

# UNA NUEVA ESPECIE DE *FLAMMULINA* P. KARSTEN, *F. CEPHALARIAE* (AGARICALES) ENCONTRADA EN ESPAÑA

J. L. PÉREZ-BUTRÓN<sup>1</sup> y J. FERNÁNDEZ-VICENTE<sup>2</sup>

1.- Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao. Apdo. 41. E-48910 Sestao (Bizkaia). E-mail: josemicologo@terra.es

2.- c/ Iparragirre 4, 4º dcha. E-48510 Trapagarán (Bizkaia). E-mail: jafdez4@hotmail.com

**RESUMEN.** Una nueva especie de *Flammulina* P. Karsten, *F. cephalariae* (Agaricales) encontrada en España. Basándonos en estudios morfológicos y moleculares, proponemos *Flammulina cephalariae* como especie nueva para la ciencia. Fructifica en terreno calcáreo, sobre restos de la planta *Cephalaria leucantha* y su distribución parece quedar limitada a una pequeña zona del Valle de Losa en la provincia de Burgos (norte de España). Se describe, iconografía y compara con taxones afines, al tiempo que se incluye una clave de las especies europeas del género *Flammulina* P. Karsten.

**Palabras clave.** Basidiomicetes, Agaricales, *Flammulina cephalariae*, taxonomía, Burgos, España.

**ABSTRACT.** A new species of *Flammulina* P. Karsten, *F. cephalariae* (Agaricales) recorded in Spain. Based on morphological and molecular studies, we propose *Flammulina cephalariae* as a new species to the scientific community. It grows in limestone soil on *Cephalaria leucantha* debris and its distribution seems to be limited to Losa Valley, in the province of Burgos (Northern Spain). We offer a description, its iconography and a comparison with similar taxa, and we include also a key for European species of genus *Flammulina* P. Karsten.

**Key words:** Basidiomycetes, Agaricales, *Flammulina cephalariae*, taxonomy, Burgos, Spain

## INTRODUCCIÓN

Hace ya 20 años que uno de los autores (J.L.P.B.) viene observando esta *Flammulina*, aparentemente terrestre, pero que en realidad crece sobre raíces enterradas de *Cephalaria leucantha*, en los prados secos y pedregosos orientados al sur y aislados de los campos de labor del tranquilo Valle de Losa en el norte de la provincia de Burgos. Desde entonces, esta bella especie nunca ha faltado a su cita en los meses de noviembre y diciembre, desapareciendo casi por completo en enero debido a las bajas temperaturas. La identificación de *Cephalaria leucantha* como planta hospedante de esta nueva *Flammulina* siempre ha sido un objetivo prioritario en nuestras investigaciones, y se ha conseguido realizar tras numerosos y exhaustivos muestreos llevados a cabo en el área de estudio a través de los años. Ahora, podemos certificar con absoluta seguridad la relación entre hongo y planta. Para el estudio del género *Flammulina*, nos hemos basado principalmente en los trabajos de BAS (1983 y 1995), REDHEAD *et al.* (1999), BON (1999) y PETERSEN *et al.* (2001), pero muy especialmente, hemos seguido los criterios taxonómicos de estos últimos autores, quienes recientemente, han efectuado una revisión mundial de este género, aportando además, datos modernos sobre caracteres moleculares y filogenia. Ello ha permitido una mejor comprensión de algunos conceptos sobre los taxones europeos. Varias muestras de material de herbario de esta nueva especie, entre ellas del holotipo, fueron enviadas a la Universidad de Tennessee, donde la Dra K.W. Hughes realizó un completo estudio molecular, cuyos resultados se exponen más adelante.

*Flammulina* P. Karsten in *Medd. Soc. Fauna Fl. Fenn.* 18 (*Symb. Mycol. fenn.* 30): 62. 1891.

Los caracteres taxonómicos que delimitan el género *Flammulina* son: basidiocarpos con porte similar a *Collybia*, *Hydropus* o *Xerula*. Pileos hemisféricos, convexos o plano-convexos, de vistosos colores rojizos, anaranjados o amarillos, más raramente blanquecinos; umbonados o no, a veces con depresión central; más o menos viscosos o glutinosos; cartilaginosos; con el margen inflexo, más o menos estriado por transparencia. Láminas más bien distantes, adnatas, sinuosas, blancas, amarillas o amarillo-ocráceas. Pie central, pruinoso, pardo-rojizo, negruzco o con tonos oliváceos, aterciopelado de forma característica, atenuado o radicante, a veces con una larga pseudorriza; duro y tenaz.

Esporas hialinas, lisas, cilíndricas, ovales, oblongas o elipsoidales, de hasta 17 µm de longitud, no amiloides, no cianófilas, gutuladas, de color blanco o crema-amarillento en masa; pileipelis en ixotricodermis, himeniforme o de tipo "*stratosa*" y pileocistidios de gran talla, pared gruesa, de lageniformes a fusiformes y de color pardo o pardo-ocráceo; caulocistidios similares a los pileocistidios; cistidios faciales y marginales hialinos, de morfología ventricoso-lageniforme; fibulas presentes. Cosmopolita. Hábitat: fructifican sobre distintas plantas leñosas o arbóreas, saprotróficas o parásitas, gregarias o dispersas, normalmente cespitosas; fructifican durante casi todo el año, aunque generalmente lo hacen en época invernal. Especie tipo: *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**ANÁLISIS MORFOLÓGICO.** Para las descripciones del material tipo se han utilizado ejemplares frescos. El análisis microscópico ha sido realizado con un microscopio óptico Nikon y se montaron las muestras en agua destilada, rojo Congo amoniacal al 1% y potasa (KOH) al 5%. Las figuras de microscopía han sido efectuadas con un ocular de dibujo de cámara clara adaptado al MO. Las fotografías de los especímenes se han realizado en su ambiente natural. El material estudiado se encuentra depositado en los herbarios de la Universidad de Tennessee (TENN), de la Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao (SEST) y en el herbario particular de J. Fdez-Vicente (J.F.V.).

