

***Psathyrella valdiviana*, revision of the paratype and study of its position within Psathyrellaceae based on a double gene phylogenetic analysis**

(versión en español en la página 65)

Pietro Voto^{1*}, María José Dibán², Gianluigi Maraia³

¹Via G. Garibaldi 173, I- 45010 Villadose (RO), Italy; ORCID 0000-0003-1922-1324 - email: pietrovoto@libero.it

²Las Palmeras 3425, Santiago, Chile - email: mjdiban@gmail.com

³Via della Speranza 6, I- 37069 Villafranca (VR), Italy - email: gian1973.gm@gmail.com

*Corresponding author: pietrovoto@libero.it

Key words

Basidiomycota

Agaricales

Phylogeny

Taxonomy

Abstract: The paratype of *Psathyrella valdiviana*, Singer M669, housed at the herbarium SGO (Santiago, Chile), was studied and sequenced. Its macromorphological characteristics, as described by Singer, attaches it to psathyrelloid taxa while the warted basidiospores remind of the genus *Lacrymaria*. A two-gene phylogenetic analysis supports its positioning within *Coprinellus*.

INTRODUCTION

During the 20th century a number of species, described in the genus *Psathyrella*, were published which were characterized by a psathyrelloid habit and more or less grossly ornamented brown spores. As these taxa had fallen into oblivion after their publication, Voto (2019) first took them into consideration by combining them, as a first provisional morphological approach, with the genus *Lacrymaria*.

Today it can be said that the operation to bring them to attention is having rapid success. Little more than a year later Eberhardt *et al.* (2021) revised *Psathyrella splendens* Corner and *Psathyrella verrucispora* Corner identifying them as synonyms of *Hebeloma parvisporum* Sparre Pedersen, Læssøe, Beker & U. Eberh., and published the new name *Hebeloma flavidifolium* (Corner) Beker & U. Eberh. for *Psathyrella flavidifolia* Corner.

In the present paper it is *Psathyrella valdiviana*'s turn to be re-examined, after half a century of neglect. Its phylogenetic data suggest his affiliation with *Coprinellus* taxa (among which are some warted-spored species such as *C. deliquescens*) which, in 1969, Singer had no means to guess basing on the knowledge of the time and without the support of the phylogenetic analysis.

MATERIALS AND METHODS

Morphology study

Dried material was studied by Voto (basidiospores also by Dibán) after reviving it with 30% ammonia or 5% KOH and, when necessary for image documentation, staining it with Congo red; spores were observed and photographed in water or 5% KOH.

The abbreviation [n/m/p] indicates 'n' basidiospores measured from 'm' basidiomata of 'p' collections. Basidiospore size was recorded as (a) b – c (d), where a = extreme minimum value, the range b – c contains at least 80% of the calculated values, and d = extreme maximum value; Q indicates individual spore length to width ratios.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA extraction and sequencing of the genes ITS, LSU and *tef1* of Singer M6699 (SGO, paratype of *P. valdiviana*) were commissioned to the Alvalab Laboratory (Spain). The couples of primers ITS1F - ITS4 and LR0R - LR5 were used for amplification of the ITS and LSU regions, respectively. Sequencing of the *tef1* region was unsuccessful.

Sequence alignment and phylogenetic analyses

To complement the morphological studies of the specimen, molecular studies were performed. For this purpose, ITS and LSU sequences from 36 collections of species of the family Psathyrellaceae and 2 sequences representing an outgroup collection, *Agrocybe pediades*, were downloaded from GenBank (Table 1). To ensure a correct identification of each species from GenBank, species were chosen based mainly on phylogenetic studies of the family Psathyrellaceae by Nagy *et al.* (2009, 2011, 2012).

Individual alignment of the ITS and LSU regions was performed. Subsequently, the sequences were concatenated in the Mega 11 software (Tamura *et al.* 2021) and uninformative regions were removed using the Phylogeny.fr platform (Dereeper *et al.* 2008), resulting in a length of 1895 characters.

