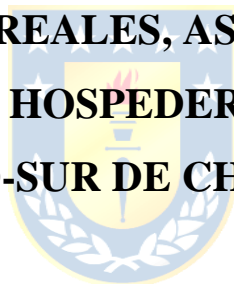




UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
DIRECCION DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
PROGRAMA MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN BOTÁNICA

**DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DEL MICOPARÁSITO  
*SEPEDONIUM* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) Y LA  
RELACIÓN CON SUS HOSPEDEROS EN LA ZONA  
CENTRO-SUR DE CHILE.**



Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción  
para optar al grado académico profesional de Magíster

JOSEFA ANTONIA BINIMELIS SALAZAR

PROFESOR GUÍA: DR. GÖTZ PALFNER

Agosto 2021

Concepción, Chile

Página oficial de Firmas:  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

Profesor Guía

---

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Ha sido aprobada por la Siguiete Comisión evaluadora

---

Nombre y Grado (s) Académico (s)



---

Nombre y Grado (s) Académico (s)

---

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Directora de Programa

---

Nombre y Grado (s) Académico (s)

## AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a toda mi familia, con especial cariño a mi abuelita, una gran mujer que siempre me ha acompañado en todos los desafíos que he decidido tomar en la vida no tan solo en lo académico, sino también en lo personal. Le agradezco sus consejos, sus enseñanzas a lo largo de mi vida, por aconsejarme y por sobretodo escucharme en mis momentos más tristes y frustrantes, pero también en los más alegres. Agradezco también a mis padres, Claudia y Hugo, a mi mamá por siempre darme su apoyo incondicional cuando decidí hace ya varios años ingresar a la carrera de Biología y luego cuando quise ingresar al Magíster, dejándome siempre claro que solo debía ser feliz con lo que hacía, creo que tú siempre tuviste más confianza en mí de que sería capaz de terminar esta etapa. Quiero agradecer a mis hermanos que son mi vida, Stefano y Martin, porque cada vez que no quería saber nada de la universidad o me sentía colapsada ellos siempre fueron mi lugar favorito para escapar, porque a pesar de las adversidades siempre hemos estado unidos, siempre nos sacamos una sonrisa y por sobre todas las cosas nos amamos.

A mis tías Monsy y Loreto, por estar conmigo cuando lo he necesitado porque siempre me han hecho sentir que tengo más de una mama, por toda la confianza y el amor que me entregan día a día, que siempre ha sido fundamental para mí en las etapas que me ha tocado vivir. A mis primos, Paulo y Felipe por todo su cariño. Quiero agradecer profundamente a mi pareja, mi negrito, Darwin. Simplemente por todo. Todo lo que me entregas día a día, por motivarme a seguir cuando pensé que no podría, por quedarte conmigo hasta la madrugada acompañándome para poder terminar el artículo, la tesis, por esperarme cuando llegaba tan tarde del trabajo los fines de semana, por ser uno de mis pilares fundamentales. Te amo.

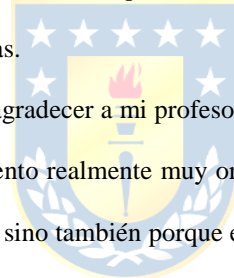
A mis amigos de la vida Constanza Barra, María paz Rojo, Natalia Sagredo, porque nadie me conoce como ustedes, les quiero agradecer por estar ahí siempre, por darme ánimo para seguir adelante pero también para decirme está bien que tomes un receso, cuando lo necesite, por darme su apoyo incondicional. A mi amiga Leyla, por ser mi salvavidas en más de una oportunidad, por todas esas veces que me escucho quejarme de lo cansada que estaba y que la mayoría de las veces finalmente terminaba riéndome a carcajadas con sus historias, te quiero mucho. A mis compañeros de Universidad que supieron contenerme en los momentos más difíciles, a mi compañera y amiga Nicol Lizama, porque aunque hubo momentos en que ni siquiera

quería levantarme de la cama, vino a darme el ánimo que necesitaba con su ternura y calidez de siempre, a mi compañera y amiga Andrea Cisterna porque a pesar de que en todo este año de pandemia no hemos podido vernos mucho, siempre estuviste preocupada por mí, siempre me dabas palabras de aliento para seguir y porque la distancia no es impedimento para sentir cuando te preocupas y cuanto me quieres. A mi compañero y amigo José Ortiz, que en más de una oportunidad me salvaste, y por toda tu ayuda estos años, a mi compañero y amigo Manu Beltrán por ser uno de los amigos más bacanes que pudo entregarme esta Universidad, por darte el tiempo de darme clases para poder aprender a hacer mapas de distribución ajaj. A mis amigos de Laboratorio, David y Sandra, que, aunque siguieron sus caminos y ya no estamos juntos, disfrute con ellos cada conversación, cada terreno juntos, fueron quienes me entregaron su conocimiento sin esperar nada a cambio y me enseñaron y motivaron cuando decidí internarme en este mundo maravilloso de los hongos.

También quiero agradecer a la Profesora Fabiola Cruces, quien siempre tuvo un momento para escucharme y alentarme, por todo su apoyo, muchas gracias.

Finalmente, de manera muy cariñosa, quiero agradecer a mi profesor guía el Dr. Gotz Palfner, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él, me siento realmente muy orgullosa de haber sido su alumna estos años, no tan solo por la calidad como docente sino también porque es una excelente persona y siempre me sentí a gusto trabajando con usted. También quiero agradecer de manera muy especial a todas las personas que hicieron posible que se pudiera llevar a cabo esta investigación, agradecer a la Dra. María Angélica Casanova, al profesor Norbert Arnold, al Dr. Gerardo González- Rocha, al Dr. Heraldo Norambuena, y por supuesto a la Dra. Celia Lima quien me ayudó muchísimo a insertarme en el área de la biología molecular. Finalmente, me gustaría hacer una mención especial, dedicarle esta Tesis a mi madrina María Cristina Ruiz, hoy ya no puedo abrazarte producto de la pandemia que nos separó físicamente, pero quiero decirte que te quiero muchísimo y siempre estarás en mi corazón.

Sé que me faltaron muchas personas por mencionar, pero a todos quiero agradecerles por haber sido parte de este largo camino, que en más de alguna oportunidad pensé que no sería capaz de lograr. Hoy puedo decir que me siento realmente orgullosa de mí.



## INDICE DE CONTENIDO

1.	RESUMEN .....	10
2.	ABSTRACT .....	11
3.	INTRODUCCIÓN.....	12
3.1	Taxonomía morfológica de <i>Sepedonium</i> .....	14
3.2	Taxonomía molecular de <i>Sepedonium</i> .....	17
3.3	Diversidad y distribución geográfica de la asociación <i>Sepedonium</i> -Boletales .....	19
3.4	Boletales introducidos y endémicos en Chile y sus posibles interacciones con <i>Sepedonium</i> .....	20
3.5	Nuevos Antecedentes: Especies de <i>Sepedonium</i> en Chile .....	22
3.6	Preguntas de Investigación .....	24
3.7	Hipótesis .....	24
3.8	Objetivo General.....	24
3.9	Objetivos Específicos .....	24
4.	METODOLOGÍA .....	25
4.1	Recopilación Bibliográfica .....	25
4.2	Recopilación de Material .....	25
4.3	Análisis Taxonómico .....	26
4.3.1	Cultivos de <i>Sepedonium</i> .....	26
4.3.2	Microscopía óptica .....	26
4.3.3	Microscopía electrónica de barrido .....	27
4.3.4	Extracción de ADN .....	27
4.3.5	Amplificación por PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) .....	27



4.3.6	Análisis filogenético .....	28
5.	RESULTADOS .....	32
5.1	Especies y cepas de <i>Sepedonium</i> recolectadas en el Centro-Sur de Chile .....	32
5.2	Caracterización morfológica especies de <i>Sepedonium</i> .....	38
5.2.1	<i>Sepedonium loyorum</i> Palfner, Casanova-Katny, N. Arnold & Binimelis-Salazar sp. nov. (figs. 6, 7, 8b, 9d, 10d).....	38
5.2.2	<i>Sepedonium ampullosporum</i> Damon, Mycologia 44(1): 91 1952 .....	42
5.2.3	<i>Sepedonium chrysospermum</i> (Bull.) Fr., Syst. mycol. (Lundae) 3(2): 438 1832.....	43
5.2.4	<i>Sepedonium laevigatum</i> Sahr & Ammer, Mycologia 91(6): 939 1999.....	44
5.3	Clave <i>Sepedonium</i> spp. en Chile.....	48
5.4	Caracterización molecular .....	50
5.4.1	Secuencias obtenidas .....	50
5.4.2	Análisis filogenéticos locus ITS .....	50
5.4.3	Árbol de especies multilocus.....	50
6.	DISCUSIÓN.....	53
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	57



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografías de atributos diagnósticos de <i>Sepedonium</i> spp. a: fialoconidios; b: aleurioconidios (Fuente: Elaboración propia).....	13
Figura 2. <i>Sepedonium ampullosporum</i> . A: Conidióforos, B: Fialoconidios, C: Aleurioconidios (fuente: Damon 1952).....	15
Figura 3. <i>Sepedonium chalcipori</i> . a: Fialoconidios, b: Fialoconidioforos, c: Aleurioconidios (fuente: Helfer, 1991). ....	16
Figura 4. Detalles de aleurioconidios de <i>Sepedonium</i> spp. bajo microscopio electrónico de barrido: 2. <i>S. chrysospermum</i> , 3. <i>S. microspermum</i> , 4. <i>S. ampullosporum</i> , 5. <i>S. laevigatum</i> , 6. <i>S. tulasneanum</i> , 7. <i>S. brunneum</i> , 8. <i>S. chalcipori</i> , 9. <i>S. chlorinum</i> (fuente: Sahr <i>et al.</i> , 1999). ....	18
Figura 5. Mapa de distribución de colecciones de <i>Sepedonium</i> spp. entre 2017 y 2018 en el Centro Sur de Chile. (Fuente: elaboración propia).....	37
Figura 6. <i>Sepedonium loyorum</i> sp. nov., conidioforos, fialoconidios y aleurioconidios en cultivo axénico (MPA) obtenidos de 4 diferentes especies de hospederos; a: de <i>Boletus loyita</i> , cepa CONC-F1760; b: de <i>B. loyi</i> , cepa CONC-F1755; c: de <i>B. putidus</i> , cepa CONC-F1754 (holotipo); d: de <i>Gastroboletus valdivianus</i> , cepa CONC-F1741; barra 20µm. ....	40
Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de aleurioconidios, <i>Sepedonium loyorum</i> sp. nov. (CONC-F1754, holotipo).....	41
Figura 8. Micrografías electrónicas de barrido de fialoconidios de <i>Sepedonium</i> spp.; a: <i>Sepedonium ampullosporum</i> CONC-F 1821; b: <i>Sepedonium loyorum</i> CONC-F 1741; c: <i>Sepedonium chrysospermum</i> CONC-F 1743; d: <i>Sepedonium laevigatum</i> CONC-F 1769. ....	45
Figura 9. Micrografías electrónicas de barrido de aleurioconidios de <i>Sepedonium</i> spp.; a: <i>S. ampullosporum</i> CONC-F 1821; b: <i>S. chrysospermum</i> CONC-F 1743; c: <i>S. laevigatum</i> CONC-F 1769; d: <i>S. loyorum</i> CONC-F 1741. ....	46
Figura 10. Cultivos In vitro de <i>Sepedonium</i> spp. de Chile templado central después de dos semanas de crecimiento en MPA en placas de Petri de 90 mm a 20-25 ° 100, la mitad izquierda de cada fotografía	

muestra la cara superior, la mitad derecha muestra relativamente el reverso de la placa de cultivo; a: *S. ampullosporum* de *Paxillus involutus*, CONC-F1732; b: *S. chrysospermum* de *Paxillus involutus*, CONC-F1743; c: *S. laevigatum* de *Suillus luteus*, CONC-F1769; d: *S. loyorum* sp. nov. de *Boletus putidus*, CONC-F1754 (holotipo)..... 47

Figura 11. Árbol filogenético reconstruido utilizando el programa Beast 2.0 que muestra la relación de parentesco de *Sepedonium loyorum* sp. nov. con todas las demás especies conocidas, inferidas de la región espaciadora transcrita interna de los genes ITS (ITS 1); el taxón externo es *Trichoderma aerugineum*; los valores de los nodos corresponden a la probabilidad posteriori. .... 51

Figura 12. Árbol de especies filogenéticas reconstruido utilizando el programa Beast 2.0 que muestra la delimitación de especies de *Sepedonium* spp. con *Trichoderma aerugineum* como grupo externo, inferida de la alineación de secuencias de ITS, RPB2 y EF1- $\alpha$  -multigene; los valores de los nodos expresan probabilidad posteriori; micrografías de aleurioconidia obtenidas de este estudio con la excepción de la micrografía de *Sepedonium chalcipori* extraída de Sahr et al. (1999)..... 52





## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de partidores a utilizar para la caracterización molecular de <i>Sepedonium</i> spp. ....	28
Tabla 2. Especies / cepas de <i>Sepedonium</i> (en orden alfabético / numérico ascendente) incluidas en la filogenia molecular con sus respectivos marcadores moleculares y números de acceso de GenBank. ....	29
Tabla 3. Ubicaciones de las especies y cepas de <i>Sepedonium</i> recolectadas en el centro sur de Chile en orden cronológico con sus respectivos hospedadores. ....	33



## 1. RESUMEN

*Sepedonium* es un género anamórfico de la División Ascomycota, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae. Las especies conocidas a nivel mundial son todas micofílicas parasitando cuerpos fructíferos de basidiomicetes del Orden Boletales en distintos ecosistemas boscosos de ambos hemisferios. A pesar de que en Chile existen hospederos Boletales tanto nativos como introducidos del micoparásito, al mismo tiempo existen muy pocos antecedentes de cuáles son las especies de *Sepedonium* presentes en el país. Como consecuencia, se postula que los micoparásitos del género *Sepedonium* son hospedero-específicos y que también poseen carácter endémico en comparación con especies subcosmopolitas de *Sepedonium* previamente identificadas sobre Boletales introducidos como por ejemplo *Sepedonium chrysospermum*. Por esto, el objetivo general es caracterizar, identificar y evaluar la posición taxonómica de *Sepedonium* colonizando Boletales nativos e introducidos en el Centro-Sur de Chile. Para ello, se realizaron campañas de recolección en el año 2017 y 2018 de hospederos infectados en la Región del Biobío, Región de Ñuble y Región de la Araucanía donde se obtuvo un total de 35 cepas axénicas. Estas colonizaban, tanto hospederos introducidos como *Chalciporus piperatus*, *Suillus granulatus*, *Suillus luteus* y *Paxillus involutus*, como los hospederos nativos *Boletus loyo*, *Boletus loyita*, *Boletus putidus* y *Gastroboletus valdivianus*. Para la identificación de estas cepas, se aisló micelio de *Sepedonium* spp. y se cultivaron las diferentes cepas en Agar Malta Peptona para realizar un análisis taxonómico exhaustivo basado en un análisis de estructuras micromorfológicas diagnósticas mediante microscopía óptica y electrónica. Adicionalmente se realizó un análisis molecular de las cepas, para así llegar a una mejor identificación de ellas, para lo cual se amplificó por PCR un total de 81 secuencias de ADN de los genes ITS (31), RPB2(25) y EF1(25). Se realizaron reconstrucciones filogenéticas con métodos bayesianos. Los análisis filogenéticos revelaron 4 especies *S. ampullosporum*, *S. chrysospermum* y *S. laevigatum* y *S. loyorum* sp. nov, dentro de las cuales existieron diferencias entre las que parasitan Boletales nativos en comparación con aquellas que infectan Boletales introducidos. El árbol de especies mostró una clara separación de clados, con un clado representado por *S. loyorum* sp. nov separado de *S. chalcipori* como especies hermanas con una divergencia de 99%. Nuestros

resultados sugieren que estaríamos en presencia de una especie distinta, *S. loyorum* sp. nov la cual fue encontrada parasitando sólo Boletales endémicos chilenos.

