



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Caracterización morfo-molecular de *Xylaria* spp. en la Reserva Biológica San Francisco como aporte taxonómico y diversidad de la micobiota del Sur del Ecuador

TRABAJO DE TITULACIÓN

Autor: Chamba Quezada Crystopher Andrés

Director: Cruz Sarmiento Darío Javier, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Crystopher Andrés Chamba Quezada declaro ser el autor del presente trabajo de titulación: Caracterización morfo-molecular de *Xylaria* spp. en la Reserva Biológica San Francisco como aporte taxonómico y diversidad de la micobiota del Sur del Ecuador, de la titulación de Biología 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. 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: Chamba Quezada Crystopher Andrés

Cédula: 1105905424

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Darío Javier Cruz Sarmiento Ph.D.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mí consideración:

El presente trabajo de titulación: “Caracterización morfo-molecular de *Xylaria* spp. en la Reserva Biológica San Francisco como aporte taxonómico y diversidad de la micobiota del Sur del Ecuador” realizado por Crystopher Andrés Chamba Quezada; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2017.

f).....

Cruz Sarmiento Darío Javier Ph.D.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado

A mis padres por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional y han sido quienes me han impulsado durante toda mi formación académica.

A mis abuelos ya que a pesar de la distancia siempre han sido la base de nuestra familia y fuente de sabiduría.

A mis hermanos que han sido un apoyo fundamental y un impulso para lograr todas mis metas planteadas.

Crystopher Andrés Chamba Quezada

AGRADECIMIENTO

Al Ph.D. Darío Cruz por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a él, lo cual me ha ayudado a adquirir todos los conocimientos requeridos para el desarrollo de este trabajo de fin de titulación. Él supo transmitir y compartir conmigo valores personales y académicos además de guiar con paciencia y sabiduría mi tesis.

Doy gracias a todo el equipo del Fungario ya que más que un equipo de trabajo hemos sido un grupo de amigos especialmente Juan Sebastián quien me dio todo su apoyo.

A todos los profesores que me han ayudado y guiado durante mi formación académica.

A mis amigos por estar siempre y todos los buenos momentos vividos.

Crystopher Andrés Chamba Quezada

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	II
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 Aspectos generales.....	7
1.1.1 Ciclo de vida.....	7
1.1.2 Clasificación y taxonomía.....	7
1.1.3 Importancia ecológica y biotecnológica.....	8
1.2 Ascomycetes.....	8
1.2.1 Taxonomía de Ascomycetes.....	9
1.2.2 Familia Xylariaceae.....	9
1.2.3 Morfología del género <i>Xylaria</i>	10
1.3 Objetivo o pregunta de investigación.....	11
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Área de estudio.....	13
2.2 Especímenes estudiados.....	13
2.3 Caracterización morfológica.....	15
2.4 Caracterización molecular.....	15
2.5 Análisis filogenético.....	16

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1 Caracterización morfológica	19
3.1.1 Especies identificadas.....	19
3.2 Caracterización molecular	35
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS	48
Anexo 1. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria adscendens</i> HUTPL(F)-1448.....	49
Anexo 2. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria anisopleura</i> HUTPL(F)-1458.....	50
Anexo 3. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria apiculata</i> HUTPL(F)-581, HUTPL(F)-704.....	51
Anexo 4. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria curta</i> HUTPL(F)-1532.....	52
Anexo 5. Ilustración de las Estructuras microscópicas de <i>Xylaria globosa</i> HUTPL(F)-1497.....	53
Anexo 6. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria multiplex</i> HUTPL(F)-1514, HUTPL(F)-1542.....	54
Anexo 7. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria telfairii</i> HUTPL(F)-1083, HUTPL(F)-1437.....	55
Anexo 8. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria tuberoides</i> HUTPL(F)-1559.....	56
Anexo 9. Ilustración de las estructuras microscópicas de <i>Xylaria</i> sp. HUTPL(F)-1543..	57
Anexo 10. Árbol filogenético de la región LSU parcial de ADNrn.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos de colección y codificación de los especímenes estudiados dentro del herbario HUTPL ¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa de la Reserva Biológica San Francisco ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 2: Ilustración y estructuras microscópicas de *Xylaria adscendens*, *Xylaria anisopleura* y *Xylaria apiculata* ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 3: Fotografías del ascocarpo de *Xylaria adscendens*, *Xylaria anisopleura* y *Xylaria apiculata* ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 4: Ilustración y estructuras microscópicas de *Xylaria curta*, *Xylaria globosa* y *Xylaria multiplex* ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 5: Fotografías del ascocarpo de *Xylaria curta*, *Xylaria globosa* y *Xylaria multiplex* ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 6: Fotografías del ascocarpo y estructuras microscópicas de HUTPL(F)-604, HUTPL(F)-921, HUTPL(F)-663, HUTPL(F)-603 y HUTPL(F)-1077 ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 7: Fotografías del ascocarpo y estructuras microscópicas de HUTPL(F)-1100, HUTPL(F)-1436 y HUTPL(F)-1533 ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 8: Ilustración y estructuras microscópicas de *Xylaria telfairii*, *Xylaria tuberosides* y *Xylaria sp* ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 9: Fotografías del ascocarpo de *Xylaria telfairii*, *Xylaria tuberosides* y *Xylaria sp* ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 10: Árbol filogenético de la región ITS-5.8S ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 11: Árbol filogenético de la región ITS-LSU ¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

El género *Xylaria* contiene varias especies localizadas principalmente en regiones tropicales como Ecuador, sin embargo la cantidad de estudios taxonómicos y filogenéticos reportados son escasos. Por lo que el objetivo del presente estudio fue realizar una caracterización morfo-molecular de 20 especímenes de *Xylaria* colectados en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), Zamora-Chinchipe. Morfológicamente se logró clasificar 11 especímenes en ocho morfo-especies, un espécimen no se logró relacionar a ningún epíteto conocido, por lo que se puede tratar de una nueva especie. Los ocho especímenes restantes por su estado asexual no se lograron clasificar para ninguna morfo-especie. Molecularmente se obtuvieron solamente 19 secuencias de la región ITS-5.8S y LSU, que se agruparon en 13 clados. Ocho de los 13 clados se correlacionaron con las definiciones morfológicas a nivel de especie, un espécimen en estado asexual se incluyó dentro del clado con una secuencia denominada *Xylaria* aff. *comosa*. Los cinco genotipos restantes no presentaron ninguna relación con las secuencias disponibles. Acorde a la definición de OTUs empleado, el umbral de 3% para la región ITS resulta impreciso para definir especies en *Xylaria*.

Palabras clave: ITS; LSU; morfología; molecular; *Xylaria*.

ABSTRACT

The genus *Xylaria* contains several species mainly located in tropical regions like Ecuador, however the amount of taxonomic and phylogenetic studies reported are scarce. Therefore, the objective of the present study was to perform a morpho-molecular characterization of 20 *Xylaria* specimens collected in the San Francisco Biological Reserve (RBSF), Zamora-Chinchipe. Morphologically it was possible to classify 11 specimens in eight morpho-species, one specimen was not able to relate to any known epithet, so it can be treated of a new species. The remaining eight specimens by their asexual status were not able to classify for any morpho-species. Molecularly only 19 sequences were obtained to the ITS-5.8S and partial LSU regions, which were grouped into 13 clades. Eight of the 13 clades were correlated with morphological definitions at the species level and an asexual specimen was included within the clade with a sequence named *Xylaria* aff. *comosa*. The remaining five genotypes had no relationship to the available sequences. According to the OTUs definition, the 3% threshold for the ITS region is imprecise to define species in these group of *Xylaria* spp.

Keywords: ITS; LSU; morphology; molecular; *Xylaria*.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio tiene como objetivo realizar una caracterización morfo-molecular de especímenes de *Xylaria* colectados en el bosque montano tropical de Reserva Biológica San Francisco, buscando dar un aporte al conocimiento de la diversidad y taxonomía de este género y especies.

El desarrollo de este estudio se dividió en cinco apartados, en el marco teórico se detalla las bases conceptuales referentes a aspectos generales como: ciclo de vida, clasificación, taxonomía e importancia en general del reino de los hongos en el ecosistema, luego se profundiza en el filo Ascomycota detallando su taxonomía, características de la familia Xylariaceae y finalmente la morfología del género *Xylaria*. En el apartado de materiales y métodos se expone las particularidades del área de estudio, los especímenes que se emplearon, así mismo se expone la metodología utilizada para realizar la caracterización morfológica y molecular además de los pasos a seguir para el análisis filogenético de los datos obtenidos. En el capítulo de resultados y discusión se detalla la cantidad de especímenes identificados morfológica y molecularmente además de las descripciones de cada uno de ellos en función de sus características macroscópicas, microscópicas y relaciones filogenéticas otorgando una serie de explicaciones que interpretan los resultados obtenidos, finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones inferidas a partir de la información de este estudio.

La importancia de este trabajo está directamente relacionada al aporte de información sobre la diversidad que presenta el género *Xylaria*, la cual hasta el momento es pobremente conocida para Ecuador. Lo mismo es cierto para el reino Fungi en su totalidad, ya que se estima que este reino posee un aproximado de 1.5 millones especies según Hawksworth (2001), de los cuales se conoce aproximadamente 100.000, es decir menos del 5% del total (Kirk et al., 2008). Entre los grupos de hongos más numerosos y conocidos se encuentran los Ascomycetes y Basidiomycetes (Piepenbring, 2015). Dentro de los Ascomycetes se encuentra la familia Xylariaceae Tul. & C., esta familia posee el género *Xylaria* Hill ex Schrank, uno de los más numerosos con aproximadamente 300 especies validadas (Henrici, 2016). No obstante más de 700 epítetos de *Xylaria* se encuentran enlistados en el Index Fungorum (visto 20 de Enero de 2016) (Fournier et al., 2011). Los miembros de *Xylaria* al igual que otros géneros dentro de Xylariaceae prestan diversos servicios ecológicos, como por ejemplo generando componentes sustanciales de los ecosistemas terrestres, desempeñando un rol

importante como descomponedores de materia orgánica (celulosa y lignina) provenientes especialmente de plantas angiospermas y gimnospermas (Nilsson & Daniel, 1989).

A pesar de la importancia ecológica que poseen los hongos y en especial las especies de *Xylaria*, se dificulta su entendimiento debido a falta de estudios sistemáticos, taxonómicos y ecológicos, principalmente en los trópicos (Nilsson & Daniel, 1989). Otro factor que ha limitado la determinación de especies es la dificultad de evaluar su alta variabilidad morfológica y la elevada similitud de formas y medidas entre varias especies del género, e inclusive con otros géneros hermanos como lo son *Kretzschmaria* e *Hypoxyton* dejando muchas veces inadecuadas definiciones (Van der Gucht, 1995). El desarrollo de técnicas moleculares y análisis filogenéticos ha ayudado constantemente en la solución a esta problemática de taxonomía clásica (Solórzano, 2012). Las regiones de DNA nuclear ribosomal (DNArn) como ITS-5.8S y LSU se han usado tradicionalmente para examinar posiciones filogenéticas y relaciones a nivel de especies o dilucidar problemas a nivel intra-especie (Lee et al., 2000). No obstante, el desarrollo de estas tecnologías ha sido beneficioso, pero también perjudicial debido a que muchos estudios de diversidad se basan exclusivamente en marcadores moleculares como ITS denominado barcode universal (Schoch et al., 2012). Esto provoca la delimitación de unidades taxonómicas operacionales moleculares (MOTUs)= “especie hipotética” que puede erróneamente aumentar o minimizar la diversidad real de especies presentes en los diferentes ecosistemas (VrÅlsted, 2011). Por esta y otras razones se recomienda que la definición de especies y su diversidad se desarrolle de forma integrativa con la mayor cantidad de información o evidencias ya sean estas morfológicas, moleculares o ecológicas (Puillandre et al., 2012).

Bajo estos antecedentes se realizó la colecta de especímenes con características macroscópicas para el género *Xylaria* en la RBSF. Estos especímenes fueron analizados buscando detallar las características macro y microscópicas de los ascocarpos, como por ejemplo tipologías de ascas, ascosporas y aparato apical que permitieron generar ilustraciones científicas. En el caso de la caracterización molecular se realizó varias PCR buscando amplificar la región ITS-5.8S y LSU parcial, para luego con las secuencias desarrollar los análisis filogenéticos. Esta integración de datos morfológicos (descripciones y claves taxonómicas) y datos moleculares para DNArn ITS-5.8S y LSU parcial nos dejó un total de ocho especies correlacionadas correctamente según sus epítetos. Un espécimen probablemente se trate de una especie nueva al no haber ninguna especie descrita con sus morfologías y sus datos moleculares la separan de las ya reportadas en la base de datos del GenBank. Una especie en estado asexual según los datos moleculares corresponde a la

especie *Xylaria* aff. *comosa*. Ocho especímenes por su estado asexual, no fueron posibles de describir morfológicamente y sus datos moleculares solamente permiten corroborar que son *Xylaria* spp.

CAPÍTULO I.
MARCO TEÓRICO

1.1 Aspectos generales

1.1.1 Ciclo de vida

La mayoría de los hongos presentan la capacidad de reproducirse tanto de manera sexual como asexual. En el caso de la reproducción sexual se produce principalmente en tres etapas: plasmogamia, cariogamia y meiosis (Piepenbring, 2015). En la plasmogamia se da la fusión entre las membranas de dos gametos haploide aunque también puede ocurrir por la unión de dos hifas no especializadas siempre y cuando sean compatibles, inmediatamente posterior a esta fusión ocurre la cariogamia, lo cual da origen al cigoto diploide, finalmente este núcleo se divide por meiosis, donde se produce la recombinación del material genético y da lugar a la formación de cuatro núcleos haploides (Webster & Weber, 2007).

En cuanto a la reproducción asexual esta se da por la partición de las hifas cada uno de las cuales tiene la posibilidad de formar un nuevo individuo, aunque también se puede dar mediante la generación de conidios o esporas, las ventajas que presenta este tipo de reproducción es la rapidez del proceso, la gran cantidad de individuos que se originan y el alto grado de viabilidad de los mismos (Curtis et al., 2008).

1.1.2 Clasificación y taxonomía

El uso de un sistema de clasificación es imprescindible con la finalidad de conocer, explicar y organizar toda la información que se genera en relación a los organismos presentes en el ecosistema (Crisci & López, 2002). Generalmente esta clasificación se basa en el análisis de caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos aunque en muchos de los casos esto no sea suficiente, un ejemplo de esto son los hongos donde el número de características observables no basta para definir las aproximadamente 100.000 especies descritas y las miles por describir (Rogers, 2000), por esto se ha recurrido a la unificación de análisis microscópicos, bioquímicos y actualmente técnicas de secuenciación de ADN (ITS-5.8S), lo cual ha elevado la comprensión de las relaciones fúngicas en varios niveles de clasificación (Piepenbring, 2015). Estos avances permitieron mejorar y dilucidar clasificaciones anteriores donde se utilizó ciertas similitudes de los hongos, como la presencia de una pared celular y su inmovilidad para agruparlos junto con las plantas, hasta el momento en el que aparecieron los seis reinos hasta ahora conocidos y mediante análisis más rigurosos estos fueron separados y asignados al reino de los hongos (Curtis et al., 2008). Empleando datos de secuencia de ADN se presume que el ancestro en común de los hongos surgió del agua a partir de células eucariotas hace aproximadamente 1.000 millones de años (Moore et al.,

2011), este ancestro probablemente presentaban un flagelo en la parte posterior que fungía como propulsor además de la presencia de moléculas de quitina en su estructura.

Dentro del reino de los hongos se encuentran principalmente los denominados hongos verdaderos los cuales presentan una pared de quitina y se dividen en cinco grandes grupos cada una con características morfológicas distintivas, por ejemplo la división Ascomycota presenta (ascas con ascosporas), Basidiomycota (basidias y basidiosporas), Blastocladiomycota (células flageladas), Chytridiomycota (células flageladas), Glomeromycota (arbúsculos) contiene a la mayoría de hongos micorrízicos y la división Zygomycota (zigosporas con suspensores) (Piepenbring, 2015).