The nucleotide substitution model that best fit the concatenated sequences was analyzed in the jModelTest software (Posada 2008), resulting in the model GTR + GAMMA + I (-lnL = 7800.6). The phylogenetic analysis was performed using two approaches. A Likelihood analysis with 1000 bootstrap replicates was performed in the RaxML GUI platform (Edler *et al.* 2020), and a Bayesian analysis with 1000000 generations was performed in the MrBayes 3.2.6 program (Ronquist *et al.* 2012).

RESULTS

Two new sequences were generated for this study, one ITS and one LSU, which were obtained from the collection M6699, paratype of *P. valdiviana*, housed at the herbarium SGO (Santiago, Chile). Their GenBank accession numbers are given after the herbarium number.

The phylogenetic analysis included 30 species of the family Psathyrellaceae represented in 7 genera, such as *Coprinellus*, *Coprinopsis*, *Heteropsathyrella*, *Lacrymaria*, *Narcissea*, *Parasola* and *Psathyrella*, to evaluate with which genus *Psathyrella valdiviana* is grouped. Phylogenetic reconstruction by both approaches shows the genera *Coprinopsis*, *Lacrymaria*, *Heteropsathyrella* and *Parasola* forming monophyletic groups with good node support (BPP > 0.9; ML > 95%), while *Psathyrella* remains polyphyletic, grouping with *Coprinellus* and *Narcissea*. However, *P. valdiviana* clusters in a clade within the genus *Coprinellus* (BPP = 1; ML = 100%), along with *C. disseminatus*, *C. truncorum* and three collections of the *C. radians* / *C. xanthothrix* complex uploaded in GenBank under the name of *C. radians* (fig. 11 and fig. 12).

As the combined phylograms produced with the MrBayes and the ML programs are slightly different we have decided to publish them both. For the purpose of this study, however, in both cases the position of M6699 is the same: it is nested in a clade containing only *Coprinellus* taxa, in agreement with the local similarities found by the BLAST program on both genes analyzed.

We note that the position of the three vouchers identified as *C. radians* used in this analysis in both phylogenies is uncertain as they encompass the sequence of *P. valdiviana*. In GenBank there are a great number of sequences identified as *C. (cf./aff.) radians* and *C. (cf./aff.) xanthothrix* which, together with another large number of sequences denominated as *C. sp.*, are somewhat intermingled. In light of the targeted purpose of this work we limit ourselves only to taking note that these three sequences and those of *C. disseminatus* and *C. truncorum* show that *P. valdiviana* is nested among them.

Psathyrella valdiviana is consequently combined with the genus *Coprinellus*.

TAXONOMY

Coprinellus valdivianus (Singer) Voto, Dibán & Maraia, comb. nov. [IF 555955]

Basionym: *Psathyrella valdiviana* Singer, Beihefte zur Nova Hedwigia 29: 185 (1969)

Morphological revision of Singer M6699 (SGO), Chile, Hueycolla, 50 m. a.s.l., 4.V.1967, paratype; GenBank: ITS ON228706, LSU OQ730407; material not reviving perfectly well.

Basidiospores [49/1/1]: 8.00 – 10.00 × 5.70 – 6.45 μm, Q = (1.34) 1.38 – 1.73 (1.86), on average 1.56; ornamented with straight to curved or angled, slender to thick, reticulate crests up to 4.0 μm long and with roundish to somewhat irregular warts 0.5 – 0.6 (0.7) μm high and up to 3 μm broad in diameter; in front view elliptic, base rounded to sometimes subtruncate, in side view amygdaliform and deeply flattened above the apiculus to sometimes elliptic, apex flat or tubular protruding up to 1.2 (2.0) μm and terminating with a (1.4) 2.0 – 2.5 (2.9) μm broad germ pore whose membrane is often swollen; initially hyaline and smooth, at maturity dark red-brown in water, grey-brown in 5% KOH.