Palabras clave: Boletales, micoparasito, *Sepedonium*, secuencias de ADN

## 2. ABSTRACT

*Sepedonium*, is an anamorphic genus of the Division Ascomycota, Order Hypocreales, Family Hypocreaceae. The species known worldwide are all mycophilic, parasitizing fruiting bodies of Basidiomycetes of the Order Boletales in different forest ecosystems of both hemispheres. Although in Chile there are both native and introduced Boletales hosts for this mycoparasite, but at the same time there is scant information on the species of *Sepedonium* present in the country, it is postulated that, the mycoparasites of the genus *Sepedonium* are host-specific and that they also possess endemic character in comparison with previously identified subcosmopolitan species of *Sepedonium* on introduced Boletales such as *Sepedonium chrysospermum*. Therefore, the general objective was to characterize, identify and evaluate the taxonomic position of *Sepedonium* by colonizing native and introduced Boletales in Central-Southern Chile. For this purpose, collection campaigns were carried out in 2017 and 2018 in order to obtain infected hosts in the Biobio Region, Ñuble Region and Araucanía Region where a total of 35 strains were collected. The colonized introduced hosts include *Chalciporus piperatus*, *Suillus granulatus*, *Suillus luteus* and *Paxillus involutus*, as well as the native hosts *Boletus loyo*, *Boletus loyita*, *Boletus putidus* and *Gastroboletus valdivianus*. For the identification of the strains, mycelium of *Sepedonium* spp. was isolated and cultured on malt peptone agar for taxonomic analysis. The mycoparasitic species in culture were characterized and identified based on an analysis of diagnostic micromorphological structures by optical and electronic microscopy. In addition, a molecular analysis of the strains was carried out in order to better identify them, for which a total of 81 DNA sequences of the genes ITS (31), RPB2 (25) and EF1(25) were amplified by PCR and sequenced using Sanger methodology. Phylogenetic reconstructions were performed using Bayesian methods. Phylogenetic analyses revealed 4 species: *S. ampullosporum*, *S. chrysospermum*, *S. laevigatum* and *S. loyorum* sp. nov., the later parasitizing native Boletales compared to the other three taxa

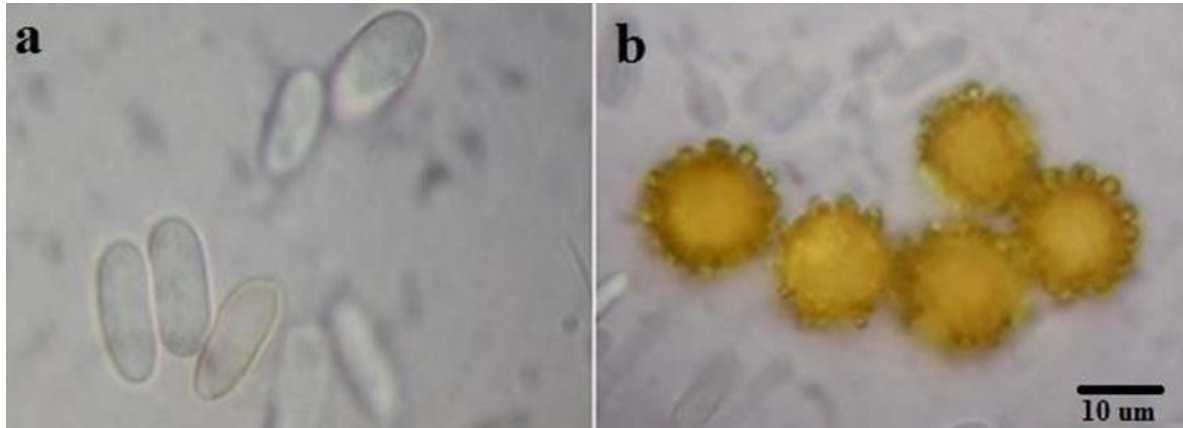
infecting introduced Boletales. The species tree showed a clear separation of clades, with one clade represented by *S. loyorum* sp.nov separated from *S. chalcipori* as a sister species with a divergence of 99 %. The results suggest that we would be in the presence of a distinct species, *S. loyorum* sp. nov which was found parasitizing only Chilean endemic Boletales.

Keywords: Boletales, mycoparasite, *Sepedonium*, DNA sequences

### 3. INTRODUCCIÓN

El Phylum Ascomycota (Reino Fungi) cuenta con aproximadamente 64.000 especies conocidas a nivel mundial (Kirk *et al.*, 2008), siendo el mayor Phylum de hongos y uno de los grupos más diversos de los eucariontes. Sus especies están presentes en numerosos nichos y prácticamente en todos los ecosistemas terrestres, cumpliendo con diversos roles como descomponedores de los sustratos orgánicos (como madera, hojarasca, estiércol), mutualistas, parásitos y patógenos de animales, plantas y otros hongos (Schoch *et al.*, 2009).

En gran parte de los ascomicetes sólo se conocen los estados reproductivos asexuales (anamorfo), los cuales predominan, más que el estado sexual (teleomorfo) (Schoch *et al.*, 2009). Tal es el caso de *Sepedonium*, género anamorfo (Hypocreales), con teleomorfo en *Hypomyces*, el cual fue establecido por Link (1809) en base de los parásitos micófilos con conidios globosos de pared gruesa, verrugosa (aleurioconidios) representados originalmente por la especie *Uredo mycophila* Pers. [= *Sepedonium mycophilum* (Pers.) Nees] la cual fue elegida especie tipo del género (Sahr *et al.*, 1999). En la actualidad corresponde a *Sepedonium chrysospermum* (Bull. Fr.) (Mitova *et al.*, 2008). *Sepedonium* se caracteriza por la formación de dos tipos de mitoesporas o conidios, aleurioconidios (esporas de persistencia) y fialoconidios (esporas de propagación rápida). Los conidióforos respectivos son hialinos y septados, con fialidos simples. Los fialoconidios son elipsoides e hialinos, mientras los aleurioconidios son amarillos y globosos con ornamentación verrugosa en la mayoría de las especies conocidas (Sahr *et al.*, 1999) (fig. 1); cabe destacar que se han encontrado parasitando sólo hongos basidiomicetes del Orden Boletales (Neuhof *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Micrografías de atributos diagnósticos de *Sepedonium* spp. a: fialoconidios; b: aleurioconidios (Fuente: Elaboración propia).

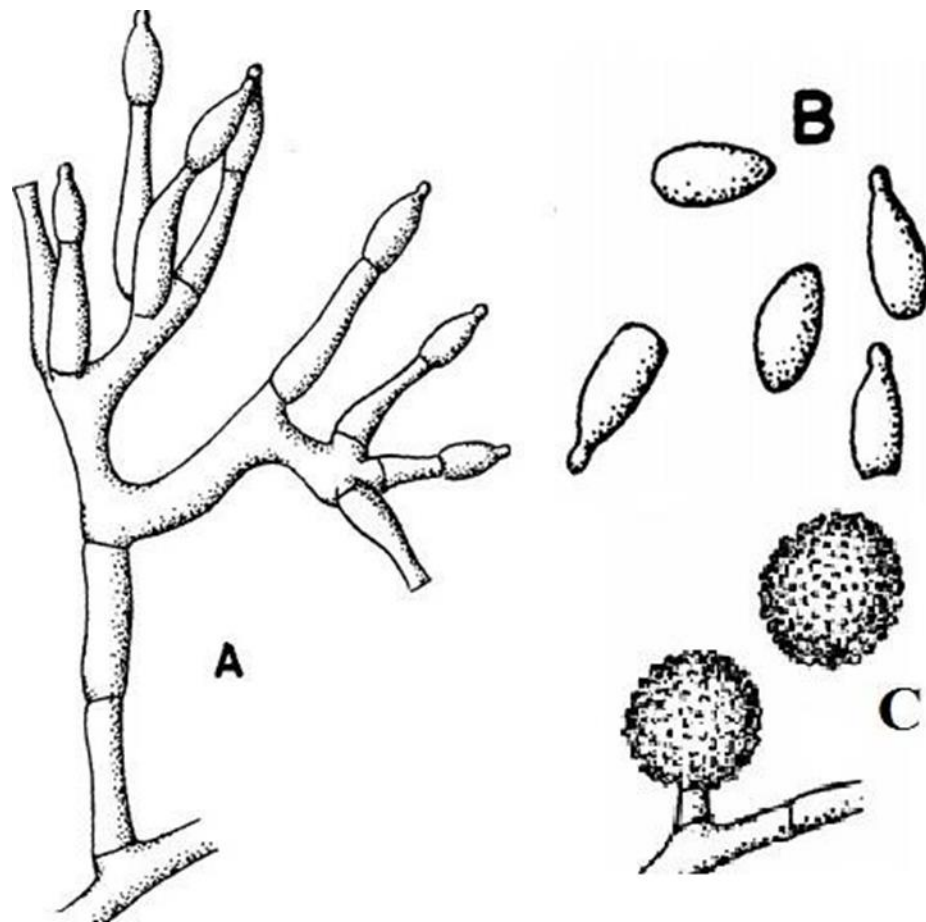
Posteriormente Petch (1938) y Pieschel (1962) notaron que existía una considerable variabilidad dentro de la morfoespecie *Sepedonium chrysospermum*, lo cual condujo al reconocimiento de nuevos taxones, como *S. ampullosporum* (Damon, 1952), *S. chalcipori* (Helfer, 1991) y *S. microspermum* (Besl *et al.*, 1998). En la actualidad se reconocen 8 taxones de *Sepedonium*, *S. chrysospermum*, *S. ampullosporum*, *S. chalcipori*, *S. chlorinum*, *S. brunneum*, *S. tulasneanum* y *S. laevigatum* (Sahr *et al.*, 1999). Los hongos micófilos como *Sepedonium* infectan y parasitan los cuerpos fructíferos o micelios de otros hongos, formando esporas en la etapa final del proceso de infección; son comunes en varios géneros de hospederos, pero infrecuentemente reportados. Aunque se conoce un amplio espectro de microorganismos parásitos incluyendo levaduras asociadas a cuerpos fructíferos de Boletales en los hábitats naturales (Yurkov *et al.*, 2012), se ha observado que los cuerpos fructíferos una vez infectados por *Sepedonium* spp., las estructuras del huésped rara vez son colonizadas visiblemente por otros microorganismos parásitos, ni siquiera por aquellos que se sabe que también están asociados con Boletales (Yurkov *et al.*, 2012); esta evidente exclusión de competidores puede correlacionarse con una importante producción de compuestos antibióticos como oligopeptidos (Otto *et al.*, 2016) y metabolitos secundarios (Vinale *et al.*, 2014), producidos por el micoparásito, para prevenir competencia.

### 3.1 Taxonomía morfológica de *Sepedonium*

Para la caracterización e identificación morfológica de las especies de *Sepedonium*, los atributos diagnósticos principales para poder diferenciar las especies son las ramificaciones de los fialoconidióforos, largo de los fiálidos, forma y tamaño de los fialoconidios así como forma, tamaño y ornamentación de aleurioconidios (Helfer, 1991; Sahr *et al.*, 1999). Es importante mencionar que para llevar a cabo el estudio tanto de los conidios como conidioforos es oportuno cultivar las especies *in vitro* para poder observar y diferenciar el desarrollo de todas las estructuras reproductivas. Esto debido a que por mucho tiempo solamente se reconoció *Sepedonium chrysospermum*, ya que sólo se observaban aleurioconidios, las estructuras dominantes *in situ* (sobre el hospedero).

Un ejemplo de esto son las estructuras de los fialoconidios, los cuales en *S. ampullosporum* presentan una forma lecitiforme (Damon, 1952 ver Figura 2), mientras en *S. chrysospermum* y otras especies presentan una forma elipsoide u ovalada; ambas fueron estudiadas de forma detallada por Sahr *et al.*, (1999).



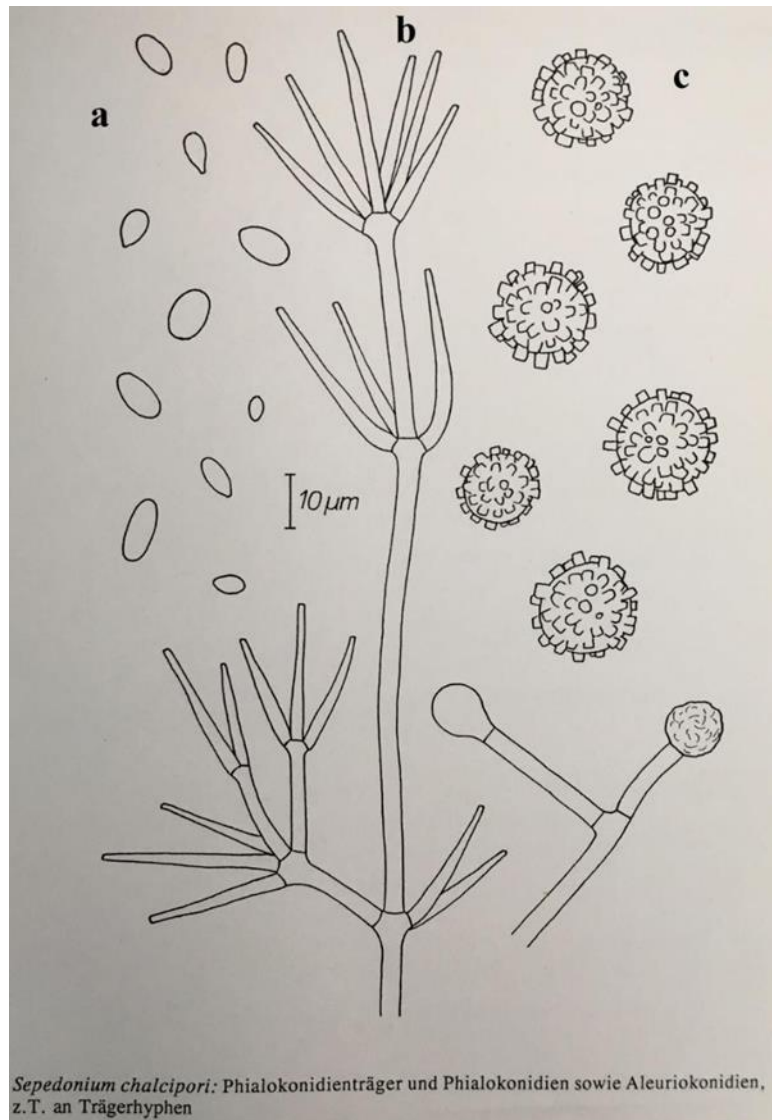


**Figura 2.** *Sepedonium ampullosporum*. A: Conidióforos, B: Fialoconidios, C: Aleurioconidios (fuente: Damon 1952).

Otro aspecto de importancia para la identificación son los atributos de las colonias miceliales *in vitro*, ya que la textura, pigmentación de los medios y velocidad de crecimiento difieren notablemente entre especies; creciendo sobre medio extracto de malta peptona, *Sepedonium ampullosporum* se caracteriza por poseer una textura del micelio algodonosa con una pigmentación del cultivo amarillo intenso, por su parte *S. chrysospermum*, presenta una textura del micelio en su mayoría lisa con una pigmentación del medio de cultivo amarillo-dorado (Helfer 1991; Sahr *et al.*, 1999), por mencionar algunas de ellas.

Helfer (1991), describe en base de material europeo *Sepedonium chalcipori* (Ver Figura 3), la cual es separada de *S. chrysospermum* s.l. basado en la morfología de conidióforos, ornamentación de aleurioconidios, y, lo más importante, la restricción a su hospedero *Chalciporus piperatus* (género

introducido en Chile) (Otto *et al.*, 2016), por lo que se cree una posible especificidad hospedero-parásito (Neuhof *et al.*, 2007).



**Figura 3.** *Sepedonium chalcipori*. a: Fialoconidios, b: Fialoconidioforos, c: Aleurioconidios (fuente: Helfer, 1991).



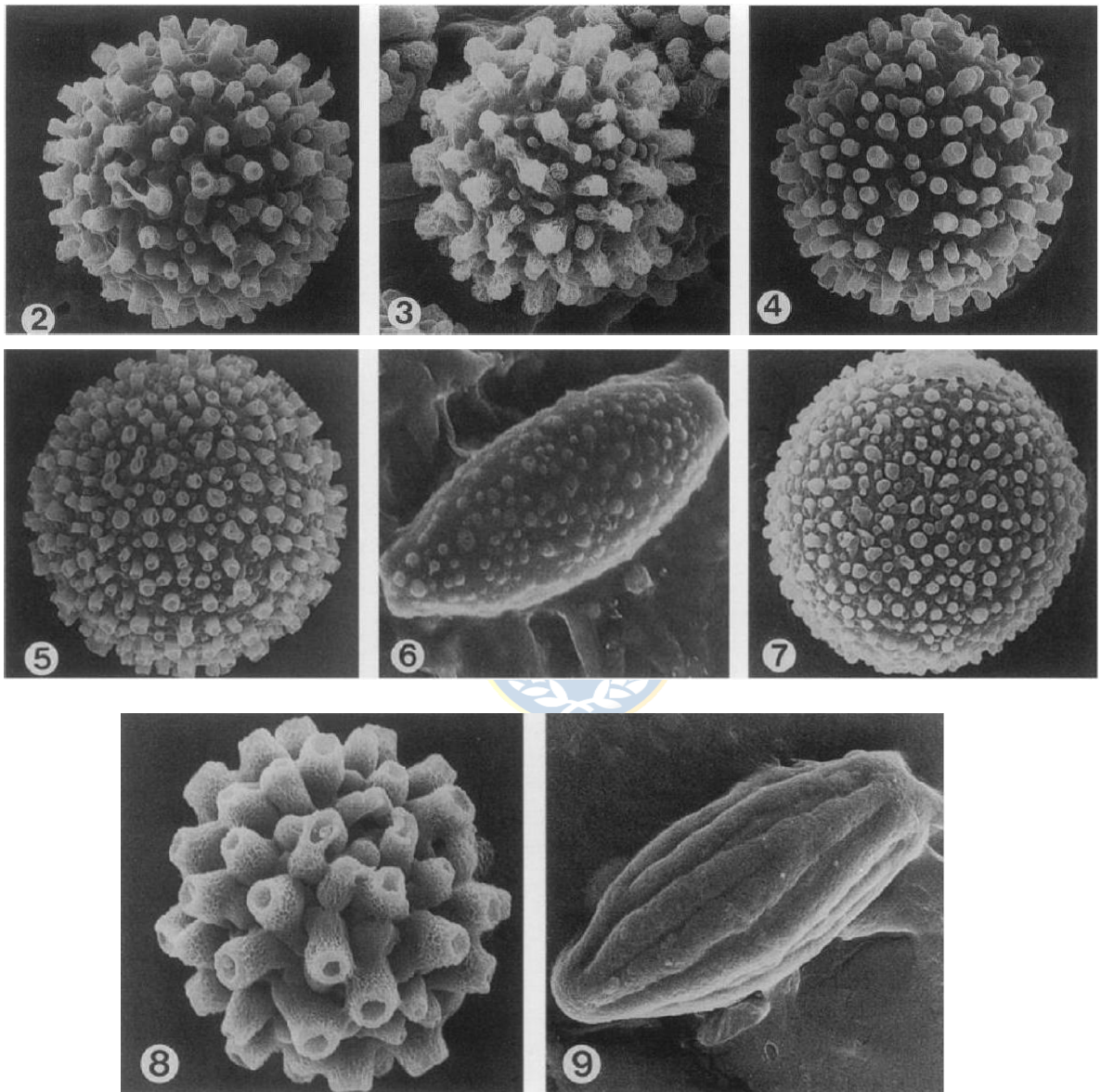
### 3.2 Taxonomía molecular de *Sepedonium*

Cabe mencionar que los métodos morfológicos para la identificación y clasificación de este tipo de hongos se han basado en su mayoría, en criterios de las características de estructuras micromorfológicas de reproducción asexual, lo cual inicialmente generó grandes aportes pero que en la actualidad no ha sido suficiente para llegar a identificaciones precisas de todas las especies (Montes *et al.*, 2003). Es por esto, que la caracterización molecular en base de secuencias de ADN de las especies de *Sepedonium* ha sido de gran importancia taxonómica, sobre todo para este género tan poco estudiado, debido a que ha permitido identificar y establecer las posibles relaciones que existen entre ellas por medio de estudios filogenéticos (Sahr *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 2016).