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.** Se tomó una porción de tejido procedente de especímenes secos de herbario y se molió utilizando arena estéril hasta obtener un polvo fino. A este polvo se añadió tampón de extracción CTAB (CARLSON *et al.*, 1991) y se realizó la extracción del ADN como describe (MATA *et al.*, 2006). La amplificación mediante PCR de la región ribosómica ITS1-5.8S-ITS2 se llevó a cabo utilizando como cebadores los oligonucleótidos ITS1F e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). Los fragmentos de ADN obtenidos se secuenciaron empleando el sistema Big Dye Terminator (ABI), siguiendo las indicaciones del fabricante, y utilizando los cebadores ITS5 (directo) y ITS4 (inverso). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas utilizando el grupo de programas GCG (GCG2000).

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO BASADO EN LAS SECUENCIAS DE ADN.** Los alineamientos preliminares de las secuencias de ADN se llevaron a cabo utilizando el programa *pileup* del paquete GCG, el cual realiza UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*). Posteriormente, se realizaron ajustes manuales de los alineamientos obtenidos. *Flammulina stratosa* fue seleccionada como grupo externo, basándose en estudios previos con el género *Flammulina* (HUGHES *et al.*, 1999). El análisis de máxima parsimonia se realizó con ayuda del paquete informático PAUP\* (SWOFFORD 2002), tratando las lagunas en los alineamientos como si se tratara de un quinto estado. Los caracteres se tomaron no-ordenados y con igual peso. El número de árboles se limitó a 100. Los caracteres multiestado se interpretaron como desconocidos. Los árboles iniciales se obtuvieron por adición de taxones paso a paso. Secuencia de adición: *furthest*. Número de árboles en cada paso durante la adición: 1. El algoritmo de intercambio de ramas fue bisección del árbol y reconexión (TBR). Opción *Steepest descent* desactivada. Se realizó un remuestreo de 1000 réplicas. Las lagunas resultaron ser pequeñas y filogenéticamente informativas. No se llevó a cabo su codificación.

## RESULTADOS

***Flammulina cephalariae* Pérez-Butrón & Fdez-Vicente, sp. nov.**

*Pileus* 17-40 (70) mm *latus*, *convexus vel expansus*, *postea leviter depressum*, *raro umbonatus*, *rubro auratus*, *luteo citrinae*, *hygrophanus*, *in sicco pallide ochraceus*, *discum versus obscurior*; *margo substriatus*, *subviscidus*. *Lamellae adnatae*, *distantiores*, *ventricosae*, *intervenosae*, *ad 10 mm latae*, *initio albidae*, *deinde luteo-pallidae*, *vel aurantio-luteae*. *Stipes* 30-80-(100) × 5-7-(10) mm, *cylindricus*, *durus*, *tenax*, *striatus in longitudinem*, *leviter compressus*, *apice luteus*, *pruinosis*, *basi attenuatus*, *radicans*, *rubro-brunneus tomentosus*. *Caro tenuis*, *lenta*, *apice lutea et base brunnea*, *odor nullus*. *Sporae* (9,2)-12-16,8-(17) × (5)-5,6-7,6-(8) μm,  $Q = 2$ , *ellipsoideae-oblongae*, *laeves*, *guttulatae*, *hyalinia*, *inamyloideae*. *Sporae en cumulo albidae*. *Basidia* (42)-48-65,6-(69,6) × (8)-9-11,2-(12) μm, *tetrasporae*. *Trama hymenialis structura parallela*, *a pigmento cum KOH brunneo instructa*. *Cheilocystidia* (49,6)-58,4-86-(100) × (9)-10-21-(25,6) μm, *lageniformia vel ventricosa*, *hyaliniae*. *Pleurocystidia cheilocystidiorum similia*. *Hyphae cuticula stiptipellis levibus hyphis* 3,2 a 5,6 μm *latae*. *Pileipellis ixotrichodermiformis*, *hyphis ramificationibus*, *coralloides*, *pigmentum luteo-brunneae instructas*. *Pileocystidia* (36)-50-116-(130) × (6)-7-10-(12) μm, *lageniformia*, *a subfusiformibus vel claviforma*, *brunneae*. *Caulocystidia* (55)-65-116-(148) × (6)-10-13,6-(15) μm, *lageniformia vel subfusiformia*, *ramosa*, *brunneae*. *Fibulae numerosae*. *Habitat ad radices Cephalaria leucantha*, *in pratis calcariis*, *apparenter terricola*, *gregaria in solitate aut interdum caespitosa*. *Holotypus in Burgos*, *Villalacre (Hispania)*, *6-12-2003*, *715 m altitudinis*, *Legavit J.L. Pérez-Butrón*; *sex specimina in herbario Universitatis Tennessee n° TENN 618009 custodita*. *Isotypus in herbario Societatis Scientiarum Naturae in Sestao n° SEST-03120602 et in herbario J. Fdez-Vicente n° JFV-0312*.

ETIMOLOGÍA: *cephalariae*, se refiere a la planta con la que va asociada.