Basidia: mainly long clavate and $20.0 - 29.0 \times 7.7 - 9.0 \mu\text{m}$ to short clavate and $15.5 - 17.5 \times 6.5 - 7.0 \mu\text{m}$, sometimes clavate-capitate and $20.0 - 24.0 \times 9.8 - 10.0 \mu\text{m}$, 4-sp., sterigmata up to approx. $3.8 \mu\text{m}$ long; hymenial surface uneven with recessed to protruding basidia; hymenophysalides not detected or indistinct.

Cheilocystidia: $38.0 - 80.0 \times 7.5 - 10.0 \mu\text{m}$, lageniform, lageniform-capitate and sometimes with a slender to strangled neck $2.5 - 5.0 \mu\text{m}$ broad, slenderly utriform, subcylindrical, some cylindrical-capitate or elongate clavate; paracystidia inconspicuous.

Pleurocystidia: only one subcylindrical and one cylindrical-utriform found, $38.0 - 42.0 \times 10.0 \mu\text{m}$, hyaline.

Pileipellis (at centre and at margin of pileus): a paraderm with irregular, pedicellate to stalkless, clavate to ellipsoid or irregularly roundish cells $25.0 - 61.0 \times 15.0 - 47.0 \mu\text{m}$; subpellis of clamped, filamentous hyphae, $20.0 - 29.0 \mu\text{m}$ broad in the uppermost layer, $6.0 - 18.0 \mu\text{m}$ broad below.

Pileocystidia: not found.

Caulopellis: of parallel, filamentous, often incrustated, clamped hyphae.

Caulocystidia (at the apex of the stipe): composed of clusters of ellipsoid to shortly clavate or subglobose cells, up to $18.0 \times 16.0 \mu\text{m}$, often terminating a chain of thick-set cells branching off from a single bearing hypha; among them some slenderly clavate to cylindrical end cells, e.g. $45.0 \times 7.5 - 11.5 \mu\text{m}$. One solitary lageniform-subcapitate cystidium, $95 \times 11 \mu\text{m}$, apex $9.5 \mu\text{m}$ broad, was found floating detached (fig. 6, top right) so that there is no certainty that it is a caulocystidium and not, most likely, a cheilocystidium detached and fallen from the gill edge.

Clamp connections: found with some difficulty (one was photographed from the stipe, fig. 7 left).



Fig. 1. *Psathyrella valdiviana*.
Paratypus Singer M6699 (SGO)