Sahr (1999), llevó a cabo el trabajo taxonómico más completo realizado hasta la fecha para *Sepedonium*; donde se estudiaron tanto características morfológicas y anatómicas, como química del pigmento, especificidad del huésped y características de crecimiento en cultivo, además de analizar la secuencia ADN de la región “ITS” incluyendo la región espaciadora transcrita interna y la región de ADN codificador S5.8 del ARN ribosomal (ITS1, S5.8, ITS2). Este estudio se realizó para aproximadamente 52 cepas del género. En su mayoría las cepas fueron extraídas de cuerpos fructíferos de Boletales originarios de Alemania, Estados Unidos y países del hemisferio Sur.

Con este estudio se logró caracterizar e identificar ocho grupos monofiléticos, los que se asignaron a las siguientes especies de *Sepedonium*: *S. ampullosporum*, *S. brunneum*, *S. chalcipori*, *S. chlorinum*, *S. chrysospermum*, *S. laevigatum*, *S. microspermum*, *S. tulasneanum* (Ver Figura 4). No obstante, algunas relaciones filogenéticas fueron escasamente sustentadas (<60 bootstrap) por el análisis de “neighbor-joining”, como es el caso de *S. chrysospermum* y *S. microspermum*. Posteriormente, Otto *et al.*, (2016) re-evaluaron la sistemática molecular de *Sepedonium* incorporando una muestra de Chile. El análisis filogenético del gen ITS basado en “maximum likelihood” obtuvo una topología diferente a la obtenida por Sahr *et al.*, (1999), mientras que el árbol concatenado (ITS, EF1-a, RPB2), con un menor número de muestras, obtuvo una topología que incluye las muestras de Chile como parte del clado *S. chalcipori*, que a

su vez es clado hermano de *S. brunneum*. Dado ese resultado, se describe la cepa chilena como *S. aff. chalcipori*, no obstante, se sugiere que *S. chalcipori sensu lato* podría corresponder a tres especies distintas (Otto *et al.*, 2016).



**Figura 4.** Detalles de aleurioconidios de *Sepedonium* spp. bajo microscopio electrónico de barrido: 2. *S. chrysospermum*, 3. *S. microspermum*, 4. *S. ampullosporum*, 5. *S. laevigatum*, 6. *S. tulasneanum*, 7. *S. brunneum*, 8. *S. chalcipori*, 9. *S. chlorinum* (fuente: Sahr *et al.*, 1999).

### 3.3 Diversidad y distribución geográfica de la asociación *Sepedonium*-Boletales

Como se mencionó anteriormente *Sepedonium* se ha encontrado asociado específicamente a Basidiomicetes del Orden Boletales (Yurkov *et al.*, 2012).

El Orden Boletales (Agaricomycetidae) es uno de los principales grupos formadores de hongos ectomicorrízicos, estos están representados en la mayoría de los ecosistemas forestales de todo el mundo. Contiene aproximadamente 1000 especies descritas (Kirk *et al.*, 2008), lo que podría ser una subestimación considerando que en extensas regiones geográficas como el Neotrópico y el Paleotrópico aún están poco estudiados; donde se cree que los Boletales han alcanzado la divergencia más notable (Binder & Hibbett, 2006). Este orden comprende varias familias dentro de las cuales podemos encontrar principalmente Boletaceae, Paxillaceae, Suillaceae, Sclerodermataceae y Rhizopogonaceae (Arzú & Gonzáles, 2018).

Los hospederos más comunes de *Sepedonium* son géneros como *Boletus s.l.*, *Xerocomus s.l.* y *Paxillus*, los cuales parasita provocando una infección que puede llegar hasta una colonización total del basidioma con la formación de grandes cantidades de aleurioconidios (Neuhof *et al.*, 2007).

La distribución conocida del género *Sepedonium* coincide con aquella de sus hospederos y es subcosmopolita.

Sin embargo aún existe un gran déficit de conocimiento acerca de la diversidad, distribución biogeográfica regional y patrones de especificidad de las especies de *Sepedonium* con sus hospederos. De acuerdo con los antecedentes entregados por Sahr *et al.*, (1999), las especies identificadas hasta ahora se distribuyen principalmente en el hemisferio norte; con enfoque en Europa (*S. chlorinum*, *S. chrysospermum*, *S. microspermum*, *S. ampullosporum*, *S. laevigatum*, *S. tulasneanum*, *S. brunneum*, *S. chalcipori*) y Estados Unidos (*S. microspermum*, *S. laevigatum*, *S. brunneum*), sin embargo probablemente existe un sesgo por esfuerzo de muestreo, el cual tradicionalmente ha sido enfocado más en países del hemisferio norte por varias razones.

Por otro lado, también en el hemisferio sur se ha encontrado: *Sepedonium ampullosporum*; especie que fue descrita y encontrada por primera vez en Brasil por Damon en 1952; *Sepedonium chalcipori* descrita por Helfer en 1991, la cual ha sido encontrada en Nueva Zelanda (Sahr *et al.*, 1999) de las cuales no existen registros para Chile; en el caso de *S. chrysospermum* existen 2 registros para Chile (Espinoza, 1917; Garrido, 1985). Más recientemente se obtuvo un registro de *S. aff chalcipori*; el cual fue aislado en 2011, desde *Boletus loyo* Phillipi (leg. /det. N. Arnold/ G. Palfner) bajo *Nothofagus obliqua* (Mirb.), en el Centro Sur de Chile (Otto *et al.*, 2016).

### **3.4 Boletales introducidos y endémicos en Chile y sus posibles interacciones con**

#### ***Sepedonium***

La diversidad de ecosistemas, de especies de flora, fauna y microbiota presentes en Chile, presenta altos niveles de endemismo (Cowling *et al.*, 1996; Vila & Habit, 2014; Ramírez & San Martín, 2005; Habit *et al.*, 2006; Valdovinos, 2006; Vidal, 2008). Esto estaría estrechamente relacionado con el creciente aislamiento geográfico de la región desde su origen gondwánico, debido a las características geomorfológicas que han formado barreras naturales, como el desierto de Atacama por el norte, la cordillera de los Andes por el este, el Océano Pacífico por el oeste y los glaciares por el sur, todo esto transforma a Chile en una isla biogeográfica, donde las posibilidades de colonización natural por un mayor número de especies desde afuera son bajas (Villagrán & Hinojosa, 2005).

Según el Ministerio del Medio Ambiente (MMA), es este mismo aislamiento el que ha favorecido la presencia exclusiva de diversas especies en nuestro territorio, concediéndole a nuestros ecosistemas una singularidad extraordinaria. A nivel nacional, casi el 25% de las especies descritas son endémicas, lo que le confiere a Chile especial relevancia ya que posee ecosistemas únicos en el mundo, por lo cual es de importancia global la conservación de la biodiversidad, ya que con esto se garantiza la viabilidad y reproducción de las especies y además se constituye un patrimonio de recursos biológicos y genéticos estratégicos para sustentar el desarrollo cultural, científico y económico del país (MMA).

La mayor diversidad y la mayor proporción de taxones endémicos se concentra en la zona mediterránea de Chile 35° y 40° SL debido a que se encuentra ubicada entre dos regiones climáticas contrastantes (la templada y la desértica), a su alto grado de heterogeneidad del territorio comparado con otros biomas y a la marcada diferencia de estacionalidad que resulta en una variabilidad de las comunidades bióticas (Panzera, 2017).

Parte de esta zona son las regiones del centro y sur de Chile, donde se ubica la ecorregión de los bosques mediterráneos, reconocida como uno de los 34 hotspot de biodiversidad global, el cual se caracteriza por tener una gran variedad de ecosistemas (Myers *et al.*, 2000; Conservation International, 2007).

La microbiota chilena está formada tanto por especies nativas como introducidas (Lazo, 2001). En el caso de las especies introducidas del Orden Boletales que encontramos en el país están asociadas particularmente a plantaciones forestales, principalmente de *Eucalyptus* spp. y de coníferas como *Pinus radiata* (Garrido 1986), que hoy en día cubren grandes extensiones que constituyen un 68% de superficie en cuanto al cambio de hectáreas de árboles nativos a forestales en la zona Centro-Sur (Aguayo & Pauchard, 2009; INFOR 2008), y las cuales permiten el ingreso de diversos hongos exóticos con los que realizan asociaciones biológicas específicas, como simbiosis micorrízica y también permite el desarrollo de hongos parásitos (Valenzuela *et al.*, 1998). Las especies de hongos ectomicorrízicos adventicios más comunes que forman micorrizas son *Suillus luteus*, *S. granulatus*, *Rhizopogon* spp., *Scleroderma* spp., *Paxillus* spp., entre otras (Garrido 1986; Singer 1969; Valenzuela *et al.*, 1998). Los potenciales hospederos introducidos de *Sepedonium* en Chile se encuentran distribuidos desde la Región de Valparaíso hasta la Región de Aysén, donde se establecen representantes, por ejemplo de la familia Boletaceae, entre ellos especies como *Chalciporus piperatus* y *Xerocomus chrysenteron* ; la familia Suillaceae donde encontramos 7 representantes en Chile los que fructifican en otoño con algunas excepciones- *Suillus bovinus*, *S. granulatus* , *S. grevillei* , *S. lakei* , *S. luteus* , *S. tomentosus*-; la familia Rhizopogonaceae donde encontramos - *Rhizopogon luteolus*, *R. roseolus* ; la familia Paxillaceae -*Paxillus involutus* y la familia Sclerodermataceae : *Scleroderma bovista* , *S. citrinum* (Garrido, 1985, 1986 ; Mujica *et al.*, 1980; Valenzuela *et al.*, 1992a; Valenzuela & Esteve-Raventos, 1999).

En el caso de las especies nativas que podrían ser potenciales hospederos del micoparásito *Sepedonium* en Chile, encontramos el género *Boletus*, el cual pertenece a la familia Boletaceae, con cinco especies: *Boletus chilensis*, *B. loyo*, *B. loyita*, *B. putidus* y *Gastroboletus valdivianus* (Garrido 1985, Valenzuela, 2003).

Fructifican dentro de los meses de abril hasta finales de mayo y han sido descritas para la misma zona de distribución del género *Nothofagus*, abarcando desde la Región del Maule hasta la Región de Los Lagos.

En esta zona es donde se encuentra un aliado fundamental para el establecimiento de estos hongos ectomicorrícicos del género *Boletus*, *Nothofagus obliqua* (Garrido, 1985; Horak, 1977). Con este antecedente, podríamos referirnos a estas especies de hongos como endémicas del cono Sur (Palfner, 2005).

Cabe mencionar, además, que la mayoría de las especies conocidas de *Sepedonium* pueden colonizar más de un género de Boletales; donde sólo se ha reportado *S. chalcipori* como un posible micoparásito altamente especializado, encontrado hasta ahora solamente en el basidiomicete *Chalciporus piperatus* (Otto *et al.*, 2016).

Sin embargo, al estudiar regiones con un alto nivel de endemismo en su micobiota surgen las preguntas: ¿son todas las otras especies de *Sepedonium* también generalistas? ¿Qué sucederá con las especies de *Sepedonium* que se han encontrado parasitando Boletales nativos? ¿Estaremos en presencia de parásitos específicos endémicos?

### **3.5 Nuevos Antecedentes: Especies de *Sepedonium* en Chile**

En Chile hasta el año 2016, sólo se contaba con 3 registros de *Sepedonium* infectando basidiocarpos; se trataba de *Sepedonium chrysospermum* (Espinoza *et al.*, 1917; Garrido *et al.*, 1985) y de *Sepedonium aff. chalcipori* (Otto *et al.* 2015). No existían antecedentes de ningún tipo de inventario local o regional de *Sepedonium* y sus hospederos, ni revisiones de las identidades de las distintas especies de *Sepedonium* que podemos encontrar en Chile.

Es así, como en el año 2018 la autora de este estudio realizó su tesis de pregrado titulada “Taxonomía de especies micoparasíticas del género *Sepedonium* (Hypocreales, Ascomycota) sobre Boletales (Basidiomycota) nativos e introducidos en la VIII Región del Biobío y la IX Región de la Araucanía, Chile” investigando 8 cepas de *Sepedonium*, las cuales fueron recolectadas de diversas especies de Boletales tanto nativos como introducidos. En este estudio se trabajó con taxonomía en base de atributos micromorfológicos, usando microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido para lograr identificar las especies que están presentes en Chile, donde se observaron estructuras tales como fialidos, fialoconidios y aleurioconidios; único trabajo previo que se ha realizado acerca de la diversidad e identidad de especies de *Sepedonium* que encontramos en el país, enmarcado en el Proyecto FONDEF IDeA1610I286.

En este instante se logró identificar dos especies, *Sepedonium ampullosporum* el cual se encontró parasitando *Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *Chalciporus piperatus* y *Suillus granulatus*, todos hospederos introducidos en nuestro país y también se identificó *S. aff chalcipori* encontrado sólo en hospederos endémicos tales como *Boletus loyo*, *Boletus loyita*, *Boletus putidus* y *Gastroboletus valdivianus*. El único antecedente previo con el que se contaba sobre *S. aff chalcipori* es el que había sido aislado en Mayo del 2011, desde *Boletus loyo* Phillipi (leg. /det. N. Arnold/ Goetz Palfner) bajo *Nothofagus obliqua* (Mirb.), en Chile (Región del Biobío, Provincia de Ñuble, Quillón, Cerro Cayumanqui). La identificación de esta especie está dada por la caracterización molecular que se le realizó por Otto et al. 2016, donde esta queda posicionada cerca del clado de *S. chalcipori*, de ahí el nombre *S. aff. chalcipori* (Otto et al., 2016).

En el transcurso de la investigación, surgieron problemas para poder llegar a la identificación de una cepa sólo mediante análisis taxonómico morfológico, por lo cual se decide continuar con estudios más avanzados y amplios de *Sepedonium*. Esto con el objetivo de seguir estudiando de manera mucho más amplia la distribución de *Sepedonium* en Chile, realizando muestreos más exhaustivos a nivel regional en la zona centro sur del país, además de obtener datos más robustos en cuanto a la identificación de las cepas y su posición filogenética con respecto a cepas ya estudiadas (Sahr et al., 1999; Otto et al., 2016) mediante herramientas moleculares. Así como también, estudiar la posible especificidad del hospedador con *Sepedonium* spp. asociado con Boletales en especies de *Nothofagus* de la zona Centro Sur de Chile,

investigando con ello la biología y ecología de la población de estos parásitos y aportar a los estudios sobre la coevolución parásito-hospedero.

Con los resultados que se logren obtener, se espera respaldar observaciones anteriores sobre que *Sepedonium aff. chalcipori* podría ser específico de hospederos endémicos, y que las otras especies de *Sepedonium* como por ejemplo *Sepedonium ampullosporum* serían más bien parásitos generalistas dentro del Orden Boletales.

### **3.6 Preguntas de Investigación**

¿Cuántos de los Boletales que tenemos en Chile tanto introducidos como nativos son susceptibles a ser infectados por *Sepedonium*? ¿Se encontrarán nuevas especies de *Sepedonium* en la zona Centro-Sur de Chile? ¿Es factible la identificación de las especies de *Sepedonium* solamente en base a sus atributos micromorfológicos dados por microscopía? ¿Qué pasa con las Boletaceas nativas, estas estarán parasitadas por los *Sepedonium* subcosmopolitas que ya se conocen? o ¿estaremos en presencia de taxones endémicos?

### **3.7 Hipótesis**

Debido al efecto del alto grado de endemismo que presentan los Boletales nativos de la zona Centro Sur de Chile, se hipotetiza que los micoparásitos del género *Sepedonium* sean hospedero-específicos y que también poseen carácter endémico en comparación con especies subcosmopolitas de *Sepedonium* previamente identificadas sobre Boletales introducidos.

### **3.8 Objetivo General**

Caracterizar, identificar y posicionar taxonómicamente las especies de *Sepedonium* encontradas sobre Boletales nativos e introducidos en la zona Centro-Sur de Chile.

### **3.9 Objetivos Específicos**

- Realizar una recolección amplia de *Sepedonium* en la zona forestal principal de la zona Centro Sur.



