auriculariales	
<i>Basiodendron caesiocinereum</i>	14
<i>Basiodendron deminutum</i>	15
<i>Basiodendron radians</i>	15
<i>Exidiopsis fugacissima</i>	16
<i>Heterochaetella brachyspora</i> (actualmente <i>Stypella dubia</i>)	16
<i>Oliveonia fibrillosa</i>	17
Atractiellales	
<i>Helicogloea</i> cf. <i>globosa</i>	19
Cantharellales	
<i>Ceratobasidium stridii</i>	19
<i>Tulasnella</i> cf. <i>asymmetrica</i>	20
Poliporales	
<i>Hyphoderma puberum</i>	20
<i>Sistotrema confluens</i>	21
<i>Scopuloides hydroides</i>	21

Taxonomía Molecular	24
Discusión	27
IV Capítulo	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
Conclusiones	30
Recomendaciones	30
V Capítulo	
1. BIBLIOGRAFÍA	32
VI Capítulo	
2. ANEXOS	37
Tabla 1	37
Morfortipos Indeterminados	39

RESUMEN

En el Ecuador podrían existir aproximadamente 100.000 especies de hongos macroscópicos, fácilmente identificables. Otros hongos son los corticioides, poco investigados por su dificultad de identificación en campo. En esta investigación se analizaron 66 muestras de hongos corticioides-resupinados almacenados en el herbario HUTPL. Para su identificación morfológica se observaron estructuras como hifas, cistidias, basidias, esterigmas, esporas, entre otras aplicando microscopía de luz. Se utilizaron claves taxonómicas para determinar el orden, género o especie de los especímenes. Para identificar molecularmente amplificamos la región ITS y LSU parcial de DNArn mediante los primers universales para eucariotas ITS1/NL4. Morfológicamente se determinaron varias especies en órdenes, como por ejemplo Auriculariales incluyendo *Basidiodendron caesiocinereum*, *Basidiodendron deminutum*, *Basidiodendron radians*, *Exidiopsis fugassicima*, *Heterochaetella brachyspora* (actualmente *Stypella dubia*), y *Oliveonia fibrillosa*; Atractiellales incluyendo *Helicogloea* cf. *Globosa*; Cantharellales con *Ceratobasidium stridii* y *Tulasnella* cf. *asymmetrica* y el orden Poliporales con *Hyphoderma meruliaceae*, *Sistotrema confluens*, *Scopuloides hydroides*. Molecularmente se obtuvieron 30 secuencias parciales para LSU, que filogenéticamente soportan la morfología a nivel de orden y género. Varias morfoespecies no se identificaron morfológicamente por desconocimiento de los grupos.

Palabras clave: hongos corticioides, ITS, LSU, morfoespecies, filogenia.

ABSTRACT

Ecuador has approximately 100,000 species of fungi, many researches have been aimed at striking macroscopic fungal structures and identifiable to the naked eye and other fungi with microscopic structures as corticioides remain little investigated because of the difficulty of identification. In this research were analyzed 66 corticioides fungal specimens deposited in the herbarium HUTPL. For morphological identification was observed microscopic structures as hyphae, cistidias, basidias, sterigmata, spores, including using light microscopy. Morphologically taxonomic keys were used to determine order, genus or species, whereas for molecular identification ITS regions and partial LSU DNArn were used. PCR products were amplified with universal primer combination for eukaryotes ITS1/NL4. A morphological identification of several specimens was carried out, including in Auriculariales *Basiodendron caesiocinereum*, *Basiodendron deminutum*, *Basiodendron radians*, *Exidiopsis fungassicima*, *Heterochaetella brachyspora* (actually *Stypella dubia*), *Oliveonia fibrillosa*; Atractiellales with *Helicogloea* cf. *globosa*; Cantharellales with *Ceratobasidium stridii* and *Tulasnella* cf. *asymmetrica* and order Poliporales with *Hyphoderma meruliaceae*, *Sistotrema confluens*, *Scopuloides hydroides*. We obtained 30 sequences of the partial LSU for phylogenetic identification of order and genera.. Unfortunately, several morphospecies were not identified due to ignorance of diagnostic characters for morphological identification.

Keywords: corticioid fungi, ITS, partial LSU, morphospecies, phylogeny.

INTRODUCCIÓN

El reino de los hongos es muy diverso y aún desconocido, especialmente en los trópicos (Hawksworth, 1991), demostrándose una presencia incuantificable de hongos en ecosistemas pequeños (Piepenbring et al. 2012). Se ha estimado una diversidad de hongos existentes con aproximadamente 1.5 millones de especies, basados en la diversidad de plantas vasculares que posee un territorio (Hawksworth, 2001). El Ecuador es considerado un país rico especialmente en plantas vasculares (Jørgensen, 1999), estimándose una relación entre hongos y plantas de 6:1 y un cálculo aproximado de 100.000 especies de hongos, de los cuales solamente 5.000 especies son conocidas (Freire, 2004).

Los hongos cumplen roles de interacción como saprófito, parásitos, mutualistas o simbióticos en diversos ecosistemas (Hawksworth, 1991). Muchos estudios sobre la diversidad de hongos en el Ecuador han sido especialmente dirigidos a la micobiota con cuerpos fructíferos grandes y visibles por sus facilidades de buscar, encontrar y reconocer en el campo (Læssøe & Petersen 2008). Otros hongos poco estudiados pero con igual importancia son los hongos corticioides (*sensu lato*) que no presentan fructificación poroide o con laminillas, pero tienen otras configuraciones como por ejemplo lisas, tuberculado, venosa, verrugosa, espinosa o plegado (Binder et al. 2005; Larsson, 2007), creciendo resupinadamente, los cuales han sido relacionados con la descomposición de materia orgánica en diferentes ecosistemas (Batallas, 2008).

Estudios previos en un bosque al montano de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF) y bosques cercanos en la zona sur del Ecuador, encontraron con ayuda de microscopía electrónica que miembros de los órdenes "Tulasnellales"-Cantharellales, Sebaciniales, y Atractiellales, como importantes micobiontes formando micorrizas en orquídeas terrestre y epífitas (Suarez et al. 2006, 2008; Kottke, 2003). Sin embargo solo se ha reportado morfológica y molecularmente especímenes del género *Tulasnella* (Cruz et al. 2011). Actualmente la combinación de datos morfológicos y moleculares se detallan como una herramienta fundamental en la delimitación de especies, especialmente en grupos complejos de hongos como los corticioides u otros hongos (Stielow et al. 2011). Principalmente se usan varias regiones de DNA nuclear ribosomal (DNArn) como por ejemplo LSU o ITS-5.8S la cual es considerada útil para barcoding universal de hongos (Schoch et al. 2012).

En la actualidad el Ecuador registra pocos datos con información de hongos, como su distribución o interacciones que cumplen en el medio ambiente. Læssøe & Petersen (2008) en

la página informativa denominada MycoKey™ (<http://www.mycoketm.com/Ecuador>) muestran varias especies de hongos del Ecuador, demostrando una alta diversidad de la microbiota en nuestro país.

El principal objetivo de nuestro trabajo es describir y reportar la diversidad de hongos corticioides encontrados saprotróficamente a través de la información morfológica y molecular. Para lo cual se analizarán 66 muestras depositadas en el Herbario HUTPL, las cuales fueron colectadas principalmente en la región sur del Ecuador, incluyendo también algunos especímenes colectados en Panamá y Alemania.

CAPÍTULO

I

ASPECTOS GENERALES

Morfología de los hongos

Los hongos según su tipo de reproducción pueden ser sexuales o asexuales, el hongo con multiplicación asexual se denomina anamorfo y con reproducción sexuada se denomina teleomorfo. Aunque en algunas especies coexisten ambas formas en el mismo organismo denominándose holomorfo (Gams, 1995).

La unidad estructural de los hongos son las hifas que se anastomosan unas con otras por medio de septos simples o fibulados formando el micelio y este micelio va a determinar sus estructuras, cuerpo fructífero y vegetativo para su determinación morfológica. El cuerpo fructífero o himenio es el que se encarga de formar los órganos reproductores como basidias, esterigmas y esporas para su reproducción sexual (FIG. 1). También se identifica a las cistidias que tiene una función de protección o espaciador entre basidias, sin embargo esta función no es muy clara (Crespo, 2008).

Podemos identificar morfológicamente mediante la ayuda de microscopía de luz estructuras como basidias con o sin septo longitudinal, presencia o ausencia de cistidias, número y tamaño de los esterigmas, y número, forma y tamaño de las esporas y así determinar su orden, género y especie mediante el uso de claves taxonómicas (Contreras, 2012).

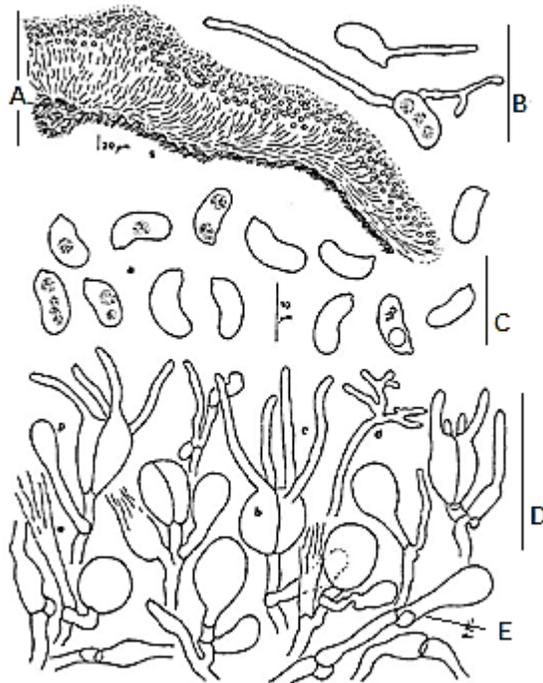


FIG. 1: Heterobasidiomycete *Myxarium atratum*. A) corte transversal del micelio, B) esporas con pseudoesterigmas, C) esporas, D) basidias, E) hifas con presencia de fíbulas. (Liuba, 2000).