1.1.3 Importancia ecológica y biotecnológica

Los hongos son componentes esenciales de muchos sistemas ecológicos esto debido a las diversas funciones que cumplen, incluso han llegado a ser considerados los principales descomponedores de materia orgánica a través de la secreción de enzimas, contribuyendo así al recambio de nutrientes del ecosistema (Christensen, 1989), además su capacidad degradadora no se limita a material vegetal o animal (eg. más de 30 especies de hongos son capaces de degradar plástico o incluso petróleo) (Nabors et al., 2006). Los hongos son los principales aliados de múltiples especies de plantas formando micorrizas, las cuales son indispensables para un buen crecimiento de las mismas, también se los puede encontrar como parásitos de algunas especies de plantas y animales dominantes lo cual ayuda al equilibrio de la biodiversidad (Piepenbring, 2015). Muchos hongos cumplen un rol importante en la medicina y la obtención de metabolitos, tanto así que el primer antibiótico (penicilina) se aisló a partir de un hongo, considerándose así a los hongos como las principales fuentes para la obtención de este tipo de moléculas y productos médicos (Nabors et al., 2006).

1.2 Ascomycetes

El filo Ascomycota es uno de los más grandes y diversos dentro del reino de los hongos con un aproximado de 64.000 especies descritas (Kirk et al., 2008), todas estas especies se distribuyen en diversos ecosistemas alrededor del mundo ya que la mayoría pueden ser cosmopolitas. Esta diversidad contiene variados problemas taxonómicos debido a que estos hongos presentan estados asexuales lo que dificulta e incrementa la ambigüedad de su definición requiriendo análisis filogenético para su correcta asignación de especies (Schoch et al., 2009).

Las estructuras asexuales son la principal forma de reproducción de los Ascomycetes. Las esporas asexuales se denominan conidios los cuales se forman por mitosis en los extremos de las hifas modificadas conocidas como conidióforos (Piepenbring, 2015). Por otra parte la reproducción sexual se inicia con la atracción entre dos micelios haploides distintos cada uno de los cuales da origen a un gametangio uno llamado anteridio y otro ascogonio. Posteriormente se lleva a cabo la plasmogamia a través de una excavación llamada tricogina, donde se acercan los núcleos y se comienzan a producir hifas dicarióticas septadas por parte del ascogonio. Las hifas se unen y forman un cuerpo fructífero conocido como ascocarpo, en esta estructura se desarrolla unos sacos llamados ascas, donde se da la cariogamia en el asca y el núcleo (diploide) se divide por meiosis dando lugar a ocho núcleos (ascosporas), otras especies pueden hacerlo por mitosis e inclusive generar conidios a partir de las ascosporas (Nabors et al., 2006).

1.2.1 Taxonomía de Ascomycetes

La mayoría de Ascomycetes se caracterizan por presentar una estructura especializada denominada asca la cual contienen elementos de reproducción llamadas ascosporas. La clasificación de este filo anteriormente se basó en esta información (Schoch et al., 2009), es así que se denominó Discomycetes si tiene forma de copa el cual se denomina apotecio, Pyrenomycetes forma de botella conocido como peritecio y Plectomycetes con ascoma globoso sin abrirse del todo llamado cleistotecio (Piepenbring, 2015).

En la actualidad el filo Ascomycota presenta tres subdivisiones: donde Taphrinomycota y Saccharomycotina son los grupos basales que contienen pocas especies, muchas de las cuales se encuentran en estado levaduliforme, y otro grupo Pezizomycotina en el cual se encuentran la mayor cantidad de especies con ascomas y sin levaduras (Piepenbring, 2015). Dentro de esta última subdivisión se encuentra la clase Sordariomycetes, orden Xylariales y familia Xylariaceae.

1.2.2 Familia Xylariaceae

La familia Xylariaceae Tul. & C. Tul., es la más grande dentro del orden Xylariales (Ascomycetes), se define principalmente como un grupo de pirenomicetos estromatolíticos con ascas unitunicadas caracterizado por un aparato apical que reacciona al yodo tiñéndose de azul y ascosporas pigmentadas de color marrón con hendidura germinal (Van der Gucht, 1995). La mayor parte de los miembros de esta familia presenta una distribución cosmopolita pero es en las regiones tropicales y subtropicales en donde se encuentra la mayor diversidad

(Sir et al., 2012), inclusive varios géneros presentan un distribución netamente tropical (Stadler, 2011). Dentro de la familia Xylariaceae se ha registrado un total de 39 géneros descritos (Ju & Rogers, 1996; Rogers et al., 1996) sin embargo según una actualización de U'ren et al. (2016) existen un total de 85 géneros y 1.343 especies aceptadas, también esto puede variar según la opinión individual ya que algunos géneros se están por confirmar. Las especies de esta familia prestan diversos servicios ecológicos como por ejemplo: descomponedores de materia orgánica especialmente de plantas angiospermas y gimnospermas, por la gran capacidad para degradar celulosa y lignina causando la podredumbre blanca en el tejido vegetal (Nilsson & Daniel, 1989). Adicionalmente se puede encontrar Ascomycetes de esta familia como patógenos de plantas, o asociados con termitas y otros como hongos endófitos (Rogers et al., 2005; Petrini & Petrini, 1985).

Estudios de la familia Xylariaceae en diversidad, molecular o ecológica en América del Sur son muy escasos, dejando pocos países como referencia, por ejemplo: Argentina (Hladki & Romero, 2010, 2009, 2007), Colombia (Soto & Bolaños, 2013), Brasil (Trierveiler-Pereira et al., 2009; Hamme & Trinidad, 2002; Poroca, 1986) y Venezuela (Rogers & Callan, 1988). En el caso de Ecuador el mayor esfuerzo destinado al estudio de la familia Xylariaceae fue el realizado por Læssøe (2002) donde se aporta con nuevos datos y registros a este grupo de hongos.

1.2.3 Morfología del género *Xylaria*

Xylaria Hill ex Schrank es uno de los géneros más numerosos dentro de la familia Xylariaceae, el cual se caracteriza por presentar ascocarpos en general carbonosos, agrietados, rugosos, peritecios en su mayoría completamente embebidos en el estroma, ostiolo papilados o umbilicados de color negro, ascas cilíndricas inoperculadas estipitadas con anillo apical el mismo que presenta una reacción amiloide en melzer y ascosporas de color marrón a negro con poro germinal (Rogers & Samuels, 1986). Este género es conocido principalmente por su historia taxonómica la cual es confusa debido a que existe un alto grado de variabilidad de las características morfológicas dentro de los individuos de una misma especie o similitud entre especies diferentes. En este grupo de hongos estructuras como los estromas pueden variar mucho en tamaño, color y en forma, estos pueden ser filiformes, ensanchados, simple o bifurcado ya sea en la base o en la punta similares en múltiples especies del género (Lee et al., 2000).

Otro factor a tomar en cuenta es que muchas especies de *Xylaria* son cosmopolitas por lo que han sido descritas más de una vez en estados de desarrollo y localidades diferentes, lo que ha provocado que varios autores en diferentes momentos proporcionen distintos nombres a

una misma especie. Además a este problema se suma que las descripciones originales son muy pobres y la mayoría solo se basan en la forma, color y dimensiones del ascocarpo y las ascosporas (Whalley, 1996; Rogers, 1979) y no se toma en cuenta las características del asca, aparato apical y la superficie de las ascosporas (Suwannasai et al., 2012) que presentan un mayor aporte en cuanto a la delimitación de especies. Estas discrepancias taxonómicas se deben al hecho de que los conceptos de especie para hongos y especialmente en *Xylaria* han variado notablemente entre autores, sumado a la carencia de información o ambigüedad inclusive del material tipo que dio origen al género (Fournier et al., 2011).

1.3 Objetivo o pregunta de investigación

El presente estudio tiene como objetivo identificar especies del género *Xylaria* presentes en el bosque montano tropical de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF) en el sur de Ecuador.

Objetivo General

Realizar una caracterización morfológica y molecular de especímenes de *Xylaria* colectados sobre madera en descomposición y así brindar un aporte taxonómico y de diversidad de especies presentes en el bosque de la RBSF en el Sur del Ecuador.

Objetivo específico

- Caracterizar morfológicamente ascocarpos de *Xylaria* spp. colectados en la Reserva Biológica San Francisco provincia de Zamora Chinchipe.
- Caracterizar molecularmente ascocarpos de *Xylaria* spp. colectados en la Reserva Biológica San Francisco provincia de Zamora Chinchipe.

**CAPÍTULO II.
MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1 Área de estudio

La Reserva Biológica San Francisco (RBSF) se encuentra ubicada entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe (Figura 1), conformada por 1.000 hectáreas de la Cordillera del Consuelo y bordeada por el Parque Nacional Podocarpus, conformada por transectos de bosque montano y algunas áreas perturbadas. Presenta un rango altitudinal comprendido entre los 1.850 a 2.700 m s.n.m. La topografía es muy escarpada con pendientes de entre 40-60° hasta un máximo de 90°. La temperatura promedio anual es de 15 a 17°C (Bussmann, 2003) y la precipitación media anual de 1.950 a 2.200 mm, esta localidad ha sido catalogado como un bosque montano tropical lluvioso (Bussmann, 2003).



Figura 1. Mapa indicativo del área de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF). Transectos muestreados (AT y T2) dentro de la RBSF (flecha negra).

Fuente: <http://www.tropicalmountainforest.org/>

2.2 Especímenes estudiados

Se examinaron 20 especímenes de *Xylaria* spp. depositados en la sección Fungario del Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (HUTPL). Los especímenes fueron

colectados previamente por el personal del Fungario en el periodo Abril 2014 - Octubre 2015 a lo largo de los senderos AT y T2 de la RBSF 03°58'18"S - 079°04'44"W, distribuidos entre los 1.800 – 2.200 m s.n.m. Muchos de estos especímenes cuentan con datos del sustrato sobre el cual se encontraban creciendo, el estado de maduración de la fructificación y sus características macroscópicas. Los códigos de colección HUTPL(F) se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de colección y codificación de los especímenes estudiados dentro del herbario HUTPL.

HUTPL(F)	Provincia	Cantón	Localidad	Colector
581	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	J. S. Eguiguren
603	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba
604	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba
663	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba
704	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	J. B. Beltrán
921	Zamora- Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	D. Cruz, P.P.Daniëls, O. Flores
1077	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba, P. Daniëls & J.S. Eguiguren
1083	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba, P. Daniëls & J.S. Eguiguren
1100	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba, P. Daniëls & J.S. Eguiguren
1436	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba; J.S. Eguiguren
1437	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba; J.S. Eguiguren
1448	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba; J.S. Eguiguren
1458	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba; J.S. Eguiguren
1497	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba; J.S. Eguiguren
1514	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	A. Chamba; J.S. Eguiguren
1532	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	D. Cruz; J.S. Eguiguren; O. Flores
1533	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	D. Cruz; J.S. Eguiguren; O. Flores

1542	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	D. Cruz; J.S. Eguiguren; O. Flores
1543	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	D. Cruz; J.S. Eguiguren; O. Flores
1559	Zamora Chinchiipe	Zamora	Reserva Biológica San Francisco	J.S. Eguiguren; O. Flores

Fuente: Base de datos Fungario HUTPL.

2.3 Caracterización morfológica

Para la obtención de las características macroscópicas superficiales como coloración y textura además de medidas de largo y ancho de los ascocarpos se empleó un calibrador y estereomicroscopio. Para observar las características microscópicas se realizó cortes transversales y horizontales de los estromas donde se registró el color del estroma, disposición de los peritecios y tipologías de ostiolos, ascas y ascosporas, para lo cual se empleó la guía de estructuras microscópicas de Largent et al. (1977). Cada una de las placas de los especímenes fueron sometidas a diferentes reacciones [i.e. una gota de azul de algodón [(0,1 mg azul de anilina disuelto en ácido láctico puro a 60 g); melzer (0.5 mg de cristales de iodo, 1.5 mg ioduro de potasio, 20 mg de hidrato cloral, 20 mL de agua destilada); y KOH al 3% respectivamente]. La observación al microscopio se la realizó en el equipo Olympus BX51 con iluminación DIC, a magnificación de 20X hasta 100X. Para que los datos sean estadísticamente significativos se realizó 30 mediciones del largo y ancho en la parte más gruesa de estructuras como: ascas y ascosporas, de estas últimas además se procedió a calcular el valor Q (largo/ancho), además de fotografías de todas las estructuras microscópicas con ayuda del software iwork (<http://www.nahwoo.co.kr/iworks-series>). Se elaboraron ilustraciones científicas para todas las muestras, con la ayuda de un tubo de dibujo adaptado al microscopio Olympus BX51.

2.4 Caracterización molecular

Se realizó la extracción de ADN desde los estromas de los distintos individuos de *Xylaria* empleando principalmente porciones secas de los peritecios de aproximadamente 1 mm. Para ello se utilizó el kit de extracción Phire® Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific) bajo las normativas estipuladas por el fabricante empleando la polimerasa Phire-Hot Start II DNA. La región de ADN a amplificar fue ITS-5.8S + LSU parcial (Dominio D1/D2).

Los primers universales empleados para la PCR anidada fueron: primera PCR, ITS1-F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' (Gardes & Bruns, 1993), LR5 5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3' (Vilgalys & Hester, 1990) y segunda PCR, ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (White et al., 1990) y NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (O'Donnell, 1993).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C por 5 s, 40 ciclos, cada ciclo constaba de un paso de desnaturalización a 98°C durante 10 s, anillamiento de primers a una temperatura de 55°C por 20 s, una extensión inicial a 72°C durante 30 s y la extensión final a 72°C por 10 min. El volumen de reacción final de la PCR fue de 20 µl. Los protocolos de PCR usados en este estudio están debidamente probados en estudios anteriores desarrollados por Cruz et al. (2016, 2014, 2011) y Suárez et al. (2006).

Los productos de PCR fueron evaluados en electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se tomó 1 µL del producto de PCR más 1,5 µL de azul de bromofenol para cada pocillo y 1,5 µL de marcador de peso molecular (1 Kb) fue adicionado en el primer pocillo como referencia. La corrida del gel se realizó en el Buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA). Las condiciones de corrida fueron a 28 V, 300 mA durante 25 minutos. La observación del gel se realizó en un transiluminador UV.

Todos los productos positivos de la PCR fueron purificados utilizando Polietilenglicol al 20% (PEG 8000, 2.5 M NaCl) e incubados a una temperatura de 37°C por 15 min, luego se procedió al centrifugando a máxima velocidad por 15 min y un posterior lavado usando etanol frío al 80%. Una vez que los tubos que contenían el pellet se secan completamente el ADN se resuspendió en agua desionizada. Todos los productos positivos fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Seoul - Korea).

Para el análisis de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) se empleó OPTSIL (Göker et al., 2009) a tres porcentajes de divergencia (3%, 5%, 7%) a partir del alineamiento de las secuencias de la región ITS-5.8S.

2.5 Análisis filogenético

Todas las secuencias obtenidas en este estudio fueron revisadas y editadas en el software Codon Code Aligner 5.1.4 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA). Luego se procedió a realizar una comparación entre las secuencias de nuestro estudio y las que se encuentran en la base de datos GenBank, NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

usando la herramienta BLAST. Las secuencias se alinearon usando la estrategia GINSI en el software MAFFT v.7.299 (Kato & Standley, 2013).

Se construyó tres árboles filogenéticos del tipo Máxima verosimilitud bajo los parámetros de 1000 réplicas de bootstrap (BS), modelo general time reversible (GTR) empleando el software de análisis genético y evolución MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). Dos de los árboles se realizaron separadamente para las regiones ITS-5.8S y otro con la región LSU parcial más secuencias disponibles en la base de datos GenBank. Para la filogenia ITS-5.8S se realizó la extracción de toda la región ITS-5.8S de nuestras secuencias con el programa ITSx versión 1.0.11 (Bengtsson-Palme et al., 2013). Así mismo se desarrolló un árbol filogenético concatenado (ITS-5.8S –LSU parcial) para todas las secuencias generadas en este estudio.

Previo a los árboles citados en este estudio, se realizaron múltiples filogenias preliminares basadas en el método Neighbor joining, usando el software MEGA v.6, que no se muestran, pero ayudaron al filtrado y selección de secuencias que no aportaban información, ni afectaban los soportes de nuestros clados.