M.J.Dibán

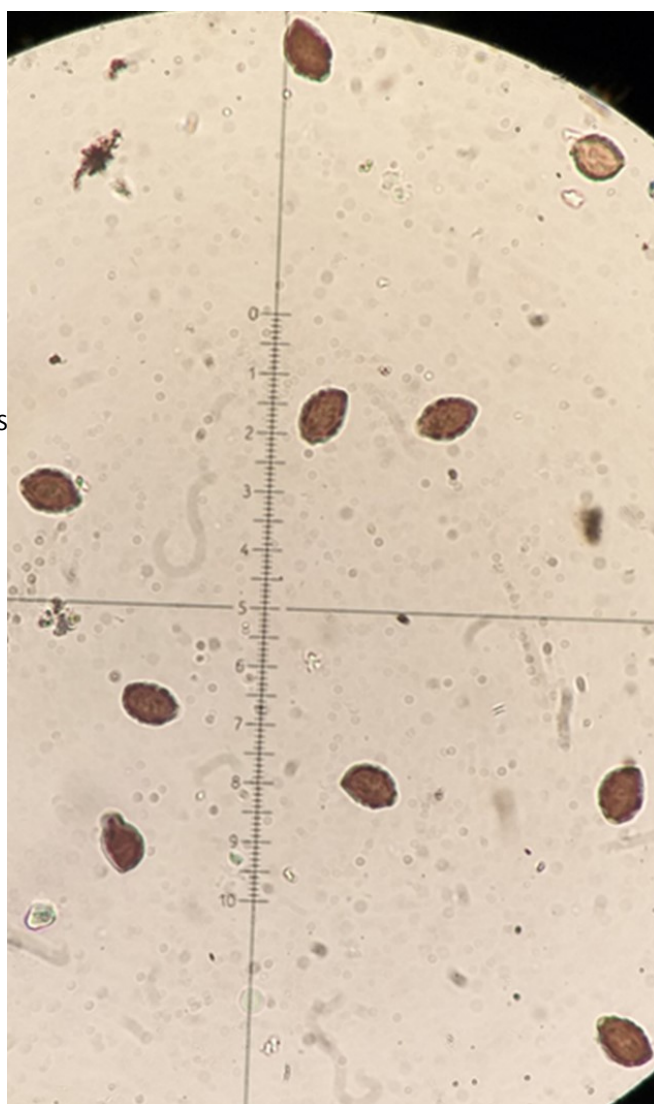


Fig. 2. Spores in 5% KOH /
Esporas en KOH 5% (0-1 = 10)