Clasificación molecular de los hongos

Hibbet et al. (2007) han planteado una clasificación molecular, la cual interpreta análisis filogenéticos de las secuencias de DNA de los hongos determinando así un lineamiento jerárquico del reino Fungi, con un subreino Dikarya, siete Phylum, 10 Subphylum, 35 Clase, 12 Subclase, y 103 órdenes, 484 familias, 4.979 géneros y unas 80.000 especies descritas de acuerdo con el Diccionario de Hongos (Kirk et al. 2008). Los phylum Ascomycota y Basidiomycota según Hibbet et al. (2007) se encuentran clasificados en el subreino Dikarya (FIG. 2).

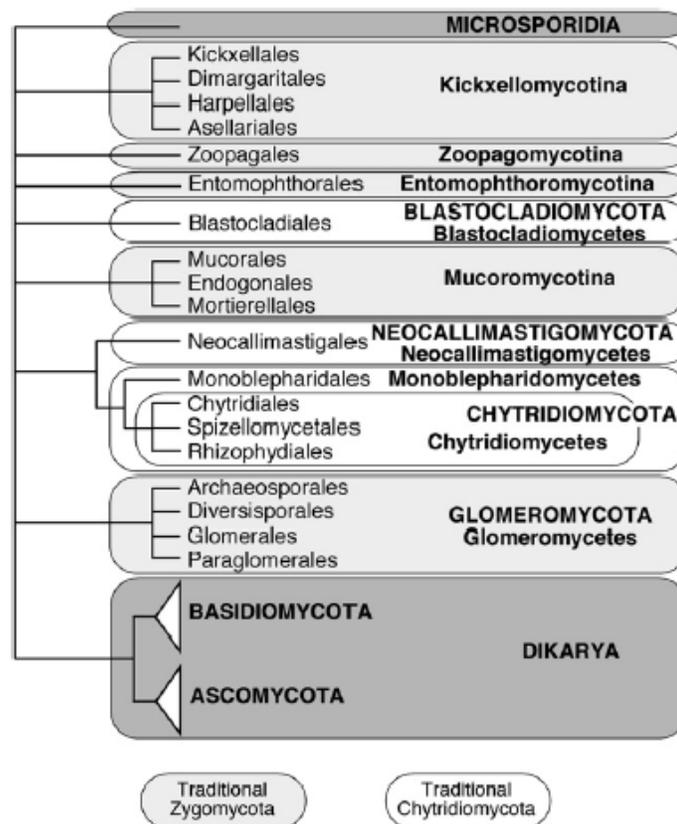


FIG. 2: Clasificación filogenética de los hongos tomado desde Hibbet et al. (2007).

Importancia de los hongos

Ecológica: Interacción simbiótica que cumple en el ecosistema en la que el hongo tiene la capacidad de poder asociarse con otros organismos de forma simbiótica para poder colonizar medios y obtener unos beneficios que por ellos mismo serían incapaces de conseguir. Las principales y más conocidas simbiosis fúngicas son: la primera es la de formar junto con algas

los líquenes, y la segunda que forman junto con raíces de plantas vasculares para formar micorrizas. Los hongos corticioides resupinados por su dificultad de identificación, casi imperceptibles a simple vista y su escasa información científica, aún se conoce muy poco sobre su distribución e interacciones que cumplen en el ambiente. Uno de sus roles es como saprofitos, es decir descomponedores de materia orgánica (Cruz et al. 2011; Ordynets, 2012) por tanto interviniendo en la mineralización de los restos vegetales o materia orgánica muerta o en descomposición para que puedan posteriormente formar parte del humus.

Industrial: Los hongos son prometedores en el campo de la industria agrícola, donde se ha determinado que algunos hongos poseen características insecticidas, remplazando a muchos químicos (Martin et al. 2000). Biotecnológicamente ya que hay hongos que pueden ayudar en proceso de fermentación como por ejemplo *Saccharomyces* y *Aspergillus*. *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza en la elaboración de vino, cerveza, etc. (Folch, 2004).

Medicinal: Por ejemplo los hongos en la medicina son muy aplicados ya que desde algunos de ellos se elaboran de antibióticos y antifúngicos, como por ejemplo *Penicillium notatum*, del cual se obtiene la penicilina. Existen también especies con posible actividad anticancerígenas y antitumorales tales como *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* y *Ganoderma applanatum* (Lopez, 2008).

Identificación de hongos

Un herbario micológico provee material de referencia para la correcta identificación de hongos, constituye un recurso imprescindible para la micología sistemática. El herbario provee material de referencia para la correcta identificación y determinación de hongos en general, para estudios de revisión de taxa, de distribución geográfica, de rango de hospederos, de variaciones estacionales y de estructura de poblaciones, siendo especialmente importante para la preservación de material, de esta manera se garantiza la futura revisión de las identificaciones realizadas y se puede realizar nuevas investigaciones (Ninoska, 1982).

Identificación clásica: La utilización de las claves taxonómicas o taxonomía clásica se basa en la determinación de formas, dimensiones y número de las estructuras del cuerpo fructífero (Delgado, 1997), y relacionarlas con claves taxonómicas de investigaciones anteriores permitiendo así definir géneros con una mayor exactitud y correlación, como se ha hecho en

estudios previos con hongos del género *Tulasnella* (Cruz et al. 2011). Por tal razón es indispensable una determinación morfológica ayudada por estas herramientas clásicas de identificación, sin embargo está debe ser apoyada por otras evidencias como lo son los datos moleculares (Franco, 2005).

Moleculares: Existen varios marcadores moleculares que se aplican en la identificación de hongos mediados por la técnica de PCR (Ayra et al. 2001) la cual permite amplificar fragmentos específicos de DNA en una serie de repeticiones de ciclos a temperaturas determinadas (Costa, 2004).

Uno de los marcadores moleculares ampliamente usados en la identificación de hongos es el DNA mitocondrial (mtDNA), es muy importante debido a que posee regiones muy conservadas y por esto es ampliamente utilizado en la determinación taxonómica y filogenética (Calle, 2005). La región del rDNA incluye el gen 18S subunidad menor (SSU), como espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S la subunidad larga (LSU) (Solé, 2002). Ampliamente utilizado para la determinación de árboles filogenéticos, por lo que se encuentran ampliamente conservadas estas regiones entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles (Yang et al. 2005).

Capítulo

II

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes examinados

Las muestras se colectaron principalmente por Juan Pablo Suárez y Darío Cruz, 45 muestras en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), Zamora-Chinchipec, Ecuador y 9 muestras en el bosque ubicado en el Km. 24 vía a Zamora-Chinchipec; 10 muestras en Panamá y 2 muestras en Alemania (colector Darío Cruz).

Morfología e Identificación taxonómica

Las estructuras morfológicas representativas de los hongos corticioides, fueron evaluadas macroscópicamente, donde se observa la coloración, textura, reflectancia de la fructificación. Para las preparaciones microscópicas se efectuaron cortes finos de las fructificaciones, luego se las tiñeron con Phloxine al 1% y aclarado con KOH al 10% observando y tomando medidas de estructuras características como hifas, cistidias, basidias, esterigmas, esporas entre otras. Con los datos tomados se efectuaron ilustraciones detalladas de cada uno de los especímenes, para definir morfotipos y luego compararlos hasta los niveles ordenes, género y especies con claves taxonómicas de diferentes fuentes bibliográficas.

DNA, PCR, y Secuenciación

Para la extracción y amplificación de DNA se extrajo una pequeña porción de no más de 5 mm² de micelio que forma la fructificación del hongo y luego se aplicó el protocolo del fabricante del kit Phire® Plant Direct PCR diluyendo la muestra en 20 µl del buffer proporcionado en el mismo kit.

La PCR se la efectuó directamente con el mix del Kit Phire® Plant Direct PCR incluyendo la polimerasa Phire-Hot Strat II DNA polimerasa. Los primers universales ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' (White et. al. 1990), NL4 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3' (White et. al. 1990), fueron aplicados con la finalidad de amplificar la región ITS y LSU parcial. Se usó un control positivo DNA desde un cultivo puro de *Tulasnella* sp. proporcionado por Darío Cruz.

Las condiciones de PCR para 20 µl de reacción son las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C por 5 minutos un ciclo; 42 ciclos de touch down; 40 ciclos de desnaturalización a 98°C por 5s, anillamiento por 5 s a 62°C y extensión a 72°C por 20s; y un ciclo con una extensión final a 72°C por 1 min para finalizar la PCR.

Los resultados de la PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (agar en solución 1X de Gel Red (Biotium), como lo dice el procedimiento del fabricante). Se tomó 3 µl de producto de PCR más 2 µl de azul de bromofenol y se corrió frente a 1.5 µl de marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen) en buffer de corrida TBE 1X (Trisborato, EDTA). Las condiciones de corrida de electroforesis fueron 28 V, 350 mA durante 20 minutos. Los productos positivos fueron purificados por el kit QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Quiagen) y enviados a secuenciar a Macrogen (Seoul-Korea). Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa CodonCode Aligner, versión 1.2.4 (CodonCode Corp.)