**CAPÍTULO III.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1 Caracterización morfológica

De 20 especímenes analizados de *Xylaria* se logró determinar morfológicamente un total de 11 especímenes que corresponden a ocho morfo-especies: *Xylaria adscendens*, *X. anisopleura*, *X. apiculata*, *X. curta*, *X. globosa*, *X. multiplex*, *X. Telfairii* y *X. tuberosides*. Por otra parte ocho especímenes codificados como: HUTPL(F)-603, HUTPL(F)-604, HUTPL(F)-663, HUTPL(F)-921, HUTPL(F)-1077, HUTPL(F)-1100, HUTPL(F)-1436, HUTPL(F)-1533 no pudieron ser clasificados en morfotipos debido a su estado asexual-anamorfo con hifas y conidias las cuales son similares en muchas especies. Dichas estructuras no representan un valor taxonómico ya que es ambigua la discriminación de especies (U'ren et al., 2016; Medel et al., 2010). Por lo que no se puede asignar con certeza un epíteto a estos morfotipos, sin embargo a pesar de esto en la actualidad existen demasiadas colecciones que consisten en estromas estériles (anamorfos) que reciben nombres, lo cual incrementa la problemática y confusión dentro de este género (Fournier, 2014). El espécimen con el código HUTPL(F)-1543 presentó características teleomórficas exclusivas y diferentes a todos los demás especímenes y especies descritas según las claves taxonómicas y bibliografía revisadas. Por esta razón a este espécimen se lo considera un morfotipo diferente que podría representar una especie nueva para la ciencia.

3.1.1 Especies identificadas

Xylaria adscendens. (Fr.) Fr., Nova Acta R. Soc. Scient. upsal., Ser. 3 1(1): 128 (1851) [1855]. (Figuras 2, 3, 6).

Sinónimo: *Sphaeria adscendens* Fr. 1830

Ascocarpo de 32 – 50 x 3 – 5 mm, cilíndrico solitario en ocasiones gregario no ramificado. Ápice estéril puntiagudo. Estipe 8 – 22 x 1 – 2 mm. Superficie externa color negro, rugoso con grietas. Superficie interna color blanco a crema. Peritecios completamente inmersos en el estroma de color negro. Ostiolos papilados que le otorgan una superficie áspera al exterior. Ascas unitunicadas, estipitadas, cilíndricas, inoperculadas conteniendo ocho ascosporas de 75 – 84 x 4 – 5 μ m. Aparato apical de 2 – 3 x 1 – 2 μ m, presenta una reacción amiloide al melzer. Ascosporas de (10–) 11 (–12) x (4–) 5 (–6) μ m y un valor Q= 2.6 μ m (n= 30), elipsoides inequilaterales uniseriadas, color marrón, con gotas de aceite al interno, y poro germinal longitudinal en posición ventral a lo largo de toda la longitud de la ascospora (Anexo 1).

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto

AT, creciendo sobre madera en descomposición, 19-Mayo-2015, HUTPL(F)-1448; misma localidad, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 3-Abril-2014, HUTPL(F)-604 (estado asexual).

Los especímenes (HUTPL(F)-1448, HUTPL(F)-604) para *X. adscendens* son similares a otros caracterizados con descripciones detalladas por Trierveiler-Pereira et al (2009); Medel et al. (2008); Van der Gucht (1995) Dennis (1974, 1957) a partir de colecciones provenientes de Brasil, Papúa Nueva Guinea, México y de bosques tropicales de América, En el caso de HUTPL(F)-604 únicamente se cuenta con la caracterización filogenética debido a que por su estado anamorfo no presenta estructuras características que nos permitan su identificación morfológica. Sin embargo el dato molecular asocia a la secuencia de este espécimen con secuencias nombradas con *X. adscendens* (Figura 10).

Xylaria anisopleura (Mont.) Fr., Nova Acta R. Soc. Scient. upsal., Ser. 3 1(1): 127 (1851) [1855]. (Figuras 2, 3).

Sinónimo: *Hypoxyton anisopleuron* Mont. 1840

Ascocarpo de 9 – 12 x 3 – 4 mm, subgloboso, moriforme clavado de crecimiento gregario, generalmente no ramificado. Ápice fértil redondeado. Estipe de 2 – 4 x 0.7 – 1 mm. Superficie externa de color negro a marrón muy oscuro moriforme, áspera agrietada. Superficie interna de color blanca con una pequeña línea negra en la base del estroma. Peritecios inmersos en el estroma de color negro. Ostiolos umbilicados. Asca con ocho ascosporas unitunicada cilíndrica estipitada, inoperculada de 142 – 164 x 9 – 12 μ m. Aparato apical de 8 – 9 x 5 – 7 μ m, muestra una reacción amiloide en el reactivo de yodo melzer. Ascosporas de (19–) 23 (–28) x (7–) 9 (–13) μ m, valor Q= 2.4 (n= 30), elipsoides inequilaterales uniseriadas de color marrón oscuro, presentan de uno a dos gotas de aceite en el interior, poro germinal oblicuo o en espiral longitudinal, generalmente en el lado ventral y de menor tamaño que la longitud de la ascospora (Anexo 2).

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto T2, creciendo sobre madera en descomposición, 02-Junio-2015, HUTPL(F)-1458.

El espécimen (HUTPL(F)-1458) catalogado como *Xylaria anisopleura* se corresponde correctamente en varios de sus caracteres morfológicos macro y microscópicos a más de sus medidas, con las descripciones de especímenes de bosques tropicales revisados por Trierveiler-Pereira et al. (2009); Ju & Rogers (1999); Van der Gucht (1995); Dennis (1974); Carroll (1964).

Xylaria apiculata Cooke, Grevillea 8(no. 46): 66 (1879). (Figuras 2, 3).

Ascocarpo de 11 – 23 x 2 – 3 mm, cilíndrico en ocasiones presenta hendiduras, de crecimiento solitario. Ápice fértil estrecho cónico. Estipe de 5 – 10 x 0.4 – 1 mm, fibriloso. Superficie externa áspera rugosa, dura de color negruzco. Superficie interna de color blanco a crema. Peritecios completamente inmersos en el estroma, de color negro ubicados a lo largo de todo el estroma. Ostiolos poco visibles umbilicados. Ascas cilíndricas, estipitadas, unitunicadas, inoperculadas con ocho ascosporas de 90 – 110 x 6 – 10 μm . Aparato apical de 9 – 11 x 5 – 8 μm , presentan una reacción amiloide en presencia de melzer. Ascosporas de (14–) 16 (–18) x (6–) 7 (–8) μm , valor $Q= 2.5 \mu\text{m}$ (n= 30), uniseriadas, elipsoides inequilaterales, con poro germinal ventral longitudinal menor al tamaño de la ascospora (Anexo 3), con uno o dos gota de aceite en el interior, ascosporas de color café a marrón.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 03-Abril-2014, HUTPL(F)-581; misma localidad, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición 03-Julio-2014, HUTPL(F)-704.

Los especímenes (HUTPL(F)-581, HUTPL(F)-704) se asemejan claramente a la especie *Xylaria apiculata*, la cual es ampliamente descrita por varios autores como por ejemplo Dennis (1956) y Van der Gucht (1995).

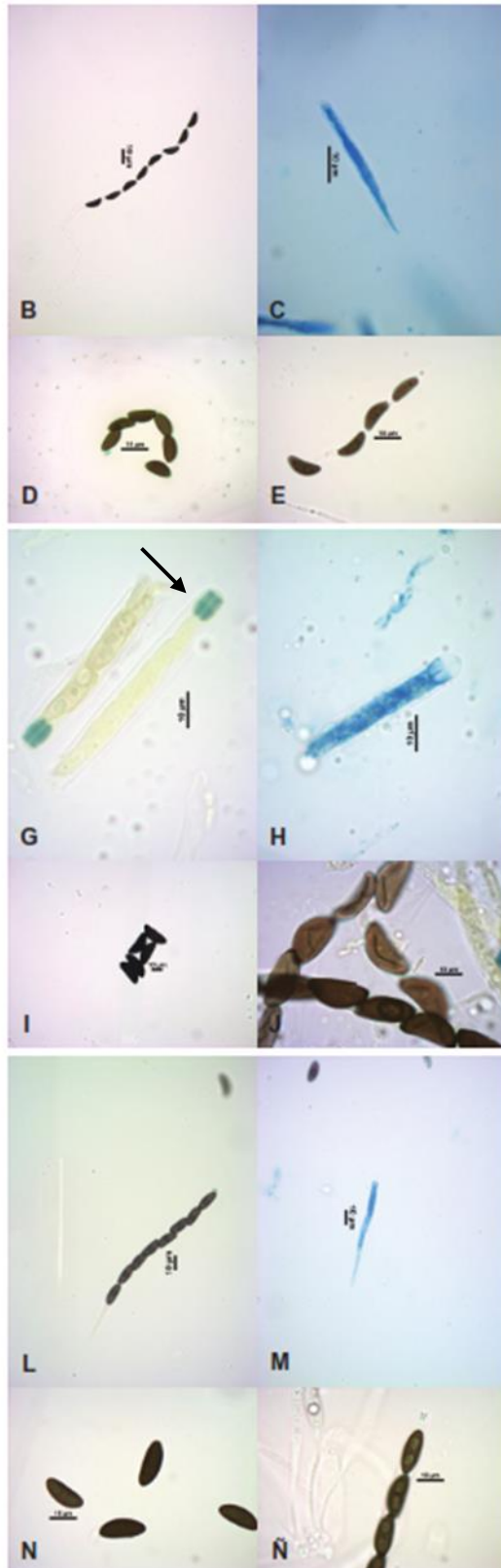
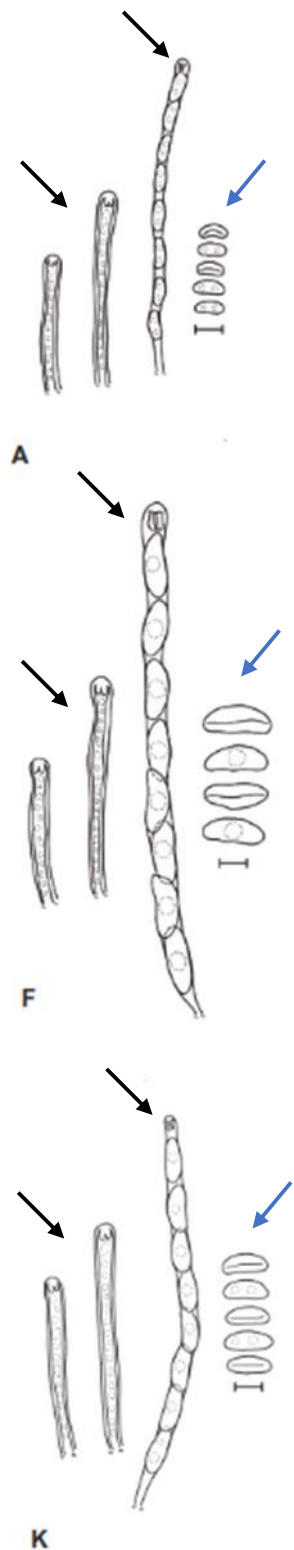


Figura 2. A-E. *Xylaria adscendens*: A, ilustración, las flechas negras muestran ascas en formación con aparato apical, la flecha azul indica ascosporas con presencia de un poro germinal. B, asca con ocho ascosporas teñida con KOH en aumento de 20X. C, asca joven pigmentada con cotton blue en aumento de 40X. D-E, ascosporas color marrón teñidas con melzer en aumento de 100X; F-J. *Xylaria*

anisopleura: F, ilustración, las flechas negras muestran ascas en formación con aparato apical, la flecha azul indica ascosporas con presencia de un poro germinal. G, la flecha negra indica el aparato apical de color azul teñido con melzer en aumento de 100X. H, asca joven pigmentada con coton blue en aumento de 100X. I, ascosporas de color marron teñidas con melzer en aumento de 40X. J, ascosporas de color marron teñidas con melzer en aumento de 100X; K-Ñ. *Xylaria apiculata*: K, ilustración, las flechas negras muestran ascas en formación con aparato apical, la flecha azul indica ascosporas con presencia de un poro germinal. L, asca teñida con KOH en aumento de 20X, M, asca joven pigmentada con coton blue en aumento de 20X, N, Ñ, ascosporas teñidas con melzer en aumento de 100X. Barras = 10 um.

Fuente: Autor.



Figura 3. Fotografías de la superficie externa del ascocarpo de: A. *Xylaria adscendens*; B. *Xylaria anisopleura*, la flecha negra muestra los peritecios embebidos en el estroma; C, D. *Xylaria apiculata*. Barras= 1 cm.

Fuente: Autor.

Xylaria curta P. , Nova Acta R. Soc. Scient. Upsal. , Ser. 3 1 (1): 126 (1851) [1855]. (Figuras 4, 5).

Sinónimo: *Xylosphaera curta* (Fr.) Dennis , Kew Bull. [13] (1): 103 (1958)

Ascocarpo de 23 – 33 x 3 – 6 mm, de crecimiento solitario, en ocasiones 2 a 6 juntos, cilíndricos. Ápices fértiles redondeados. Estipe de 8 – 11 x 1 – 3 mm. Superficie externa de color negro, áspero, rugoso, agrietada en ocasiones presenta una cubierta de escamas que le confieren un color blanquecino. Superficie interna color crema un poco blanquecina en ocasiones hueca. Peritecios completamente inmersos en el estroma, globoso de color negro. Ostiolos papilados. Ascas unitunicadas, estipitadas, inoperculadas, cilíndricas contiene ocho

ascosporas de 65 – 77 x 4 – 8 μm . Aparato apical de 2 – 3 x 1 – 2 μm , con reacción amiloide en presencia del reactivo melzer. Ascosporas uniseriadas, inequilaterales, elipsoides de (9–) 10 (–11) x (4–) 4.5 (–5) μm , valor Q= 2.2 (n= 30), poro germinal transversal, aproximadamente del tamaño del ascospora, ubicado en la parte ventral aunque en acciones también se la puede observar en alguno de sus costados (Anexo 4), ascosporas de color marrón a café.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto T2, creciendo sobre madera en descomposición, 25-Agosto-2016, HUTPL(F)-1532.

Nuestro espécimen (HUTPL(F)-1532) presentó una morfología semejante a la mostrada por descripciones para *Xylaria curta* detalladas en varios estudios por Trierveiler-Pereira et al. (2009); Ju & Rogers (1999); Van der Gucht (1995); Dennis (1956) de muestras provenientes de México, Brasil, Costa Rica, Francia y Venezuela, con ciertas variaciones en el tamaño del ascocarpo sin embargo esto se puede deber al estado de desarrollo del espécimen.

Xylaria globosa (Pers.) Mont., (1855). (Figura 4, Figuras 5, 6).

Sinónimo: *Diderma globosum* Pers. 1794

Ascocarpo de 16 – 29 x 4 – 8 mm, con formas muy variables algunas cilíndricas otras con forma de fresa. Ápice fértil generalmente termina en punta pero en algunos caso se lo puede encontrar un poco redondeado. Estipe de 5 – 14 x 1 – 2 mm, en algunos casos está casi ausente. Superficie externa color negra, rugosa, agrietada. Superficie interna color blanco un poco crema una vez seca. Peritecios completamente embebidos en el estroma de color negro. Ostiolos papilados. Ascas estipitadas, cilíndricas, unitunicadas, inoperculadas con ocho ascosporas de 146 – 210 x 8 – 14 μm . Aparato apical de 7 – 10 x 5 – 7 μm , presenta una reacción amiloide frente al reactivo melzer. Ascosporas de (25–) 28 (–33) x (8–) 9 (–11) μm , valor Q= 3 (n= 30), elipsoides inequilaterales, color marrón oscuro. Poro germinal menor al tamaño de la ascospora trasversal oblicuo ubicado generalmente en la parte media (Anexo 5), presenta de una a dos gotas de aceite en el interior.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto T2, creciendo sobre madera en descomposición, 07-Julio-2016, HUTPL(F)-1497; misma localidad, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 05-Junio-2014 HUTPL(F)-663 (estado asexual).

Los especímenes (HUTPL(F)-663, HUTPL(F)-1497) caracterizados como *Xylaria globosa* se identificaron morfológicamente en función del trabajo desarrollado por Hladki & Romero (2010)

en el cual se presenta una clave taxonómica sobre el género *Xylaria* en Argentina. En relación al espécimen HUTPL(F)-663 no se cuenta con una caracterización morfológica del mismo debido a que el material examinado se encontraba en estado asexual impidiendo así su identificación en base a caracteres morfológicos. No obstante el análisis molecular asocia a la secuencia de este espécimen con secuencias nombradas como *X. globosa* en el GenBank (Figura 10).