Píleo 17-40 (70) mm de diám., al principio convexo, pero enseguida extendido y finalmente con depresión central; ocasionalmente umbonado. Margen regular, incurvado, estriado por transparencia, a veces crenulado. Cutícula adnata, excedente, lisa, brillante, algo viscosa en tiempo húmedo, de color rojo anaranjado o rojo ladrillo uniforme; a veces, se presentan formas de color amarillo citrino; higrofana, de color beige-ocráceo al perder la humedad, con el disco central que permanece más oscuro (pardo-rojizo). Consistencia tenaz, elástica, gelatinosa y poco frágil. Láminas algo espaciadas, ventradas, de hasta 10 mm de anchura, adnatas o sinuoso-adherentes, contabilizándose de 20-37 láminas enteras y de 1-6 lamélulas intercaladas de distintas longitudes, intervenadas en el fondo, a veces ahorquilladas; inicialmente blanquecinas, luego de amarillo pálido a amarillo anaranjado, con máculas rojizas de distribución irregular en la madurez. Esporada blanca. Estípite 30-80-(100) × 5-7-(10) mm, central, cilíndrico, a veces comprimido, retorcido, estriado longitudinalmente, fusiforme, atenuado radicante hacia la base en un tramo que varía según la profundidad a que se encuentre la planta hospedante (pseudorriza de hasta 70 mm de longitud), fistuloso, duro, tenaz, hirsuto o algo aterciopelado, pardo-rojizo o negruzco hacia la base, amarillento y pruinoso en la sumidad. Carne escasa, elástica, amarillenta en el sombrero y parda en el pie, que es de consistencia leñosa. Sin olor significativo.

Esporas (9,2)-12-16,8-(17) × (5)-5,6-7,6-(8) μm; × = 13,6 × 6,8 μm,  $Q = 2$ , (n 50, H<sub>2</sub>O), elipsoidales, cilíndrico-elipsoidales u oblongas, con apículo prominente y oblicuo, lisas, hialinas, granuladas interiormente, de pared gruesa, uni o plurigutuladas, no amiloides (Fig. 1, B). Basidios de grandes dimensiones (42)-48-65,6-(69,6) × (8)-9-11,2-(12) μm, interiormente granulados, tetraspóricos, fibulíferos, esterigmas de hasta 10 μm de longitud (Fig. 1, D). Basidiolos abundantes, muy variables, irregulares y tortuosos (Fig. 1, C). Queilocistidios (49,6)-58,4-86-(100) × (9)-10-21-(25,6) μm, lageniformes o ventricosos-lageniformes, subcapitados, hialinos, de pared gruesa, fibulíferos (Fig. 2, H). Pleurocistidios similares a los queilocistidios, pero menos abundantes. Trama laminar regular, compuesta de hifas cilíndricas, paralelas, septadas, de hasta 17-22 μm de diámetro, fibulíferas. Pigmento pardo oscuro con KOH. Caulocistidios (55)-65-116-(148) × (6)-10-13,6-(15) μm, lageniformes, subfusiformes, de cuello alargado, ramificados, a veces septados, curvados, de color pardo y pared gruesa, fibulíferos, muy abundantes a lo largo de todo el pie (Fig. 2, G). Hifas de la caulocutis fibulíferas, de pared espesa, de 3,2 a 5,6 μm de diámetro, envueltas en

un pigmento pardo. Pileipelis gelificada, en ixotricodermis, formada por hifas ramificadas, coraloides (3-4  $\mu\text{m}$  de anchura) o cilíndricas, de hasta 114-190  $\times$  3-10-(14)  $\mu\text{m}$ , con terminaciones fusiformes; septadas, fibulíferas, embebidas en un gel mucilaginoso con pigmento intracelular amarillento-parduzco (Fig. 2, E). Pileocistidios (36)-50-116-(130)  $\times$  (6)-7-10-(12)  $\mu\text{m}$ , lageniformes, a veces claviformes, subfusiformes, con un largo cuello de ápice obtuso, septados (ocasionalmente, se contabilizan 5 septos), a veces bifurcados en la base, de pared gruesa y de color amarillo-parduzco (Fig. 2, F).

**ECOLOGÍA Y FENOLOGÍA.** Vive en praderas xero-termófilas, orientadas al sur, desarrolladas sobre suelo calcáreo; aparentemente sobre el suelo, pero los basidiomas están provistos de una larga pseudorriza que alcanza la raíz de la planta hospedante, *Cephalaria leucantha*; crece gregaria o solitaria; a veces se presentan dos o tres ejemplares unidos, cespitosos, sobre el mismo sustrato. Aparece a mediados del otoño (noviembre) y permanece hasta principios del invierno (primeros días de enero), incluso entre la nieve. Raramente se observa algún ejemplar aislado en fechas posteriores, aunque a veces, se han visto algunos especímenes de forma esporádica en el mes de febrero. Localmente abundante.

El análisis filogenético de las secuencias de ADN obtenidas permitió obtener 100 árboles que se diferenciaron principalmente en el clado *Flammulina velutipes* y en la posición relativa de *F. ononidis*. De un total de 812 caracteres, 558 fueron constantes y 119 variables no informativos. El número de caracteres informativos filogenéticamente fue de 135. La longitud del árbol fue 451 pasos. Los índices de consistencia y homoplasia fueron 0,723 y 0,277 respectivamente.