Análisis e identificación molecular

Previo a los análisis filogenéticos, las secuencias obtenidas en este estudio se compararon en una búsqueda rápida usando BLAST con la base de datos NCBI- GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Por lo que son secuencias de varios géneros y grupos se utilizó únicamente la región parcial conservada D1/D2 para LSU. Las secuencias obtenidas en este trabajo se alinearon con las secuencias obtenidas en GenBank con el programa MAFFT v5.667 (Kato et al. 2002) mediante la estrategia G-INS-i. El árbol filogenético presentado en este estudio es un Maximum Likelihood (ML) (Stamatakis, 2006) con 1000 réplicas de bootstrap (BS) (Felsenstein, 1985) generado en el programa MEGA5 (Tamura et al. 2011).

Capítulo

III

RESULTADOS

Taxonomía clásica

Los 66 especímenes analizados del Herbario HUTPL se los clasificó morfológicamente en varios morfotipos correspondientes a varias especies en diferentes géneros y ordenes: 21 especímenes corresponden a Auriculariales con las especies *Basidiodendron caesiocinereum*, *Basidiodendron deminutum*, *Basidiodendron radians*, *Exidiopsis fungassicima*, *Heterochaetella brachyspora* actualmente *Stypella dubia*, *Oliveonia fibrillosa*; Atractiellales con la especie *Helicogloea* cf. *globosa*; Cantharellales-Tulasnellales incluyendo las especies *Ceratobasidium stridii* y *Tulasnella* cf. *asymmetrica* y Poliporales con las especies *Hyphoderma meruliaceae*, *Sistotrema confluens*, *Scopuloides hydroides* (FIGS. 3 y 4).

18 morfotipos correspondientes a 18 especímenes fueron ilustrados pero no se determinó el grupo taxonómico al que pertenecen (FIG. 6). 27 especímenes fueron descartados ya que no se pudieron ilustrar ni describir debido a sus estructuras degradadas o poco desarrolladas (Tabla 1).

Orden Auriculariales

Basidiodendron caesiocinereum (Höhn. & Litsch.) Luck-Allen, Can. J. Bot. 41: 1036 (1963)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta un manto de coloración blanquecina, cremosa, reflectante a la luz, perceptibles a simple vista, película algodonosa marrón claro vista al estereoscopio.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: De finas a gruesas ramificadas sinuosas, condensadas en dirección a la fructificación con presencia de septos con fíbulas, 1.5-2.5(3) μm de diámetro. Cistidias: Grandes gruesas de forma irregular septadas con fíbulas en su parte basal proyectados de las hifas ubicándose paralelamente al basidio, redondeadas en su parte distal y su diámetro de 22-23x5-7 μm . Basidias: Globosas grandes en algunas ocasiones clavadas a subglobosas irregulares con septos fibulados en su parte basal, (16)19-22x(5)6-8 μm . Esterigmas: En un número de 4, cónicos pequeños afinados con punta redondeada de 4-5x1.5-2 μm . Esporas: Elipsoidal a lacrimoide, con poro germinativo de 7-8x(4)5-6 μm (FIG. 3a).

Especímenes examinados: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 235; DC 276; DC 47; DC 194.

Ecología: corticioide resupinado, saprofito descomponiendo madera muerta.

Basidiodendron deminutum (Bourdot) Luck-Allen, Can. J. Bot. 41: 1041 (1963)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen a simple vista se presenta con un micelio de coloración blanquecina, al estereoscopio el basidioma es reflectante a la luz.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas y tortuosas, ramificadas constantemente transversal a la fructificación con presencia de septos simples sin fíbulas, 1-2(2.5) μm de diámetro. Cistidias: grandes gruesas de forma irregular con septos simples proyectados de las hifas ubicándose paralelamente al basidio, redondeadas en su parte distal y su diámetro de (23)24-27(30)x3-5 μm . Basidias: se presentan globosas a subglobosas, transversalmente septadas, septos basales simples, (9)10-12x7-9 μm de diámetro. Esterigmas: En un número de 4, flexuosos y alargados de (5)8-9x1-2 μm . Esporas: amigadaliformes, con poro germinativo basal en forma de pepita, observándose también la presencia de pseudoesterigma, diámetro de (3)4-8x2-4(5) μm . (FIG. 3b).

Especímenes examinados: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 233 y 92,

Ecología: Saprofitos de madera.

Basidiodendron radians (Rick) P. Roberts, Kew Bull. 56(1): 170 (2001)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta a simple vista un micelio de coloración blanquecino-grisácea, reflectante a la luz, al estereoscopio la fructificación se presenta algodonosa blanquecina.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas condensadas muy ramificadas y repetidamente articuladas y anastomosadas a los cuerpos fructíferos mediante septos fibulados, 1.5-2 μm . Cistidias: Grandes globosas irregulares a subglobosas con septo basal fibulado (30)32-34x(8)9-10 μm . Basidias: Transversalmente septadas globosas esféricas grandes, septos fibulados basalmente 15(17)x(14)15(16) μm . Esterigmas: En un número de 4, Grandes alargadas y cilíndricas sinuosas de 8-9(15) x(3)4(5) μm . Esporas: grandes de forma lacrimoide-citriforme con poro germinativo apical y presencia de pseudoesterigmas, 10x7-8(10) μm . (FIG. 3c).

Espécimen examinado: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 29.

Ecología: Hongo saprofito descomponiendo madera.

Exidiopsis fugacissima (Bourdot & Galzin) Sacc. & Trotter, Syll. fung. (Abellini) 21: 452 (1912)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen es como una película grasosa blanquecino-grisácea de 3-5 cm de diámetro, al estereoscopio dicho micelio se presenta como una fructificación grasosa con puntos blanquecinos, reflectante a la luz.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas y tortuosas, constantemente septadas y fibuladas, (1)1.5-2.5(3) μm de diámetro. Cistidias: ausentes. Basidias: transversalmente septadas, constantemente clavadas, algunas veces se presentan globosas a subglobosas, (10)12-15x8-9 μm . Esterigmas: En un número de 4, alargadas y cilíndricas de (6)10-13(14)x1.5-2 μm . Esporas: amigadaliformes, subglobosas con terminación en punta en forma de pepita. Paredes finas sin ornamentaciones, 8-9x4-5 μm . (FIG. 3d).

Especímenes examinados: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 23, Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco DC 44, Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco DC 52.

Ecología: corticioide resupinado, saprofito descomponiendo madera muerta.

Heterochaetella brachyspora Luck-Allen, Can. J. Bot. 38: 566 (1960)

Actualmente ***Stypella dubia*** (Bourdot & Galzin) P. Roberts, Mycotaxon 69: 216 (1998)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta una fructificación de coloración blanco violáceo a simple vista al estereoscopio se observa una película amarillento blanquecina con prolongaciones puntiagudas.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: Finas sinuosas, ramificadas condensadas en paralelo a la fructificación sin presencia de fíbulas septos simples, 1,5-2.5 μm de diámetro. Cistidias: grandes irregularmente cilíndricas ubicándose una junto a la otra condensándose formando una estructura característica su diámetro de 100-90x7-3 μm . Basidias: septadas transversalmente se presentan globosas a subglobosas, 10x9-7 μm . Esterigmas: En un número de 4, flexuosos muy alargados cilíndricas de 107x4 μm . Esporas: amigaloide-elipsoidal, con

poro germinativo apical dimensiones de 9-7x5-4 μm y presencia de pseudoesterigmas (FIG. 3e).

Especímenes examinados: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 280 (b); PANAMÁ DC 209.

Ecología: corticioide resupinado, saprofito descomponiendo madera muerta.

Oliveonia fibrillosa (Burt) Donk, Fungus, Wageningen 28: 20 (1958)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta una fructificación de coloración blanquecina grasosa, reflectante a la luz, perceptibles a simple vista, al estereoscopio se observa el hongo dispuesto como una película blanquecina cremosa.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas bifurcadas transversalmente con presencia de fíbulas, 2.5-4 μm de diámetro. Cistidias: finas tortuosas con septos fibulados en su parte basal su diámetro de 20-25x3-3.5 μm . Basidias: septadas transversalmente se presentan globosas a subglobosas, 20-25x3.5-5 μm . Esterigmas: finas alargadas en un número de cuatro con dimensiones de 5x1-2 μm . Esporas: amigdaloides, con poro germinativo de (5)6-7x2.5-3 μm . (FIG. 3f).

Especímenes examinados: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 261.

Ecología: corticioide resupinado, saprofito descomponiendo madera muerta.