Xylaria multiplex (Kunze) Fr., Nova Acta R. Soc. Scient. upsal., Ser. 3 1(1): 127 (1851) [1855]. (Figuras 4, 5, 7).

Sinónimo: *Sphaeria multiplex* Kunze 1830

Ascocarpo de 17 – 48 x 1 – 4 mm, creciendo en grupos en algunas ocasiones ramificado o gregario. Estipe de 3 – 22 x 1 - 2 mm. Ápice fértil, Superficie externa de color negro lisa un poco agrietada con surcos. Superficie interna de color blanco con una línea central de color negro. Peritecios completamente inmersos en el estroma. Ostiolos papilados. Ascas cilíndricas, unitunicadas, inoperculadas, estipitadas con ocho ascosporas de 66 - 99 x 4– 6 µm. Aparato apical de 2 – 4 x 2 – 3 µm, presentan reacción amiloide frente al reactivo melzer. Ascosporas de (11–) 13 (–16) x (4–) 5 (–6) µm, valor Q= 3 (n= 30) de color marrón elipsoides inequilaterales, poro germinal longitudinal menor al tamaño de la ascospora (Anexo 6), con dos gotas de aceite en el interior.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincia de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 21-Julio-2016, HUTPL(F)-1514; misma localidad, transecto T2, creciendo sobre madera en descomposición, 25-Agosto-2015, HUTPL(F)-1542; misma localidad, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 19-Mayo-2015, HUTPL(F)-1436 (estado asexual).

La caracterización morfológica de los especímenes (HUTPL(F)-1436, HUTPL(F)-1514, HUTPL(F)-1542) se corresponden con la descripción de *Xylaria multiplex*, la cual presenta varios problemas, debido a su gran variación en medidas y formas como lo describen ya varias investigaciones realizadas por Hladki & Romero (2010); Trierveiler-Pereira et al. (2009); Medel et al. (2008); Ju & Rogers (1999); Van der Gucht (1995); Dennis (1956). Esta especie ha sido resaltada como una de las más conflictivas dentro del género *Xylaria* según Dennis (1956), ya que se reporta que existe un gran número de especies dentro de esta morfología constituyéndose en un complejo de especies (eg. *Xylaria multiplex-arbuscula-apiculata*) (Medel et al., 2008). Adicionalmente se suma el hecho de que esta especie fue una de las primeras en ser descrita dentro del género *Xylaria*, contando con más diez sinónimos

dificultando una adecuada delimitación de la misma (Medel et al., 2008). Uno de los especímenes (HUTPL(F)-1436) se encontró en estado asexual lo cual impidió su definición morfológica. Sin embargo la secuencia molecular se agrupa con las secuencias para los otros especímenes determinados como *Xylaria multiplex* (Figura 10).

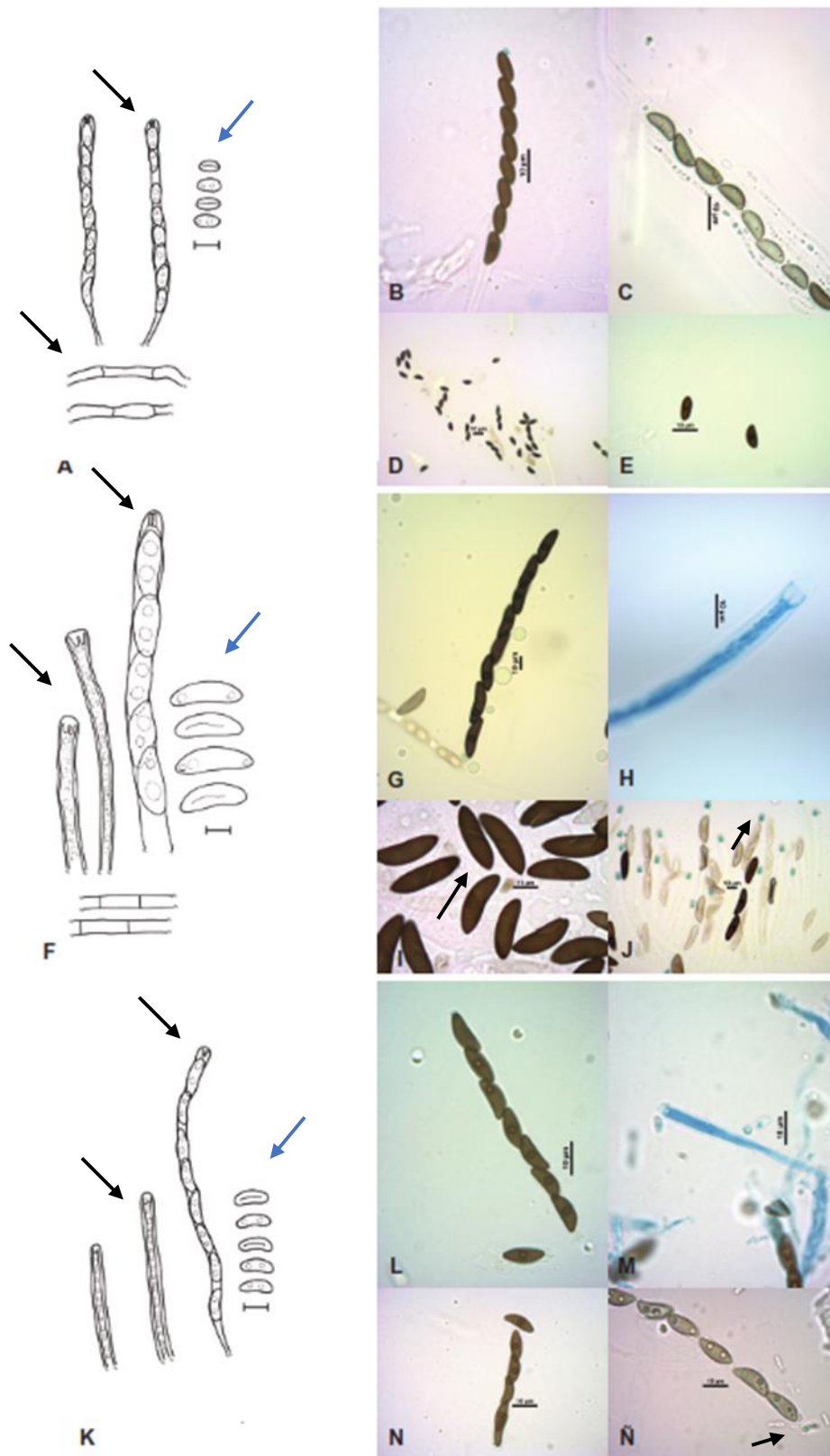


Figura 4. A-E. *Xylaria curta*: A, Ilustración, las flechas negras muestran hifas y ascas con aparato apical, la flecha azul indica ascosporas con presencia de un poro germinal. B asca con ocho ascosporas teñida con melzer en aumento de 100X. C, asca teñida con KOH en aumento de 100X; D ascosporas

teñidas con melzer en aumento de 40X. E, ascosporas de color marron teñidas con melzer en aumento de 100X; F-J. *Xylaria globosa*: F, Ilustración, las flechas negras muestran las ascas en formacion con aparato apical, la flecha azul indica ascosporas con presencia de un poro germinal. G, asca con ocho ascoporas teñida con melzer en aumento de 40X. H, asca joven pigmentada con coton blue en aumento de 100X. I, ascosporas de color marron, la flecha negra muestra el poro germinal en aumento de 100X. J, ascosporas, la flecha negra indica la presenica del aparato apical pigmentado con melzer en aumento de 40X; K-Ñ. *Xylaria multiplex*: K, ilustración, las flechas negras muestran las ascas en formacion con aparato apical, la flecha azul indica ascosporas con presencia de un poro germinal. L, asca con ocho ascosporas teñidas con KOH en aumento de 100X. M, asca joven pigmentada con coton blue en aumento de 100X. N, ascosporas de color marron teñida con KOH en aumento de 100X, Ñ, ascosporas, la flecha negra indica la presenica del aparato apical teñido con KOH en aumento de 100X . Barras= 10 µm.

Fuente: Autor.



Figura 5. Fotografías de la superficie externa del ascocarpo de: A. *Xylaria curta*, la flecha negra indica los peritecios embebidos en el estroma; B. *Xylaria globosa*; C, D. *Xylaria multiplex*. Barras= 1 cm.

Fuente: Autor.

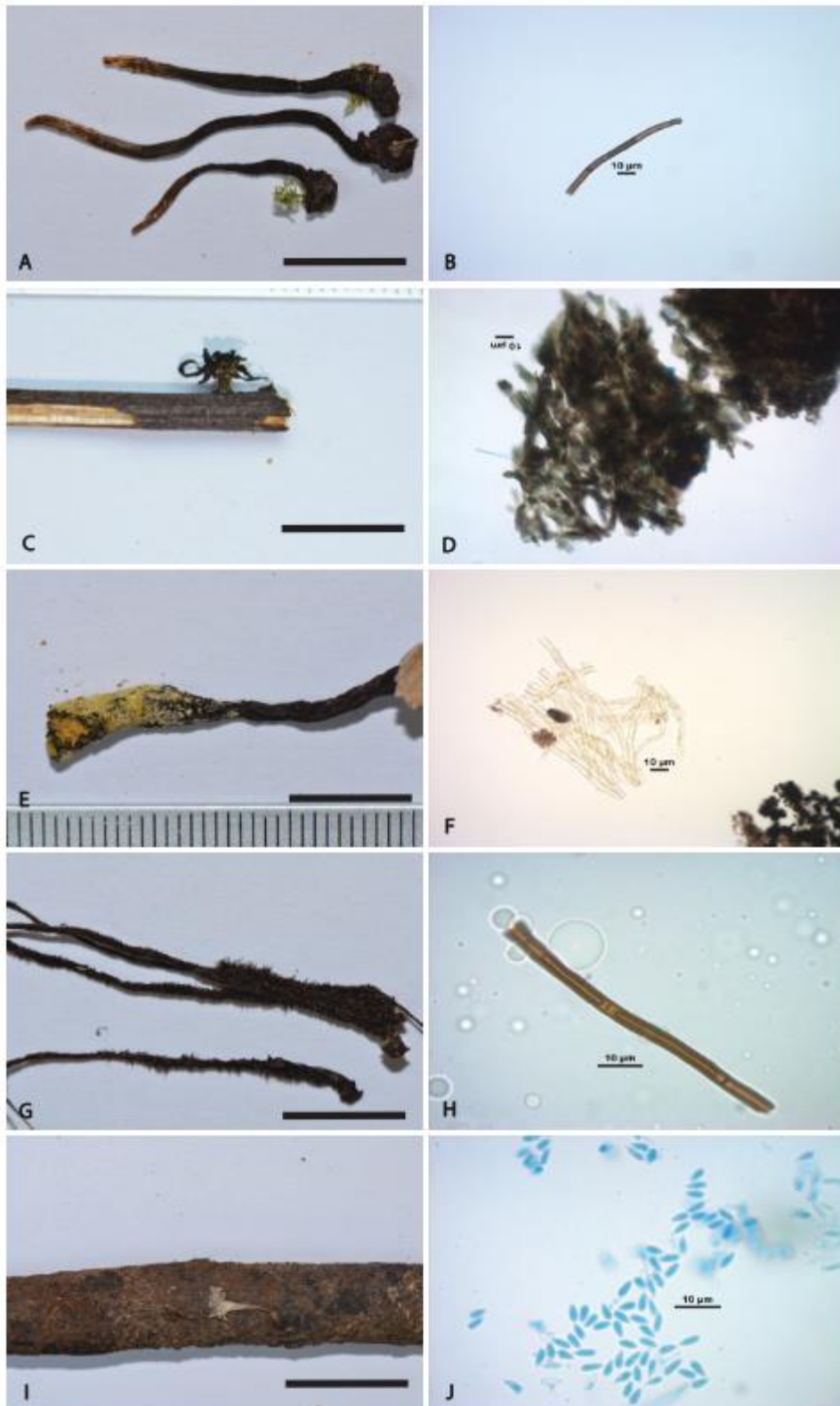


Figura 6. A, B *Xylaria adscendens* estado asexual (HUTPL(F)-604): A, fotografía del ascocarpo, B, hifa septada teñida con coton blue en aumento de 40X; C, D. *Xylaria aff. comosa* estado asexual (HUTPL(F)-921): C, fotografía del ascocarpo. D, hifas septadas teñidas con coton blue en aumento de 40X; E, F. *Xylaria globosa* estado asexual (HUTPL(F)-663): E, fotografía del ascocarpo. F, hifas

septadas teñidas con melzer en aumento de 40X; G, H. *Xylaria* sp. estado asexual (HUTPL(F)-603): G, fotografía del ascocarpo, H, hifa septada teñida con coton blue en aumento de 40X; I, J. *Xylaria* sp. estado asexual (HUTPL(F)-1077): I, fotografía del ascocarpo, J, conidiosporas teñidas con coton blue aumento de 100X. Las barras de la las fotografías de la columna izquierda equivalen a 1 cm y las de la columna derecha a 10 μ m.

Fuente: Autor.



Figura 7. A, B. *Xylaria* sp. estado asexual (HUTPL(F)-1100): A, fotografía del ascocarpo. B, conidiosporas teñidas con coton blue en aumento de 40X; C, D. *Xylaria multiplex* estado asexual (HUTPL(F)-1436): C, fotografía del ascocarpo. D, resto de ascospora teñida con melzer en aumento de 100X; E, F. *Xylaria* sp. estado asexual (HUTPL(F)-1533): E, fotografía del ascocarpo, F, hifas septadas teñidas con KOH en aumento de 100X. Las barras de las fotografías de la columna izquierda equivalen a 1 cm y las de la columna derecha a 10 μ m.

Fuente: Autor.

Xylaria telfairii (Berk.) Sacc., Syll. fung. (Abellini) 1: 320 (1882). (Figuras 8, 9).

Sinónimo: *Sphaeria telfairii* Berk. 1839

Ascocarpo de 62 – 95 x 13 – 14 mm, solitario o en grupos muy pequeños, cilíndrico, clavado. Ápice redondeado fértil. Estipe de 16 – 57 x 4 mm, en la mayoría de los casos es muy corto. Superficie externa lisa, dura, color amarillento a café amarillento. Superficie interna color

blanco con el tiempo se pueden volver hueca. Peritecios embebidos en el estroma de color negro. Ostiolos umbilicados puntiformes. Ascas unitunicadas, estipitadas, inoperculadas con ocho ascosporas cilíndrica de 124 – 153 x 6 – 11 μm . Aparato apical de 5 – 6 x 3 – 5 μm , muestra una reacción amiloide en presencia de melzer. Ascosporas de (18–) 22 (–25) x (5–) 7 (–9) μm , valor Q= 3.1 μm (n= 30), elipsoides, inequilaterales, color marrón, presencia de poro germinal longitudinal menor al tamaño de la ascospora, ubicada de forma recta, oblicua o un poco curva en el lateral (Anexo 7), presentan una o dos gotas de aceite en el interior.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto T2, creciendo sobre madera en descomposición, 05-Marzo-2015, HUTPL(F)-1083; misma localidad, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 19-Mayo-2016, HUTPL(F)-1437.

En el caso de los especímenes (HUTPL(F)-1083, HUTPL(F)-1437) catalogados morfológicamente como *Xylaria telfairii*, se muestran un poco diferentes con ciertas variaciones en cuanto al tamaño del estipe. En HUTPL(F)-1083 el estipe es de 57 mm de largo x 4 mm de ancho, en tanto que en HUTPL(F)-1437 el estipe presenta valores de 16 mm de largo x 4 mm de ancho. En relación al tamaño de las ascosporas no existe mayor diferencia (18-) 21 (-25) μm de largo x (6-) 7 (-9) μm de ancho para HUTPL(F)-1083 y medidas de (18-) 21 (-24) μm largo x (5-) 7 (-9) μm ancho en HUTPL(F)-1437, lo mismo ocurre con los tamaños de las ascas y aparato apical. Un factor a tomar en cuenta que puede explicar estas pequeñas variaciones encontradas sobre todo en lo que se refiere al tamaño del estipe, se puede deber al alto grado de variabilidad morfológica entre individuos dentro de la misma especie principalmente en cuanto a ascocarpos dentro de *Xylaria* (Dennis, 1957). Es conocido que una misma especie en *Xylaria* puede variar mucho en tamaño, color y forma lo cual se encuentran relacionadas con el estado de desarrollo (Lee et al., 2000). Estas variaciones han dado lugar a la descripción de grupos erróneos, por lo que varias especies supuestamente distintas morfológicamente pertenezcan a un solo taxón (Dennis, 1956). Tomado en cuenta todo lo anteriormente expuesto es muy probable que nuestros especímenes (HUTPL(F)-1083, HUTPL(F)-1437) propuestos como *Xylaria telfairii* corresponden a esta especie a pesar de sus ligeras variaciones.

