

Estudos no xénero *Hygrophorus*: *Hygrophorus nemoreus*

Jose CASTRO

Sociedade Micolóxica Lucus.jose.cogomelos@gmail.com

RESUMO

Apórtanse neste artigo os datos resultantes dos estudos macroscópicos, microscópicos e moleculares sobre a especie *Hygrophorus nemoreus*. Segundo os nosos datos, trataríase ademais da primeira cita desta especie para Galicia.

Palabras chave: *Hygrophorus nemoreus*, *Hygrophoraceae*, Reserva da Biosfera Terras do Miño, O Corgo, Lugo.

SUMMARY

In this paper, we report macroscopic, microscopic and molecular studies about the species *Hygrophorus nemoreus*. According to our data, it would be also the first record of this species for Galicia.

Keywords: *Hygrophorus nemoreus*, *Hygrophoraceae*, Biosphere Reserve Terras do Miño, O Corgo, Lugo.

► INTRODUCCIÓN

A familia *Hygrophoraceae* Lotsy, á que pertence o xénero *Hygrophorus* Fr. propúxose por ROZE (1876), aínda que co nome inválido de “*Hygrophoreés*” e posteriormente publicouse validamente por LOTSY (1907). Tras varios traballos sobre esta familia, os recentes e amplos estudos moleculares efectuados por LODGE *et al.* (2014) levaron a incluír nela, ademais do xénero *Hygrophorus* Fr., outros moi diversos xéneros: *Acantholichen* P.M.Jørg.; *Ampulloclitocybe*

Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys; *Arrhenia* Fr.; *Cantharellula* Singer; *Cantharocybe* H.E.Bigelow & A.H.Sm; *Chromosera* Redhead, Ammirati & Norvell; *Chrysomphalina* Clemencon; *Cora* Fr.; *Corella* Vain.; *Cuphophyllus* (Donk) Bon; *Cyphellostereum* D.A.Reid; *Dictyonema* Reinsch; *Eonema* Redhead, Lucking & Lawrey; *Gliophorus* Herink; *Haasiella* Kotl. & Pouzar; *Humidicutis* (Singer) Singer; *Hygroaster* Singer; *Hygrocybe* (Fr.) P.Kumm.; *Lichenomphalia* Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys; *Neohygrocybe* Herink;



Fig.1. *Hygrophorus nemoreus*. Col: JCAS0081038000075



Fig.2. *Hygrophorus nemoreus*. Detalle do estípite coa base rematada en punta e fortemente fendido.

Porpolomopsis Bresinsky e *Pseudoarmillariella* (Singer) Singer.

O xénero *Hygrophorus* Fr. ten unha dilatada traxectoria taxonómica. Citouse por primeira vez por parte de FRIES (1836) e dous anos despois o mesmo FRIES (1838), distribúe as distintas especies que compoñen este xénero en tres grandes tribos, aínda que non utiliza o nome de tribo como actualmente se considera como un rango por baixo da familia, senón que usa tribo como unha categoría infraxenérica, non recoñecida actualmente. Esas tres tribos serían: *Hygrocybe*, *Limacium* e *Camarophyllus*. KUMMER (1871) convertería as tribos de Fries en xéneros: *Hygrocybe* (Fr.) P. Kumm., *Limacium* (Fr.) P. Kumm. e *Camarophyllus* (Fr.) P. Kumm., utilizando o termo de xénero *Limacium* e non *Hygrophorus* para a maioría das especies que actualmente si se consideran como pertencentes ao xénero *Hygrophorus*. KARSTEN (1876) si recoñece o xénero *Hygrophorus* Fr., en vez de *Limacium* sensu P. Kumm. e ademáis convirte

en seccións as antigas tribos de Fries: *Limacium*, *Camarophyllus* e *Hygrocybe*.

Xa no pasado século XX, diversos autores realizaron estudos e monografías sobre o xénero, onde cada un deles propuxo diversas solucións taxonómicas: HESLER & SMITH (1963), ARNOLDS (1990), BON (1990), CANDUSSO (1997), etc.