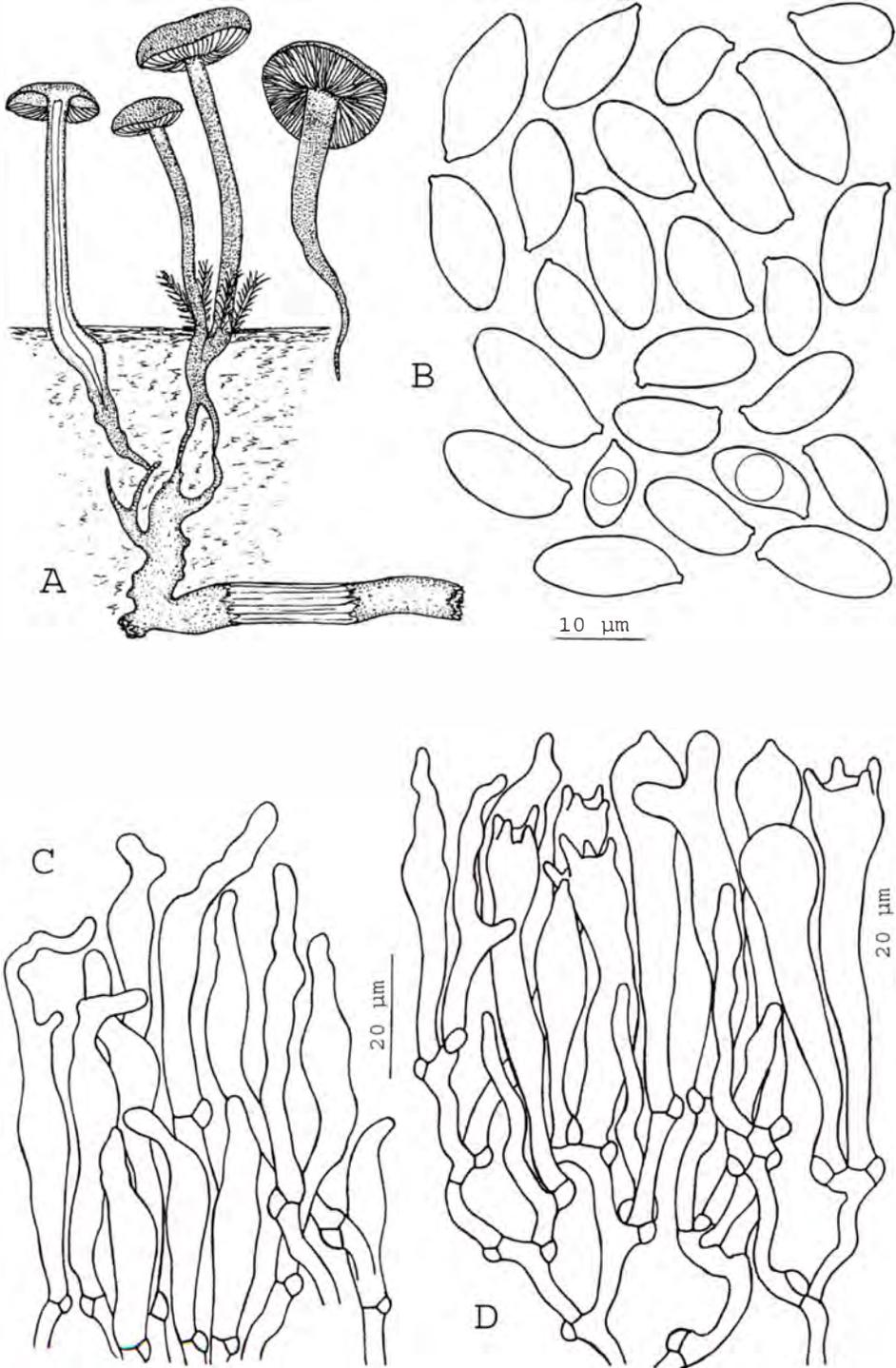
Los resultados obtenidos permiten comprobar que *Flammulina cephalariae* aparece como un clado separado, con un valor de soporte de remuestreo muy alto (99%). Sin embargo, su posición relativa dentro del género no pudo resolverse mediante los análisis realizados. En algunas filogenias es agrupada con *F. velutipes*, mientras que en otras aparece junto a *F. elastica* (K.W. Hughes y R.H. Petersen, datos no publicados, com. pers.).

**MATERIAL EXAMINADO. ESPAÑA. BURGOS:** Valle de Losa, Villalacre, UTM 30TVN6664, alt. 715 m, basidiomas gregarios o solitarios, a veces cespitosos, aparentemente terrícolas, en suelo calcáreo, sobre raíces enterradas de *Cephalaria leucantha*, 6-12-2003, leg. J.L. Pérez-Butrón, recolección de 6 basidiomas conservados secos en el herbario de la Universidad de Tennessee, número de referencia TENN 61809 (*Holotypus*). Recolección de 9 basidiomas conservada en el herbario de la Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao, referencia SEST-03120602 (*Isotypus*) y recolección de 2 basidiomas de la conservación en el herbario personal de J. Fdez-Vicente, referencia JFV-0312 (*Isotypus*).

**OTRAS RECOLECCIONES EXAMINADAS (Paratypus). ESPAÑA. BURGOS:** Valle de Losa, Castrobarco, UTM 30TVN6765, alt. 750 m, sobre raíces enterradas de *Cephalaria leucantha*, 5-11-2004, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-04110503.- *Ibid.*, 14-11-2004, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-04111402.- *Ibid.*, 11-11-2005, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-05111102.- *Ibid.*, 7-12-2006, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-06120701.- *Ibid.*, 17-12-2006, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-06121702.- Valle de Losa, Villalacre, UTM 30TVN6664, alt. 715 m, sobre raíces enterradas de *Cephalaria leucantha*, 4-12-2004, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-04120401.- *Ibid.*, 7-12-2005, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-05120701.- *Ibid.*, 7-12-2006, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-06120703.- *Ibid.*, 17-12-2006, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-06121701.- *Ibid.*, 6-1-2007, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-07010601. Valle de Losa, Las Eras, UTM 30TVN6665, alt. 700 m, sobre raíces enterradas de *Cephalaria leucantha*, 20-11-2005, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-05112004.- Valle de Losa, Colina, UTM 30TVN6465, alt. 710 m, sobre raíces enterradas de *Cephalaria leucantha*, 8-12-2006, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-06120801.- *Ibid.*, 18-12-2006, leg. J.L. Pérez-Butrón, SEST-06121804.

A continuación se ofrece una clave sencilla para separar las especies europeas del género *Flammulina*, basada en los recientes trabajos llevados a cabo por REDHEAD & PETERSEN (1999) y PETERSEN *et al.* (2001).