Xylaria tuberosides Rehm, Hedwigia 40 : 146 (1901). (Figuras 8, 9).

Ascocarpo de 12 – 16 x 8 – 11 mm, globosos, esférico. Ápice fértil. Estipe de 3 – 4 x 2 – 4 mm. Superficie externa de color negro dura. Superficie interna de color blanco un poco crema. Peritecio de color negro completamente inmerso en el estroma. Ostiolos papilados. Ascas

unitunicadas, estipitadas, cilíndricas, inoperculadas de 156 – 203 x 7 – 12 μm . Aparato apical de 5 – 6 x 3 – 5 μm , presenta una reacción amilodes frente al reactivo melzer. Ascosporas de (24–) 28 (–32) x (6–) 7 (–11) μm , valor $Q= 3.9$ ($n=40$), de color marrón oscuro, elipsoides, uniseriadas, inaquilaterales, poro germinal ventral longitudinal menor que el largo de la ascospora (Anexo 8), generalmente presentan de dos a tres gotas de aceite en el interior.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto AT, creciendo sobre madera en descomposición, 3-Septiembre-2015, HUTPL(F)-1559.

En el caso del morfotipo para *Xylaria tuberoides* correspondiente al espécimen (HUTPL(F)-1559) muestra una diferencia en cuanto a la forma del ascocarpo (subgloboso) en comparación con el resto de especies de *Xylaria* examinados, los cuales en su mayoría son fusiformes o clavados. Nuestro espécimen se lo ha clasificado como *X. tuberoides* ya que concuerda con los datos morfológicos obtenidos por Silva (2015). Sin embargo presenta variaciones en el ancho del estroma lo cual se puede deber al estado de desarrollo del espécimen.

***Xylaria* sp.** (Figuras 8, 9).

Ascocarpo de 65 – 99 x 4 – 8 mm. Estipe de 30 – 47 x 3 – 4 mm. Ápice fértil. Superficie externa estriada con surcos de color negro. Superficie interna color crema blanquecina. Peritecios completamente inmersos en el estroma. Ostiolos papilados. Ascas unitunicadas inoperculadas, estipitadas de 133 – 169 x 5 – 11 μm . Aparato de apical de 4 – 5 x 3 – 4 μm , presenta reacción amiloide en presencia de melzer. Ascosporas de (28–) 33 (–36) x (5–) 6 (–7) μm , valor $Q= 5.5$ ($n= 30$), elipsoides, inequilaterales, uniseriadas de color marrón oscuro, poro germinal longitudinal en posición ventral de menor tamaño que el largo de la ascospora, (Anexo 9) presenta de dos a tres gotas de aceite en el interior.

Especímenes examinados: América del Sur, Ecuador, Zamora Chinchipe, el Tambo, Km 30 entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Reserva Biológica San Francisco, transecto T2, creciendo sobre madera en descomposición, 25-Agosto-2015, HUTPL(F)-1543.

El espécimen (HUTPL(F)-1543), presenta su morfológica teleomórfica diferente a todos los especímenes estudiados y a todas las especies descritas según la bibliografía revisada. Una de sus principales diferencias es el tamaño de las ascosporas (28–) 33 (–36) x (5–) 6 (–7) μm , mucho más grande que otras especies. Esta diferencia en tamaño de ascosporas nos deja la alta probabilidad de que esta especie corresponda a una especie nueva para la ciencia. Adicionalmente la secuencia obtenida para este espécimen, no se agrupa con ninguna otra

secuencia con nombre científico depositada en la base de datos GenBank. No obstante la carencia de secuencias para especies descritas de *Xylaria*, no permiten afirmar a esta especie como nueva.

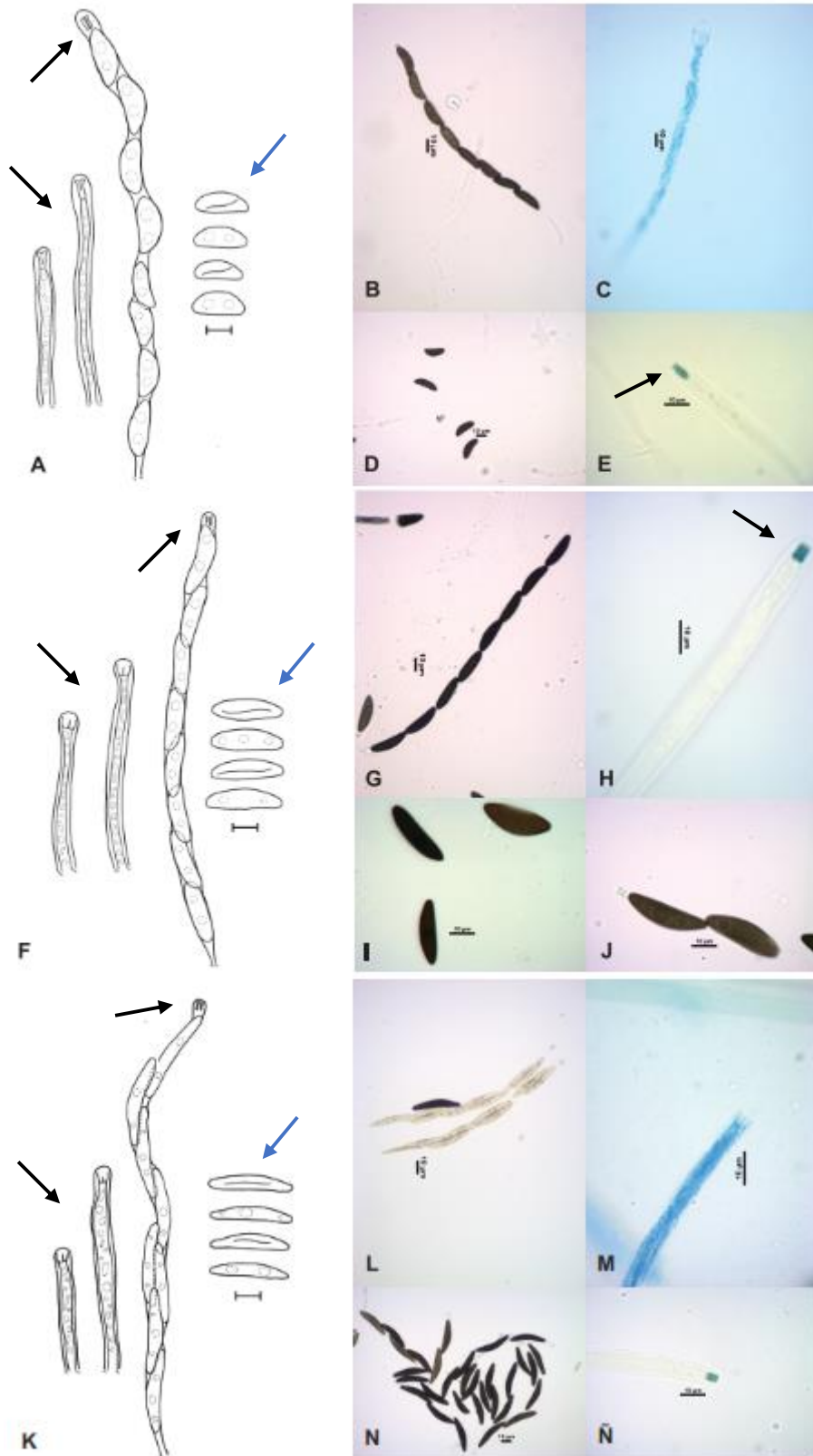


Figura 8. A-E. *Xylaria telfairii*: A, ilustración, las flecha negras muestran las ascas y aparato apical, la flecha azul indica las ascosporas con presencia de un poro germinal. B, asca con ocho ascosporas teñida con KOH en aumento de 40X. C, asca joven pigmentada con coton blue en aumento de 40X. D, ascosporas de color marron teñidas con coton blue en aumento de 40X. E, la flecha negra indica el

aparato apical pigmentado con melzer en aumento de 100X; F-J. *Xylaria tuberoides*: F, ilustración, las flechas negras muestran las ascas y aparato apical, la flecha azul indica las ascosporas con presencia de un poro germinal. G, asca con ocho ascosporas teñida con KOH en aumento de 40X. H, la flecha negra indica el aparato apical pigmentado con melzer en aumento de 100X. I, J, ascosporas de color marron teñidas con melzer en aumento de 100X; K-Ñ. *Xylaria* sp (HUTPL(F)-1543): K, ilustración, las flechas negras muestran las ascas y aparato apical, la flecha azul indica las ascosporas con presencia de un poro germinal. L, ascas con ocho ascosporas teñida con melzer en aumento de 40X; M, asca jóvenes teñidas con coton blue en aumento de 100X; N, ascosporas de color marron oscuro teñidas con melzer en aumento de 40X; Ñ, asca con aparato apical teñida con melzer en aumento de 100X. Barras= 10 µm.
Fuente: Autor.



Figura 9. Fotografías de la superficie externa del ascocarpo de: A,B. *Xylaria telfairii*; C. *Xylaria tuberoides*; D. *Xylaria* sp. (HUTPL(F)-1543). Barras= 1 cm.
Fuente: Autor.

3.2 Caracterización molecular

De los 20 especímenes de *Xylaria* examinados molecularmente en este estudio, se obtuvieron 19 secuencias para la región de DNAnr ITS-5.8S y un total de 15 para la región de DNAnr LSU. El espécimen HUTPL(F)-1533 no se logró secuenciar para ninguna de las dos regiones de ADN, y otros especímenes únicamente para la región ITS-5.8S, posiblemente debido a la presencia de inhibidores de PCR, ya que muchos de ellos presentan coloraciones negras debido a su alto contenido de melanina, los cuales disminuyen la sensibilidad de la técnica

(Schrader et al., 2012; Innis et al., 1991). Al analizar únicamente la región ITS-5.8S (Figura 10), se puede observar que las 19 secuencias se agruparon en 13 clados o genotipos altamente soportados con valores entre 90 y 100. Ocho de los 13 clados se correlacionan correctamente con las definiciones morfológicas así tenemos: *Xylaria adscendens*, *X. anisopleura*, *X. apiculata*, *X. curta*, *X. globosa*, *X. multiplex*, *X. telfairii*, *X. tuberoides* (Figura 10). Un individuo morfológicamente asexual (HUTPL(F)-921) calza dentro de un clado con una secuencia denominada *Xylaria* aff. *comosa*. Sin embargo no hay información morfológica de su estado sexual para la secuencia del GenBank, por lo que es ambiguo el determinar si efectivamente corresponde o no a esta especie nuestro espécimen analizado. Los tres genotipos restantes correspondientes a secuencias obtenidas a partir de los especímenes HUTPL(F)-603, HUTPL(F)-1077, HUTPL(F)-1100 los cuales se encontraban en estado asexual por lo que no cuenta con una caracterización morfológica además de que no presentaron correlación con ninguna especie secuenciada, probablemente por la escases de secuencias para especies de *Xylaria* bien identificadas. La posible especie nueva corresponde al espécimen HUTPL(F)-1543 donde su secuencia tampoco se correlaciona a secuencias correspondientes a especies identificadas de *Xylaria*, a pesar de que actualmente en las bases de datos públicas existen más de 90.000 secuencias de la región ITS correspondientes a 17.000 taxones (Toju et al., 2012). Sin embargo si hacemos una comparación entre el número de taxones secuenciados (17.000) y el estimado de hongos solamente de la familia Xylariaceae que es de alrededor de 1.300 especies aceptadas y muchas por descubrir, sugiere una elevada falta de información correspondiente a la región ITS para muchos de los hongos (Stadler et al., 2013). Además de que alrededor del 20% de estas secuencias corresponden a muestras ambientales, las cuales probablemente no han sido validadas a través de estudios morfológicos y se tratan solamente de aproximaciones sobre posibles especies (Piepenbring, 2015).

Respecto al la región nrDNA LSU se desarrolló un árbol filogenético únicamente con las 15 secuencias generadas en este estudio que contenía solamente la región LSU parcial en el cual se puede observar un resultado similar en cuanto a los clados obtenidos con el análisis de la región ITS-5.8S (Anexo 10).

De igual manera se generó un árbol filogenético para el concatenado de la región ITS y LSU parcial a través de un análisis de máxima verosimilitud, empleado únicamente las 19 secuencias que se obtuvieron en este estudio (Figura 11), en el cual se puede evidenciar que los genotipos anteriormente identificados con la región ITS-5.8S se mantienen agrupadas en clados similares manteniendo sus relaciones filogenéticas. Las especies que mostraron un

mayor soporte y por tanto mejor certeza en cuanto a su identificación corresponden a: *X. adscendens*, *X. anisopleura*, *X. apiculata*, *X. globosa*, *X. multiplex* y *X. telfairii*. Otros cuatro especímenes tres en estado asexual (HUTPL(F)-603, HUTPL(F)-1077, HUTPL(F)-1100) y uno en estado sexual (HUTPL(F)-1543) también presentaron valores altos superiores al 60% en cuanto al soporte de las ramas. Por otra parte especies como *Xylaria* aff. *comosa*, *Xylaria curta* y *Xylaria tuberoïdes* presentan valores de soporte menores al 60% (Figura 11).

Los diferentes clados obtenidos fueron evaluados a distintos umbrales (3, 5 y 7%) para la verificación de la definición de OTUs en la región ITS-5.8S (Figura 10). Este análisis nos deja ver que esta región no es adecuada para definir algunas especies en *Xylaria* debido a su gran variabilidad (Platas et al., 2004). Es de notar que al usar el umbral de 3%, como lo recomiendan muchos autores para definir especies moleculares (Nilsson et al., 2008), muy pocas especies como por ejemplo *Xylaria adscendens*, *X. apiculata*, *X. globosa*, *X. multiplex*, *X. tuberoïdes* se mantienen correctamente dentro del clado para este umbral. Por otra parte, el resto de *Xylaria* spp. se dividen en más de un taxón en función del umbral al que se analice (Figura 10). Esto puede deberse efectivamente a la variabilidad que muestra esta región como ya se ha demostrado en varios estudios (Platas et al., 2001; Sanchez-Ballesteros et al., 2000), lo que también puede deberse a que muchas secuencias del GenBank son amplificadas desde muestras ambientales y carecen de una correcta determinación taxonómica (Piepenbring, 2015). Esto puede conllevar al aumento o disminución de la diversidad real de muchos de los taxones.

Al aplicar el 5 y 7 % como umbral para la delimitación de OTUs se reduce drásticamente la diversidad de especies para algunos miembros de *Xylaria*, por ejemplo *Xylaria adscendens* la cual se agrupa con más de tres taxones como son: *X. multiplex*, *X. globosa* y *X. Brevipes* los cuales no presentan ninguna relación taxonómica (Figura 10). Esto deja mucha ambigüedad para calibrar un umbral universal para esta región (ITS-5.8S). Adicionalmente esta problemática se pueda deber a que existe escasa información de secuencias desde material tipo (Fournier et al., 2011). En la sumatoria total en relación al umbral del 3% se generaron 31 OTUs, al 5% 26 OTUs, y al 7% se obtuvieron en total 20 OTUs (Figura 10).