FIG. 3

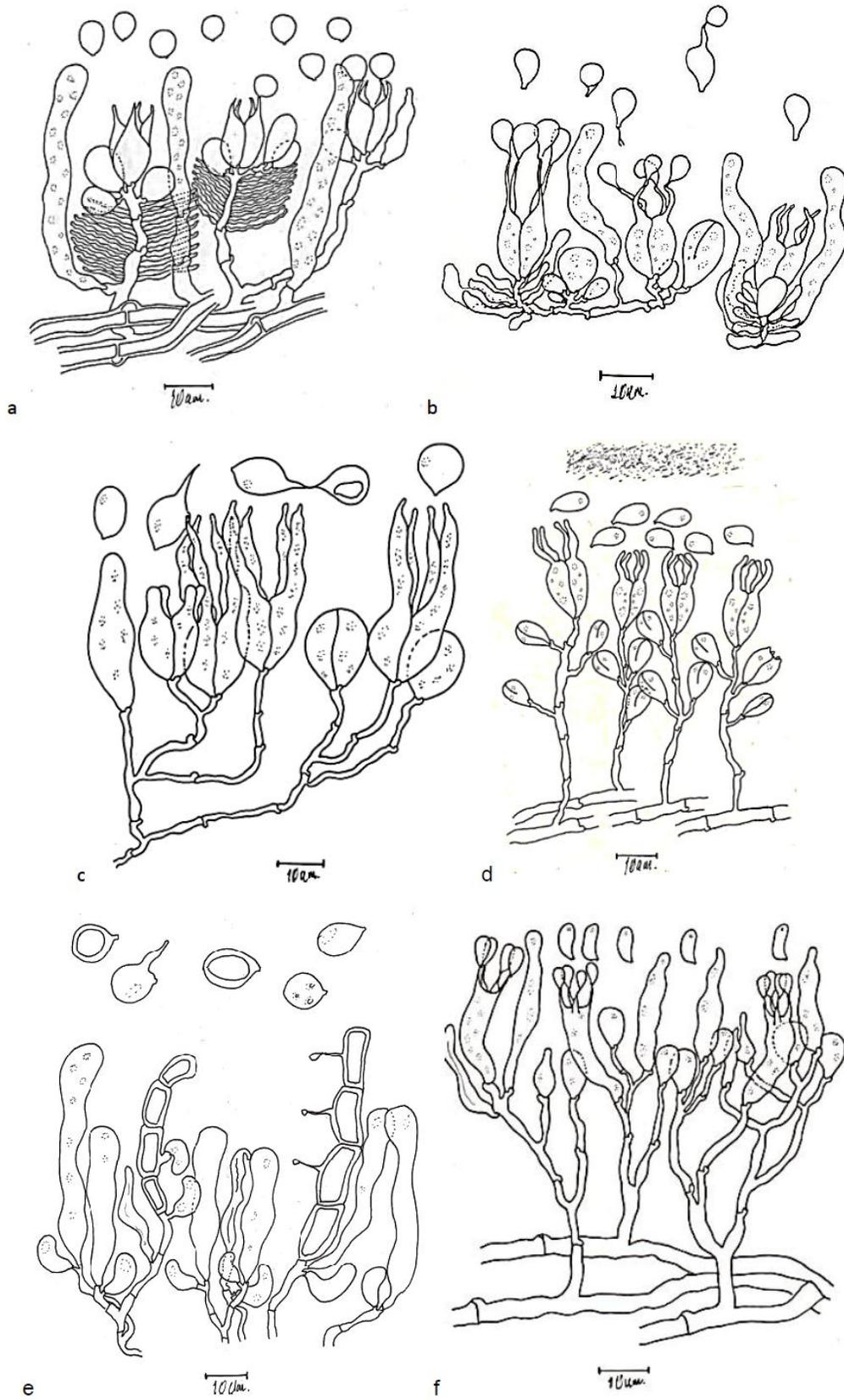


FIG. 3a-f: Ilustración representativa de los especímenes correspondientes a cada especie incluyendo estructuras de desarrollo como hifas con o sin fíbulas, basidias, cistidias presentes o ausentes, esterigmas y basidiosporas. **Auriculariales:** a) *Basiodendron caesiocinereum*, espécimen DC 47. b) *Basiodendron deminutum*, espécimen 92. c) *Basiodendron radians*, espécimen DC 29. d) *Exidiopsis fungasscima*, espécimen DC 52. e) *Heterochaetella brachyspora* (actualmente *Stypella dubia*), espécimen DC 209. f) *Oliveonia fibrillosa*, espécimen DC 261. Acrónimo DC se refiere al nombre del colector Darío Cruz.

Orden Atractiellales

Helicogloea cf. globosa Chee J. Chen & Oberw., Mycotaxon 76: 280 (2000)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen es como una película grasosa de color blanquecino que cubre casi toda la muestra, al estereoscopio dicho micelio se presenta como una fructificación grasosa reflectante a la luz.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas bifurcadas, constantemente septadas y sin fíbulas, (2)2.5-3 μm de diámetro. Cistidias: grandes alargadas irregulares 45-48x6-7 μm , basidias septadas formando cuatro basalmente con septos simples con sus medidas 45x6-7 μm . Esterigmas: En un número de 4, alargadas de 6x1.5-2 μm . Esporas: subglobosas a manera de bolsitas con dimensiones de 11-13x9 μm . (FIG. 4a).

Especímenes examinados: PANAMÁ, David; Chiriquí, sobre madera en descomposición DC 207.

Ecología: corticioide resupinado, saprofito descomponiendo madera muerta.

Orden Cantharellales-Tulasnellales

Ceratobasidium stridii J. Erikss. & Ryvarden, Cortic. N. Eur., 2 Aleurodiscus-Confertobasidium (Oslo): 227 (1973)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta un manto de coloración blanquecina cremosa, reflectante a la luz, perceptibles a simple vista, al estereoscopio el micelio se observa como una película blanquecina cerosa.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas constantemente septadas simples bifurcadas, 2-2.5 μm de diámetro. Cistidias: irregulares colapsadas con septo simple basal y su

diámetro de 28-30x2.5-3 µm. Basidias: globosas constantemente clavada sin septo transversal basalmente con septo simple, 10-12(15)x(5)6-7(8) µm. Esterigmas: En un número de 4, finas alargados de 5-7x2.5-3 µm. Esporas: cilíndrico-elipsoidales, con poro germinativo de 8-9x4-5 µm. (FIG. 4b).

Especímenes examinados: ECUADOR: Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, sobre madera en descomposición DC 280 (a).

Ecología: corticioide resupinado, saprofítico descomponiendo madera muerta.

Tulasnella cf. asymmetrica Warcup & P.H.B. Talbot, New Phytol. 66: 637 (1967)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen es como una película grasosa de color marrón casi imperceptible, al estereoscopio dicho micelio se presenta como una fructificación grasosa verdosa, reflectante a la luz.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas y tortuosas, constantemente septadas dispuestas transversalmente y sin presencia de fíbulas, 1.5-2 µm de diámetro. Cistidias: ausentes. Basidias: ovaladas y oblongas, ocasionalmente clavadas, 8-10x5-7 µm. Esterigmas: En un número de 4, alargadas en forma de huso con dimensiones 10x2.5-1.5 µm. Esporas: esféricas, subglobosas con terminación en punta en forma de pepita. Paredes finas sin ornamentaciones, 5x4-5 µm. (FIG. 4f).

Especímenes examinados: ECUADOR: Bosque, Kilometro 24 vía a Zamora Chinchipe, sobre madera en descomposición DC 182.

Ecología: corticioide resupinado, saprofítico descomponiendo madera muerta.

Orden Poliporales

Hyphoderma puberum (Fr.) Wallr, Fl. crypt. Germ. (Norimbergae) 2: 576 (1833)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta una película de coloración blanquecina cremosa, perceptibles a simple vista, al estereoscopio se observa un micelio con brotes blanquecinos.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: finas constantemente septadas sin fíbulas bifurcadas dispuestas perpendicularmente a la fructificación, 1-1.5 µm de diámetro. Cistidias: muy grandes cilíndrico irregulares con presencia de estructuras a manera de doble membrana

80-85x3-4(5) μm . Basidias: cilíndrico irregulares con su parte distal globosa, (10)15-17x3-5 μm . Esterigmas: En un número de 4, finas cortas de 3.5-4x1 μm . Esporas: lacrimoides, con poro germinativo de 2x3-3.5 μm . (FIG. 4c).

Especímenes examinados: PANAMÁ, David; Chiriquí, sobre madera en descomposición DC 205.

Ecología: Hongo saprófito corticioide descomponiendo madera.

Sistotrema confluens Pers., Neues Mag. Bot. 1: 108 (1794)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta un manto de coloración amarillenta cremosa perceptibles a simple vista, en el estereoscopio se observa un manto blanquecino con pústulas tomates.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: Finas grandes gruesas dispuestas en paralelo a la fructificación, sin presencia de fíbulas, 1.5-2.5 μm de diámetro. Cistidias: grandes gruesas irregulares con su parte basal muy ancha y en su parte distal cilíndrica tortuosa más delgada con paredes gruesas su diámetro de 98-112.5x12.5 μm . Basidias: irregulares de base más ancha y globosa sin septa longitudinal y septa simple basal, 16-24x6-8 μm . Esterigmas: En un número de 4, finas muy alargados de 4-5x1.5-2 μm . Esporas: elipsoidal a lacrimoide, con poro germinativo apical con dimensiones de 7-8x4-5 μm . (FIG. 4d).

Especímenes examinados: ECUADOR: Bosque, Kilometro 24 vía a Zamora Chinchipe, sobre madera en descomposición DC 252.

Ecología: Hongo saprófito corticioide descomponiendo madera.

Scopuloides hydnoides (Cooke & Masee) Hjortstam & Ryvarde, Mycotaxon 9(2): 509 (1979)

Morfología: Material fresco (no observado). En herbario el espécimen presenta una fructificación de coloración blanquecina reflectante a la luz, al estereoscopio si aspecto es algodonoso con brotes puntiagudos.

Microscópicamente el basidioma presenta; Hifas: Gruesas tortuosas, ramificadas orientadas transversalmente a la fructificación con presencia de septos fibulados de 1,5-2(3) μm de diámetro. Basidias: se presentan subglobosas, no septadas, (9)10-12x4,5-5 μm de diámetro. Cistidias: Grandes cilíndricas de forma irregular con presencia de brotes o incrustaciones

cristalinas a lo largo de su parte externa y en su parte superior puntiaguda en otros casos redondeada y en su parte inferior presencia de septos simples proyectados de las hifas ubicándose paralelamente al basidio y su diámetro de $(50)45 \times 3(3,5) \mu\text{m}$. Esterigmas: En un número de 4, puntiagudos con medidas de $4-5 \times 1.5 \mu\text{m}$. Esporas: alantoides, con poro germinativo apical y con diámetro de $6-7 \times (2)3 \mu\text{m}$. (FIG. 4e).

Especímenes examinados: 8-106; 8-108; 103(a).

Ecología: Hongo saprófito descomponiendo madera.