- 1 a) Especies lignícolas, que crecen directamente sobre madera distanciada del suelo; cespitosas ..... 2
- b) Especies terrestres o radicícolas; gregarias o dispersas, a veces cespitosas ..... 5
- 2 a) Pileipelis en ixotricodermis con hifas ramificadas ..... 3
- b) Pileipelis de tipo himeniforme. Pileo rosa pálido blanquecino o marfil, de 20-50 mm de diám.; esporas 7, 4-11  $\times$  3,8-4,5  $\mu\text{m}$ , Q = 2,04; elipsoidales u ovoides; usualmente asociada con *Salix*, más raramente con *Populus trichocarpa*, *P. tremuloides*, *Betula*, *Alnus*; Rusia ..... *F. rossica*



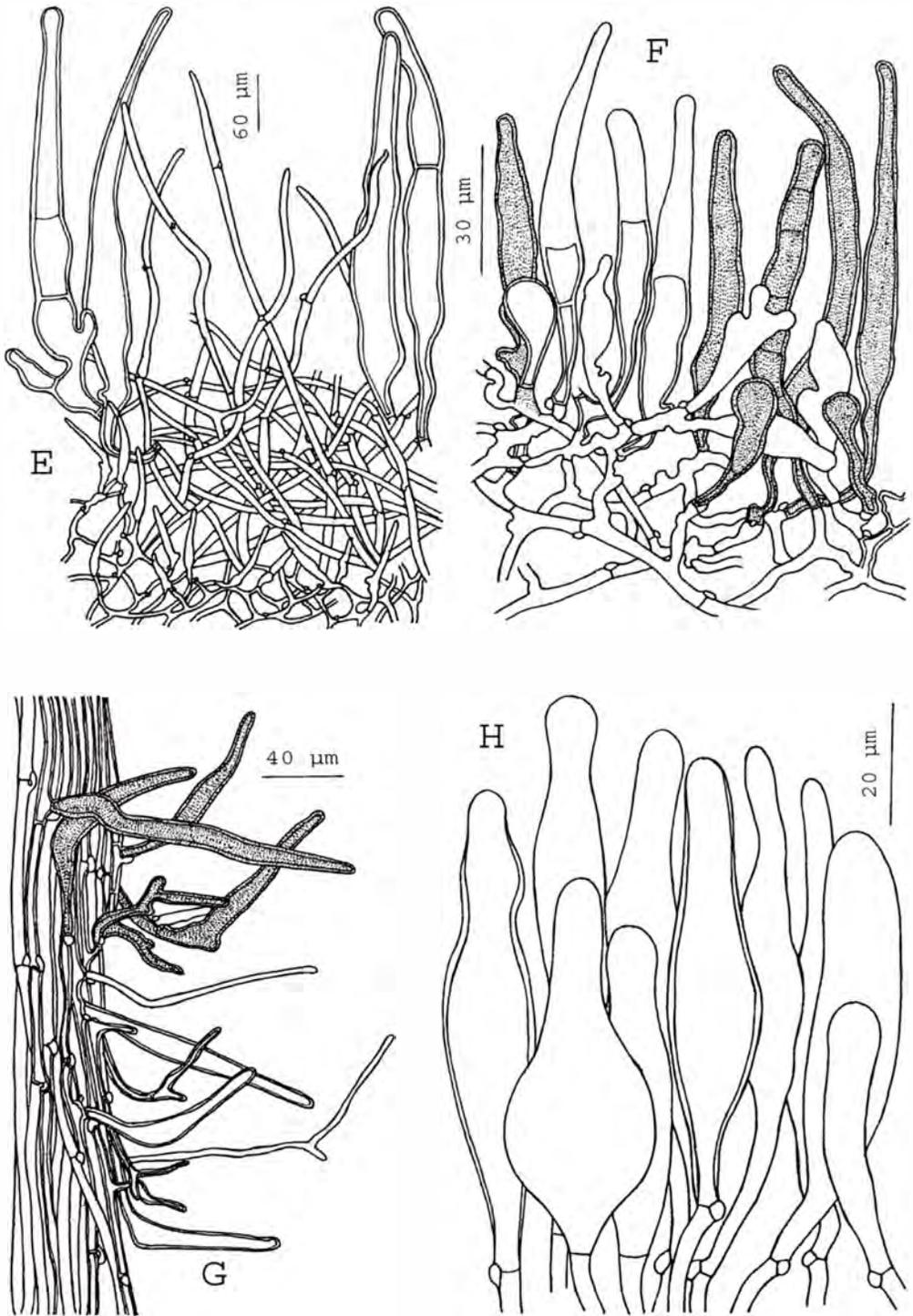
**Fig. 1.** *Flammulina cephalariae* Pérez-Butrón et Fdez-Vicente. (*Holotypus*, TENN 61809): **A)** Basidiomas; **B)** esporas; **C)** Basidiolos; **D)** Basidios y basidiolos.