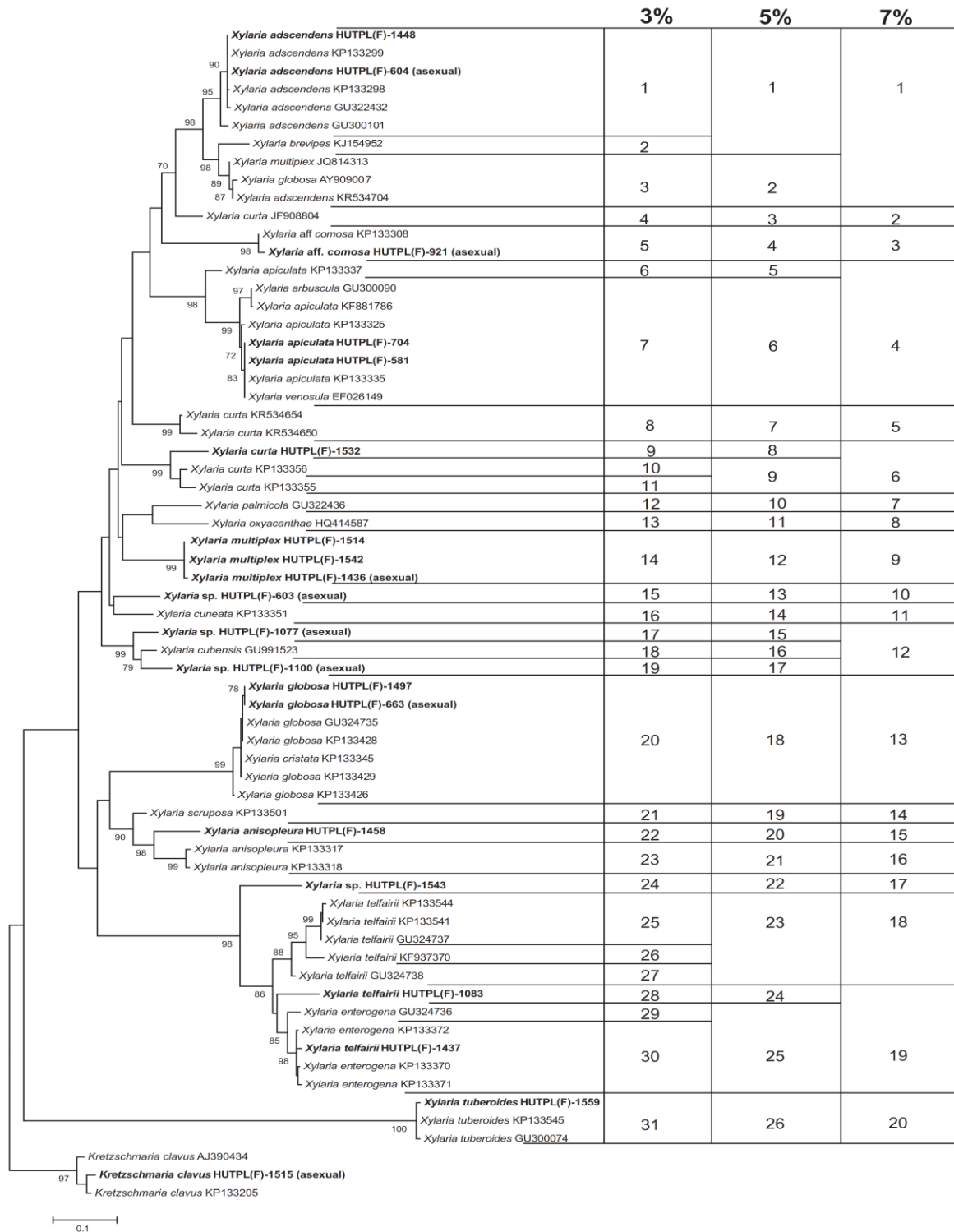


Figura 10 Árbol filogenético de la región ITS-5.8S de ADNrn obtenido mediante una análisis de máxima verosimilitud, las secuencias generadas en el presente estudio se muestran en negrita, en la parte derecha se observa la cantidad de OTUs obtenidos en el análisis a partir de porcentajes del 3, 5 y 7% Los números bajo cada umbral representan el orden de los OTUs, en las ramas solamente se muestran los valores de Bootstrap superiores al 60%, para el enraizamiento se empleó como grupo externo el género *Kretzschmaria*.

Fuente: Autor.

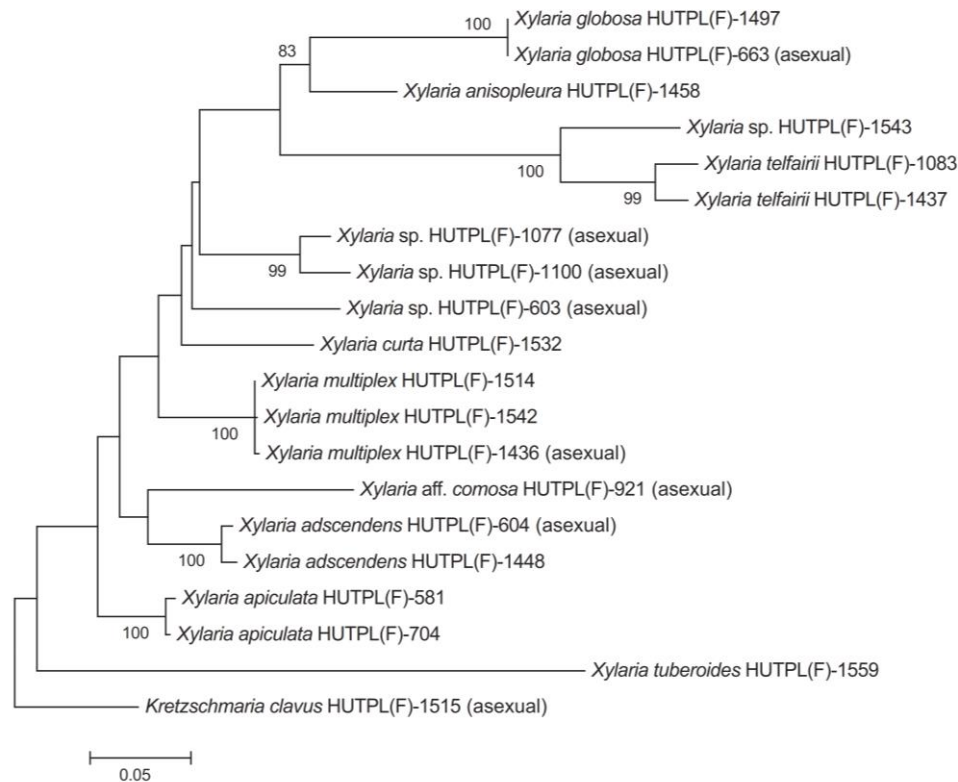


Figura 11. Árbol filogenético de la región ITS-LSU de ADNrn obtenido mediante una análisis de máxima verosimilitud. Las 19 secuencias que se muestran corresponden a las generadas en el presentes estudio, en las ramas solamente se muestran los valores de Bootstrap superiores al 60%, para el enraizamiento del árbol se empleó como grupo externo al género *Kretzschmaria*. Fuente: Autor.

A partir de toda esta evidencia y en base a otros estudios de análisis filogenéticos para el género *Xylaria*, se ha establecido que el uso de genes ribosómicos no proporcionan información suficiente para esclarecer los múltiples problemas taxonómicos que presenta la familia Xylariaceae a nivel de especie (Duong et al., 2004), inclusive el gen (ITS) que ha sido el más utilizado para análisis filogenéticos dentro del género *Xylaria* está siendo analizado debido al bajo nivel de efectividad, universalidad y confianza que presenta en comparación con nuevos marcadores que se están estudiando. En una investigación realizada por Krüger et al. (2009) se establece que el uso de la región ITS-5.8S puede mostrar buenos resultados de relaciones filogenéticas a nivel de género por otra parte en el caso de estudios sobre discriminación de especies se plantea el uso de otro tipo de cebadores que presenten un mayor grado de afinidad, una posible solución a esto es el uso de genes codificadores de proteínas como RPB1, RPB2 y TEF1 (Schoch et al., 2009) los cuales proporcionarían un

mayor grado de información filogenética y mejor soporte estadístico para la resolución de las discrepancias filogenéticas que presenta este género (U'ren et al., 2016).

CONCLUSIONES

El género *Xylaria* presentó una alta diversidad de especies presentes en el bosque tropical montano de la RBSF.

La integración de datos morfológicos y moleculares permitió identificar nueve especies para el género *Xylaria*.

En análisis de caracteres morfológicos en especímenes de *Xylaria* en estado anamórfico no permiten una delimitación de especies debido a su similitud entre especies.

El espécimen HUTPL(F)-1543 debe ser analizado y comparado con especímenes y material tipo, para establecer su identidad taxonómica y comprobar si efectivamente corresponde a una nueva especie.

La cantidad y calidad de información en cuanto a secuencias (ITS-5.8S) de especímenes de *Xylaria* disponibles en las bases de datos públicas es muy baja y no disponen de una debida verificación mediante estudios taxonómicos.

La definición de OTUs sugiere que el umbral de 3 % denominado como universal para definir especies en hongos, no puede ser aplicado correctamente para la mayor parte de especies de *Xylaria*.

RECOMENDACIONES

Incrementar los estudios destinados a tratar de comprender la diversidad que alberga el reino de los hongos que hasta el momento presenta un alto grado de desconocimiento.

El desarrollo de futuros estudios que correlacionen análisis morfológicos y moleculares que se muestran como una posible solución que puede implantarse con la finalidad de tratar de resolver las discrepancias taxonómicas que presenta el género *Xylaria*.

Se requiere de una búsqueda y análisis de nuevas regiones de DNA que codifiquen a proteínas como por ejemplo RPB1, RPB2, β -tubulina con el fin de examinar las correlaciones filogenéticas dentro de *Xylaria*.

Ampliar la cantidad de información referente a secuencias de ADN de especímenes de hongos de regiones tropicales, ya que la mayor parte de la información que se dispone en la actualidad corresponde a especies de zonas templadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bengtsson-Palme, J; Ryberg, M; Hartmann, M; Branco, S; Wang, Z; Godhe, A; Wit, P; Sánchez, M; Ebersberger, I; De Sousa, F; Amend, A; Jumppoonen, A; Unterseher, M; Kristiansson, E; Abarenkov, K; Bertrand, Y; Sanli, k; Ericksson, K; Vik, U; Veldre, V; Nilsson, R. (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: 914–919
- Bussmann, R. (2003). Los Bosques Montanos de la Reserva Biológica San Francisco (Zamora-Chinchiipe, Ecuador) zonación de la vegetación y Regeneración naturales. *Lyonia* 3: 57–72.
- Carroll, G. (1964). Pyrenomycetes, mainly Xylariaceae, from some South Pacific Islands. *Bottidsskr* 59: 301–310.
- Christensen, M. (1989). A View of Fungal Ecology. *Mycologia* 81: 1–19
- Crisci, J; López, M. (2002). Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. 3–12.
- Cruz, D; Suárez, J; Kottke, I; Piepenbring, M. (2014). Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia* 106: 708–22.
- Cruz, D; Suárez, J; Kottke, I; Piepenbring, M; Oberwinkler, F. (2011). Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress* 10: 229–238.
- Cruz, D; Suárez, J; Piepenbring, M. (2016). Morphological revision of Tulasnellaceae, with two new species of *Tulasnella* and new records of *Tulasnella* spp. for Ecuador. *Nova Hedwigia* 102: 279–338.
- Curtis, H; Barnes, N; Schnek, A; Massarini, A. (2008). Curtis Biología. Medica Panamericana. Buenos Aires.
- Dennis, R. (1957). Further notes on tropical American Xylariaceae. *Kew Bulletin* 12: 297–332
- Dennis, R. (1956). Some Xylarias of Tropical America. *Kew Bulletin* 11: 401–444
- Dennis, R. (1974). Xylariaceae from Papua and New Guinea. *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* 43: 127–138.
- Duong, L; Lumyong, S; Hyde, K; Jeewon, R. (2004). *Emarcea castanopsidicola* gen. et sp. nov. from Thailand, a new xylariaceous taxon based on morphology and DNA sequences. *Studies in Mycology* 50: 253–260.
- Fournier, J. (2014). Update on European species of *Xylaria*. 5 – 6.
- Fournier, J; Flessa, F; Peršoh, D; Stadler, M. (2011). Three new *Xylaria* species from southwestern Europe. *Mycological Progress* 10: 33–52.

- Gardes, M; Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Göker, M; García-Blázquez, G; Voglmayr, H; Tellería, M; Martín, M. (2009). Molecular taxonomy of phytopathogenic fungi: a case study in *Peronospora*. *PLoS one* 4: e6319.
- Hamme, M; Trinidad, R. (2002). Contribuição ao estudo biosistemático de espécies do gênero *Xylaria* (Xylariaceae: Ascomycota) para o Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia. Série botânica* 57: 135–201.
- Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422–1432.
- Henrici, A. (2016). *Xylaria cinerea* and *X. crozonensis*: two distinctive additions to the British mycota. *Field Mycology* 17: 7–11.
- Hladki, A; Romero, A. (2010). A preliminary account of *Xylaria* in the Tucuman Province, Argentina, with a key to the known species from the Northern Provinces. *Fungal Diversity* 42: 79–96.
- Hladki, A; Romero, A. (2007). Primeras citas del género *Xylaria* (Ascomycota, Xylariaceae) para la república Argentina. *Darwiniana nueva serie* 45: 28–44.
- Hladki, A; Romero, A. (2009). *Xylaria berkeleyi* (Xylariaceae, Ascomycota) primera cita para la República Argentina. *Lilloa* 46: 68–71.
- Innis, M; Gelfand, D; Sninsky, J; White, T. (1991). Degenerate primers for DNA amplification. In T. Campton [ed.], PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego.
- Ju, Y; Rogers, J. (1999). The Xylariaceae of Taiwan (excluding *Anthostomella*). *Mycotaxon* 73: 343–440.
- Ju, Y; Rogers, J. (1996). A revision of the Genus *Hypoxylon*. USA: APS P. *The American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota.
- Katoh, K; Standley, D. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kirk, P; Cannon, P; Minter, D; Stalpers, J. (2008). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CABI Publi. Kirk, P; Cannon, P; Minter, D; Stalpers, J. [eds.],. *Wallingford*.
- Krüger, M; Stockinger, H; Krüger, C; Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212–223.
- Læssøe, T. (2002). The Xylariaceae of Ecuador-an update. *Ikke Angivet*.
- Largent, D; Johnson, D; Watling, R. (1977). How to identify mushrooms to Genus: microscopic features. *Eureka*. California.
- Lee, J; Ko, K; Jung, H. (2000). Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal

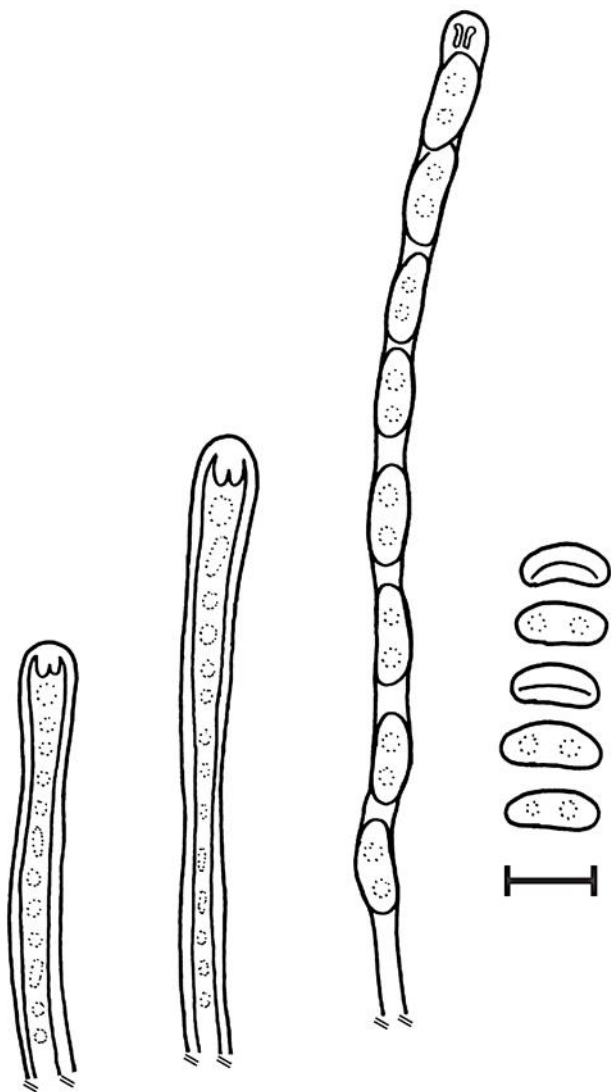
- ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters* 187: 89–93.
- Medel, R; Castillo, R; Guzmán, G. (2008). Las especies de *Xylaria* (Ascomycota, Xylariaceae) conocidas de Veracruz, México y discusión de nuevos registros. *Revista mexicana de micología* 28: 101–118.
- Medel, R; Guzmán, G; Castillo, R. (2010). Adiciones al conocimiento de *Xylaria* (Ascomycota, Xylariales) en México. *Revista mexicana de micología* 31: 9–18.
- Moore, D; Robson, G; Trinci, A. (2011). 21st Century Guidebook to Fungi. *Cambriedge. Cambriedge*.
- Nabors, M; Gonzalez, P; Gacía, M; Moreno, J. (2006). Introducción a la Botánica. *Pearson. Madrid*.
- Nilsson, R; Kristiansson, E; Ryberg, M; Hallenberg, N; Larsson, K. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics online* 4: 193–201.
- Nilsson, T; Daniel, G. (1989). Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes. *Holzforschung* 43: 11–18.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, *Wallingford*. 225–233.
- Petrini, L; Petrini, O. (1985). Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia* 38: 216–234.
- Piepenbring, M. (2015). Introducción a la micología en los Trópicos. 1st ed. American Phytopathological Society [ed.], APS press, Frankfurt.
- Platas, G; Ruibal, C; Collado, J. (2004). Size and sequence heterogeneity in the ITS1 of *Xylaria hypoxylon* isolates. *Mycological Research* 108: 71–75.
- Poroca, J. (1986). Revisão histórica das Xylariaceae do Brasil. *Boletín micológico* 3: 41–53.
- Puillandre, N; Modica, M; Zhang, Y; Sirovich, L; Boisselier, M; Cruaud, C; Holford, M; Samadi, S. (2012). Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21: 2671–2691.
- Rogers, J. (1979). The Xylariaceae: systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia* 71: 1–42.
- Rogers, J. (2000). Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research* 104: 1412–1420.
- Rogers, J; Callan, B. (1988). *Xylaria* (Sphaeriales, Xylariaceae) from Cerro de la Neblina, Venezuela. *Mycotaxon* 31: 103–153.
- Rogers, J; Ju, Y; Lehmann, J. (2005). Some *Xylaria* species on termite nests. *Mycologia* 97: 914–923.