FIG. 4

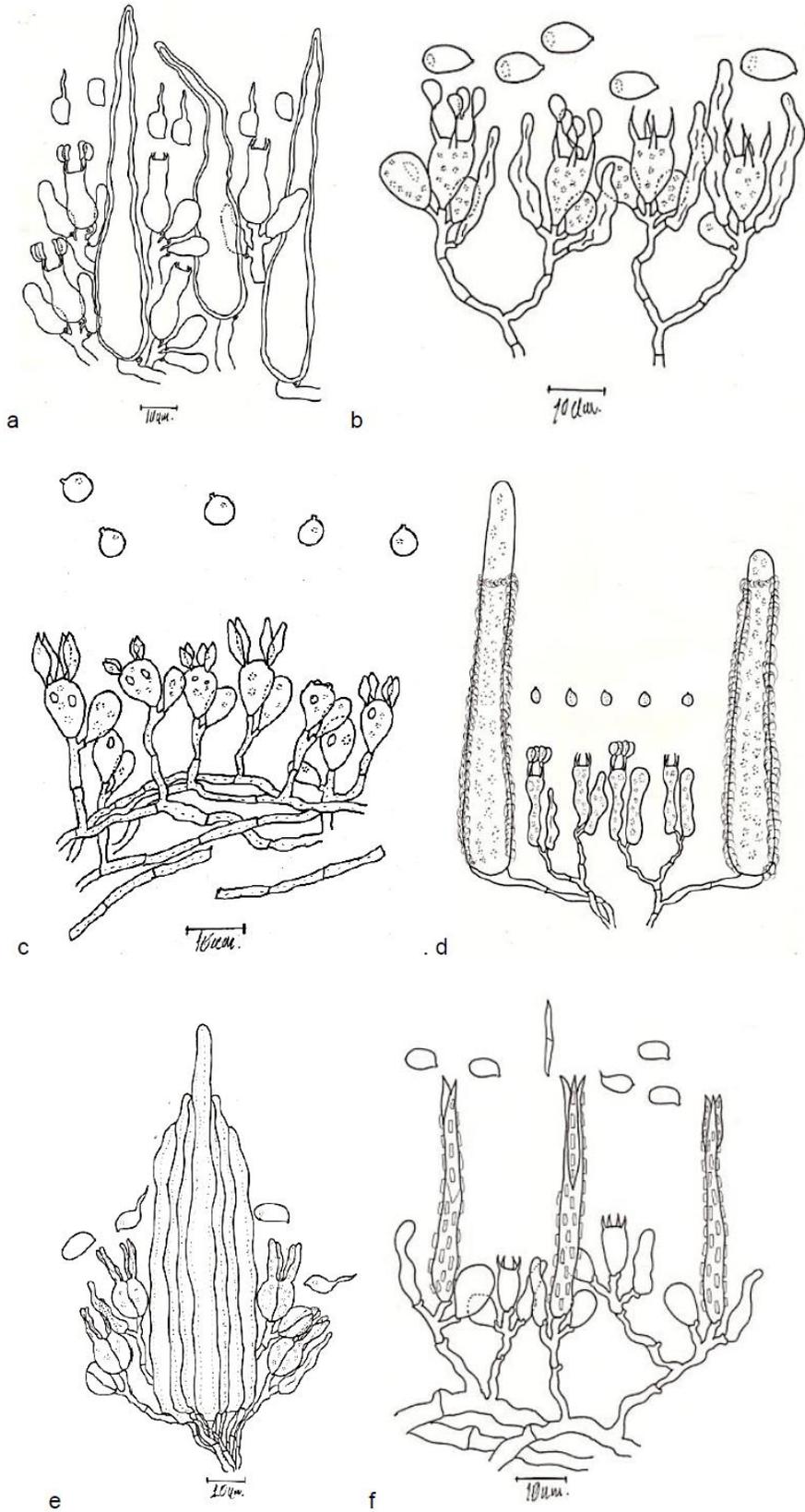


FIG. 4a-f: Ilustración representativa de los especímenes correspondientes a cada especie incluyendo estructuras de desarrollo como hifas con o sin fíbulas, basidias, cistidias presentes o ausentes, esterigmas y basidiosporas. **Atractiellales:** a) *Helicogloea* cf. *globosa*, espécimen DC 207. **Cantharellales:** b) *Ceratobasidium stridii*, espécimen DC 280 (a), c) *Tulasnella* cf. *asymmetrica*, espécimen DC 182. **Poliporales:** d) *Hyphoderma puberum*, espécimen DC 205. e) *Sistotrema confluens*, espécimen DC 252. f) *Scopuloides hydnoides*, espécimen 103(a). Acrónimo DC se refiere al nombre del colector Darío Cruz.

Taxonomía molecular

Molecularmente se obtuvieron 30 secuencias a partir de los basidiomas. Estas secuencias mediante análisis filogenético de LSU parcial permitieron la ubicación de las secuencias en varios órdenes como Auriculariales, Atractiellales, Cantharellales, Poliporales (FIG. 5).

Dentro del orden Auriculariales se ubican 20 secuencias obtenidas en este estudio. 11 obtenidas desde los basidiomas DC23; DC194; DC44; DC198; DC75; DC203; 98; DC256; SC062; DC55; DC219 se relacionan estrechamente con los géneros *Exidia* y *Exidiopsis*, 7 secuencias dentro del género *Basidioidendron* para los basidiomas 92; DC74; DC74; DC52; DC47; 8_117, una secuencia para el género *Heterochaetella* el basidioma DC280b y dos secuencias para el género *Bourdotia* desde los basidiomas DC295; DC276, confirmando su ubicación y descripción morfológica (FIG. 5).

Dentro del orden Atractiellales se ubica una secuencia para el género *Helicogloea* desde el espécimen DC207, apoyando su identificación morfológica (FIG. 5).

Dentro del orden Polyporales con 5 secuencias obtenidas desde el basidioma 8_111a para el género *Calathella*, otra secuencia desde el basidioma DC201 para el género *Crepidotus*, dos secuencias desde los basidiomas DC76; DC76 para el género *Phanerochaete*, una secuencia desde el espécimen DC304 para el género *Hyphoderma* (FIG. 5).

Filogenéticamente se formaron dos clados distantes para el grupo Cantharellales- Tulasnellales en la cual una secuencia desde el basidioma DC280a se ubica dentro del género *Clavulicium* y otras secuencias de los basidiomas DC182, DC252 dentro del género *Tulasnella*. La secuencia del basidioma DC182 es confirmada morfológicamente para el orden *Cantharellales* (FIG. 5).

La región ITS más la región LSU parcial de estas 30 secuencias, se analizaran en un trabajo posterior independientemente para cada género: *Basidioidendron*, *Ceratobasidium*, *Exidiopsis*,

Helicogloea, *Heterochaetella* (*Stypella*), *Hyphoderma*, *Oliveonia*, *Scopuloides*, *Sistotrema*, *Tulasnella* y así poder determinar o confirmar las especies morfológicas.

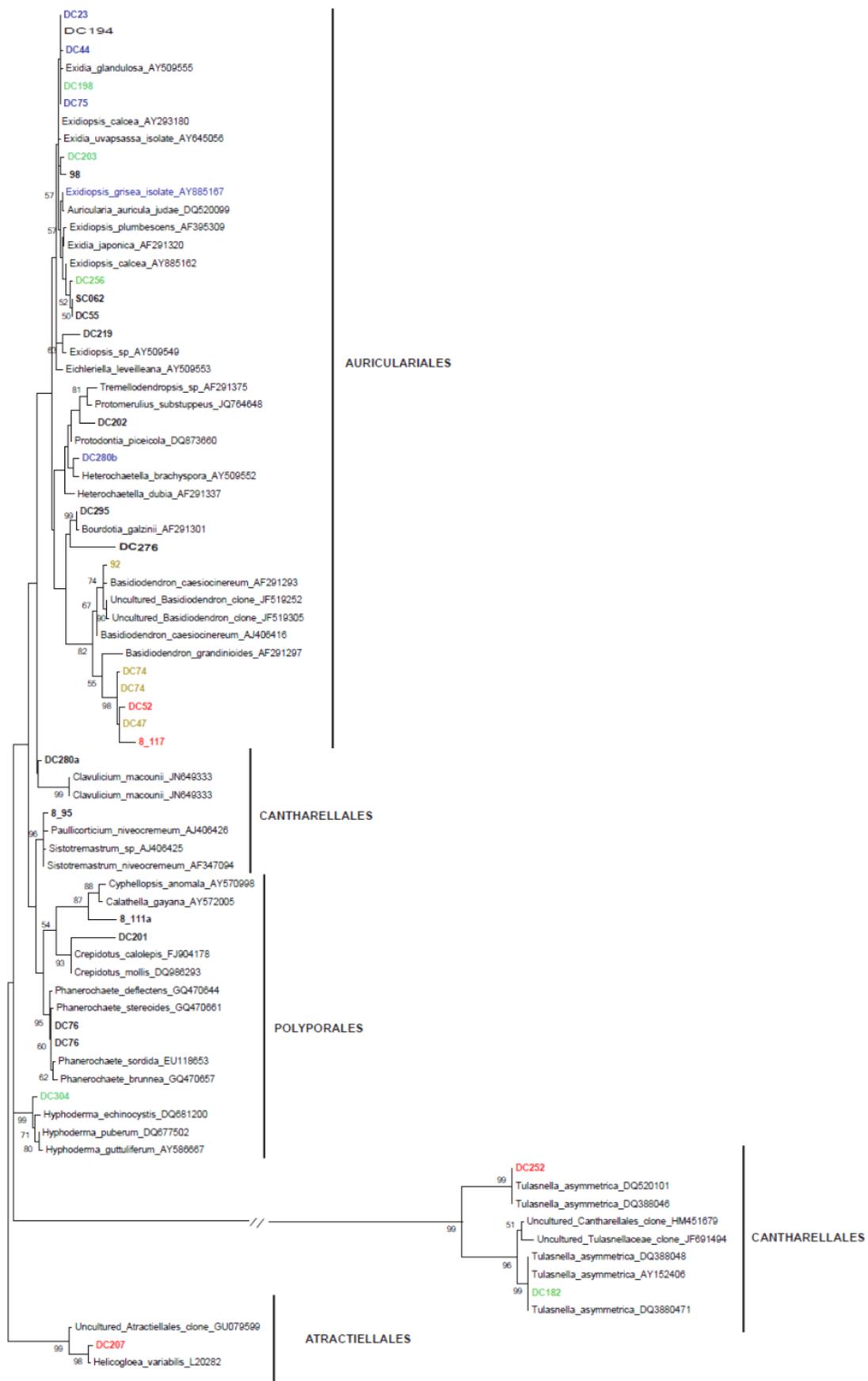


FIG. 5. Hipótesis filogenética de la región LSU parcial de DNArn, para determinación de los diferentes grupos morfológicos. Acrónimos DC, se refiere al colector de los basidiomas, Darío Cruz y SC para la colectora Stefania Cevallos.