Hygrophorus é un xénero monofilético (MATHENY *et al.*, 2006; LARSSON, 2010; LODGE *et al.*, 2014), presenta unha ampla distribución mundial e abrangue unhas 250 especies (KIRK, 2018), cunha escasa representación en Galicia, onde estarían citadas, según RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ & CASTRO (2016), as seguintes especies e variedades: *H. agathosmus* (Fr.) Fr., *H. chrysodon* (Batsch) Fr., *H. chrysodon* var. *cistophilus* Pérez-De-Greg., Roqué & Macau, *H. hypothejus* (Fr.) Fr., *H. lindtneri* M.M.Moser. *H. olivaceoalbus* (Fr.) Fr., *H. penarius* Fr., *H. persoonii* Arnolds e *H. pseudodiscoideus* var. *cistophilus* Bon et G.Riouisset.

Este artigo pretende contribuír a ampliar os coñecementos e estudo no xénero *Hygrophorus* en Galicia.

MATERIAL E MÉTODOS

Tomáronse *in situ* todos os datos morfolóxicos e organolépticos dos exemplares obxecto de estudo e tamén a información da vexetación circundante, así como diferentes datos da zona. Utilizando un aparello GPS Garmin Fenix rexistráronse as coordenadas e altitude da súa posición. O estudo de campo completouse coa toma de diversas fotografías do basidioma utilizando unha cámara réflex dixital Nikon D5300, provista de obxectivo Nikkor AF-S Micro 60mm f/2.8G ED e a recolla de varios exemplares como mostras.

O estudo microscópico realizouse sobre material fresco e tamén sobre material seco, cun microscopio óptico trinocular Olympus CX41 provisto de obxectivos de 4x 10x 40x 60x e 100x (inmersión), así como de oculares 10x. Para as preparacións utilizouse auga, reactivo vermello congo, reactivo vermello congo amoniacal e IKI. As fotografías das distintas estruturas microscópicas efectuáronse cunha cámara Touptek U3CMOS18000KPA acoplada ao microscopio mediante un adaptador Touptek parfocal 0,5x e para as medicións das mesmas utilizouse o software Piximètre v.5.9.

Analizouse o PH do chan no que se desenvolvían os exemplares recollidos como mostras, para o que se utilizou un PH-metro portátil Adwa AD-11 con compensación automática de temperatura, empregándose para a medición unha proporción de terra-auga de 1:5.

As medidas esporais tomáronse en auga sobre esporada libre. A comprobación da presenza ou ausencia de amiloidía efectuouse utilizando IKI.

Realizouse tamén un estudo cromático sobre diversos basidiomas do fungo, tomando referencias e descrições das cores de varias zonas dos mesmos que se incorporaron a este traballo segundo os códigos tomados das *Munsell Soil-Color Charts* (MUNSELL, 2009).

Tras os estudos macro e microscópicos, os exemplares do fungo recollidos como mostras secáronse a 40° C mediante deshidratador eléctrico, codificáronse e etiquetáronse para a súa almacenaxe como *exsiccata* no herbario privado do autor (JCAS).

Extracción do ADN, amplificación e secuenciación:

o ADN total extraeuse a partir de mostras secas de herbario empregando unha modificación do protocolo de MURRAY & THOMPSON (1980). Unha porción das mostras homoxeneizouse coa axuda dun micropistilo en 600 μ L de *buffer* CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris-HCl pH 8.0 100 mM).

A mestura incubouse durante 30 minutos a 65°C. Un volume equivalente de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) engadiuse e mesturouse coa mostra ata a súa emulsión. Tras centrifugar a mestura durante 10 min a 10000 g, o ADN no sobrenadante precipitouse cun volume de isopropanol. Tras 15 minutos de centrifugación á mesma velocidade, lavouse o *pellet* en etanol 70% frío, centrifugado de novo 2 minutos e secado. Finalmente, resuspendeuse en 100-300 μ L de ddH₂O. A amplificación por PCR realizouse cos *primers* ITS1F e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990; GARDES & BRUNS, 1993) para a rexión ITS, e os *primers* LROR y LR5 (VILGALYS & HESTER, 1990, CUBETA *et al.*, 1991), para a rexión 28S rADN. O programa de amplificación consistiu en un *hot start* a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 45, 30 e 45 seg a 94°C, 54°C y 72°C, respectivamente, cunha fase final de elongación a 72°C durante 10 min. Os resultados comprobáronse nun xel de agarosa ao 1%, e as reaccións positivas purificáronse e secuenciáronse co *primer* ITS4. As secuencias obtidas comparáronse cos cromatogramas orixinais para detectar e corrixir posibles erros de lectura.