- Determinar la diversidad de Boletales tanto introducidos como nativos infectados por *Sepedonium* que se pueden encontrar en la zona Centro Sur.
- Determinar la posición taxonómica y especificidad de las especies de *Sepedonium* encontradas en Chile mediante diferentes marcadores moleculares como ITS, EF1-a y RPB2.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Recopilación Bibliográfica

Se recopiló información necesaria para poder contar con antecedentes previos de las especies a estudiar tanto de *Sepedonium* como de los hospederos (Boletales), y así manejar información relevante como son: antecedentes de los registros tanto en Chile como en el extranjero, distribución natural, características macro y microscópicas, ecología y biología de estas especies fúngicas para llevar a cabo comparaciones con los taxones que se logren recolectar en terreno (Horak, 1977; Garrido, 1985, 1986, 1988; Mujica *et al.*, 1980; Singer, 1969; Valenzuela *et al.*, 1998).



### 4.2 Recopilación de Material

Los basidiomas visiblemente infectados por *Sepedonium* fueron recolectados durante incursiones en Chile templado central, en las Regiones del Bío-bío, Región del Ñuble y Araucanía (Tabla 3, Fig. 5), aproximadamente entre 36° 15' y 38° 45' SL, durante la temporada completa de fructificación de hongos entre los meses de abril y octubre del año 2017, además entre febrero y mayo del año 2018. Los hábitats visitados incluyen bosques nativos de *Nothofagus*, así como plantaciones maderables de *Pinus radiata* introducido y otros hábitats antropogénicos como parques y jardines con presencia de árboles ectomicorrícicos compatibles con los hospederos Boletales requeridos. Las zonas de muestreo se caracterizan por poseer condiciones climáticas favorables para el desarrollo de una comunidad fúngica micorrícica diversa como, que posee un clima mediterráneo templado mientras que a latitudes más altas se

encuentra el bosque templado lluvioso ( Di Castri 1991 ; Rejmánek et al., 1991; Figueroa et al., 2004; Jiménez et al., 2008); además de ser una zona que posee una gran cobertura de plantaciones forestales, también cuenta con restos del bosque nativo caducifolio (Aguayo & Pauchard 2009). Los basidiomas localizados con signos visibles de infección por *Sepedonium* se documentaron *in situ*, se extrajeron, se almacenaron en recipientes de plástico y se trasladaron al laboratorio en el mismo día donde se refrigeraron a 4°C para su posterior procesamiento. Los basidiomas de hospederos Boletales fueron identificados en el campo y en el laboratorio mediante examen macroscópico y microscópico de los atributos morfológicos diagnósticos, de acuerdo con las claves y descripciones de referencia proporcionadas por Garrido (1988) y Horak (1977; 1980) para especies nativas chilenas y por Breitenbach & Kränzlin (1991), Knudsen y Vesterholt (2012) y Lazo (2016) para taxones adventicios, así como diversos recursos electrónicos. Los ejemplares de voucher deshidratados fueron depositados en CONC-F (Fungarium G. Palfner, Universidad de Concepción).

### **4.3 Análisis Taxonómico**

#### **4.3.1 Cultivos de *Sepedonium***



Bajo una campana de flujo laminar, se tomaron raspados de micelio y conidios de *Sepedonium* de basidiomas frescos infectados en condiciones estériles y se colocaron en placas Petri con agar de extracto de malta peptona (Otto et al. 2016). Se incubaron tres réplicas de cada cepa a 25°C y se purificaron de la contaminación si fue necesario, hasta obtener cultivos axénicos. Las cepas se conservan en el Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos, Universidad de Concepción, Chile y en KSH (Kulturen Sammlung Halle), Instituto de Bioquímica Vegetal, Halle (Saale), Alemania.

#### **4.3.2 Microscopía óptica**

Para microscopía óptica, se montaron trozos de micelio y raspados de conidios en portaobjetos de vidrio con una gota de agua destilada sin teñir. Las muestras se observaron en un microscopio compuesto Olympus

CX31 (Olympus, Tokio, Japón) con un aumento de 1000x con una cámara digital y un dispositivo de dibujo adjuntos. Se examinaron, midieron y documentaron estructuras diagnósticas como conidióforos, fialoconidios y aleurioconidios según Helfer (1991).

#### **4.3.3 Microscopía electrónica de barrido**

Se fijaron muestras deshidratadas de *Sepedonium* en huéspedes infectados y de cultivos axénicos en soportes SEM con parches de cinta adhesiva de doble cara, se metalizaron con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6380LV (JEOL, Tokio, Japon), con el fin de obtener imágenes de alta resolución de la estructura de la pared de los aleurioconidios.

#### **4.3.4 Extracción de ADN**

La obtención de tejidos se realizó utilizando un asa de inoculación estéril, donde las muestras de micelio se rasparon con o sin agar desde la placa y se suspendieron en una solución tampón proporcionada por FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), que es adecuado para la extracción de ADN genómico fúngico. Se siguieron las instrucciones del fabricante, para la extracción y purificación de ADN, incluido el paso de lisis mecánica que consta de dos ciclos de 40 s a 6 m/s en un FastPrep-24™ Classic Instrument (MP Biomedicals, USA), homogeneizador de alta velocidad adecuado para homogeneizar una variedad de muestras biológicas, lo que permite un aislamiento rápido y reproducible del ADN genómico de buena calidad. El ADN resultante se almacenó a -20°C hasta su posterior procesamiento. El procedimiento se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Investigación en Agentes antibacterianos (LIAA).

#### **4.3.5 Amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*)**

Para la amplificación por PCR, se utilizó 2 µL de la extracción de ADN (aproximadamente 10 ng) como templado en un volumen de reacción de 10 µL, que contiene además KAPA Taq ReadyMix with dye (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) diluido con agua libre de nucleasas estéril, a una concentración final de 1x

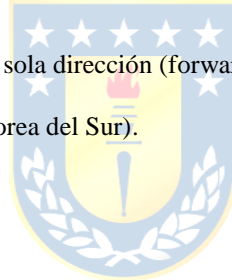
(correspondiente a una concentración de 0,2  $\mu$ M dNTPs y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) y 0,2  $\mu$ M de cada uno de los partidores moleculares (ver Tabla 1) (Crespo *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2001; White *et al.*, 1990).

**Tabla 1.** Secuencias de partidores utilizados para la caracterización molecular de *Sepedonium* spp.

Blanco genético	Partidor forward	Partidor reverse
ITS	ITS 1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS 4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
EF1- $\alpha$	EF1T: ATGGGTAAGGARGACAAGAC	1567R: ACHGTRCCRATACCACCSATCTT
RPB2	fRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	fRPB2-7cR: CCCATRGCTTGTYRCCCAT

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) usando el siguiente programa: 95°C por 3 min; seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s, 54°C por 15 s y 72°C por 30 s; un paso de incubación final a 72°C durante 7 min con el cual concluirá el protocolo de amplificación.

Los productos de PCR se secuenciaron en una sola dirección (forward) mediante secuenciación automática utilizando ABI3730XL de Macrogen (Seúl, Corea del Sur).



#### 4.3.6 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas desde MACROGEN para cada marcador moleculares utilizado (ITS1, JB EF1-a, JB Rpb2) se editaron mediante el programa Codon Code Aligner v. 3.0.3 (CodonCode Corporation, www.codoncode.com). Las secuencias se alinearon usando el programa MUSCLE (Edgar, 2004) integrando también las secuencias de *Sepedonium* disponibles en la base de datos GenBank (ver Tabla 2). La prueba de saturación se realizó en el programa DAMBE v. 5.2 (Xia, 2013), para evaluar la utilidad de las secuencias para los análisis filogenéticos. La proporción de los sitios invariables, parámetro clave para la prueba de saturación, se obtuvo con jModeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012), se utilizó el mismo software para identificar el modelo de reemplazo de nucleótidos de mejor ajuste para cada gen que resultó T93 + G para ITS1, EF1-a y RPB2 según los criterios el criterio de información de Akaike.

Se recuperaron dos árboles de especies en \*BEAST, un componente de BEAST v. 2.3.2 (Drummond & Rambaut, 2012), uno realizado a nivel de individuos utilizando el marcador molecular ITS 1 (68 cepas) y el otro realizado a nivel de especie utilizando los individuos para los que estaban disponibles las secuencias ITS1, EF1-a y RPB2 (ver Tabla 2). Utilizamos la misma configuración de modelo y sustitución de nucleótidos para cada conjunto de datos. Considerando que T93 + G es un modelo de evolutivo simple, evaluamos el efecto de modelos más complejos (GTR + G + I), obteniéndose topologías idénticas. Para cada set de datos se realizaron 100 millones de iteraciones y se tomaron muestras cada 1000 pasos, el primer 25% de los resultados se descartó mediante burn-in. La convergencia del análisis de MCMC se examinó visualmente en Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2013) para verificar la estacionariedad y los tamaños de muestra efectivos (ESS) superiores a 200. Para todos los análisis se utilizó como grupo externo *Trichoderma aeruginum* Jaklitsch. La visualización de los árboles se realizó con el programa Fig Tree (Rambaut, 2007).

**Tabla 2.** Especies / cepas de *Sepedonium* (en orden alfabético / numérico ascendente) incluidas en la filogenia molecular con sus respectivos marcadores moleculares y números de acceso de GenBank.

Especies	Código cepa	Marcadores ADN y números de acceso GenBank		
		ITS1	EF1- $\alpha$	RPB2
<i>S. ampullosporum</i>	C1732	MW386316	MZ285598	MZ360964
<i>S. ampullosporum</i>	C1734	MW386317	-	-
<i>S. ampullosporum</i>	C1735	MW386318	MZ308648	MZ360965
<i>S. ampullosporum</i>	C1736	MW386339	MZ360967	MZ360966
<i>S. ampullosporum</i>	C1744	MW386486	-	-
<i>S. ampullosporum</i>	C1821	MW386488	MZ343800	MZ366757
<i>S. ampullosporum</i>	C1857	MW386489	MZ343801	MZ389106
<i>S. ampullosporum</i>	C1858	MW386493	MZ343802	MZ389107
<i>S. ampullosporum</i>	C1859	MW390916	MZ343803	MZ389108

<i>S. ampullosporum</i>	C1861	MW386627	MZ333232	MZ389109
<i>S. ampullosporum</i>	CBS645.66	MH858903.1	-	-
<i>S. ampullosporum</i>	S15	AF054853.1	-	-
<i>S. ampullosporum</i>	WIC 001	MG052636.1	-	-
<i>S. ampullosporum</i>	WIC 007	MG052634.1	-	-
<i>S. brunneum</i>	AF054861.1	AF054861.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	CBS148.92	MH862347.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	CBS168.92	MH862349.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	CBS278.92	MH874023.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	JAC14133	MK432800.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	KSH 401	KT946840.1	KU041502.1	KU041490.1
<i>S. chalcipori</i>	KSH 587	KT946846.1	KU 041508.1	KU041496.1
<i>S. chalcipori</i>	KSH 558	KT946845.1	KU041507.1	KU041495.1
<i>S. chalcipori</i>	KSH 602	KT946847.1	KU041509.1	KU041497.1
<i>S. chalcipori</i>	S32	AF054864.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	S33	AF054863.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	S35	KT946840.1	-	-
<i>S. chalcipori</i>	S44	KT946846.1	-	-
<i>S. chlorinum</i>	AF54866.1	AF054866.1	-	-
<i>S. chrysospermum</i>	C1743	MZ272442	MZ333230	MZ366750
<i>S. chrysospermum</i>	C1768	MZ272474	MZ333231	MZ366753
<i>S. chrysospermum</i>	C1777	MZ272476	MZ322966	MZ366755
<i>S. chrysospermum</i>	C1779	MZ272477	-	-
<i>S. chrysospermum</i>	C1781	MZ292899	MZ329802	MZ366756
<i>S. chrysospermum</i>	C1786	MZ272698	-	-

<i>S. chrysospermum</i>	C1845	MZ272885	MZ329801	MZ389105
<i>S. chrysospermum</i>	C1846	MZ273040	-	-
<i>S. chrysospermum</i>	S47	AF054844.1	-	-
<i>S. laevigatum</i>	C1769	MW386487	MZ333233	MZ366754
<i>S. laevigatum</i>	C1867	MW386632	MZ333234	MZ389110
<i>S. laevigatum</i>	CBS101645	NR119422.1	-	-
<i>S. laevigatum</i>	S45	AF054856.1	-	-
<i>S. laevigatum</i>	S88	AF054857.1	-	-
<i>S. laevigatum</i>	S173	AF054858.1	-	-
<i>S. laevigatum</i>	S176	AF054855.1	-	-
<i>S. loyorum</i>	C1741	MW396890	-	-
<i>S. loyorum</i>	C1753	MW386647	MZ343804	MZ389111
<i>S. loyorum</i>	C1754	MW386648	MZ343805	MZ389112
<i>S. loyorum</i>	C1755	MW386649	-	-
<i>S. loyorum</i>	C1760	MW396888	MZ343806	MZ366751
<i>S. loyorum</i>	C1765	MW386650	MW759845	MZ366752
<i>S. loyorum</i>	C1766	MW386651	-	-
<i>S. loyorum</i>	C1780	MW396889	-	-
<i>S. loyorum</i>	C1856	MW396891	-	-
<i>S. loyorum</i>	KSH 883	KT946848.1	KU041510.1	KU041498.1
<i>S. loyorum</i>	KSH 928	KT946850.1	KU 041512.1	KU041500.1
<i>S. microspermum</i>	S6	AF054849.1		
<i>S. microspermum</i>	S23	AF054851.1	-	-
<i>S. microspermum</i>	S24	AF054847.1	-	-
<i>S. microspermum</i>	S77	AF054848.1	-	-

<i>S. microspermum</i>	S155	AF054850.1	-	-
<i>S. microspermum</i>	S177	AF054852.1	-	-
<i>S. tulasneanum</i>	CBS940.69	MH871270.1	-	-
<i>S. tulasneanum</i>	S29	AF054859.1	-	-
<i>S. tulasneanum</i>	S165	AF054860.1	-	-
<i>Trichoderma aerugineum</i>	FJ860516.1	-	-	FJ860516.1
<i>Trichoderma aerugineum</i>	FJ860608.1	-	FJ860608.1	-
<i>Trichoderma aerugineum</i>	NR134379.1	NR 134379.1	-	-

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Especies y cepas de *Sepedonium* recolectadas en el Centro-Sur de Chile

Las 35 cepas de *Sepedonium* examinadas sobre diferentes hospederos (ver Tabla 3), pertenecen a cuatro especies que fueron caracterizadas e identificadas en base a sus atributos diagnósticos como ramificación de filioconidióforos, tamaño y forma de filioconidios, tamaño y ornamentación de aleurioconidios y también en base a su identidad molecular (secuencias ITS).

Se trata de *Sepedonium ampullosporum*, *Sepedonium chrysospermum*, *Sepedonium laevigatum* y *Sepedonium loyorum* **sp. nov.** Se evidencia que existe una distribución no aleatoria, dado que, de los hospederos analizados, los seis introducidos (*Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *Chalciporus piperatus* y *Suillus granulatus*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus*) fueron infectados por *Sepedonium ampullosporum*, *Sepedonium chrysospermum*, *Sepedonium laevigatum*, mientras los otros cuatro hospederos nativos fueron infectados por *Sepedonium loyorum* (*Gastroboletus valdivianus*, *Boletus loyo*, *Boletus loyita* y *Boletus putidus*).



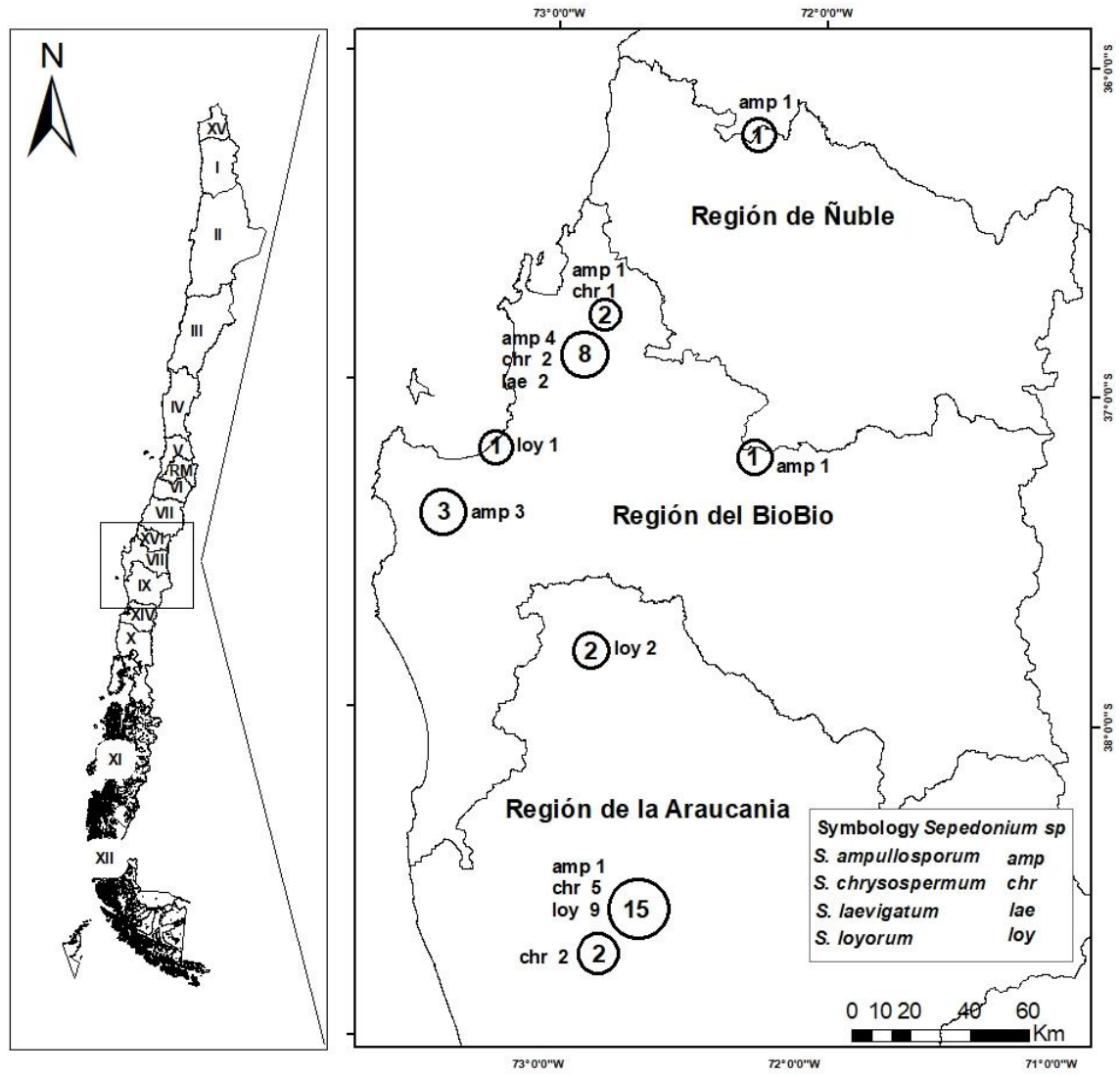
**Tabla 3.** Ubicaciones de las especies y cepas de *Sepedonium* recolectadas en el centro sur de Chile en orden cronológico con sus respectivos hospedadores.