DISCUSIÓN

Caracterización morfología vs molecular

Dentro de nuestro estudio se logró definir especies morfológicas que son altamente coincidentes con los datos moleculares. Los grupos más grandes morfológica y molecularmente son Auriculariales, Atractiellales y Cantharellales y Poliporales (FIGS. 3, 4 y 5).

Auriculariales: Morfológicamente se logró determinar varias especies dentro de los géneros *Basiodendron* (Rick, 1938) con las especies *Basiodendron caesiocinereum* descrita por Heikki & Reima para la cual se logró obtener secuencias desde los basidiomas DC 47; DC74 (FIG. 3a), filogenéticamente se ubican en un clado soportado con el 98% BS-ML (FIG. 5) y la especie; *B. deminutum* descrita por Peter Roberts (1993), con la secuencia desde el basidioma DC92 (FIG. 3b) con un soporte filogenético de 74% de BS-ML (FIG. 5), lo cual confirma que nuestras especies efectivamente pertenecen al género *Basiodendron*. Este género está conformado especialmente por especies corticioides resupinadas descomponedoras de madera y principalmente se las encuentra según la bibliografía consultada en madera conífera (Dueñas, 1989). Para cada especie, son corroboradas filogenéticamente dentro del género mediante el análisis de LSU parcial. (FIGS. 3a, 3b y 5). Para el género *Exidiopsis*, se determinó morfológicamente las especies *Exidiopsis fugacissima*, reportada por Roberts et al. (1993) las especies morfológicas DC23 y DC44 (FIG. 3d) son muy semejantes a este género lo cual en conjunto con las secuencias obtenidas y mediante su análisis filogenético de LSU parcial (FIG. 5). se ubican muy cerca de *Exidiopsis*. *Heterochaetella brachyspora* actualmente *Stypella dubia* (CABI & Landcare Research, 2009) en la página informativa Index Fungorum (www.indexfungorum.org), reportada por Liuba Kisimova, Horovitz, Oberwinkler and Gómez (2000), la secuencias obtenida desde el espécimen DC 280 (b) (FIG. 3e) correspondiente a este género lo ubican morfológica y molecularmente según el análisis filogenético de LSU parcial (FIG. 5) dentro de éste género *Heterochaetella* se encuentra en madera en descomposición (Robena, 1960).

En el orden Atractiellales, morfológicamente se determinó la especie *Helicogloea* cf. *globosa* desde el espécimen DC 207 (FIG. 4a), colectado en Panamá, está especie fue reportada por

Chen & Oberw (2000). La secuencia y su análisis filogenético para LSU parcial (FIG. 5), confirman la morfología de este espécimen hasta nivel de género con un 98% de soporte de BS-ML. Esta secuencia debe ser analizada más detalladamente incluyendo la región ITS y LSU en conjunto, para determinar si pertenece o está cercana a secuencias con nombres científicos o cercana a secuencias de Atractiellales reportadas para el sur del Ecuador por (Kottke et al. 2010) como potenciales micobiontes formadores de micorrizas en orquídeas epífitas y terrestres.

En el orden Cantharellales-Tulasnellales con la especie *Tulasnella* cf. *asymmetrica* reportada por Warcup Talbot (1967) la secuencia obtenida para el espécimen DC 182 (FIG. 4c) de la región LSU parcial determinado por un análisis filogenético (FIG. 5) confirmó la morfología hasta el nivel de género *Tulasnella* con un 99% de soporte de BS-ML. Corroborando el análisis morfológico obtenido, siendo este género uno de los principales potenciales micobiontes en orquídeas (Cruz et al. 2011)

Muestras que no coincide la morfología con molecular:

Las secuencias DC 276 y DC 194 obtenidas desde *Basiodendron caesionerium* se ubican en otros clados, la secuencia DC276 está dentro de Auriculariales y la DC194 muy distante dentro de un grupo de Cantharellales. En el orden Cantharellales *Ceratobasidium stridii* reportada por Erikss y Cortic (1973) mediante una descripción morfológica el análisis filogenético arroja un resultado distante. Lo mismo sucede para *Sistotrema confluens* reportada por Person (1821) morfológicamente, pero el análisis filogenético arroja un resultado muy distante (FIG. 5).

Los siguientes análisis moleculares de la región LSU no se pudieron contrastar con su análisis morfológico: Dentro del orden Auriculariales tenemos *Basiodendron deminutum* la especie morfológica DC 233 lo clasificó morfológicamente dentro de este género, *Basiodendron radians* reportada por Peter Roberts (2001) para el espécimen DC 29, *Oliveonia fibrillosa* reportada por Kotiranta y Saarenoksa (2005) morfológicamente se lo clasificó dentro de este género, dentro del orden Poliporales el género *Hyphoderma meruliaceae* reportada por Wallr (1833) morfológicamente el espécimen DC 205 se compara a este género y el *Scopuloides hydroides* reportada por Robert I, Gilbertson y Karen K. Nakasone (2003) para los especímenes 8-106; 8-108; 103(a) morfológicamente se clasificó dentro de este género (Tabla 1).

CAPÍTULO

IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

El uso combinado de taxonomía clásica y datos moleculares aportan evidencias complementarias y útiles para la identificación de especies.

El uso de PCR directa aplicando el kit Phire® Plant Direct PCR, fue muy útil para obtener y amplificar DNA de las muestras de herbario.

Recomendaciones:

Se recomienda el uso de PCR directa aplicando el kit Phire® Plant Direct PCR para muestras de hongos corticioides resupinados ya que se tiene elevadas probabilidades de amplificar el DNA correcto y evitar los contaminantes de otros hongos u otros organismos presentes en este tipo de muestras.

Se recomienda fomentar la ampliación de nuevos Herbarios que optimice la colección, conservación y estudio de los hongos, ya que la gran diversidad de este reino es aún pobremente entendida.

CAPÍTULO

V

BIBLIOGRAFÍA

- Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. Dpto. de ácaros y hongos entomopatógenos, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.
- Batallas, R. (2008). Estudio de la Micobiota de la Reserva Ecológica El Ángel. Corporación Grupo Randi Randi/ PRODERENA-ESPEJO.
- Binder, M., Hibbett, DS, Larsson, KH., Larsson, E., Langer, E & Langer, G. (2005). The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Systematics and Biodiversity* 3: 1-45.
- CABI Bioscience, CBS & Landcare Research. 2009 update 1 January 2013. "Index Fungorum" www.indexfungorum.org.
- Calle, J. (2005). Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Tesis para el grado de Maestro en Ciencia en Agronomía. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.
- Contreras, M., Pérez, L., Cifuentes, J. (2012). Estudio taxonómico de hongos corticioides (Hymenomycetes: Fungi) poco conocidos en Mexico, *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 15-22
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínica Provincial. Barcelona. España. Cap12
- Crespo, A. (2008). Botánica Farmacéutica Micología, Facultad de Farmacia UCM.
- Cruz, D., Suárez, JP., Kottke, I., Piepenbring, M., Oberwinker, F. (2011). Defining species in *Tulasnella* by correlation morphology and nrDNA ITS-5.8s sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress* 10: 229-238
- Delgado, A. & Piñeiro, A. (1997). Avances de estudios taxonómicos de la Micobiota en diferentes hábitats del estado Zulia y Venezuela. *Memorias. XV Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracaibo - Venezuela.* p. 50
- Dueñas, M. (1989). Phragmobasidiomycetes del norte de España. *Anales Jard. Bot. Madrid* 46(1): 229-232
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791

- Folch-Mallol, J., Garay, D., Lledias, F., Covarrubias, A., (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. ALAM pp. 24-46
- Franco, A., (2005). Estudio fisiológico y molecular de especies Ocratoxigénicas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Freire, A. (2004) Botánica Sistemática Ecuatoriana. St. Louis, MO, Missouri Botanical Garden.: ix, 209p. ISBN 9978-43-481-X.
- Gams, W. 1995. How natural should anamorph genera. Canadian Journal of Botany 73: S747–S753.
- Hawksworth, DL. (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycol Res 95: 641–655.
- Hawksworth, DL. (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycol Res 105: 1422–1432.
- Hibbett, D et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological Research 111: 509-547.
- Erikss, J. & Ryvarde, C.. (1973) N. Eur., 2 Aleurodiscus-Confertobasidium Oslo: 227
- Jørgensen, PM., León, S. (1999) Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75: i–viii, 1–1182.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transformation. Nucleic Acids Res 30: 3059–3066
- Kirk, PM., Cannon, PF., Minter, DW., Stalpers, JA. (2008). Diccionario de los hongos (10^a ed.). Wallingford
- Kottke, I., Beiter, A., Weiß, M., Haug, I., Oberwinkler, F., Nebel, M. (2003) Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. Mycol Res 107: 957–968.
- Kottke, I., Suarez, JP., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., Garnica, S. (2010) Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 277: 1289-98.
- Læssøe, T., Petersen, J.H. (2008). 'Svampelivet påækvator'. Svampe, vol. 58, pp. 1-52.
- Larsson, KH. (2007). Re-thinking the classification of corticioid fungi. (2000). Mycological Research 111: 1040-1063.