Os procesos de extracción do ADN, amplificación e secuenciación realizáronse no laboratorio especializado ALVALAB (Oviedo).

DESCRICIÓN

Hygrophorus nemoreus (Pers.) Fr., *Epicr. syst. mycol.* (Upsaliae): 326. 1838 [1836-1838]

Descrición orixinal: AGARICVS NEMOREVS: magnus solitarius, pileo carnoso late vmbonato, planiusculo fulvo-rubescens, lamellis decurrentibus albis subdistantibus, stipite longissimo solido basi lanato. Hab. in silvis vmbrosis ad terram rarissime. *Stipes* 3-4 vnc. longus, ½ vnc. crassus, pallescens. *Lamel.* 2-3 lin. latae. *Pileus* 3 vcn. fere latus, compactus. Ob locum natalem praesertim ob lamellas et stipitem a priore diversus est.

Etimoloxía: *Hygrophorus*: palabra composta derivada do termo grego *hugros*, “humidade” e do tamén grego *phero*, “portador”, por tanto significa “portador de humidade”. *Nemoreus*: do termo latino “nemus” que significa “bosque” ou “arboredo”, polo seu hábitat tipicamente forestal, no medio do bosque.

Pileo de ata 50 mm de diámetro, primeiro convexo, logo aplanado e con forma de funil ao final, provisto dun umbón ancho e obtuso (non obstante na madurez pode en ocasións aparecer tamén deprimido no centro), recuberto de finas fibrilas radiais de cor entre laranxa escura e apardazada,