<b>Codigo Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Localidad</b>	<b>Hospedero</b>
CONC-F1732	<i>S. ampullosporum</i>	LS 36° 49' 25,8" LO 73° 00' 23,5"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, patio privado	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Castanea sativa</i>
CONC-F1734	<i>S. ampullosporum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1735	<i>S. ampullosporum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Chalciporus piperatus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1736	<i>S. ampullosporum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1741	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 18,59" LO 72° 36' 11,43"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Gastroboletus valdivianus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1743	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 42' 7,57" LO 72° 32' 57,38"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, campus Universidad Católica de Temuco	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i>
CONC-F1744	<i>S. ampullosporum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1752	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 20,06" LO 72° 36' 13,07"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Boletus putidus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>

CONC-F1753	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 18,80" LO 72° 36' 12,10"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Boletus loyo</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1754	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 7,09" LO 72° 36' 2,39"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Boletus putidus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1755	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 18,79" LO 72° 36' 12,39"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Boletus loyo</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1756	<i>S. loyorum</i>	LS 37° 11' 47,62" LO 73° 00' 0,35"	Región Biobío, Ciudad de Santa Juana, remanente de bosque nativo	<i>Boletus putidus</i> bajo <i>Nothofagus obliqua</i>
CONC-F1758	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 25,76" LO 72° 36' 11,02"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Gastroboletus valdivianus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1760	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 47,75" LO 72° 36' 25,93"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Boletus loyita</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1765	<i>S. loyorum</i>	LS 37° 48' 59" LO 72° 55' 30"	Región Araucanía, Ciudad de Angol, camino a Parque Nacional Nahuelbuta	<i>Boletus loyo</i> bajo <i>N. obliqua</i>
CONC-F1766	<i>S. loyorum</i>	LS 37° 48' 59" LO 72° 55' 30"	Región Araucanía, Ciudad de Angol, camino a Parque Nacional Nahuelbuta	<i>Boletus loyo</i> bajo <i>N. obliqua</i>
CONC-F1767	<i>S. chrysospermum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>

CONC-F1768	<i>S. chrysospermum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1769	<i>S. laevigatum</i>	LS 36° 52' 36" LO 72° 59' 32"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1777	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 39' 29,77" LO 72° 36' 15,52"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1778	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 39' 29,77" LO 72° 36' 15,52"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1779	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 43' 38" LO 72° 35' 35"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Monumento Natural Ñielol	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1780	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 28,77" LO 72° 36' 11,76"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Boletus loyita</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1781	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 27' 52" LO 72° 45' 50"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1786	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 49' 49,5" LO 72° 02' 0,5"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, campus Universidad de Concepción	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1821	<i>S. ampullosporum</i>	LS 37° 12' 39,5" LO 73° 33' 45,5"	Región Biobío, Ciudad de Arauco, Fundo Llico	<i>Suillus granulatus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>

CONC-F1845	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 39' 29,77" LO 72° 36' 15,52"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1846	<i>S. chrysospermum</i>	LS 38° 39' 29,77" LO 72° 36' 15,52"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Paxillus involutus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1856	<i>S. loyorum</i>	LS 38° 39' 25,76" LO 72° 36' 11,02"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Gastroboletus valdivianus</i> bajo <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i>
CONC-F1857	<i>S. ampullosporum</i>	LS 36° 13' 27" LO 72° 37' 25"	Región Ñuble, Ciudad de Quirihue, Fundo El Guanaco	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1858	<i>S. ampullosporum</i>	LS 37° 22' 49,90" LO 73° 29' 9,11"	Región Biobío, Ciudad de Curanilahue, camino a Villa Alegre	<i>Rhizopogon luteolus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1859	<i>S. ampullosporum</i>	LS 37° 22' 49,90" LO 73° 29' 9,11"	Región Biobío, Ciudad de Curanilahue, camino a Villa Alegre	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1861	<i>S. ampullosporum</i>	LS 37° 25' 51,72" LO 73° 23' 48,62"	Región Biobío, City of Curanilahue, road to Huillinco	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1867	<i>S. laevigatum</i>	LS 36° 52' 42" LO 72° 59' 33"	Región Biobío , Ciudad de Concepción, Parque Nacional Nonguén	<i>Rhizopogon roseolus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>
CONC-F1869	<i>S. ampullosporum</i>	LS 38° 39' 29,77" LO 72° 36' 15,52"	Región Araucanía , Ciudad de Temuco, Reserva Forestal Rucamanque	<i>Suillus luteus</i> bajo <i>Pinus radiata</i>



**Figura 5.** Mapa de distribución de colecciones de *Sepedonium* spp. entre 2017 y 2018 en el Centro Sur de Chile. (Fuente: elaboración propia).

## 5.2 Caracterización morfológica especies de *Sepedonium*

### 5.2.1 *Sepedonium loyorum* Palfner, Casanova-Katny, N. Arnold & Binimelis-Salazar sp. nov.

(figs. 6, 7, 8b, 9d, 10d)

**Etimología:** loyorum: plural latinizado de loyo, se refiere a las principales especies hospedadoras *Boletus loyo* y *Boletus loyita*; ambos epítetos son derivados de los correspondientes nombres nativos chilenos (mapudungun) que son “Loyo” para *Boletus loyo* y “Pichiloyo” (pequeño loyo) para *B. loyita*.

**Diagnosis:** Tegumentum tomentosum, in sporocarpis boletorum Chilensium, primo album, maturitate aureum; phialoconidiophori in cultivo (MPA) verticillati, 2-3 (4) phialidibus curtibus, 23-60(80) × 2-3,5 μm; phialoconidia incolorata, tenuitunicata, subcylindracea, ovoidea vel ellipsoidea, magnitudine variabilis, 8-15 × 3-7 μm; aleurioconidia in hyphis lateralibus, primo incolorata, deinde lutea, crassitunicata, globosa, 10-15 μm diam, verrucosa; verrucae breviter cylindraceae vel doliiformae, 1-3 μm altae, apice paulum depresso; coloniae in MPA 25 °C post septem dies 25- 30 mm diametro, paucim mycelio aereo albo, medium nutricium lutescens.

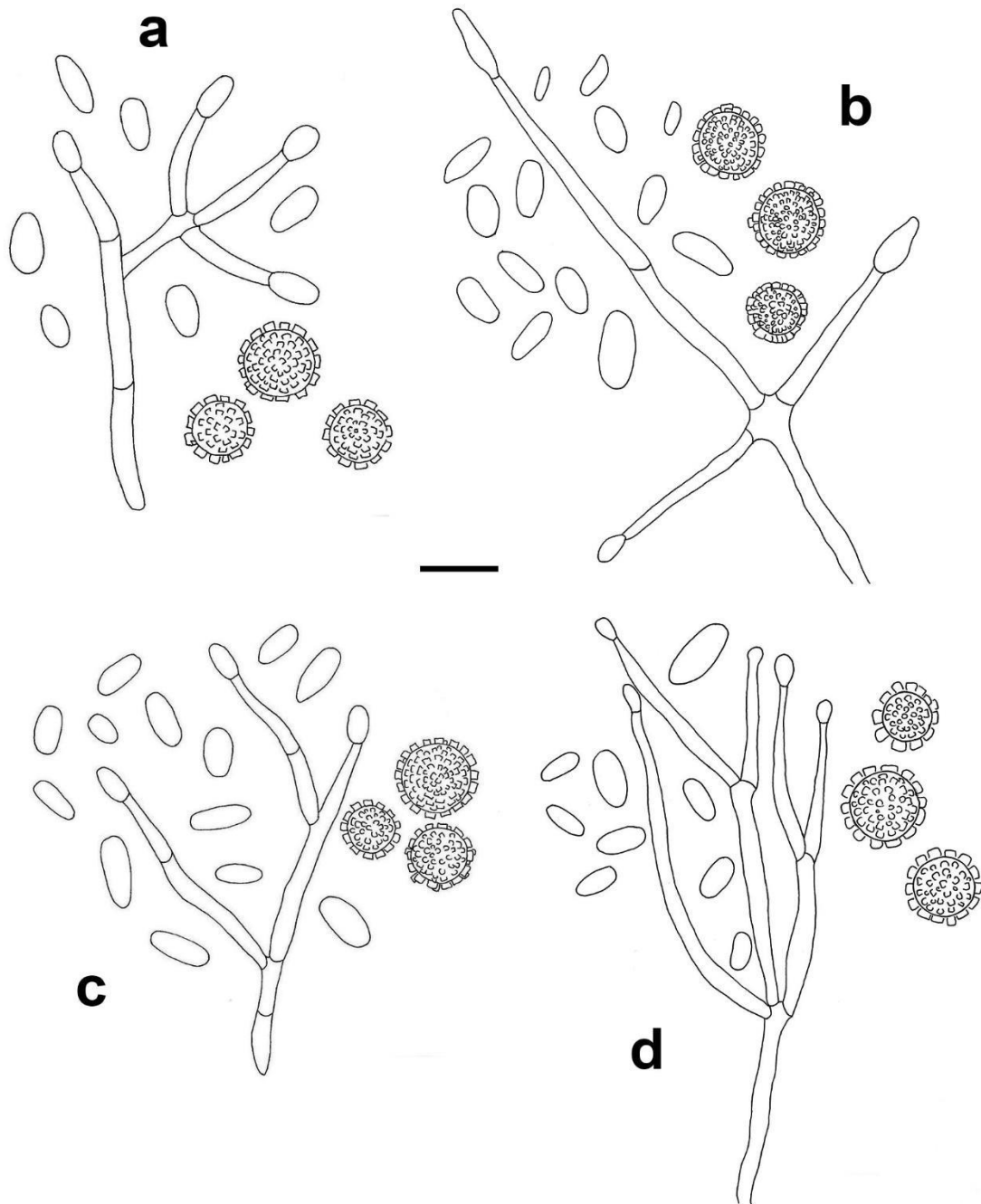
El micelio forma una capa tomentosa a pubescente en los carpóforos de las Boletaceae nativas de Chile, blanco al principio, amarillo dorado en la madurez (Fig. 6a-c); conidióforos (Fig. 4) en el cultivo (MPA) hialinos, verticilados, tabicados, verticilados 2-3 (4); filidos cortos, 23-60 (80) μm × 2-3,5; fialoconidios (Fig. 4) incoloros, de paredes delgadas, ovoides, elipsoides o subcilíndricos, bastante variables en tamaño, 8-15 × 3-7 μm; aleurioconidios (Figs.4, 5, 8d) incoloros al principio, luego se vuelven amarillos, de paredes gruesas, esféricas, de 10-15 μm de diámetro, verrugosas, verrugas cilíndricas o con forma de barril o de volcán, 1-3 μm de largo , típicamente con depresión apical densamente dispuestas; colonias (Fig. 7d) que crecen lentamente en MPA, 25-30 mm en siete días a 25 °C, formando una estera fina, blanquecina, bastante

compacta de micelio tomentoso, el medio de cultivo lentamente se torna de color amarillo cuando los aleuriocnidios están maduros; teleomorfo no conocido.

**Hospedero:** *Boletus loyita*, *Boletus loyo*, *Boletus putidus*, *Gastroboletus valdivianus* E. Horak 1977.

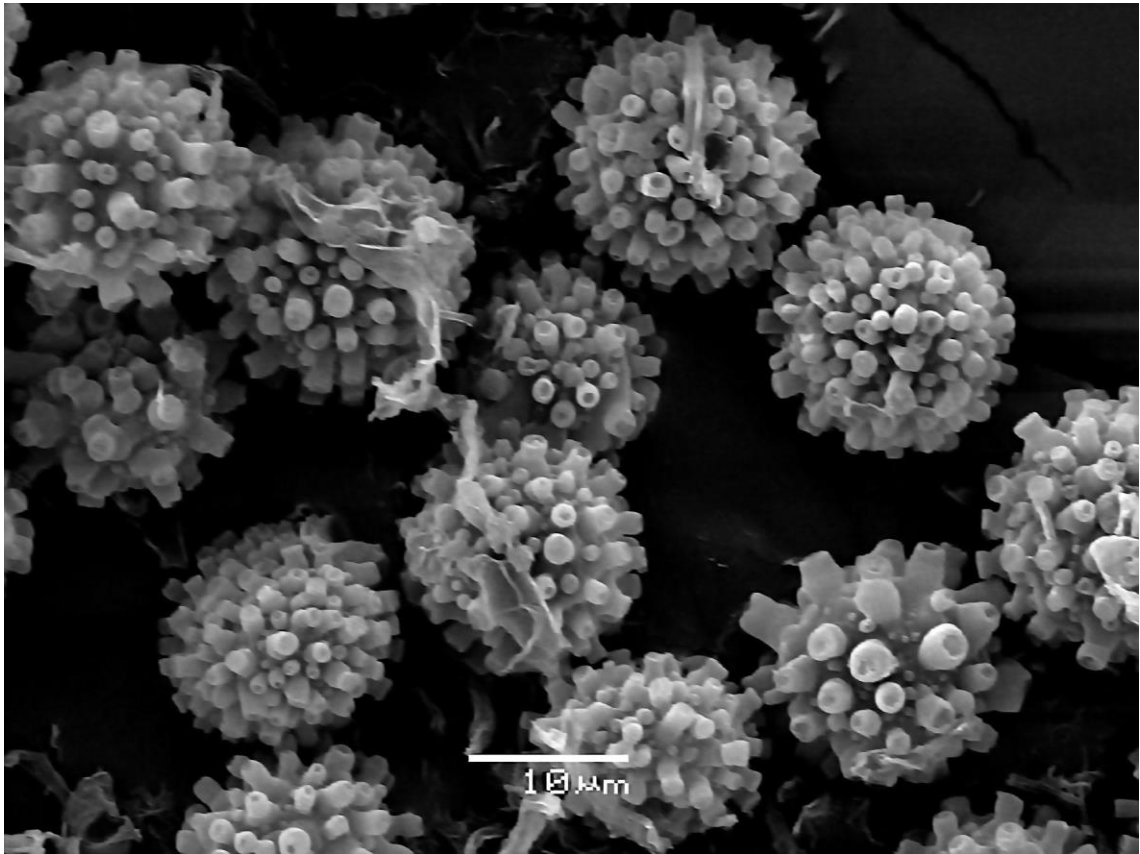
**Material examinado:** Holotipo: Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus putidus*, 12 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1754, KSH1001); material adicional: Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus putidus*, 30 Marzo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1741); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus putidus*, 12 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1752); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus loyo*, 12 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1753); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus loyo*, 12 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1755); Chile, Región del Biobío, Santa Juana, sobre *Boletus putidus*, 18 Abril 2017, leg. N.N. (CONC-F1756); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Gastroboletus valdivianus*, 27 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1758); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus loyita*, 27 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1760); Chile, Región de la Araucanía, Angol, Nahuelbuta, sobre *Boletus loyo*, 01 Mayo 2017, leg. N. Arnold (CONC-F1765); Chile, Región de la Araucanía, Angol, Nahuelbuta, sobre *Boletus loyo*, 01 Mayo 2017, leg. N. Arnold (CONC-F1766); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Boletus loyita*, 09 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1780); Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Gastroboletus valdivianus*, 24 Abril 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1856).

Comentario: Según nuestros resultados, *Sepedonium aff. chalciporus* citado por Otto et al. (2016) es conespecífico con *S. loyorum*.



**Figura 6.** *Sepedonium loyorum* sp. nov., conidioforos, fialoconidios y aleurioconidios en cultivo axénico (MPA) obtenidos de 4 diferentes especies de hospederos; a: de *Boletus loyita*, cepa CONC-F1760; b: de *B. loyo*, cepa CONC-F1755; c: de *B. putidus*, cepa CONC-F1754 (holotipo); d: de *Gastroboletus valdivianus*, cepa CONC-F1741; barra 20µm.





**Figura 7.** Micrografía electrónica de barrido de aleurioconidios, *Sepedonium loyorum* sp. nov. (CONC-F1754, holotipo).