- Rogers, J; Ju, Y; San Martin, F. (1996). *Jumillera* and *Whalleya*, new genera segregated from *Biscogniauxia*. *Mycotaxon (USA)* 64: 30–50.
- Rogers, J; Samuels, G. (1986). Ascomycetes of New Zealand 8. *Xylaria*. *New Zealand Journal of Botany* 24: 615–650.
- Schoch, C; Seifert, K; Huhndorf, S; Robert, V; Spouge, J; Levesque, C; Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 1–6.
- Schoch, C; Sung, G; Lopez-Giraldez, F; Townsend, J; Miadlikowska, J; Hofstetter, V; Robbertse, B; Matheny, P; Kauff, F; Wang, Z; Gueidan, C; Andrie, R; Trippe, K; Ciufetti, L; Wynns, A; Fraker, E; Hodkinson, B; Bonito, G; Groenewald, J; Arzanlou, M; Sybren de Hoog, G; Crous, P; Hewitt, D; Pfister, D; Peterson, K; Gryzenhout, M; Wingfield, M; Aptroot, A; Suh, S; Blackwell, M; Hillis, D; Griffith, G; Castlebury, L; Rossman, A; Lumbsch, H; Lucking, R; Budel, B; Rauhut, A; Diederich, P; Ertz, D; Geiser, D; Hosaka, K; Inderbitzin, P; Kohlmeyer, J; Volkmann-Kohlmeyer, B; Mostert, L; O'Donnell, K; Sipman, H; Rogers, J; Shoemaker, R; Sugiyama, J; Summerbell, R; Untereiner, W; Johnston, P; Stenroos, S; Zuccaro, A; Dyer, P; Crittenden, P; Cole, M; Hansen, K; Trappe, J; Yahr, R; Lutzoni, F; Spatafora, J. (2009). The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic Biology* 58: 224–239.
- Schrader, C; Schielke, A; Ellerbroek, L; Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1014–1026.
- Silva, C. (2015). *Xylariaceae (Ascomycota) no Parque Estadual de São Camilo, Palotina, PR. Universidade Federal Do Parana.*
- Sir, E; Hladki, A; Parrado, M; Romero, A. (2012). Biodiversity of Xylariaceae (Ascomycota) and their hosts in protected areas from Tucuman (Argentina). *Kurtziana* 37: 35–48.
- Solórzano, S. (2012). Colección, caracterización morfológica–molecular y experimentos de inoculación in-vitro de Basidiomicetes potencialmente micorrízicos de orquídeas en Bosque Montano del Sur del Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Soto, E; Bolaños, A. (2013). Xylariaceae in a Cloud forest of Valle del Cauca (Colombia). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 37: 343–351.
- Stadler, M. (2011). Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for assessment of their taxonomy, phylogeny, and functional biodiversity. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 1: 75–133.
- Stadler, M; Kuhnert, E; Peršoh, D; Fournier, J. (2013). The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the “One Fungus-One Name” (1F1N) concept. *Mycology* 4: 5–21.
- Suárez, J; Weiss, M; Abele, A; Garnica, S; Oberwinkler, F; Kottke, I. (2006). Diverse

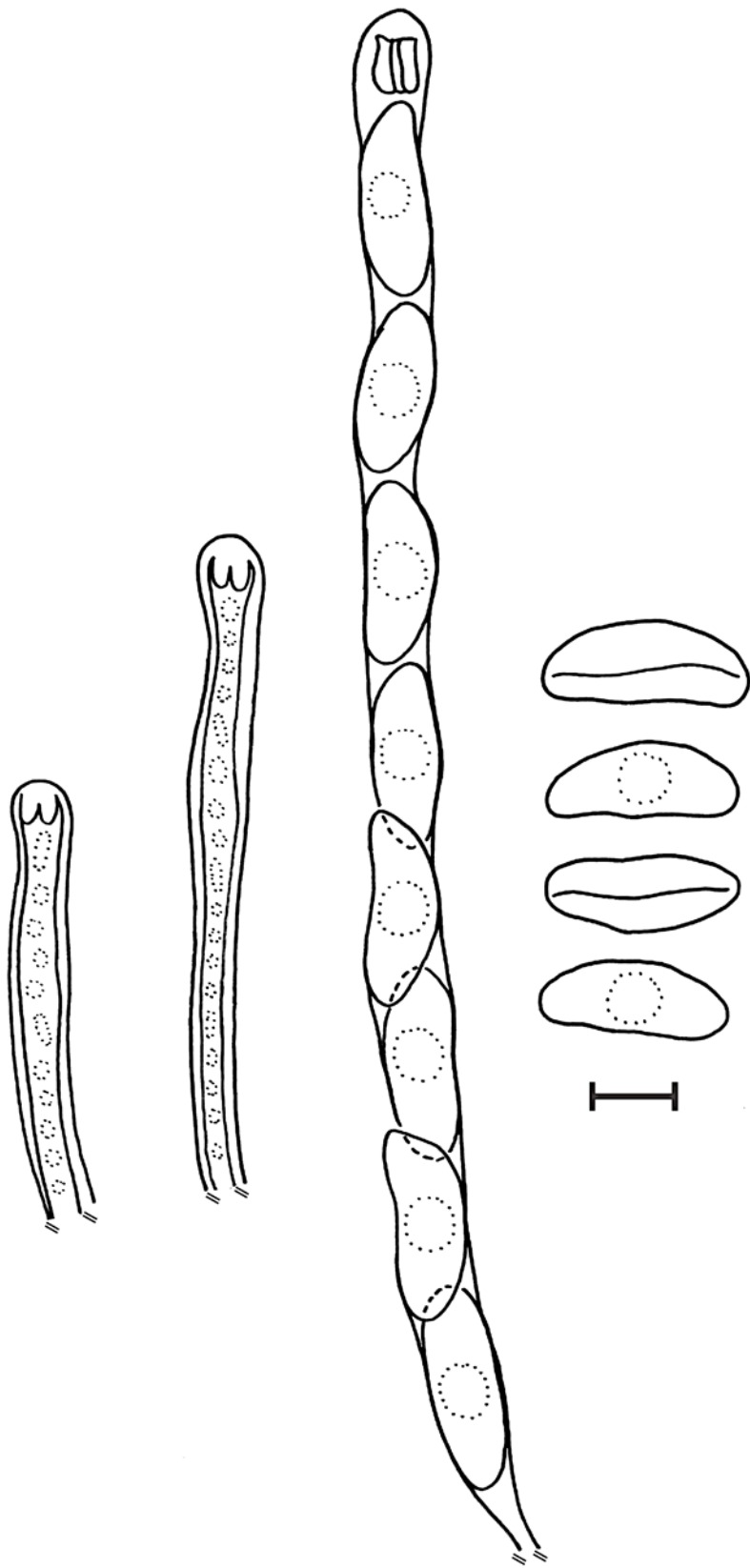
- tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological research* 110: 1257–70.
- Suwannasai, N; Whalley, M; Whalley, A; Thienhirun, S; Sihanonth, P. (2012). Ascus apical apparatus and ascospore characters in Xylariaceae. *IMA fungus* 3: 125–33.
- Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; Filipinski, A; Kumar, S. (2013). Mega6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Toju, H; Tanabe, A; Yamamoto, S; Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *Plos one* 7: e40863.
- Trierveiler-Pereira, L; Romero, A; Baltazar, J; Loguercio-Leite, C. (2009). Addition to the knowledge of *Xylaria* (Xylariaceae, Ascomycota) in Santa Catarina, Southern Brazil. *Mycotaxon* 107: 139–156.
- U'ren, J; Miadlikowska, J; Zimmerman, N; Lutzoni, F; Stajich, J; Arnold, A. (2016). Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of Xylariaceae (Sordariomycetes, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 98: 210–232.
- Van der Gucht, K. (1995). Illustrations and descriptions of Xylariaceous fungi collected in Papua New Guinea. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique* 64: 219–403.
- Vilgalys, R; Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- VrÅlstad, T. (2011). ITS, OTUs and beyond-fungal hyperdiversity calls for supplementary solutions. *Molecular Ecology* 20: 2873–2875.
- Webster, J; Weber, R. (2007). Introduction to Fungi. Cambridge University Press, New York.
- Whalley, A. (1996). The xylariaceous way of life. *Mycological Research* 100: 897–922.
- White, T; Bruns, S; Lee, S; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White [eds.], PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 315–322. Academic Press, New York.

ANEXOS

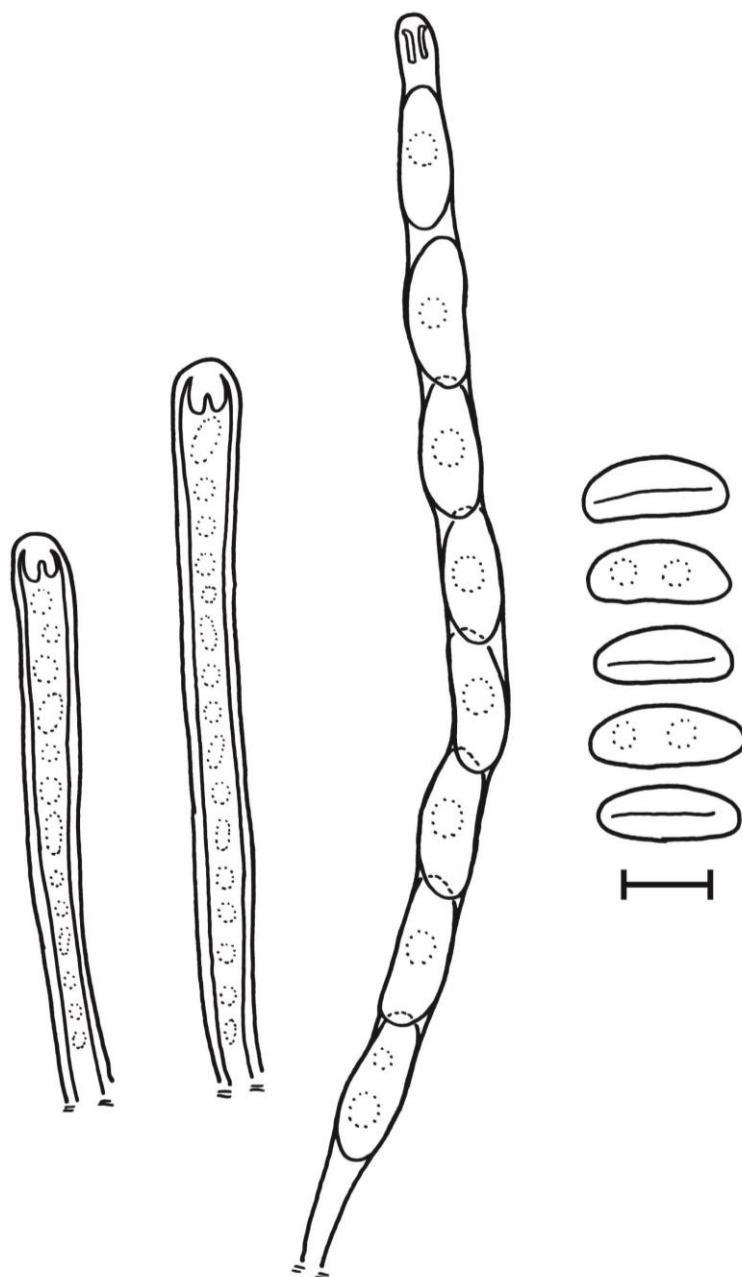
Anexo 1. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria adscendens* HUTPL(F)-1448.



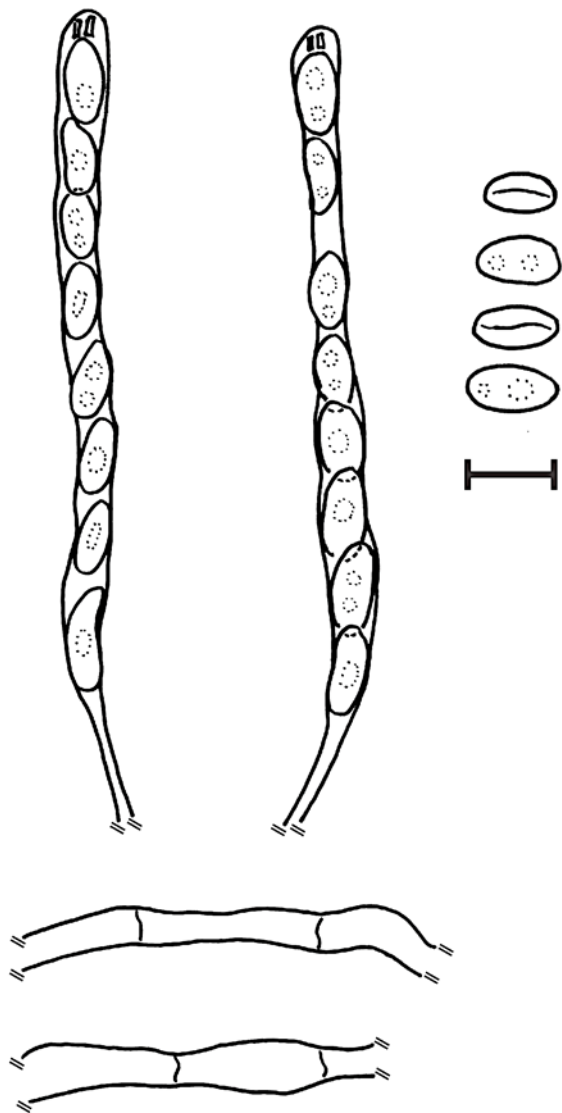
Anexo 2. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria anisopleura* HUTPL(F)-1458.