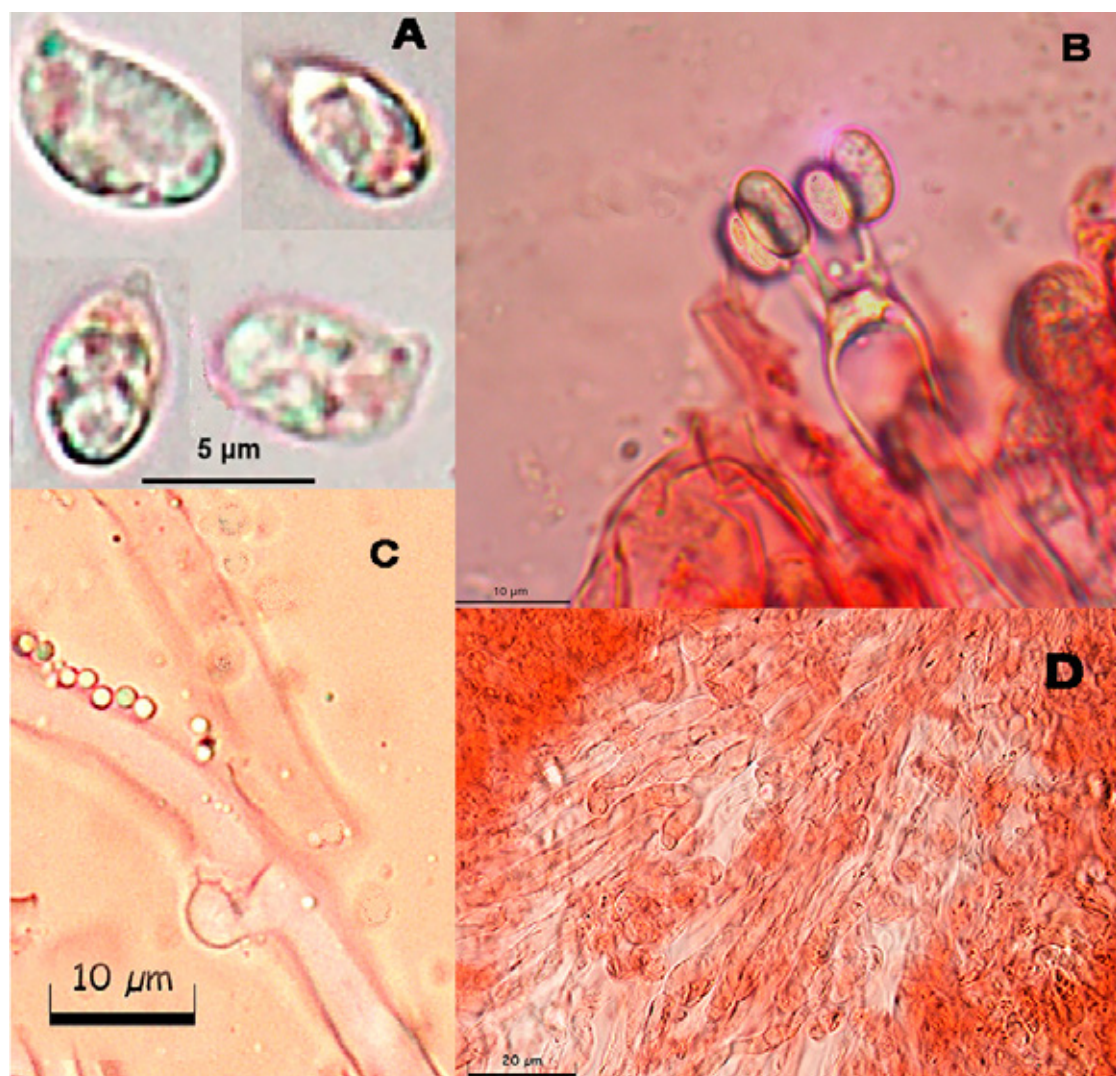


Fig.3. *Hygrophorus nemoreus*. A-Esporas; B-Basidio con esporas; C-Fibelas da pileipellis; D- Trama himenial

marxe persistentemente involuta, ondulada, lisa, un pouco excedente, con pileipellis seca, so lixeiramente viscosa en tempo húmido, mate, de cor xeral crema alaranxada (Mu 5YR 5/8), sendo no centro do píleo máis escura, laranxa escura a apardazada, por efecto da acumulación das fibrilas radiais (Mu 7.5YR 6/6) e clarexando un pouco cara á marxe (Mu 7.5YR 7/6). Lamelas separadas, de adnatas a decorrentes, intercaladas con lameliñas de lonxitude variable, coa aresta lisa, primeiro de cor branca, logo de cor crema (Mu 10YR 8/2). Estípite de cor crema no ápice (Mu 10YR 8/2), máis claro cara á base (Mu 10YR 9.5/2), duro e seco, moi variable en lonxitude e anchura, normalmente oscilando entre 31-100 mm de longo e 9-23 mm de ancho, cunha relación media do estípite respecto ao píleo de 1,4:1, na maioría das veces

rematado en punta. A superficie do estípite é fibrilosa lonxitudinalmente e finamente escamosa no ápice. O estípite é normalmente cheo, pero ás veces presenta un grande oco central, especialmente cando o estípite é ancho. O contexto é abundoso e firme, de cor branca ou branca-crema, inmutable. O cheiro é débil, a fariña, apreciándose máis intensamente ao cortar a carne. O sabor é suave, doce, agradable, a fariña. Reaccións macroquímicas: KOH + no contexto da base do estípite, amarelo limón. Esporada en masa de cor branca.

No estudo microscópico obsérvanse basidios craviformes a subcilíndricos, tetráspóricos, raramente monospóricos, de medidas 36-48 x 6,4-8,6 µm, provistos de fibela basal. Basidiosporas lisas, de elipsoidais a subovoidais en canto á súa forma, de

medidas 6-7,4 (7,8) × (3,6) 3,7 - 5 (5,6) μm; Q = (1,3) 1,4 - 1,6 (1,8), inamiloides, con pequenas gútulas. Trama himenial de estrutura bilateral, con hifas redondeadas no seu ápice e provistas de fibelas. Pileipellis con estrutura trichoderma, de hifas entrelazadas, con numerosas fibelas e pigmentos intracelulares de cor amarela-ocrácea. Fibelas presentes e abundosas en xeral.

Hábitat: os exemplares estudados desenvolvíanse de xeito gregario nun bosque de *Quercus robur* L, con algún exemplar illado de *Pinus pinaster* Ait. e con presenza próxima do fento *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, en chan fortemente ácido, cun PH de 4,9.

Material estudado: ESPAÑA: Lugo, O Corgo, Santo Estevo de Folgosa, Reserva da Biosfera Terras do Miño, 540 m, en bosque de *Quercus robur* con algún exemplar illado de *Pinus pinaster*, 13-XI-2016, leg. et det.: J. Castro, Código de herbario: JCASO081038000075. Identificador de secuencia en GenBank: MH703904.