- López, R. (2008). Introducción Importancia actual de la micología médica en México, Gac Méd Méx; 144(2): 121-122
- Liuba, K., Kisimova, A., Oberwinkler, F., Luis, D., Gómez, P. (2000). Basidiomicetos resupinados de Costa Rica. Myxariaceae s. Jülich, Sebacinaceae Wells & Oberw., y Tremellodendropsidaceae Jülich Rev. biol. trop vol.48 no.2-3 San José jun.
- Martin, R., James, D., Lévesque, C. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Ann. Rev. Phytopathol. 38: 207-239.
- Ninoska, P. (1982). El herbario micológico y su importancia en la investigación. Fonaiap Divulga N. 07
- Ordynets, O. (2012) New records of corticioid fungi with heterobasidia from Ukraine. Turk J Botany doi:10.3906/bot-1109-1
- Petersen, JH. & Læssøe, T. (2013). "MycoKey™", <http://www.mycokey.com/Ecuador/EcuadorLitt.htm>
- Piepenbring, M., Hofmann, T., Unterseher, M., Kost, G. (2012). Species richness of plants and fungi in western Panama: towards a fungal inventory in the tropics Biodivers Conserv DOI 10.1007/s10531-011-0213.
- Person, F. (1821). *Sistotrema confluens* Syst. Mycol. 1: 426.
- Robena, LA. (1960). The Genus *Heterochaetella*, Canadian Journal of Botany, 1960, 38(4): 559-569, 10.1139/b60-050
- Roberts, P., Bourdot & Galzin. (1993). *Microsebacina*, Mycol. Res. 97(4): 473
- Roberts, P. (1993). *Exidiopsis* species from Devon, including the new segregate genera *Ceratosebacina*, *Endoperplexa*, *Microsebacina*, and *Serendipita*. 97: 467-478
- Roberts, P. (1998). *Oliveonia* and the origin of the holobasidiomycetes *folia* Cryptog. Estonica, Fasc. 33: 127-132
- Roberts, P. (2001). *Basiodendron radians* (Rick), Kew Bull. 56(1): 170.
- Robert, I., Gilbertson, A., Karen, K., Nakasone, E. (2003). New taxa of Hawaiian corticioid fungi are described with keys to *Crustoderma* *Radulomyces*, and *Scopuloides*. Mycologia, 95(3), pp. 467–473
- Solé, M. (2002). Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales (Tesis doctoral) Universitat rovíra i virgili, facultat de medicina i ciències de la salut, departament de ciències mèdiques bàsiques, unitat de microbiologia
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688–2690

- Suárez, JP., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res.* 110: 1257–1270.
- Suárez, JP., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., Kottke, I. (2008). Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol Progress* 7: 75-85.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. (2012). The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 6241-6246
- Stielow, B., Bratek, Z., Orczán, A., Rudnoy, S., Hensel, G., Hoffmann, P., Klenk, HP., Göker. (2011). Species delimitation in taxonomically difficult fungi: The case of *Hymenogaster*. *PLoS ONE* 6(1): e15614. doi:10.1371/journal.pone.0015614
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739
- Wallr, Fl., (1833). *Hyphoderma puberum*, *Crypt. Germ.* 2: 576.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White T. J. (eds), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Application*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Yang, Z., Matheny, P., Ge, Z., Slot, J., Hibbet, D. (2005). New Asian species of the genus *Anamika* (euagarics, hebelomatoid clade) based on morphology and ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 109 (11): 1259-1267.

CAPÍTULO

VI

ANEXOS

Tabla 1

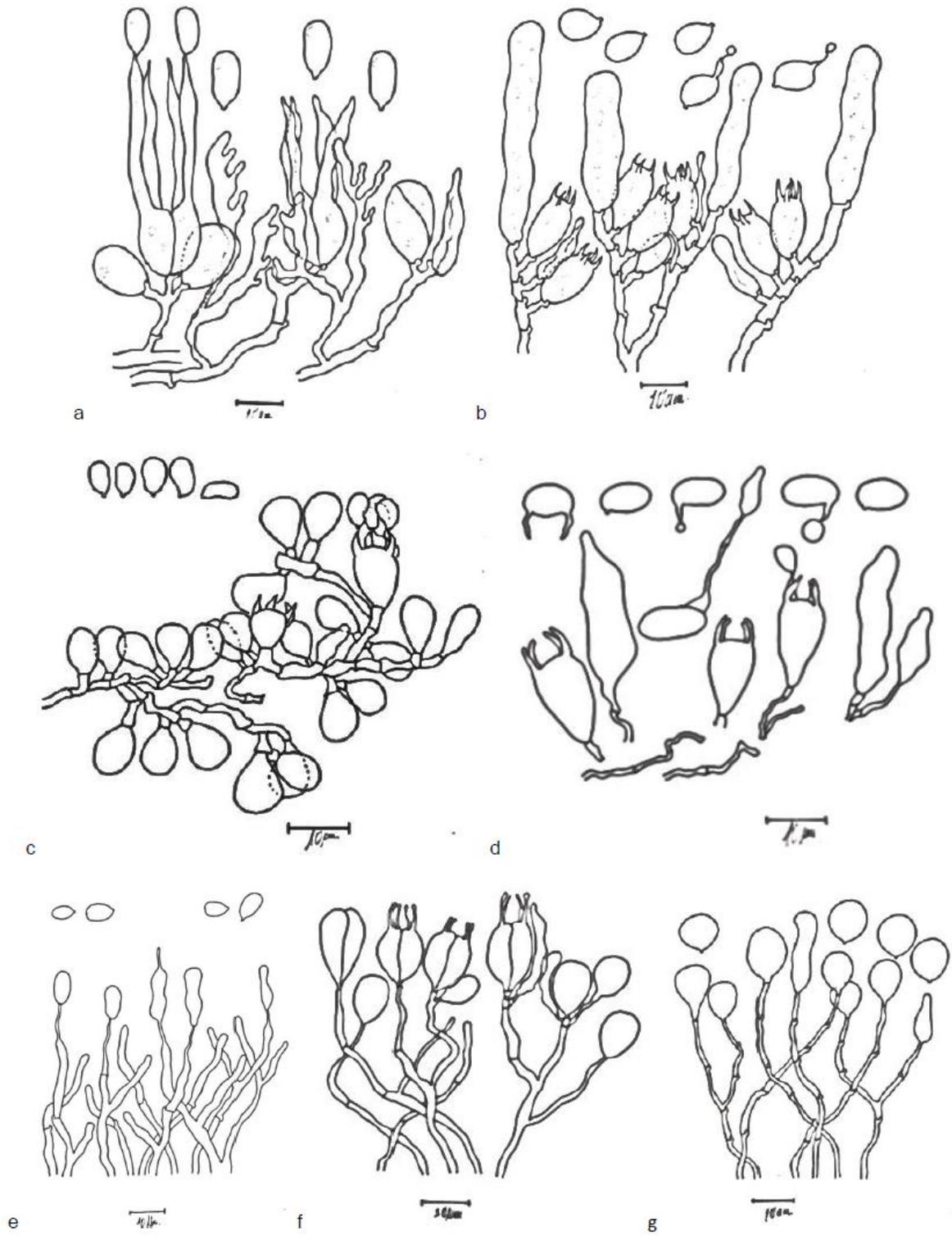
	MORFOLOGIA	MUESTRA O ESPECIMEN	MOLECULAR
		Auriculariales	
1		DC 23	EXIDIOPSIS
2	<i>Exidiopsis fungassicima</i>	DC 44	EICHLERIELLA
		DC 52	NO
4	<i>Basiodendron radians</i>	DC 29	NO
5		DC 235	NO
6	<i>Basiodendron caesionereum</i>	DC 276	Basiodendron
7		DC 47	Basiodendron
8		DC 194	EXIDIA GLANDULOSA
9	<i>Basiodendron deminutum</i>	DC 92	BASIDIODENDRON
10		DC 233	NO
11	<i>Oliveonia fibrillosa</i>	DC 261	Uncultured Lemonniera clone
12	<i>Heterochaetella brachyspora</i>	DC 280 (b)	Heterochaetella brachyspora
13	<i>Actualmente (Stypella dubia)</i>	DC 209	NO
		Cantharellales	
14	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DC 182	Tulasnella asymmetrica
15	<i>Sistotrema confluens</i>	DC 252	Tulasnella asymmetrica
16	<i>Ceratobasidium stridii</i>	DC 280 (a)	Uncultured Agaricomycetes
		Poliporales	
17		8-106	NO
18	<i>Scopuloides hydroides</i>	8-108	NO
19		103(a)	NO
20	<i>Hyphoderma meruliaceae</i>	DC 205	NO
		Atracteliales	
21	<i>Helicogloea globosa</i>	DC 207	Helicogloea