### 5.2.2 *Sepedonium ampullosporum* Damon, Mycologia 44(1): 91 1952

**Descripción:** Conidióforos hialinos, septados y verticilados de hasta 3 fialidos, 43-128 x 3-5  $\mu\text{m}$ ; fialoconidios hialinos, lecitiformes, 15-22 x 5-8  $\mu\text{m}$ ; aleurioconidios con ornamentación corta (1-1,5  $\mu\text{m}$ ), 14(15)-19(21)  $\mu\text{m}$ ; el micelio en cultivo tiene un crecimiento óptimo a una temperatura entre 23 y 25°C; de micelio amarillo y textura algodonosa; medio de cultivo tornándose amarillo intenso; velocidad de crecimiento 5,2 mm/día en un promedio de 7 días a 25°C; no se encontraron diferencias de las estructuras micromorfológicas entre hospedero colonizado y cultivo axénico.

**Hospederos:** *Suillus luteus* (L.) Roussel 1796, *Suillus granulatus* (L.) Roussel 1796, *Chalciporus piperatus* (Bull.) Bataille 1908, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. 1838, *Rhizopogon luteolus* Fr. 1817.

**Material Examinado:** Chile, Región del Biobío, Concepción, Puchacay, sobre *Paxillus involutus*, 4 Marzo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1732), Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Suillus luteus*, 28 Marzo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1734); Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Chalciporus piperatus*, 28 Marzo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F 1735); Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Suillus luteus*, 28 Marzo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1736); Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Suillus luteus*, 4 Abril 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1744); Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Suillus luteus*, 4 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1767); Chile, Región del Biobío, Arauco, sobre *Suillus granulatus*, 19 Octubre 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1821); Chile, Región de Ñuble, Quirihue, on *Suillus luteus*, 29 Abril 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1857); Chile, Región del Biobío, Arauco, Curanilahue, sobre *Rhizopogon luteolus*, 10 Mayo 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1858), Chile, Región del Biobío, Arauco, Curanilahue sobre *Suillus luteus*, 10 Mayo 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1859), Chile, Región del Biobío, Arauco, Curanilahue, sobre *Suillus luteus*, 11 Mayo 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1861), Chile, Región del Biobío, Arauco, sobre *Suillus luteus*, 10 Mayo 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1869).

### 5.2.3 *Sepedonium chrysospermum* (Bull.) Fr., Syst. mycol. (Lundae) 3(2): 438 1832

**Descripción:** Conidióforos hialinos, septados, verticilados de 1-3 fialidos, 55-110 x 4,5-6  $\mu\text{m}$ ; fialoconidios hialinos, elipsoides ,6-24 X 3-11  $\mu\text{m}$ ; aleurioconidios con ornamentación corta cilíndrica (1-1,5  $\mu\text{m}$ ), 14(16)-19(22)  $\mu\text{m}$ ; micelio de color amarillo claro y textura lisa; medio de cultivo tornándose amarillo oro; velocidad de crecimiento de 4,6 mm/día en un promedio de 7 días a 25°C; no se encontraron diferencias de las estructuras micromorfológicas entre hospedero colonizado y cultivo axénico.

**Hospedero:** *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. 1838.

**Material examinado:** Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Universidad Católica de Temuco, sobre *Paxillus involutus*, 29 Marzo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1743b), Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Suillus luteus*, 4 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1768), Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Paxillus involutus*, 9 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1777), Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, on *Paxillus involutus*, 9 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F 1778), Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Cerro Ñielol, sobre *Paxillus involutus*, 9 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1779), Chile, Región de la Araucanía, Curacautín, Andenrose lodge, sobre *Paxillus involutus*, 5 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1781), Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Paxillus invoutus*, 16 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1786), Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Paxillus involutus*, 28 Febrero 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1845), Chile, Región de la Araucanía, Temuco, Reserva Rucamanque, sobre *Paxillus involutus*, 28 Febrero 2018, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F1846).

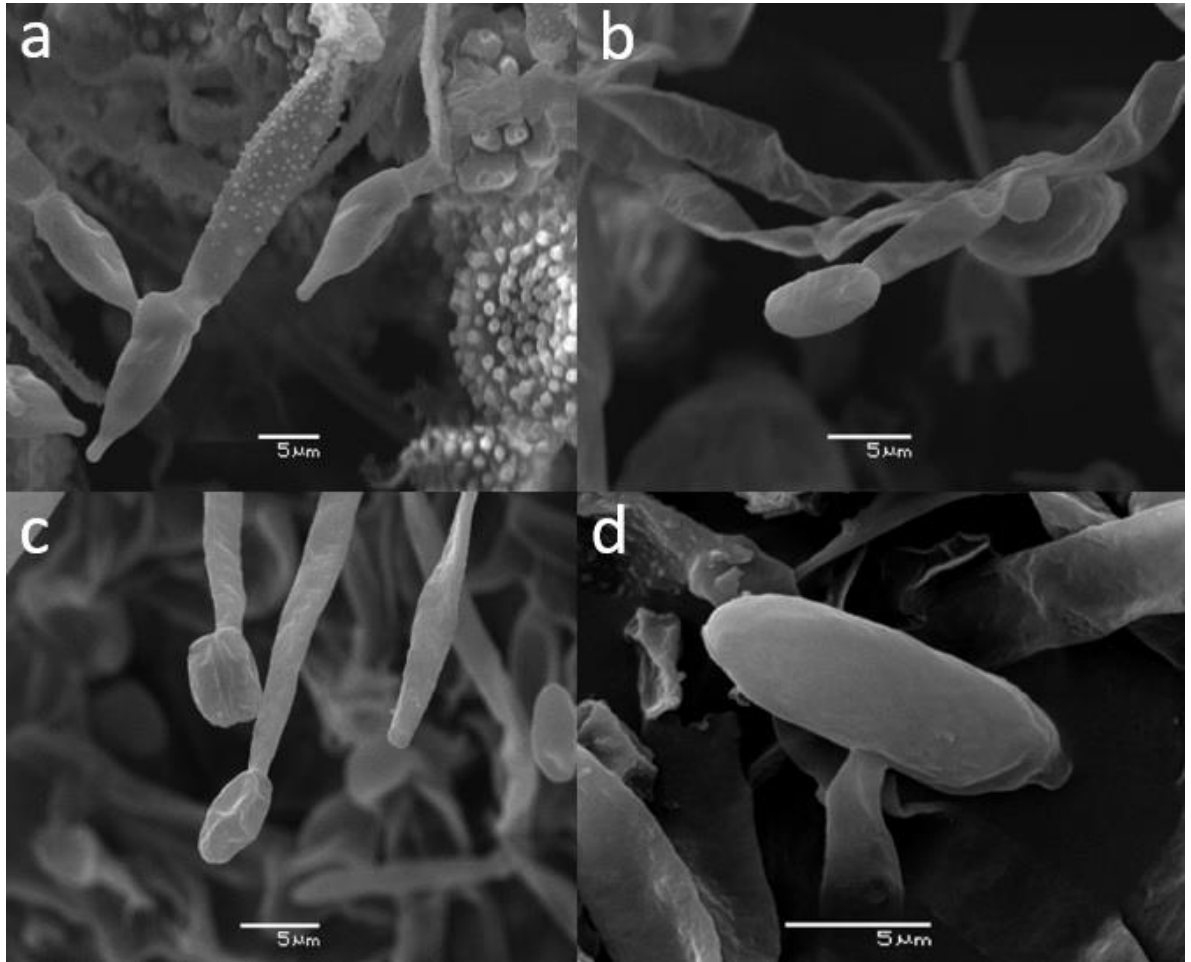
#### 5.2.4 *Sepedonium laevigatum* Sahr & Ammer, Mycologia 91(6): 939 1999

**Descripción:** Conidióforos hialinos, septados, verticilados de 1-2 fialidos, 115-220 x 3-4,5  $\mu\text{m}$ ; fialoconidios hialinos, elipsoides 8-26 X 3-11  $\mu\text{m}$ ; aleurioconidios con ornamentación corta cilíndrica (1-1,5  $\mu\text{m}$ ), 13(14)-17(19)  $\mu\text{m}$ ; micelio de color anaranjado y textura lisa; medio de cultivo tornándose anaranjado oscuro; velocidad de crecimiento de 7,5 mm/día en un promedio de 7 días a 25°C; no se encontraron diferencias de las estructuras micromorfológicas entre hospedero colonizado y cultivo axénico.

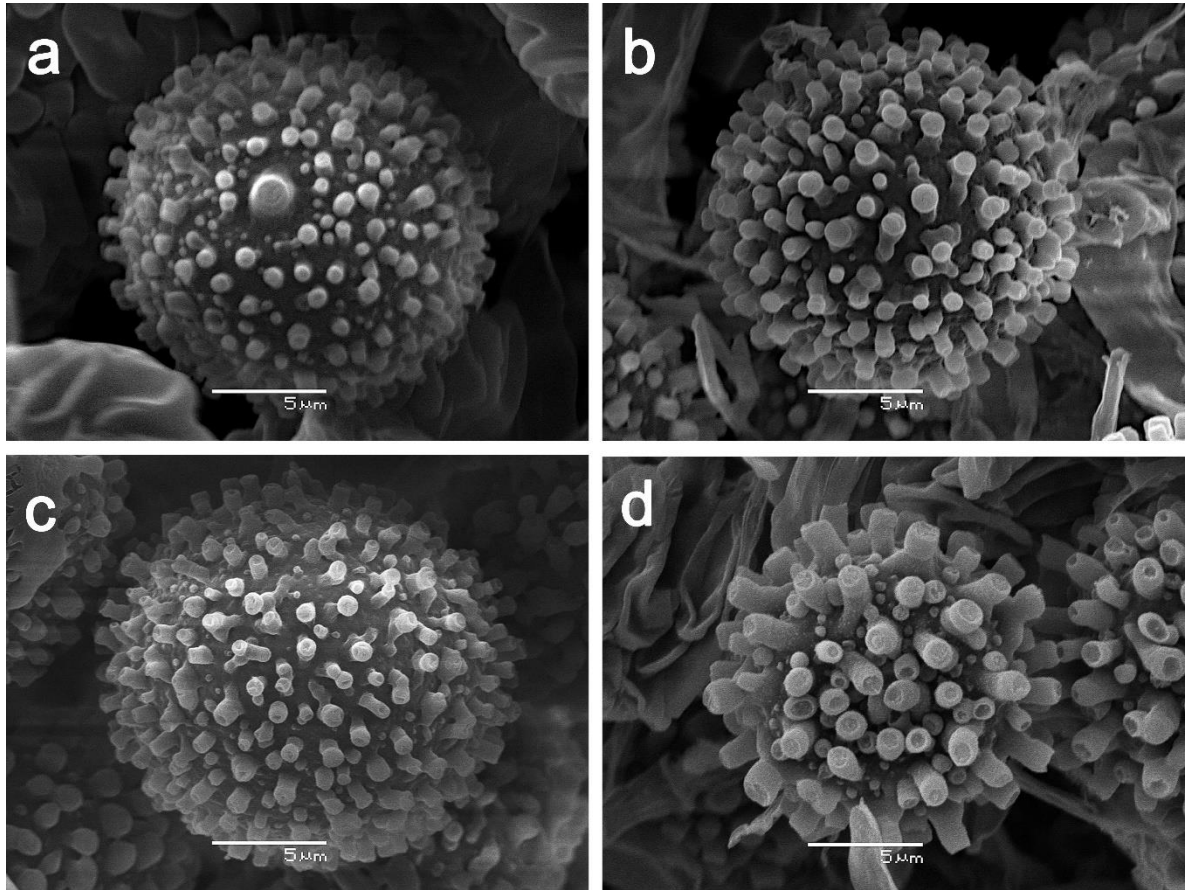
**Hospedero:** *Suillus luteus* (L.) Roussel 1796, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. 1909.

**Material Examinado:** Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Suillus luteus*, 4 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F 1769) Chile, Región del Biobío, Concepción, Reserva Nonguén, sobre *Rhizopogon roseolus*, 16 Mayo 2017, leg. A. Casanova-Katny (CONC-F 1867).

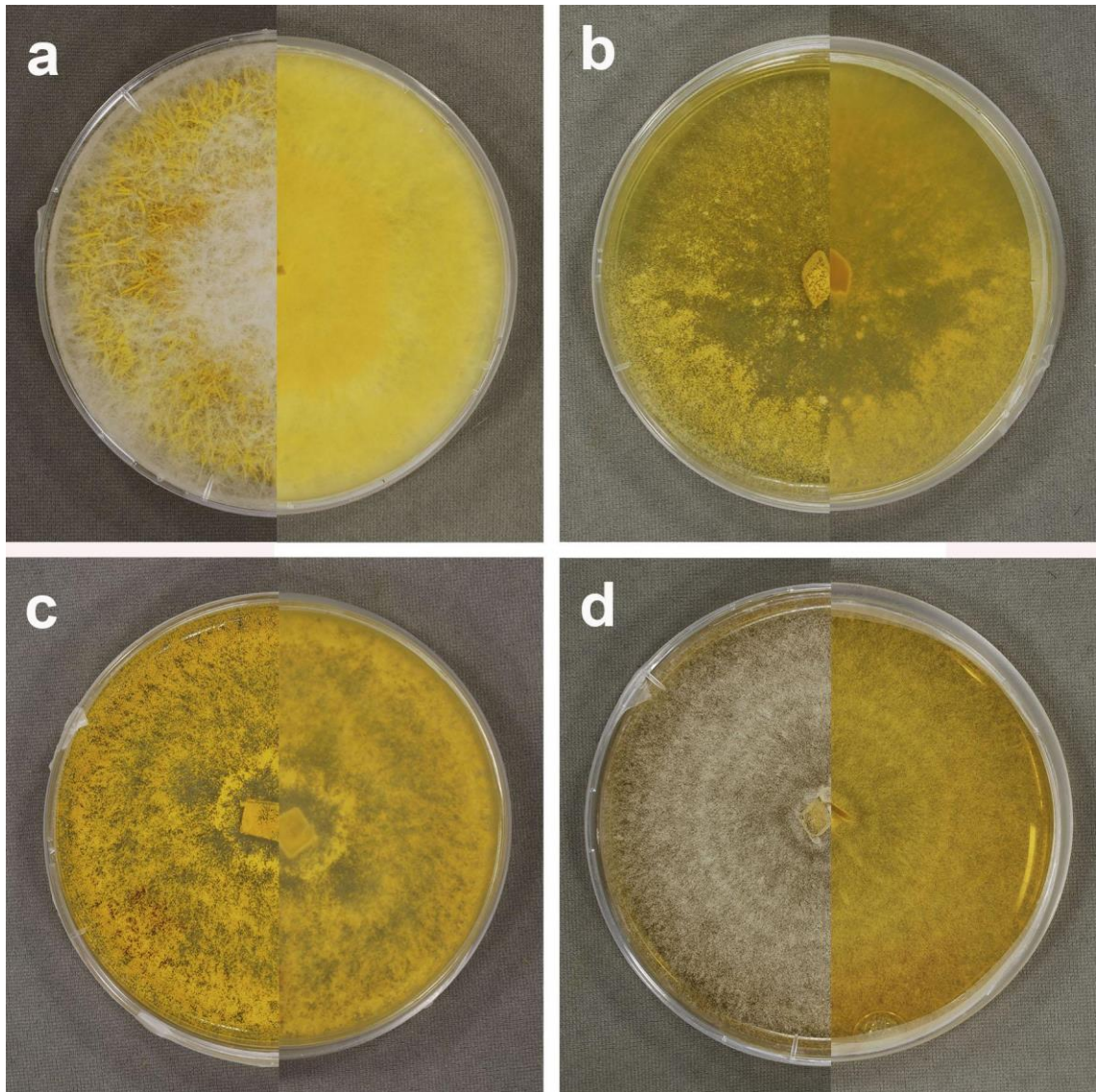




**Figura 8.** Micrografías electrónicas de barrido de filicoconidios de *Sepedonium* spp.; a: *Sepedonium ampullosporum* CONC-F 1821; b: *Sepedonium loyorum* CONC-F 1741; c: *Sepedonium chrysospermum* CONC-F 1743; d: *Sepedonium laevigatum* CONC-F 1769.



**Figura 9.** Micrografías electrónicas de barrido de aleurioconidios de *Sepedonium* spp.; a: *S. ampullosporum* CONC-F 1821; b: *S. chrysospermum* CONC-F 1743; c: *S. laevigatum* CONC-F 1769; d: *S. loyorum* CONC-F 1741.



**Figura 10.** Cultivos In vitro de *Sepedonium spp.* de Chile templado central después de dos semanas de crecimiento en MPA en placas de Petri de 90 mm a 20-25 ° 100, la mitad izquierda de cada fotografía muestra la cara superior, la mitad derecha muestra relativamente el reverso de la placa de cultivo; a: *S. ampullosporum* de *Paxillus involutus*, CONC-F1732; b: *S. chrysospermum* de *Paxillus involutus*, CONC-F1743; c: *S. laevigatum* de *Suillus luteus*, CONC-F1769; d: *S. loyorum* sp. nov. de *Boletus putidus*, CONC-F1754 (holotipo).

### 5.3 Clave *Sepedonium* spp. en Chile

(spp. marcado con \* hasta ahora no reportado para la región)

La siguiente clave dicotómica incluye todas las especies de *Sepedonium* actualmente aceptadas que han demostrado ser micofílicas en los huéspedes Boletales, las que aparecen en las monografías más importantes de Helfer (1991) y Sahr et al. (1999) y para las cuales existen secuencias de ADN. Aunque hasta ahora sólo se han registrado cuatro especies en Chile, las especies extraterritoriales también se han incluido en la clave para permitir su uso en otras regiones, ya que tampoco se puede descartar que se puedan detectar especies adicionales en Chile en el futuro.

1 Aleurioconidios sub cilíndricos, en forma de huso o elipsoides, finamente verrugosas o ranuradas longitudinalmente.....