DISCUSIÓN

Hygrophorus nemoreus, segundo LODGE *et al.* (2014), encádrase no subxénero *Colorati* (Bataille) E. Larss., na sección *Pudorini* (Bataille) Candusso e na subsección *Clitocyboides* (Hesler & A.H. Sm.) E. Larss. Nesta subsección tamén se incluírían, ademais de *H. nemoreus* (Pers.) Fr., *H. penarius* Fr., *H. penarioides* Jacobsson & E. Larss., *H. poetarum* R. Heim, *H. russula* (Schaeff.) Kauffman sendo *H. sordidus* Peck a especie tipo desta subsección. *Hygrophorus nemoreus* confundíuse e malinterpretouse ao longo dos anos, especialmente con *Hygrophorus leporinus* Fr. (actualmente denominada *Hygrocybe leporina* (Fr.) P.D. Orton & Watling) e, no seu momento, tamén se considerou

como unha variedade de *Hygrophorus pratensis* (QUÉLET, 1883). VESELSKÝ (1968) mesmo realizou unha comparativa destes tres taxons no seu artigo sobre unha cita de *H. leporinus*. Non obstante *H. nemoreus* presenta, de xeito característico, unha pileipellis de cor crema alaranxada, non viscosa, con fibras radiais máis escuras, lamelas claras, de cores abrancazadas a crema, estípites escamosos no ápice, cheiro a fariña, máis ou menos intenso e un hábitat eminentemente forestal. Compre sinalar que, na nosa experiencia con esta especie, non resulta raro atopar exemplares cun estípites estilizado que da varias voltas sobre si mesmo a modo de sacarollas, igualmente que tampouco resulta raro atopar outros exemplares cun estípites moi ancho, fortemente fendido na parte central, ata incluso abrirose totalmente o contexto deixando un oco central considerable; ambas circunstancias coinciden coa posibilidade de que o carpóforo sufra unha presión vertical no seu desenvolvemento baixo terra, pero revisada a zona de desenvolvemento en numerosas ocasións durante varios anos, non se atopou ningún elemento que oprimira o píleo nin tampouco a terra aparece compactada como para poder exercer tal presión sobre o mesmo. Polo demais, os exemplares estudados presentan os caracteres de identificación típicos da especie, confirmada ademais polo estudo microscópico e as análises moleculares efectuadas. Con respecto a estas últimas, a secuencia de ADN correspondente ás mostras dos exemplares estudados (identificador de secuencia en GenBank: MH703904), comparouse, mediante a ferramenta bioinformática BLAST, coa secuencia de identificador GenBank EF395374, correspondente aos taxons estudados no traballo de JACOBSSON & LARSSON (2007), dando como resultado un grao de similitude entre ambas do 99,8%. (472 de 473 bases).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLDS, E. (1990). Genus *Hygrophorus*. En: Bas, C.; Kuyper, T.W.; Noordeloos, M.E.; Vellinga, E.C. (Eds.), *Flora Agaricina Neerlandica* 2, AA Balkema, Lisse, 115-133.
- BLAST [sitio web]. 2018. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [Última consulta: 27-05-2018]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- BOERTMANN, D. (1995). *The genus Hygrocybe. Fungi of Northern Europe* V., 1st edn. Danish Mycological Society, Greve.
- BON, M. (1990). *Les Hygrophores. Hygrophoraceae* Lotsy. Documents Mycologiques. Mémoires Hors-Série 11-99, pp. 1-6.
- CANDUSSO, M. (1997). *Fungi Europaei* 6. *Hygrophorus* s.l. Libreria Basso. Alassio.
- CUBETA, M.A.; ECHANDI, E.; ABERNETHY, T. & R. VILGALYS (1991). Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* 81: 1395-1400.
- FRIES, E.M. (1836). *Corpus Florarum provincialium sueciae* 1. Floram Scanicam, Uppsala.
- FRIES, E.M. (1838). *Epicrisis systematis mycologici seu synopsis Hymenomycetum*. Uppsala.
- GARDES, M. & T.D. BRUNS (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- GENBANK [sitio web]. (2018). NIH genetic sequence database. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [Derradeira consulta: 28-