M.J.Dibán

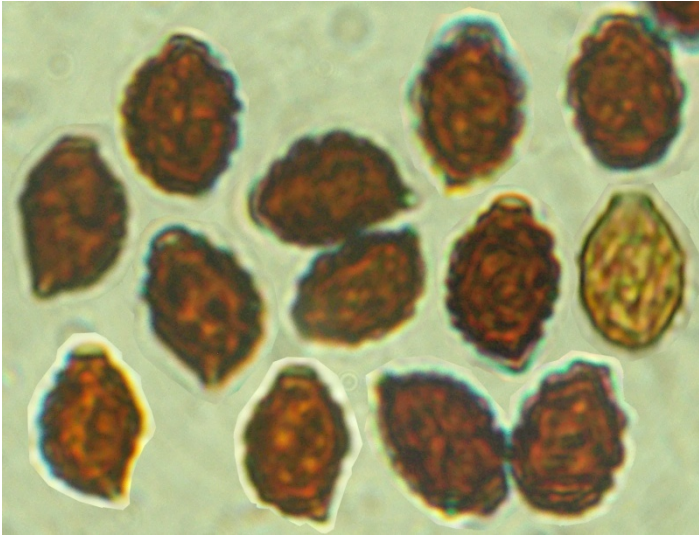


Fig. 3. Spores in 5% KOH /
Esporas en KOH 5%

P. Voto

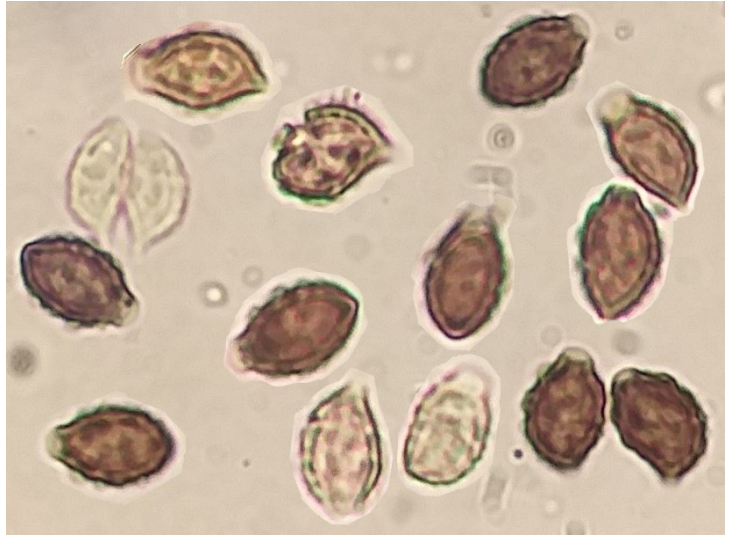


Fig. 4. Spores in 5% KOH /
Esporas en KOH 5%

M.J.Dibán

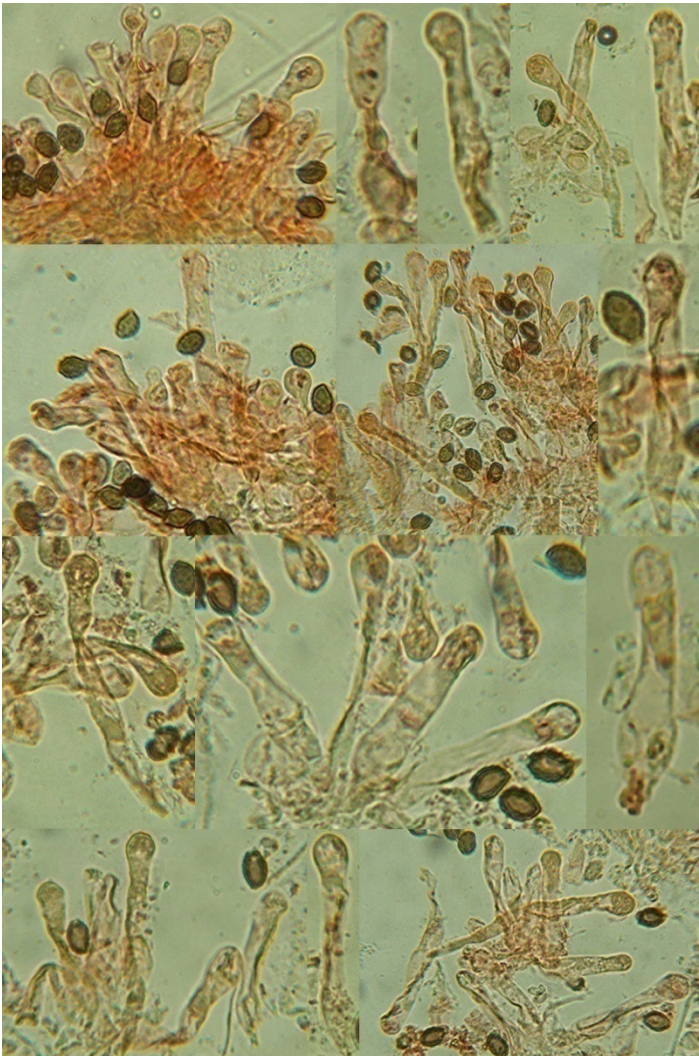


Fig. 5. Cheilocystidia in Congo red /
Queilocistidios en Rojo Congo

P. Voto