.....2

1\* Aleurioconidios globosos, cubiertos de verrugas prominentes

.....3

2 Aleurioconidios elipsoides, marrón grisáceo, finamente verrugosos.....S.

*tulasnearum*\*

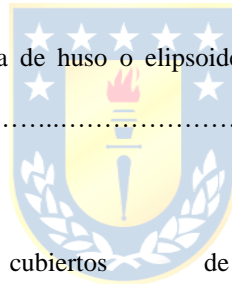
2\* Aleurioconidios subcilíndricos en forma de huso, amarillos, ranurados longitudinalmente

.....S.

*chlorinum*\*

3 Fialoconidios lecitiformes, en huéspedes introducidos.....S.

*ampullosporum*





- 3\* Fialoconidios ovalados o elipsoides, en huéspedes introducidos o nativos.....4
- 4 Fialidos de apenas 60  $\mu\text{m}$  de largo, nunca alcanzan los 100  $\mu\text{m}$ .....5
- 4\* Pocas o la mayoría de los fialidos de más de 100  $\mu\text{m}$  de largo..... 7
- 5 Aleurioconidios de hasta 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, con verrugas angulares, en *Xerocomus chrysenteron* y especies relacionadas.....*S. microspermum*\*
- 5\* Aleurioconidios de más de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, con verrugas cilíndricas, en diferentes huéspedes.... .6
- 6 Fialidos hasta 8 por verticilo, fialoconidios de hasta 3  $\mu\text{m}$ , en *Chalciporus piperatus*.....*S. chalcipori*\*
- 6\* Fialidos hasta 3 (4) por verticilo, fialoconidios de 3 hasta 4  $\mu\text{m}$  en hospederos nativos.....*S. loyorum sp. nov.*
- 7 Aleurioconidios pardos, en *Suillus pictus*..... *S. brunneum*\*
- 7\* Aleurioconidios amarillos..... 8
- 8 Fialidos de hasta 120  $\mu\text{m}$  de largo, aleurioconidios con verrugas anchas, colonias que crecen hasta 4,6 mm por semana en AMP.....*S. chrysospermum*
- 8\* Fialidos de hasta 250  $\mu\text{m}$  de largo, aleurioconidios con verrugas estrechas, colonias de rápido crecimiento, hasta 7-8 mm por semana en AMP .....*S. laevigatum*



## 5.4 Caracterización molecular

### 5.4.1 Secuencias obtenidas

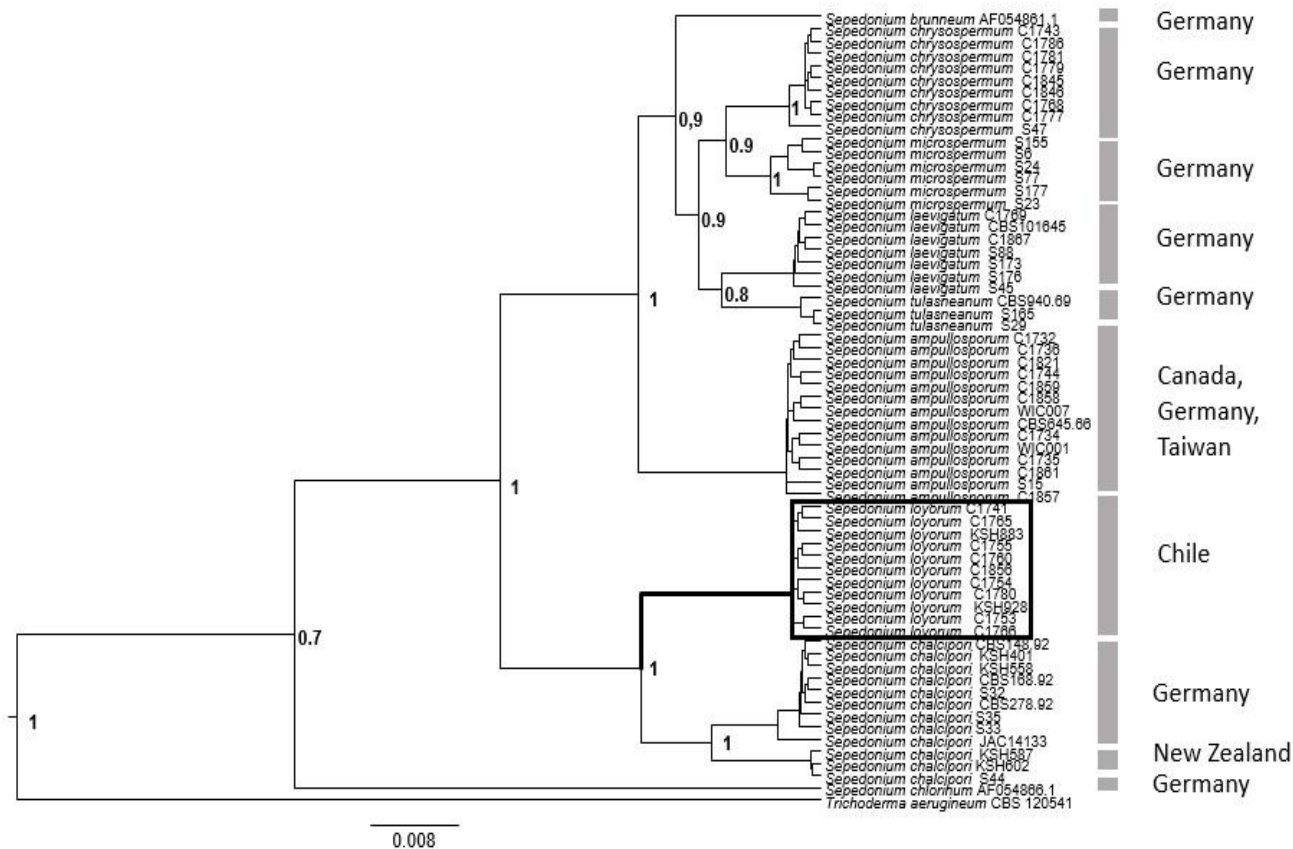
Se obtuvieron 68 secuencias con 517 pares de bases para el gen ITS1, 25 secuencias con 659 pares de bases para el gen RPB2 y 25 secuencias con 596 pares de bases para el gen EF1-a. Todos los genes mostraron baja saturación con un  $p < 0,05$  (ITS1: 0,33971; EF1-a: 0,00188; RPB2: 0,54632). Los sitios polimórficos para el gen ITS1 son 70; sitios polimórficos para el gen EF1-a son 224 y los sitios polimórficos para el gen RPB2 son 156.

### 5.4.2 Análisis filogenéticos locus ITS

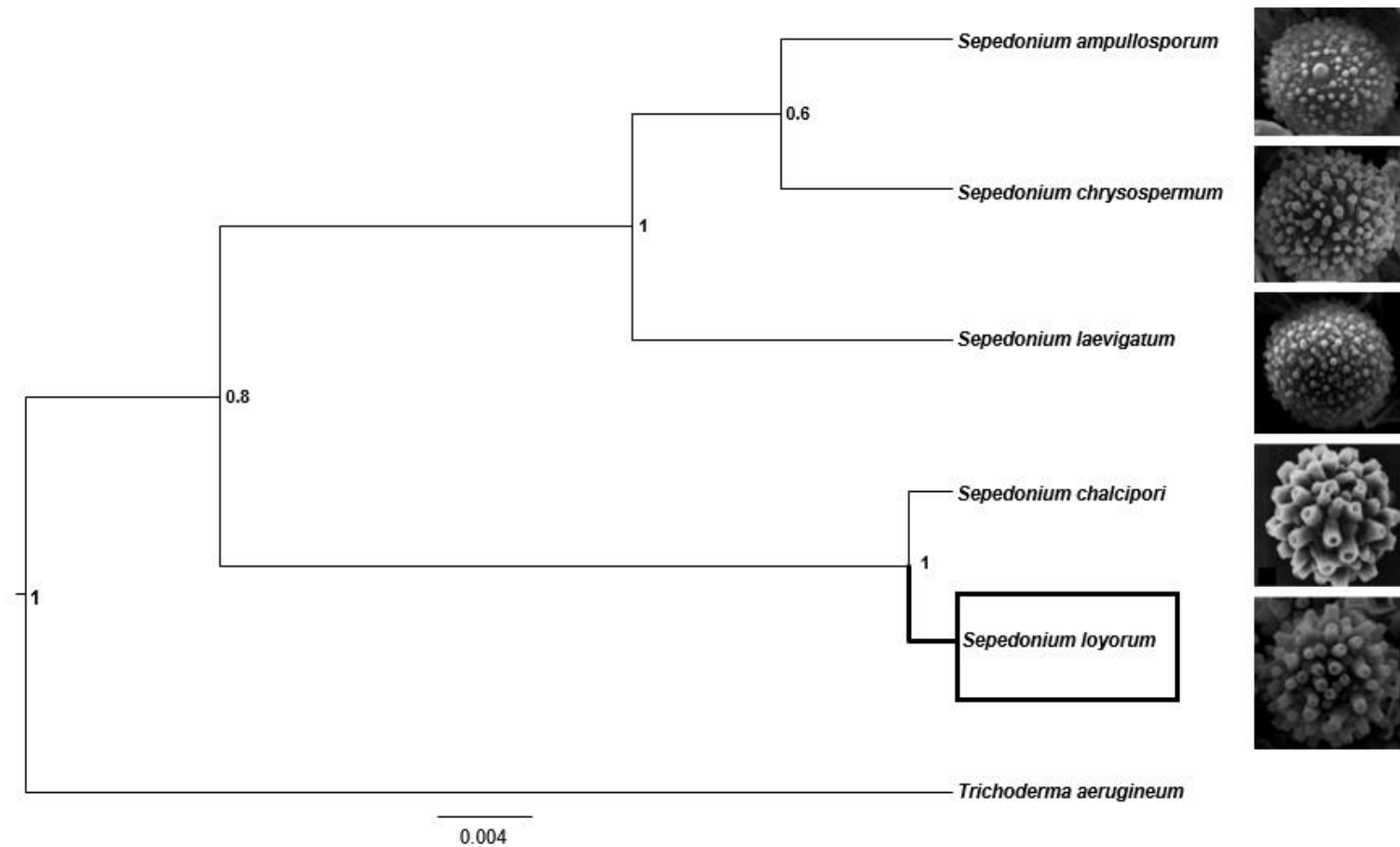
Para el árbol representado por el marcador molecular ITS, mediante análisis de inferencia bayesiana se recuperó el género *Sepedonium* como monofilético (1.0 PP). Se observan 3 clados principales, los cuales están representados por 9 taxones diferentes. El primer clado está compuesto por *Sepedonium chlorinum* el cual está sustentado con un 0,7 PP (probabilidad posteriori). El segundo clado está compuesto por *S. loyorum* **sp. nov** y *S. chalcipori* y está sustentado con un 1.0 PP. Y el tercer clado está compuesto por las especies *S. ampullosporum*, *S. chrysospermum*, *S. microspermum*, *S. tulasneanum*, *S. laevigatum* y *S. brunneum*, el cual está sustentado por un soporte de 1.0 PP (Fig. 11).

### 5.4.3 Árbol de especies multilocus

El árbol filogenético de delimitación de especies multilocus (ITS, EF1 y RPB2) recuperó al género *Sepedonium* como monofilético (PP= 1.0; Fig. 12), con dos clados (PP=0,8), uno representado por *S. loyorum* **sp nov** y *S. chalcipori* con un soporte del PP= 1.0 y otro clado que incluye *S. ampullosporum*, *S. chrysospermum* y *S. laevigatum* soportado con PP=1.0 (Fig. 12).



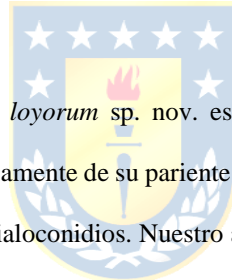
**Figura 11.** Árbol filogenético reconstruido utilizando el programa Beast 2.0 que muestra la relación de parentesco de *Sepedonium loyorum* sp. nov. con todas las demás especies conocidas, inferidas de la región espaciadora transcrita interna de los genes ITS (ITS 1); el taxón externo es *Trichoderma aeruginum*; los valores de los nodos corresponden a la probabilidad posteriori.



**Figura 12.** Árbol de especies filogenéticas reconstruido utilizando el programa Beast 2.0 que muestra la delimitación de especies de *Sepedonium* spp. con *Trichoderma aerugineum* como grupo externo, inferida de la alineación de secuencias de ITS, RPB2 y EF1- $\alpha$  -multigene; los valores de los nodos expresan probabilidad posteriori; micrografías de aleurioconidia obtenidas de este estudio con la excepción de la micrografía de *Sepedonium chalcipori* extraída de Sahr *et al.*, (1999).

## 6. DISCUSIÓN

Durante este estudio del género fúngico micófilo *Sepedonium* en Chile templado central, cuatro especies pudieron ser recuperadas de los huéspedes de Boletales que crecen en vegetación leñosa, y ser caracterizadas e identificadas por atributos de diagnóstico morfológicos y moleculares: El parásito recién descrito *S. loyorum* sp. nov. regionalmente endémico de Boletaceae, a saber: *Boletus loyita*, *B. loyo*, *B. putidus* y *Gastroboletus valdivianus*, mientras que *S. ampullosporum*, *S. chrysospermum* y *S. laevigatum* fueron identificados en huéspedes alóctonos incluyendo los géneros *Chalciporus*, *Paxillus*, *Rhizopogon* y *Suillus*, *S. ampullosporum* se encontró que era el taxón más frecuente, *S. laevigatum* la especie más raramente encontrada y *S. chrysospermum*, en concordancia con Sahr (1999) y Neuhoef *et al.*, (2007), mostró una fuerte preferencia por *Paxillus involutus*. El total de especies identificadas representa alrededor del 44% de todas las *Sepedonium* spp. conocidas a nivel global.



Nuestros datos indican que *Sepedonium loyorum* sp. nov. es probablemente co-endémica con sus huéspedes; se puede distinguir morfológicamente de su pariente filogenético más cercano *S. chalcipori* por la arquitectura y dimensiones de los fialoconidios. Nuestro árbol filogenético bayesiano basado en el gen ITS recuperado de *S. loyorum* sp. nov. como especie hermana de *S. chalcipori* con alta probabilidad posteriori (1.0). Como era de esperar, nuestros análisis dieron lugar a una topología no congruente con el árbol de unión de vecinos de Sahr *et al.* (1999). El reordenamiento más obvio involucra a *S. brunneum* como especie hermana de un clado compuesto por *S. chrysospermum*, *S. microspermum*, *S. laevigatum* y *S. tulasneanum*, con *S. tulasneanum* como especie hermana de *S. laevigatum*. Este patrón es en gran medida coherente con la filogenia ITS obtenida por Torbati *et al.*, (2018) para siete especies de *Sepedonium* con el fin de dilucidar el parentesco de *S. microspermum* de Irán.

Nuestro árbol de especies multilocus (basado en ITS, RPB2 y EF1- $\alpha$ ) también recuperó *S. loyorum* sp. nov. como especie hermana de *S. chalcipori* con una alta probabilidad posteriori (1.0), este resultado

apoya el concepto de *S. loyorum* sp. nov. de ser una especie filogenética diferente de *S. chalcipori* siguiendo los criterios de concepto de especie filogenética (Eldredge & Cracraft, 1980).

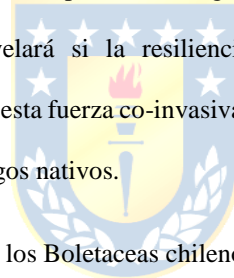
Este estudio representa, a nuestro conocimiento, el primer estudio de *Sepedonium* en un área geográfica coherente importante. Aunque *S. chrysospermum* ha sido históricamente reportado con bastante frecuencia en varios países de ambos hemisferios incluyendo Chile, no todos los registros pueden haber sido identificados correctamente, especialmente aquellos que datan antes de los estudios exhaustivos de Helfer (1991) y Sahr *et al.*, (1999): Debe considerarse que *S. chrysospermum* era una de solo cerca de tres especies descritas hasta la segunda mitad del siglo XX, también que los aleuroconidios en basidiomas infectados del huésped eran a menudo el principal o aún el único atributo de diagnóstico que se examinaría, y finalmente que las herramientas moleculares nuevas se han aplicado para la delimitación de la especie por solamente cerca de 30 años. Registros mundiales publicados de otras especies de *Sepedonium* spp. son todavía demasiado escasos y dispersos para permitir afirmaciones sobre su biogeografía. Sin embargo, el *S. loyorum* aparentemente endémico parece estar asociado mucho más específicamente a su entorno regional y huéspedes de lo que se suponía anteriormente para otras especies del género. Debido a su evidente afiliación a Boletáceas endémicas de los bosques sudamericanos de *Nothofagus*, un origen gondwanico de *S. loyorum* aparece probable. Esta sugerencia se ve reforzada por la observación de que su vecino filogenético más cercano, *S. chalcipori*, parece tener una conexión geográfica con Nueva Zelanda (Sahr *et al.*, 1999), aunque puede haber sido introducido en Australasia desde el hemisferio norte junto con su huésped *Chalciporus* asociado con especies exóticas de pino (Dickie *et al.*, 2016). En cualquier caso, sería muy interesante investigar la co-evolución de ambas especies y sus huéspedes conocidos, lo que también puede arrojar nueva luz sobre la diversificación y los aspectos micogeográficos de Boletales en el hemisferio sur. Ninguna de las otras tres especies de *Sepedonium* detectadas (*S. ampullosporum*, *S. chrysospermum*, *S. laevigatum*) se pudo encontrar en Boletales chilenos endémicos durante nuestro estudio que permite concluir que esos taxones, al igual que sus respectivos huéspedes y árboles asociados, son adventicios en Chile. El informe de *S. chrysospermum* en *B. bresinskyanus* Garrido, un boletal chileno insuficientemente

conocido (Garrido, 1988), puede ser el resultado de una identificación errónea basada en las limitaciones taxonómicas históricas mencionadas anteriormente.