- 05-2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- JACOBSSON, S.; LARSSON, E. (2007). *Hygrophorus penarioides*, a new species identified using morphology and ITS sequence data. *Mycotaxon* 99: 337-343.
- KARSTEN, P. (1876). *Mycologia Fennica. Pars tertia (Basidiomycetes)*. Bidrag till Kännedom af Finlands Natur och Folk. Helsingfors. 377 pp.
- KIRK, P.M. (2018). *Species Fungorum* (versión Oct 2017). En: ROSKOV, Y.; ABUCAY, L.; ORRELL, T.; NICOLSON, D.; BAILLY, N.; KIRK, P.M.; BOURGOIN, T.; DEWALT, R.E.; DECOCK, W.; DE WEVER, A.; NIEUKERKEN, E. VAN, ZARUCCHI, J. & L. PENEV (eds.) 2018. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th June 2018. Recurso dixital de www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- KUMMER, P. (1871). *Der Führer in die Pilzkunde*. C. Luppe, Zerst.
- LARSSON, E. (2010). *Hygrophorus, A Monophyletic Genus With Species Showing Strong Host Preferences*. International Mycological Congress (IMC9), Edinburgh, Scotland (Poster Abstract P4): 111.
- LODGE, D.J.; PADAMSEE, M.; MATHENY, P.B.; AIME, M.C.; CANTRELL, S.A.; BOERTMANN, D.; KOVALENKO, A.; VIZZINI, A.; DENTINGER, B.T.M.; KIRK, P.M.; AINSWORTH, A.M.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R.; LARSSON, E.; LÜCKING, R.; GRIFFITH, G.W.; SMITH, M.E.; NORVELL, L.L.; DESJARDIN, D.E.; REDHEAD, S.A.; OVREBO, C.L.; LICKY, E.B.; ERCOLE, E.; HUGHES, K.W.; COURTECUISSE, R.; YOUNG, A.; BINDER, M.; MINNIS, A.M.; LINDER, D.L.; ORTIZ-SANTANA, B.; HAIGHT, J.; LÆSSØE, T.; BARONI, T.J.; GEMI, J. & T. HATTORI (2014). Molecular phylogeny, morphology, pigment chemistry and ecology in *Hygrophoraceae* (Agaricales). *Fungal Diversity* 64:1–99. doi: 10.1007/s13225-013-0259-0
- LOTSY, J.P. (1907). *Vorträge über botanische Stammesgeschichte*. Gustav Fischer, Jena.
- MATHENY, P.B.; CURTIS, J.M.; HOFSTETTER, V.; AIME, M.C.; MONCALVO, J.M.; GE, Z.W.; SLOT, J.C.; AMMIRATI, J.F.; BARONI, T.J.; BOUGHER, N.L.; HUGHES, K.W.; LODGE, D.J.; KERRIGAN, R.W.; SEIDL, M.T.; AANEN, D.K.; DENITIS, M.; DANIELE, G.M.; DESJARDIN, D.E.; KROPP, B.R.; NORVELL, L.L.; PARKER, A.; VELLINGA, E.C.; VILGALYS, R. & D.S.HIBBETT (2006). Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98: 982-995.
- MUNSELL, A.H. (2009). *Munsell Soil Color Charts*. Munsell Color Company, Inc. Baltimore, Maryland.
- MURRAY, M.G. & W.F. THOMPSON (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19): 4321-4325.
- ORTON, P.D. & R. WATLING (1969) A reconsideration of the classification of the Hygrophoraceae. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 29(1).
- PERSOON, C.H. (1801). *Synopsis methodica fungorum: sistens enumerationem omnium huc usque detectarum specierum, cum brevibus descriptionibus nec non synonymis et observationibus selectis*. Pars secunda. Gottingae. Apud Henricum Dieterich.
- QUÉLET, L. (1883). Quelques especes critiques ou nouvelles de la Flore Mycologique de France. *Comptes Rendus de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences* 11: 387-412.
- RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J. & M. L. CASTRO (2016). *Micobiota galega, 1867-2015 (Ascomycota, Basidiomycota)*. Documento preliminar para a base de datos micolóxica galega MICBIOTAGALICIA.MDB. Ed. Grupo Micolóxico Galego. [Consulta: 20-05-2018]. Disponible en: <http://www.mykes.es/contidos/20/>
- ROZE, E. (1876). Essai d'une nouvelle classification des agaricinées. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 23:45.54.
- SINGER, R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy*, 4th edn. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- VESELSKÝ, J. (1968). Stavnatka Zajeci-Camarophyllus leporinus (Fr.) Wunsche v Zamecke Zahrade v Kyjovicich u Opavy. *Acta Musei Silesiae ser. A*, XVII: 55-58.
- VILGALYS, R. & M. HESTER (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238-4246.