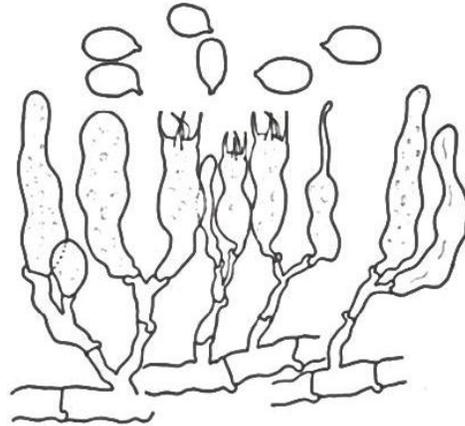
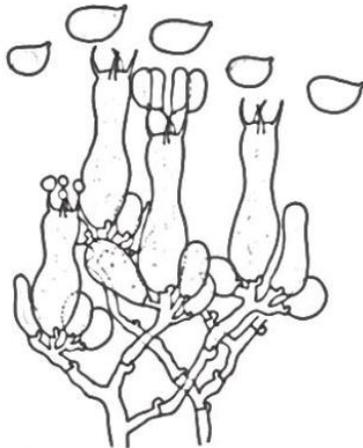
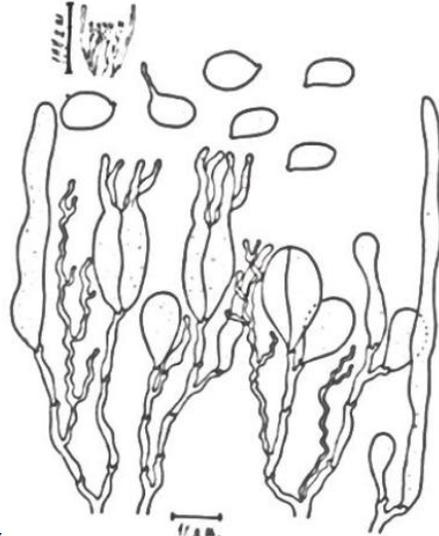
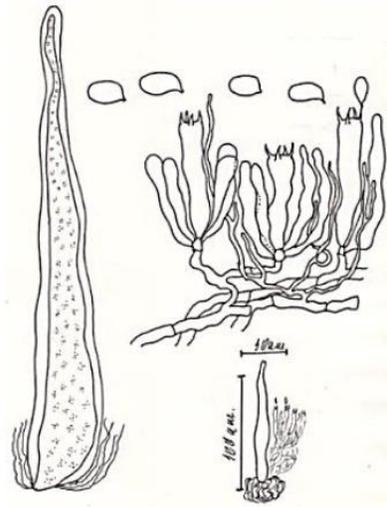
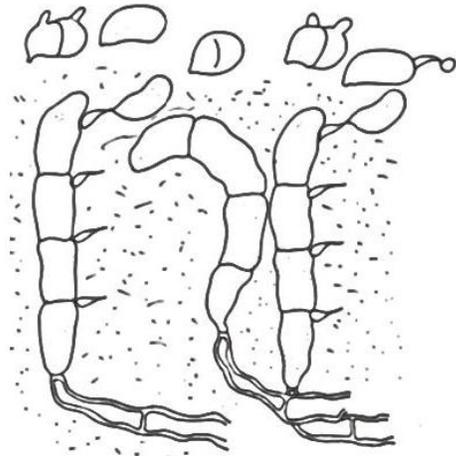
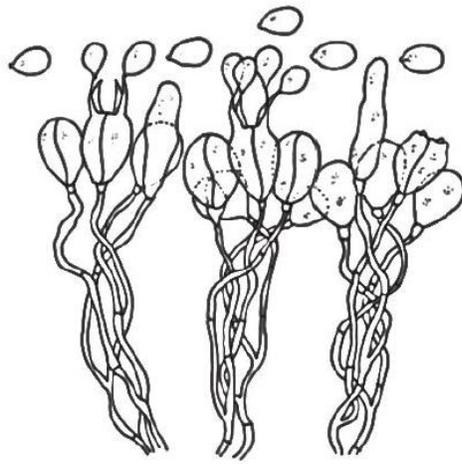
	MORFOLOGIA	Morfotipos indeterminados	MOLECULAR	
22	Morfotipo 13	8-95	Antrodia wangii isolate	Poliporales
23	Morfotipo 14	98	Auricularia auricula-judae	Auriculariales
24	Morfotipo 15 (Poliporales)	DC 76	Phanerochaete	Poliporales
25	Morfotipo 16 (Basiodendron)	DC 74	Basiodendron	Auriculariales
26	Morfotipo 17	DC 55	Exidiopsis	Auriculariales
27	Morfotipo 18 (Auricularioide)	DC 202	Auricularioide	Auriculariales
28		8-117	Auriculariales	Auriculariales
29	Morfotipo 19	DC 296	NO	NO
30	Morfotipo 20	103 (b)	NO	NO
31	Morfotipo 21 (Basidias Agaricoides)	DC 295	Auricularioide	Auriculariales

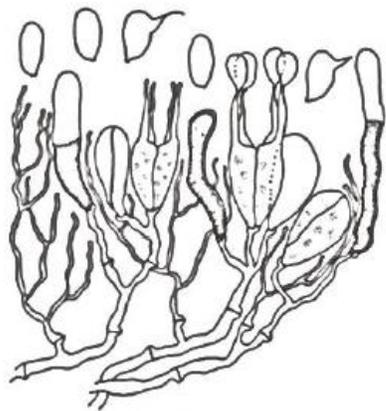
Secuencias descartadas para descripción Morfológica		
40	DC 203	Auricularia auricula-judae
41	DC 198	Exidia glandulosa
42	DC 304	Hyphoderma puberum
43	8--81	NO
44	97	NO
45	102	NO
46	8--115	NO
47	8--116	NO
48	8--118	NO
49	DC 3	NO
50	DC 30	NO
51	DC 63	NO
52	DC 71	NO
53	DC 72	NO
54	DC 73	NO
55	DC 76	NO
56	DC 78	NO
57	DC 156	NO
58	DC 160	NO
59	DC 188	NO
60	DC 196	NO
61	DC 199	NO
62	DC 200	NO
63	DC 204	NO
64	DC 206	NO
65	DC 238	NO
66	DC 256	Exidiopsis

MORFOTIPOS INDETERMINADOS.

FIG. 6

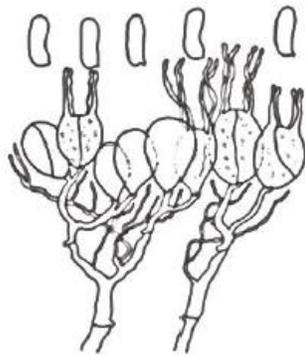






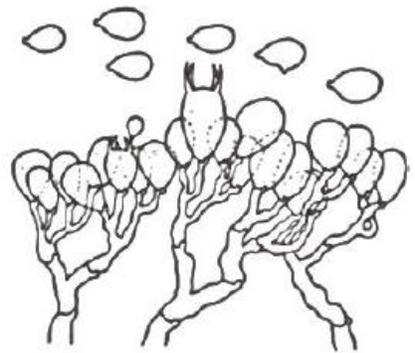
n

30 μm



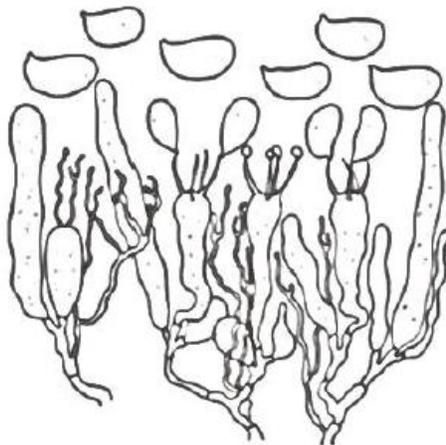
o

10 μm



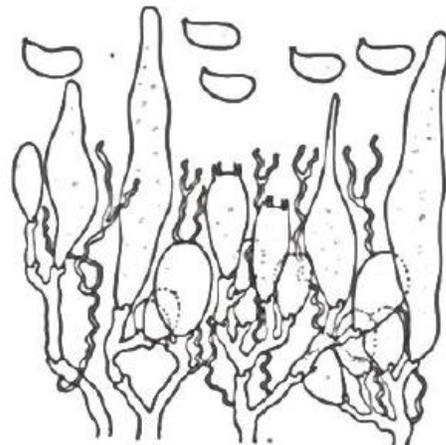
p

10 μm



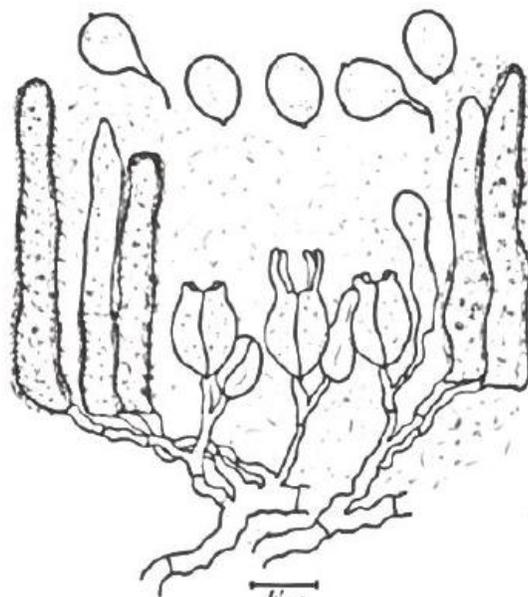
q

10 μm



r

10 μm



s

10 μm

FIG. 6a-t: Ilustraciones de morfotipos indeterminados. Especímenes incluyen estructuras en desarrollo con o sin fíbulas, basidias, cistidias presentes o ausentes, esterigmas y basidioesporas. a) Especímen DC 256. b) Especímen DC 208. c) Especímen 8-95. d) Especímen 98. e) Especímen DC 76. f) Especímen DC 74. g) Especímen DC 55. h) Especímen DC 202. i) Especímen DC 296. j) Especímen 103 (b). k) Especímen DC 295. l) Especímen DC 216. m) Especímen DC 201. n) Especímen DC 6. o) Especímen 100. p) Especímen DC 75. q) Especímen 8-111(b). r) Especímen 8-111(a). s) Especímen DC 219.