- 3 a)** Esporas que no sobrepasan 10-(10,6)  $\mu\text{m}$  de longitud ..... **4**  
**b)** Esporas más alargadas, de (7,5)-8-11,5-(12) x (2,3-)-3-4-(4,7)  $\mu\text{m}$ ; (Qm = 2,5-3); cilíndricas; asociada a *Salix*; Finlandia; Austria, Países Bajos ..... *F. elastica*
- 4 a)** Píleo de hasta 100-(120) mm de diámetro, de amarillento a castaño rojizo, en el centro oscuro; láminas adnatas, amarillo-ocráceas; estípite aterciopelado, de amarillento con tonos oliváceos a casi negro; esporas inconstantes, normalmente de 6-9,5 x 3-4  $\mu\text{m}$ , subcilíndricas, Q = 2,5; cosmopolita ..... *F. velutipes* var. *velutipes*  
**b)** Píleo de 20-30 mm de diámetro, de color blanco-crema, con el disco amarillento; láminas y estípite blanquecinos; esporas 7,5-10-(10,6) x (2,5)-3-4  $\mu\text{m}$ , estrechamente elípticas a subfusiformes, Q = 2-3,0-(3,3); *Betula*, *Sambucus*; Países Bajos ..... *F. velutipes* var. *lactea*
- 5 a)** Hábitat generalmente terrícola, en el humus del bosque, sobre madera o raíces enterradas; estípite con pseudorriza o sin ella ..... **6**  
**b)** Hábitat prático, radicícola; en terreno calcáreo; estípite provisto de una larga pseudorriza; pileipelis en ixotricodermis con hifas ramificadas ..... **7**
- 6 a)** Esporas de pequeñas dimensiones 6,3-7,4 x 3,7-4,5  $\mu\text{m}$ , Q = 1,62, ovoides, elipsoidales o amigdaliformes; pileipelis con una capa himeniforme; estípite subradicante; cespitosa o aislada, ocasionalmente sobre tocones o en la base de los árboles; asociada preferentemente con *Populus* y, a veces, con *Betula*, *Alnus*, *Pinus* y *Picea*; Escandinavia ..... *F. populicola*  
**b)** Píleo de color marfil blanquecino o amarillento-ocráceo; estípite con pseudorriza; basidiosporas 6-7,5-(8) x 4-4,5 (5)  $\mu\text{m}$ , Q = 1,55-1,70; Pileipelis en ixotricodermis constituida por hifas no ramificadas combinadas con elementos claviformes; gregaria o cespitosa; sobre raíces enterradas de *Robinia pseudoacacia*, *Populus*, *Salix*; Francia, Países Bajos, Dinamarca, Hungría, Eslovaquia, Italia, Suiza y España ..... *F. fennae*
- 7 a)** Píleo normalmente pequeño 5-35-(45) mm de diámetro; esporas (7,5)-8,5-13-(14) x (4)-4,5-6  $\mu\text{m}$ ; solitaria o en grupos, asociada a las raíces de *Ononis spinosa* (*Fabaceae*); Alemania, República Checa, Italia, Francia, Rusia y Hungría ..... *F. ononidis*  
**b)** Píleo de hasta 70 mm de diámetro; esporas (9,2)-12-16,8-(17) x (5)-5,6-7,6-(8)  $\mu\text{m}$ , Q = 2; gregaria o dispersa, ocasionalmente cespitosa, sobre raíces de *Cephalaria leucantha* (*Dipsacaceae*); España ..... *F. cephalariae*

## DISCUSIÓN

El género *Flammulina*, ampliamente extendido por todo el mundo, cuenta en la actualidad con 12 especies descritas, según el *Index Fungorum* (2007), de las cuales, 7 viven en Europa (incluyendo la especie presentada en este trabajo). *F. cephalariae* está muy bien caracterizada por diferentes aspectos relativos a su morfología, por su llamativo píleo de color rojo, rojo-anaranjado o amarillo vivo y por su estípite aterciopelado provisto de una larga pseudorriza, pero destaca especialmente desde el punto de vista microscópico, donde sobresale por el gran tamaño de esporas y basidios. Sin ninguna duda, dentro del género ambos elementos son los que presentan valores más grandes. Macroscópicamente, se puede confundir con *Flammulina ononidis* Arnolds, de aspecto similar, que también habita en praderas basófilas, pero que posee un basidioma de menor tamaño (píleo de 5-35-(45) mm de diám., estípite 15-55-(80) x 1-4 mm (BAS, 1995). En el artículo de la diagnosis original (ARNOLDS, 1977) se incluyen unas medidas aún inferiores (píleo 12-22 mm, estípite 24-75 x 2-4 mm). Como se desprende de dichas descripciones, *F. ononidis* posee un basidioma más esbelto y menos robusto que *F. cephalariae*. Por otra parte, si comparamos la ecología de ambos taxones, observamos que *F. ononidis* se asocia a la planta *Ononis spinosa*, muy extendida en Europa y, sin embargo, *F. cephalariae* está ligada a la planta xero-termófila de ámbito mediterráneo *Cephalaria leucantha*. Además, *F. ononidis* tiene un crecimiento más aislado, mientras que *F. cephalariae*, aunque esporádicamente, también lo hace de forma cespitosa.

Con el fin de aclarar las diferencias existentes entre ambos taxones, se presenta una tabla comparativa con los caracteres microscópicos más relevantes, según las respectivas diagnosis originales.



**Fig. 2.** *Flammulina cephalariae* Pérez-Butrón et Fdez-Vicente. (*Holotypus*, TENN 61809): **E)** Hifas de la pileipelis y pileocistidios; **F)** Pileocistidios; **G)** Caulocistidios; **H)** Queilocistidios y pleurocistidios.