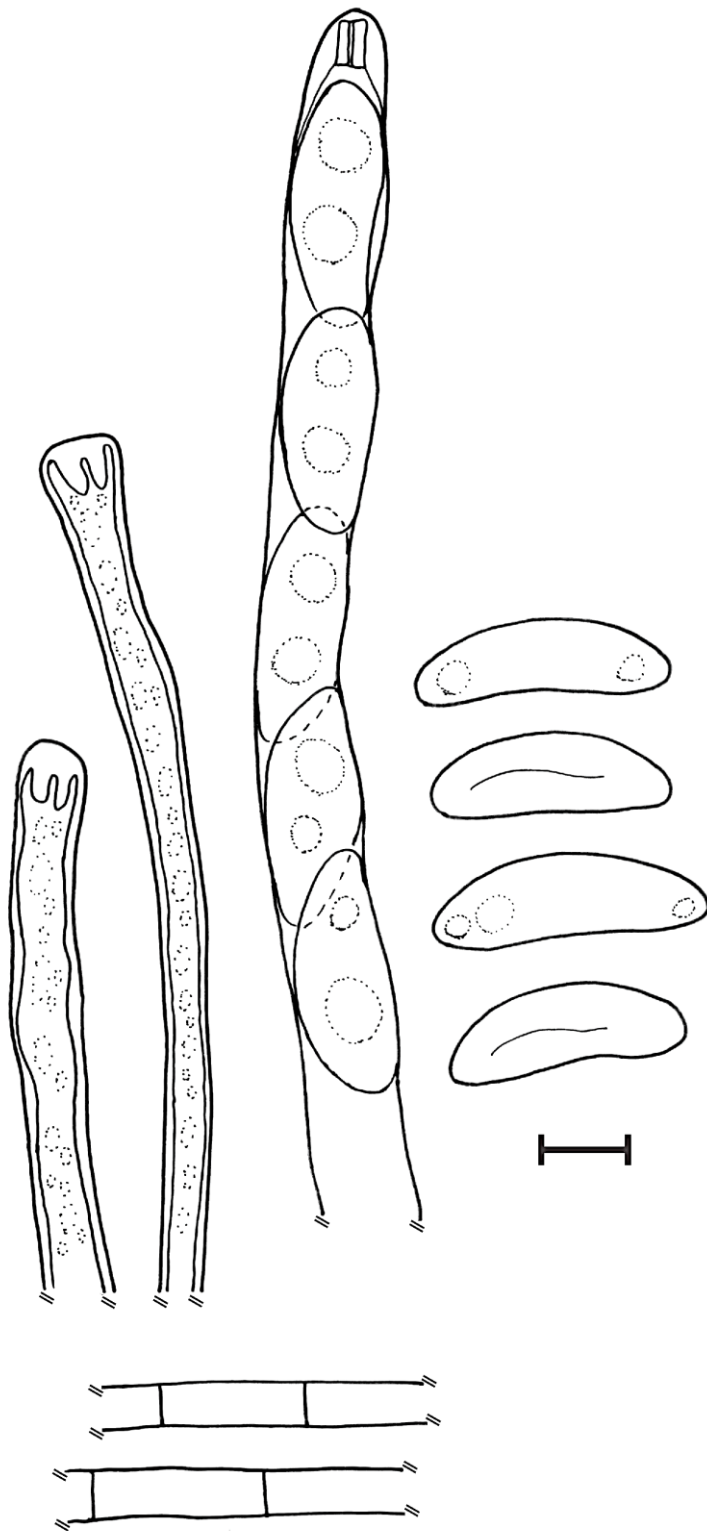
Anexo 3. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria apiculata* HUTPL(F)-581, HUTPL(F)-704.



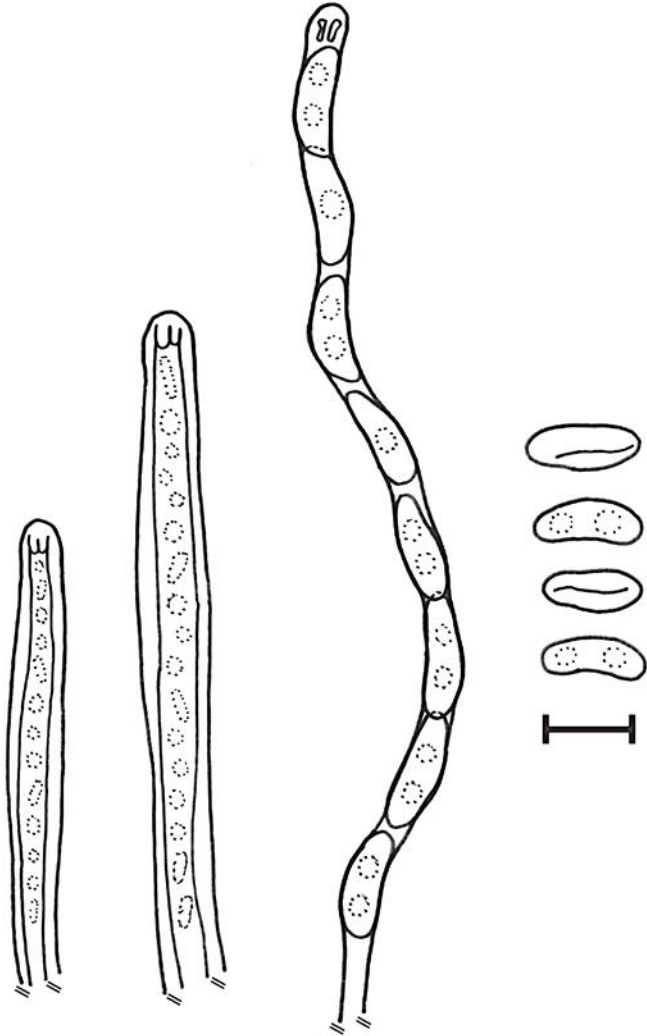
Anexo 4. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria curta* HUTPL(F)-1532.



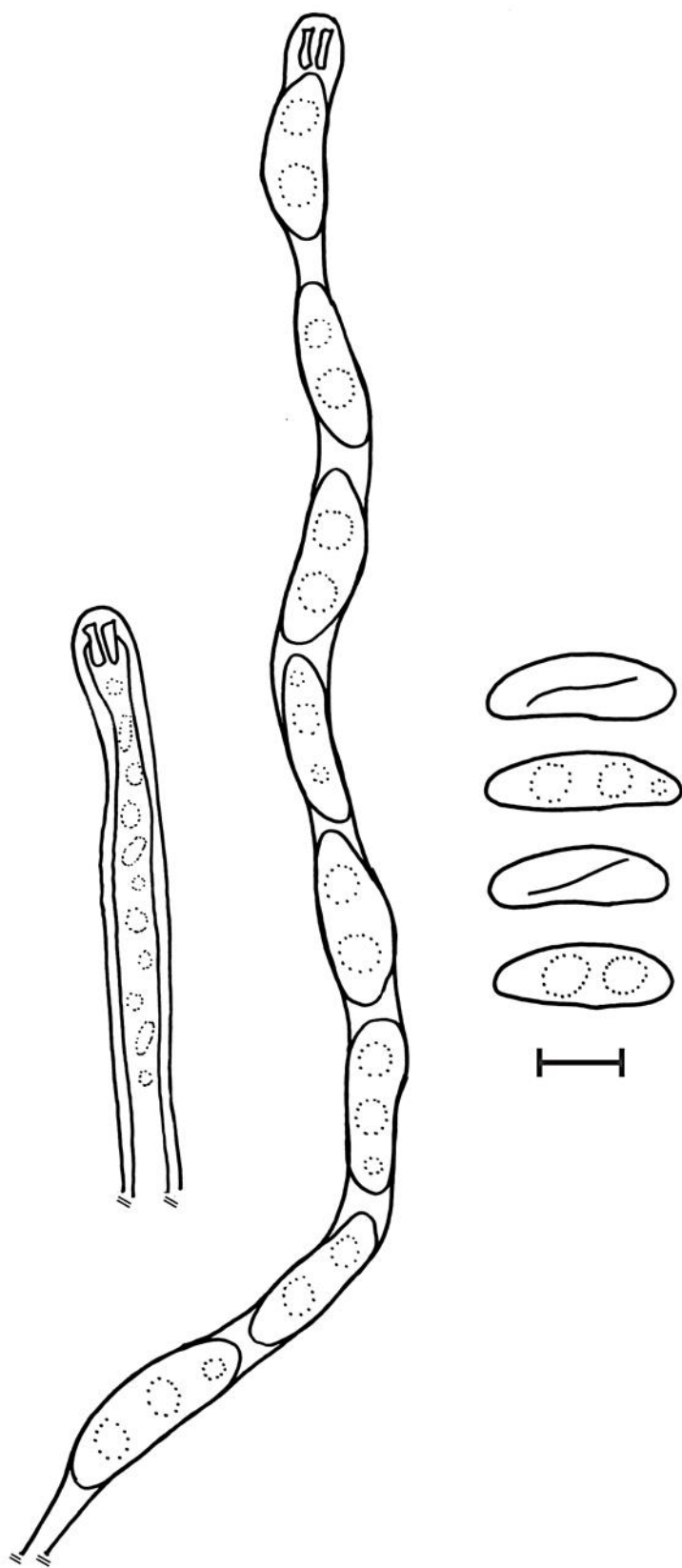
Anexo 5. Ilustración de las Estructuras microscópicas de *Xylaria globosa* HUTPL(F)-1497.



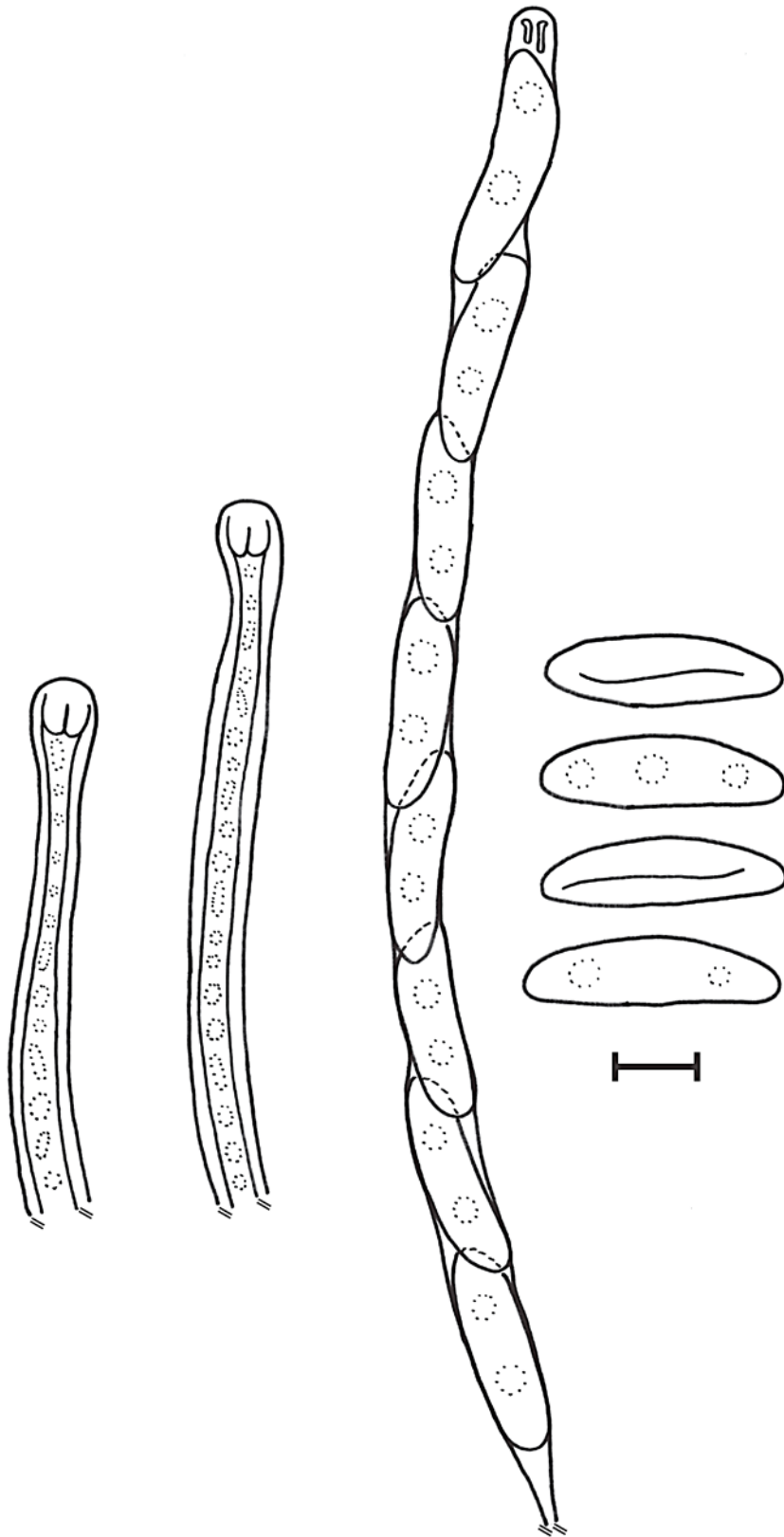
Anexo 6. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria multiplex* HUTPL(F)-1514, HUTPL(F)-1542.



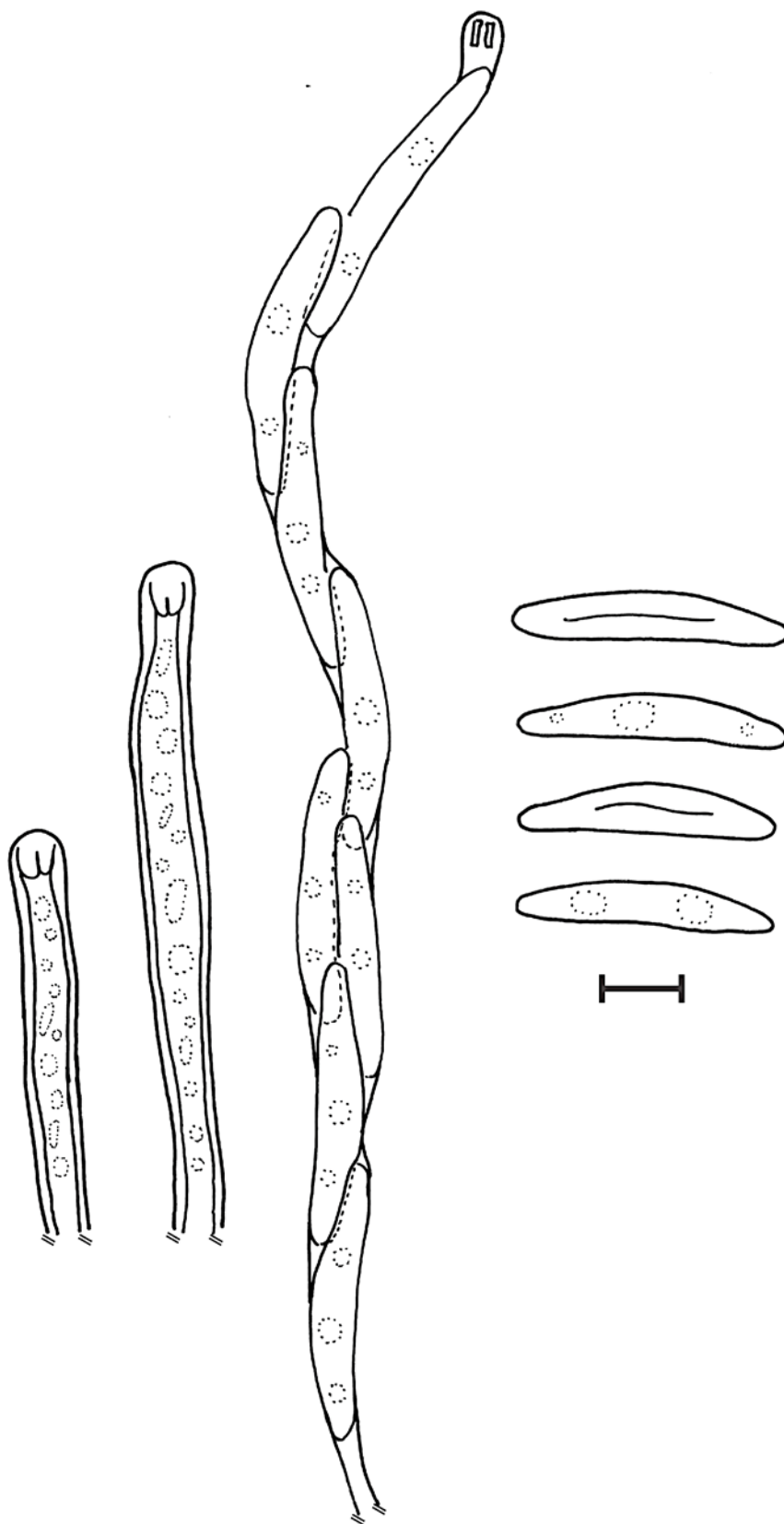
Anexo 7. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria telfairii* HUTPL(F)-1083, HUTPL(F)-1437.



Anexo 8. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria tuberoides* HUTPL(F)-1559.



Anexo 9. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Xylaria* sp. HUTPL(F)-1543.



Anexo 10. Árbol filogenético de la región LSU parcial de ADNrrn

Realizado mediante un análisis de máxima verosimilitud, todas las secuencias que se muestran corresponden a las generadas en el presente estudio, en las ramas solamente se muestran los valores de Bootstrap superiores al 60%