Un grupo de huésped de *Sepedonium* interesante debido a los patrones de infección contrastantes en el área estudiada es el complejo *Paxillus-Austropaxillus*: *Austropaxillus boletinoides* (Singer) Bresinsky & Jarosch y *A. statuum* (Speg.) Bresinsky & Jarosch son hongos ectomicorrícicos nativos comunes en los bosques chilenos de *Nothofagus* pero, contrastando nuestras expectativas, nunca se encontró que estuvieran infectados por *Sepedonium* durante nuestros estudios, mientras que el adventicio *Paxillus involutus* que comúnmente crece en sitios perturbados como jardines, parques y plantaciones de madera bajo árboles introducidos, como castaño, roble o eucalipto, pero también bajo *Nothofagus* nativo, fue infectado regularmente, preferentemente por *S. chrysospermum*. La distancia filogenética entre ambos géneros dentro de los Boletales, puede ser decisiva para esta diferencia de susceptibilidad al micoparásito: el género *Austropaxillus* fue separado de *Paxillus* por Bresinsky *et al.*, (1999), basándose principalmente en evidencia molecular, y convincentemente colocado en la familia Serpulaceae junto con *Gymnopaxillus* y *Serpula* (Kirk *et al.*, 2008; Vizzini *et al.*, 2012). En cuanto a nuestro conocimiento, ninguno de los tres géneros se ha divulgado hasta ahora por ser parasitado por *Sepedonium*, otro ejemplo que las relaciones del huésped-parásito pueden ser indicadores importantes de la filogenia.

Teniendo en cuenta que casi todos los huéspedes de Boletales detectados de *Sepedonium* son simbioses ectomicorrícicos, estamos contemplando asociaciones tróficas tripartitas entre micoparásitos, hongos micorrícicos hospedantes y árboles micorrícicos que incluso pueden compartir su estado de endemismo como en el caso de *S. loyorum* y sus huéspedes endémicos que de nuevo están formando micorriza con especies de *Nothofagus* autóctonas en el sur de América del Sur. En el caso especial de *Chalciporus piperatus* que se supone que parasita el micelio de *Amanita muscaria* (Dickie *et al.*, 2016) y que encontramos infectado por *S. ampullosporum*, esta asociación se extendería aún más al nivel epiparasitario, a saber: *Sepedonium* - *Chalciporus* - *Amanita* y por lo tanto a una simbiosis cuatripartita cuando se tiene en cuenta el flujo de carbono desde el árbol micorrícico.

Al observar estas vías de nutrientes bastante complejas hacia el *Sepedonium* en los ecosistemas forestales, es importante estimar el potencial invasor de las asociaciones alóctonas parásito-huésped en las comunidades endémicas, especialmente en un paisaje mosaico que consiste en plantaciones de madera exótica y restos de bosques nativos que caracteriza no solo nuestra área de estudio en el centro de Chile, sino que hoy en día existe a nivel mundial en muchas regiones (Bogaert *et al.*, 2011; Dickie *et al.*, 2016; Fuentes *et al.*, 2020). La *Amanita muscaria* acompañada de *Chalciporus piperatus* fue originalmente adventicia con el Pino Monterrey introducido en el sur de Chile, pero ahora se observa en bosques puros de *Nothofagus* con creciente frecuencia (Fuentes *et al.*, 2020; Palfner & Casanova, 2019); por lo tanto, se puede suponer con seguridad que se ha producido un cambio de árbol huésped de *Pinus* a *Nothofagus* que tiene la capacidad de promover la penetración de *Amanita* en el bosque nativo como precursor o vector, tanto para *Chalciporus* como para *Sepedonium* spp. exótico, donde puede ocurrir competencia con, o incluso reemplazo de, hongos endémicos tanto a nivel micorrízico como micoparasitario. El tiempo revelará si la resiliencia de los taxones endémicos es lo suficientemente fuerte como para integrar esta fuerza co-invasiva en una comunidad estable, sin erosión o incluso pérdida de la diversidad de hongos nativos.



Una amenaza existente y apremiante para los Boletaceas chilenos endémicos y asociados a *S. loyorum* es la disminución y deterioro de sus hábitats nativos del bosque de *Nothofagus* como resultado de los efectos directos e indirectos del cambio de uso de la tierra en el centro y sur de Chile (Echeverría *et al.*, 2006; Luebert & Plischoff, 2018; Plischoff, 2015). La categoría de conservación de los cuatro hospedadores identificados ha sido clasificada entre 2014 y 2019 por criterios de la UICN: *Boletus loyo* y *Gastroboletus valdivianus* como amenazados (EN), *B. loyita* como vulnerable (VU) y *B. putidus* como casi amenazado (NT) (<https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/>). En consecuencia, los conceptos de conservación deben ser evaluados para *S. loyorum* también basado en su estado endémico y asociación específica a los huéspedes y hábitats amenazados.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, M., Pauchard, A., Azócar, G., & Parra, O. (2009). Cambio del uso del suelo en el centro sur de Chile a fines del siglo XX: Entendiendo la dinámica espacial y temporal del paisaje. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82(3), 361 -374 pp.
- Arzú, R. F., & González, M. D. C. B. (2018). Diversidad de hongos micorrícicos en bosques de *Pinus caribaea* en Poptún, Guatemala. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 1(1), 33-47 pp.
- Binder, M., & Hibbett, D. S. (2006). Molecular systematics and biological diversification of Boletales. *Mycologia*, 98(6), 971-981 pp.
- Bogaert, J., Barima, YSS., Iyongo, L., Mongo, W., Bamba, I., Mama, A., Toyi, M., & Laforzezza, R. (2011). Forest Fragmentation: Causes, Ecological Impacts and Implications for Landscape Management. En: Li Ch, Laforzezza R, Chen J (eds.): *Landscape Ecology in Forest Management and Conservation Challenges and Solutions for Global Change*, (pp. 273-296) Berlin, Heidelberg: Springer.
- Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1991). *Fungi of Switzerland*. Volume 3: Boletes and Agarics (1st Part). Strobilomycetaceae, Boletaceae, Paxillaceae, Gomphidiaceae, Hygrophoraceae, Tricholomataceae, Polyporaceae (lamellate). Verlag Mykologia: Luzern, Switzerland, 361 pp.
- Cowling, R.M., Rundel, P.W., Lamont, B.B., Arroyo, M.K., & Arianoutsou, M. (1996) Plant diversity in Mediterranean-climate regions. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(9), 362-366 pp.
- Crespo, A., Lumbsch, H. T., Mattsson, J. E., Blanco, O., Divakar, P. K., Articus, K., & Wedin, M. (2007). Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in Parmeliaceae (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), 812-824 pp.
- Dahlberg, A., & Finlay, R. D. (1999). *Suillus*. In Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile. Springer Berlin Heidelberg, 33-64 pp.
- Damon, S. C. (1952). Two noteworthy species of *Sepedonium*. *Mycologia*, 44(1), 86- 96 pp.

- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallelcomputing. *Nat. Methods*, 9: 772 pp.
- Dickie, I.A., Nuñez, M.A., Pringle, A., Lebel, T., Tourtellot, S.G., & Johnston, P.R. (2016). Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions*, 18, 3383-3395 pp.
- Di Castri, F. (1991). An ecological overview of the five regions of the world with mediterranean climate. *Biogeography of Mediterranean Invasions*. 127pp
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST1.7. *Mol. Biol. Evol*, 29: 1969–1973 pp.
- Echeverría C, Coomes D, Salas J, Rey-Benayas J, Lara M, Newton A. (2006). Rapid deforestation and fragmentation of Chilean temperate forests. *Biological Conservation*, 130(4): 481-494 pp.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, 1792–1797 pp.
- Eldredge N, Cracraft J. (1980). *Phylogenetic Patterns and the Evolutionary Process*. Columbia Univ. Press, New York, USA.
- Espinosa, M. (1917). Informe de encargado de la sección plantas criptógamas. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural Chile*, 10: 186-187 pp.
- Fierro, P., Valdovinos, C., Arismendi, I., Díaz, G., De Gamboa, M.R., & Arriagada, L. (2019). Assessment of anthropogenic threats to Chilean Mediterranean freshwater ecosystems: Literature review and expert opinions. *Environmental Impact Assessment Review*, 77, 114-121 pp.
- Figuroa, J., S. Castro, P. Marquet & F. Jaksic. (2004). Exotic plant invasions to the Mediterranean regions of Chile: causes, history and impacts. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77: 465-483 pp.



- Fuentes, N., Marticorena, A., Saldaña, A., Jerez, V., Ortiz, J.C., Victoriano, P., Moreno, R.A., Larraín, J., Villaseñor-Parada, C., Palfner, G., Sánchez, P., & Pauchard, A. (2020). Multi-taxa inventory of naturalized species in Chile. *NeoBiota*, 60: 25–41 pp.
- Garrido, N., Bresinsky, A., & Marticorena, C. (1985). Index Agaricalium Chilensium. Band 99, J. Cramer Vaduz, 339 pp.
- Garrido, N. (1986). Survey of ectomycorrhizal fungi associated with exotic forest trees in Chile. *Nova Hedwigia*, 43(3-4): 423-442 pp.
- Garrido, N. (1988). *Agaricales als und ihre Mykorrhizen in den Nothofagus- Wäldern Mittelchiles*. Bibliotheca Mycologica, Band 120, J. Cramer Yaduz, 43: 423-442 pp.
- Habit, E., Dyer, B., & Vila, I. (2006). Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70, 100–113 pp.
- Helfer, W. (1991). Pilze auf Pilzfruchtkörpern: Untersuchungen zur Ökologie, Systematik und Chemie (Vol. 1). IHW-Verlag. 211 pp.
- Horak, E. (1977). New and rare boletes from Chile [*Nothofagus chilensis*, *Gastroboletus valdivians*, *Boletus loyita*, *Boletus putidus*]. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 18: 97-109 pp.
- Horak, E. (1980). Agaricales y gasteromicetes secotioides. En: Flora Criptogámica de Tierra del Fuego, tomo XI, fascículo 6: Fungi, Basidiomycetes, FECYC, Buenos Aires, Argentina, 524 pp.
- Jimenez, A., Pauchard, A., Cavieres, L., Marticorena, A., & Bustamante, R. (2008). Do climatically similar regions contain similar alien floras? A comparison between the mediterranean areas of central Chile and California. *Journal of Biogeography*, 35(4): 614-624 pp.
- Kirk, P. M., Cannon, P.F., Minter, D.W., & Stalpers, J.K. (2008). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford. 771 p.
- Knudsen, H., & Vesterholt, J. (2012). *Funga Nordica*, Editorial Nordsvamp, Copenhagen, Denmark, 511pp.



- Lazo, W. (2016). *Hongos de Chile, Atlas micológico*. (2ª ed.). Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago de Chile. 316 pp.
- Lazo, W. (2001). *Hongos de Chile, Atlas micológico*. (1ª ed.). Santiago de Chile. Facultad de Ciencias-Universidad de Chile. 231pp.
- Luebert, F., & Plischoff, P. (2018). *Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile* (2ª ed.). Editorial Universitaria, Santiago de Chile, 384 pp.
- Malloch, D. W., Pirozynski, K & Raven. (1980). Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(4), 2113-2118 PP.
- Mitova, M., Murphy, A., Lang, J., Blunt, A., Cole, G., & Munro, M. (2008). Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. The isolation of chrysaibol, an antibiotic peptaibol from a New Zealand sample of the mycoparasitic fungus *Sepedonium chrysospermum*. *Journal of Natural Products*, 71(9): 1600-1603 pp.
- Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J.G. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomedica*, 23(2), 213-224 pp.
- Mujica, F., Vergara, C., & Oehrens, E. (1980). *Flora fungosa chilena*. Universidad de Chile, Santiago. 308 pp.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G.A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772):853-858 pp.
- Neuhof, T., Berg, A., Besl, H., Schwecke, T., Dieckmann, R., & Von Döhren, H. (2007). Peptaibol production by *Sepedonium* strains parasitizing boletales, *Chemistry & Biodiversity*, 4(6): 1103- 1115 pp.
- Otto, A., Laub, L., Wendt, A., Porzel, J., Schmidt, Palfner, G & B. Westermann. (2016). Chilenopeptins A and B, Peptaibols from the Chilean *Sepedonium* aff. *chalcipori* KSH 883. *Journal of Natural Products*. 79(4): 929-938 pp.
- Panzer Almada, M. A. (2017). *Filogeografía, delimitación de especies y reconstrucción de relaciones filogenéticas del complejo Liolaemus tenuis* (Tesis de Doctorado), Universidad de Concepción, Chile.

- Palfner, G. (2005). *Tylopilus temucensis* sect. Oxydabiles (Fungi, Basidiomycota, Boletaceae), new species and first record of the genus from Southamerican Nothofagus forest. *Fungal Diversity*, 20, 157–166 pp.
- Palfner, G., & Casanova-Katny, A. (2019). Micocenosis en remanentes de bosque nativo y en plantaciones forestales en la Península de Arauco, Biobío, Chile: composición, aspectos funcionales y conservación. En: C. Smith-Ramírez, F.A. Squeo, eds.: *Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile* (pp. 175-210). Osorno, Chile. Editorial Universidad de Los Lagos.
- Pliscoff, P. (2015). *Aplicación de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) para la evaluación de riesgo de los ecosistemas terrestres de Chile*. Informe Técnico elaborado por Patricio Pliscoff para el Ministerio del Medio Ambiente, Santiago, Chile, 63 pp.
- Rambaut, A. (2007). FigTree. Version 1.4.3. Program and documentation. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Drummond AJ., & Suchard M. (2013). Tracer v1.6. Available from: 833 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Ramírez, C., & San Martín, C. (2005). Diversidad de macrófitas chilenas. En: Vila, I., Veloso, A., Schlatter, R., Ramírez, C. (Eds.), *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile* (pp. 21–61). Santiago de Chile. Editorial Universitaria.
- Rejmanék, M., Thomsen, C., & Peters, D. (1991). Invasive vascular plants of California, Biogeography of Mediterranean Invasions. 81 -101 pp.
- Sahr, T., Ammer, H., Besl, H., & Fischer, M. (1999). Infrageneric classification of the boleticolous genus *Sepedonium*: species delimitation and phylogenetic relationships. *Mycologia*, 935-943 pp.
- Simonetti, J., M. Arroyo, A., Spotorno & E. Lozada. (1995). Diversidad Biológica en Chile. Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología, Santiago, Chile. 364 PP.

- Sullivan, R., Bergen, M. S., Patel, R., Bills, G. F., Alderman, S. C., Spatafora, J. W., & White JR, J. F. (2001). Features and phylogenetic status of an enigmatic clavicipitalean fungus *Neoclaviceps monostipa* gen. et sp. nov. *Mycologia*, 90-99 pp.
- Torbati, M., Arzanlou, M., & Babai-Ahari, A. (2018). Polyphasic identification of *Sepedonium microspermum* isolated from two genera of Boletales in Iran. *Mycologia Iranica*, 5(2): 71 – 77pp.
- Valenzuela, E., Moreno, G., & Grinbergs, J. (1992a). Algunas Boletaceae que fructifican en el Sur de Chile. *Boletín Micológico*, (7): 1 –5 pp.
- Valenzuela, E., Moreno, G., Garnica, S., & Ramirez, C. (1998). Micosociología en bosques nativos de *Nothofagus* y plantaciones de *Pinus radiata* en la X Región de Chile: diversidad y rol ecológico. *Revista Chilena de Historia Natural*, 71 133-146 pp.
- Valenzuela, E., & Esteve-Raventos, F. (1999). Algunos agaricales s.l. alóctonos asociados a especies arbóreas exóticas cultivadas en la X región de Chile / Some alochthonous agaricales s. l associated to exotic trees cultivated in the X region of Chile. *Bol. Micol.*, 14(1-2):73-81 pp.
- Valdovinos, C. (2006). Invertebrados dulceacuícolas, Diversidad de especies, in: CONAMA (Ed.), Biodiversidad de Chile: patrimonios y desafíos. CONAMA, Santiago de Chile, 202–223 pp.
- Vidal, M. (2008). *Biogeografía de anfibios y reptiles*. In: Vidal, M.A., Labra, A. (Eds.), Herpetología de Chile. Springer Science, 195–231 pp.
- Vila, I., & Habit, E. (2014). Current situation of the fish fauna in the Mediterranean region of Andean river systems in Chile. *FiSHMED* 2: 1–19 pp.
- Villagrán, Moraga, C., & Hinojosa, Opazo, L. (2005). Esquema biogeográfico de Chile. Laboratorio de Palinología, Facultad de Ciencias - Universidad de Chile. 38 pp.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1): 127-139 pp.
- Vizzini, A., Angelini, C., & Ercole, E. (2012). A new *Neopaxillus* species (Agaricomycetes) from the Dominican Republic and the status of *Neopaxillus* within the Agaricales. *Mycologia*, 104(1): 138-147 pp.
- Xia X. (2013). DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 30:1720-1728 pp.
- Yurkov, A., Krüger, D., Begerow, D., Arnold, N., & Tarkka, T. (2012). Basidiomycetous yeasts from Boletales fruiting bodies and their interactions with the mycoparasite *Sepedonium chrysospermum* and the host fungus *Paxillus*. *Microbial Ecology*, 63(2): 295-303 pp.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors, PCR protocols A guide to methods and applications (pp. 315-322). Academic Press.