**Tabla 1.** Comparación entre los caracteres microscópicos de *Flammulina cephalariae* y *F. ononidis*.

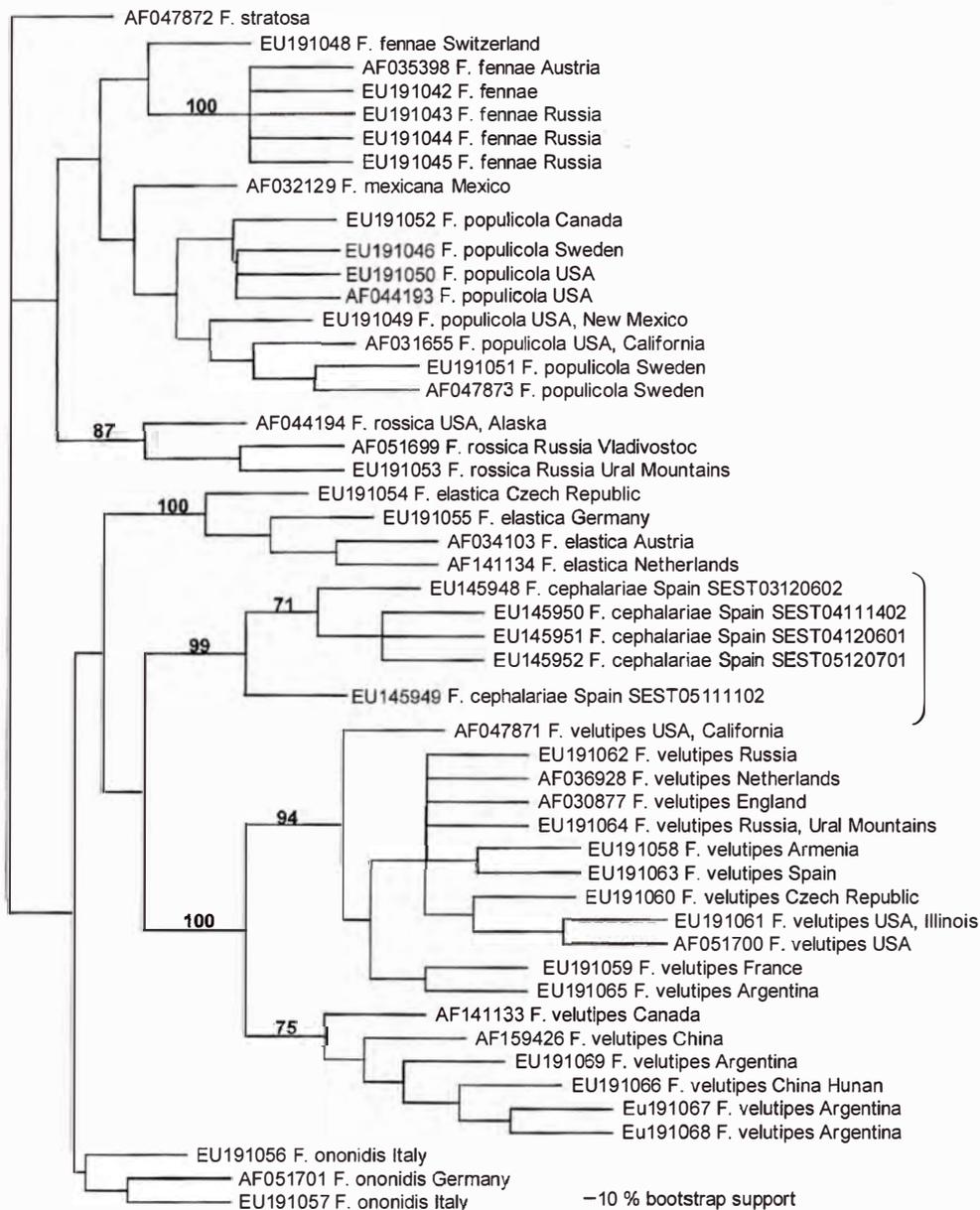
	<i>Flammulina cephalariae</i>	<i>Flammulina ononidis</i>
Esporas	(9,2-)12-16,8(-17) × (5-)5,6-7,6(-8) µm cilíndrico-elipsoidales, oblongas	(7,5-)8,5-13(-14) × (4-) 4,5-6 µm elipsoidales, oblongas
Basidios	(42-)48-65,6(-69,6) × (8-)9-11,2(-12) µm 4 esporas	(25-)34,5-42(-50) × (-5)6,5-7,5(-8) µm 4 esporas
Queilocistidios- Pleurocistidios	(49,6-)58,4-86(-100) × (9-)10-21(-25,6) µm Ventricoso-lageniformes, subcapitados	(32-)38,5-56(-66) × (6,5-)8,5-14,5(-21) µm Utriformes
Pileocistidios	(36-)50-116(-130) × (6-)7-10(-12) µm Lageniformes, subfusiformes, claviformes	(43-)60-86(-99) × (6-)8,5-11(-17) µm Lageniformes
Caulocistidios	(55-)65-116(-148) × (6-)10-13,6 (-15) µm Lageniformes, subfusiformes; ramificados	40,5-90,5 × 7-12(-15) µm Lageniformes
Pileipelis	En ixotricodermis	En ixotricodermis

Al examinar la tabla adjunta, se puede comprobar que la microscopía de las dos especies es muy distinta. En efecto, en todos los elementos (esporas, basidios, queilocistidios, pileocistidios y caulocistidios) las medidas son netamente superiores en el caso de *F. cephalariae*. Del resto de especies europeas que poseen pie con pseudorriza y que están contempladas en la clave, *F. fennae* Bas, guarda un parecido macroscópico con *F. cephalariae*; sin embargo, el basidioma presenta colores blanquecinos con tonos ocráceos (BAS, 1983, 1995). Esta especie también es terrícola y posee una larga pseudorriza, y crece sobre madera enterrada en zonas de bosque (BAS, 1983, 1995) y no en praderas, como en el caso de *F. cephalariae*. Por otra parte, las esporas de menor tamaño (6-8 × 4-4,5 µm) y las hifas de la pileipelis no ramificadas (BAS, 1983, 1995; GAGGIANESE *et al.*, 1998; PETERSEN *et al.*, 2001), las separa definitivamente. *Flammulina velutipes* var. *velutipes* (Curtis: Fr.) Singer, aunque posee una microanatomía muy similar a *F. cephalariae*, difiere fundamentalmente por las menores dimensiones de esporas y basidios. Macroscópicamente, se diferencia por sus basidiomas de mayor porte, píleo de hasta 95 mm (BAS, 1983, 1995), o aún mayor, de 120 mm (MORENO *et al.*, 1984), por la superficie pileica más viscosa, por el estípite más vistosamente aterciopelado y carente de pseudorriza, por su crecimiento fasciculado, por su distribución cosmopolita y por tener una fenología diferente, de preferencias claramente invernales. Analizando la monografía de PETERSEN *et al.* (2001), donde se realiza una exhaustiva revisión morfológica y molecular del género *Flammulina* a nivel mundial, hemos podido recopilar datos muy significativos del resto de especies extraeuropeas: *F. mexicana* Redhead, Estrada & R.H. Petersen, *F. stratosa* Redhead, Petersen & Methven, *F. similis* Horak, *F. ferrugineolutea* (Beeli) Singer, *F. callistosporioides* (Singer) Singer y *F. velutipes* var. *lupinicola* Redhead & Petersen y, de todas ellas, únicamente este último táxon se aproxima ligeramente a *F. cephalariae*, en cuanto al tamaño de las esporas (7-14,8 × 3,7-6,5 µm) sin embargo, el aspecto macroscópico con los basidiomas de tonos blanco-amarillentos, el crecimiento en grandes ramilletes; sobre *Lupinus arboreus*, (planta ausente en nuestro país) y, su procedencia americana (costa de California), la descartan por completo.

Los datos obtenidos del análisis filogenético de las secuencias de ADN de la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 demuestran claramente que *Flammulina cephalariae* representa un único y bien definido clado dentro del género *Flammulina*. Sin embargo, no han podido resolverse las relaciones entre las distintas especies de dicho género. Sería necesario obtener y analizar secuencias de otros genes o regiones para definir las posiciones de cada una de las especies (K.W. Hughes y R.H. Petersen, datos no publicados, com. pers.).

## CONCLUSIÓN.

La comparación de la morfología macro y microscópica de nuestro material y su ecología con las otras especies del género, nos confirma la indudable singularidad de *F. cephalariae*. Por otra parte,



**Fig. 3.** Filogenia de ejemplares del género *Flammulina* basada en análisis de parsimonia de secuencias de ADN de regiones ITS. Los ejemplares se identifican por su número de acceso a la base de datos GenBank. Los valores de remuestreo mayores de 70% se muestran a la izquierda del nodo correspondiente.

los análisis del ADN apoyan la identidad de *F. cephalariae* como especie claramente diferenciada de otros taxones del mismo género (com. pers. de R.H. Petersen). Por todo ello, proponemos a *F. cephalariae* nueva especie para la ciencia.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. K.W. Hughes, de la Universidad de Tennessee (USA), quien declinó aparecer como co-autora del presente artículo, por su intervención e interés mostrado en los estudios moleculares realizados con nuestro material de herbario. Al Dr. R.H. Petersen de la Universidad de Tennessee (USA) por su inestimable ayuda y por la confirmación de la nueva especie. Al Dr. J. Ponce de la Universidad Complutense de Madrid, por la traducción de la diagnosis original en lengua latina y por el resumen al idioma inglés. Al Dr. O. Bañuelos (Granada) por la traducción al idioma español del informe molecular. Al Dr. S. Adamcik de Bratislava (Eslovaquia) por los interesantes comentarios aportados. A Gabriele Cacialli de Livorno (Italia), R. Picón de la Sociedad Micológica de Portugalete (Bizkaia) y, a la Dra. N.V. Psurtseva (Rusia), por facilitarnos bibliografía específica. A los compañeros de la "Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao" (Bizkaia), A L. M<sup>a</sup> Santirso por la colaboración prestada y S. Patino por la identificación de *Cephalaria leucantha*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLDS, E.J.M. (1977).- Einige Pilze eines Halbtrockenrasens bei Detmold (Westfalen). *Westfälische Pilzbriefe* 11: 29-39.
- BAS, C. (1983). *Flammulina* en western Europe. *Persoonia* 12: 51-66.
- BAS, C. (1995).- *Flammulina* Karsten. In: Bas, C., Kuyper, T.W., Noordelos, M.E. Vellinga, E.C., eds. *Flora Agaricina Neerlandica* 3. Rotterdam, Brookfield: Balkema, pp. 170-173.
- BON, M. (1999).- Flore Mycologique d'Europe. 5. Les collybio-marasmioïdes et ressemblants. *Documents Mycol. Mémoire hors série n° 5*. Ass. d'Ecol. et de Mycol. Lille. 171 pp.
- CABI Bioscience, CBS & Landcare Research (2007).- *Index Fungorum*. <http://www.indexfungorum.org>.
- CARLSON, J.E., TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., LUK, V.M.K., KAUFFELDT, C. & R. RUTLEDGE (1991).- Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifer. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 194-200.
- GCG. (2000).- Wisconsin package. Version 10.3. *Accelrys Inc.* San Diego, CA.
- GAGGIANESE, E., NOBILI, G. & A. PRIM (1998).- Primo ritrovamento nella valle del Ticino di due funghi interessanti. *Rivista di Micologia* 1: 53-59.
- HUGHES, K.W., MCGHEE, L.L., METHVEN, A.S., JOHNSON, J.E. & R.H. PETERSEN (1999).- Patterns of geographic speciation in the genus *Flammulina* based in sequences of the ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 area. *Mycologia* 96: 978-986.
- KARSTEN, P.A. (1891).- Symbolae ad Mycologiam Fennicam. Pars. XXX. *Meddel. Soc. Fauna Flora Fenn.* 18: 61-68.
- MATA, J.L., HUGHES, K.W. & R.H. PETERSEN (2006).- An investigation of *Omphalotaceae* (Fungi: Euagarics) with emphasis on the genus *Gymnopus*. *Sydowia*, 59(2) 181-289.
- MORENO, G., MANJÓN, J.L. & A. ZUGAZA (1986).- *La Guía de Incafo de los hongos de la Península Ibérica*. Madrid. Tomo 2, 1279 pp.
- PETERSEN, R.H., HUGHES, K.W. & S.A. REDHEAD (2001).- *The genus Flammulina a Tennessee tutorial*, <http://fp.bio.utk.edu/mycology/Flammulina/default.html>, 1-29.
- REDHEAD, S.A. & R.H. PETERSEN (1999).- New species, varieties and combinations in the genus *Flammulina*. *Mycotaxon* 71: 285-294.
- SWOFFORD, D.L. (2002).- *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- WHITE, T.J., BRUNS T., LEE, S. & J. TAYLOR (1990).- Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols, A guide to methods and applications*. (eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.) *Academic Press*, New York: 315-322.



*Flammulina cephalariae* Pérez-Butrón & Fdez-Vicente (*holotypus*, fotografía J.L. Pérez-Butrón).