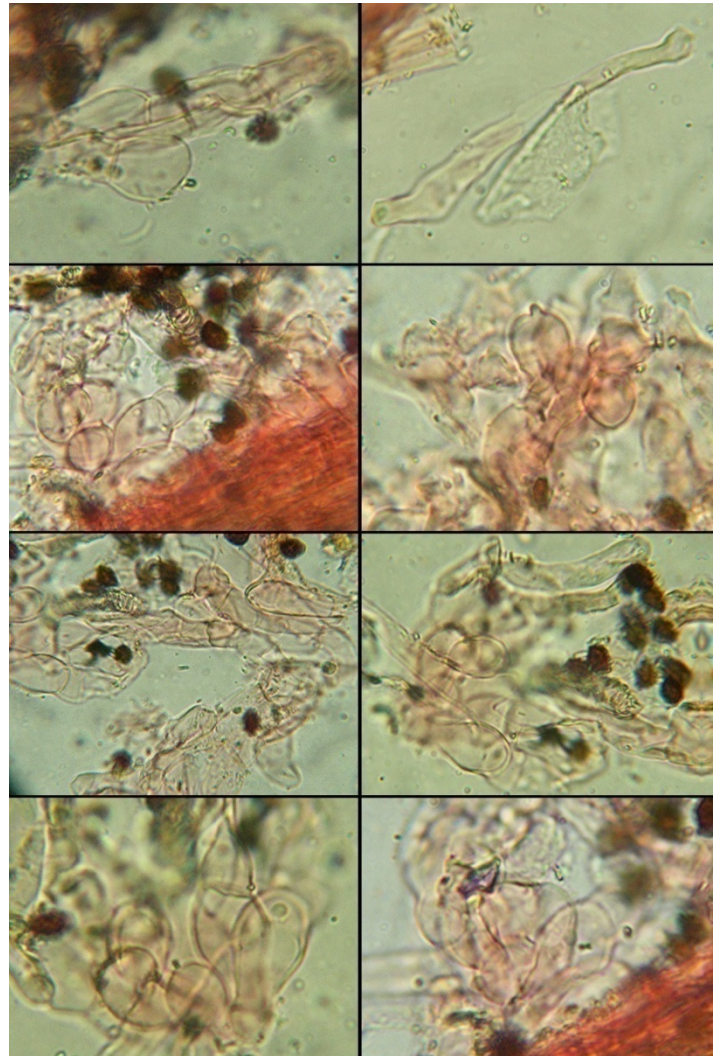


Fig. 6. Caulocystidia in Congo red /
Caulocistidios en Rojo Congo

P. Voto

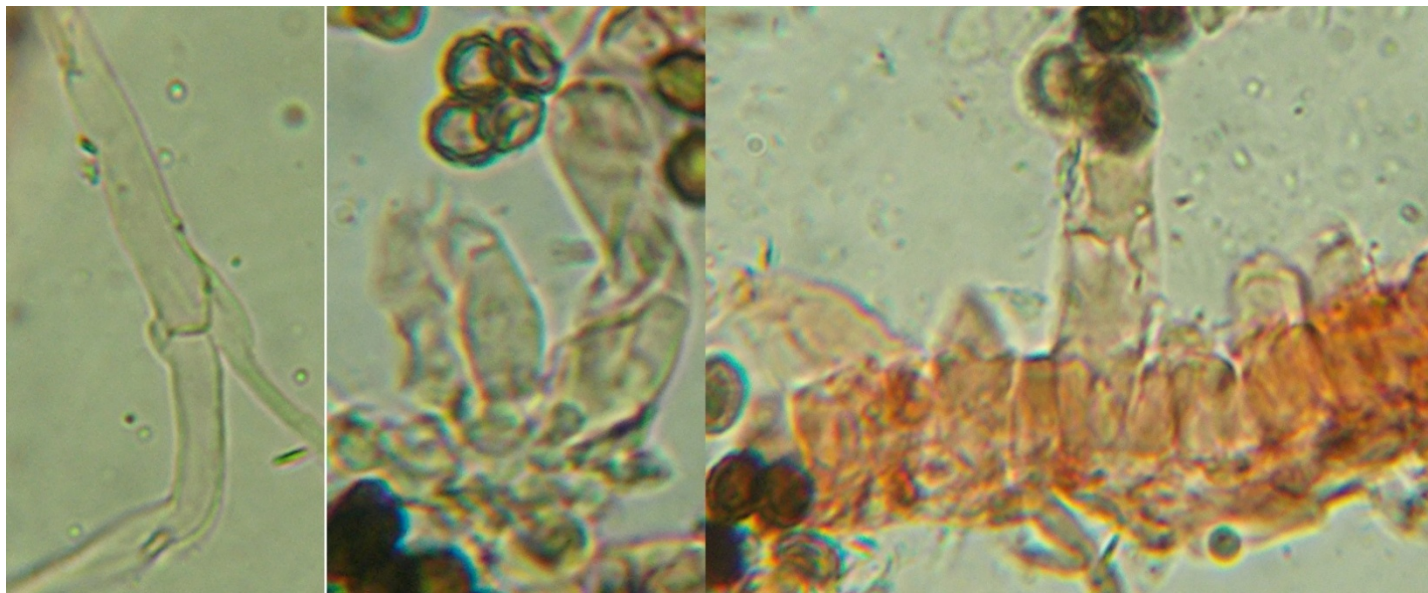


Fig. 7. Clamp connection in the stipe (left); pleurocystidia in Congo red (right) / Fíbula en el estípote (izquierda); pleurocistidios en Rojo Congo (derecha) P. Voto

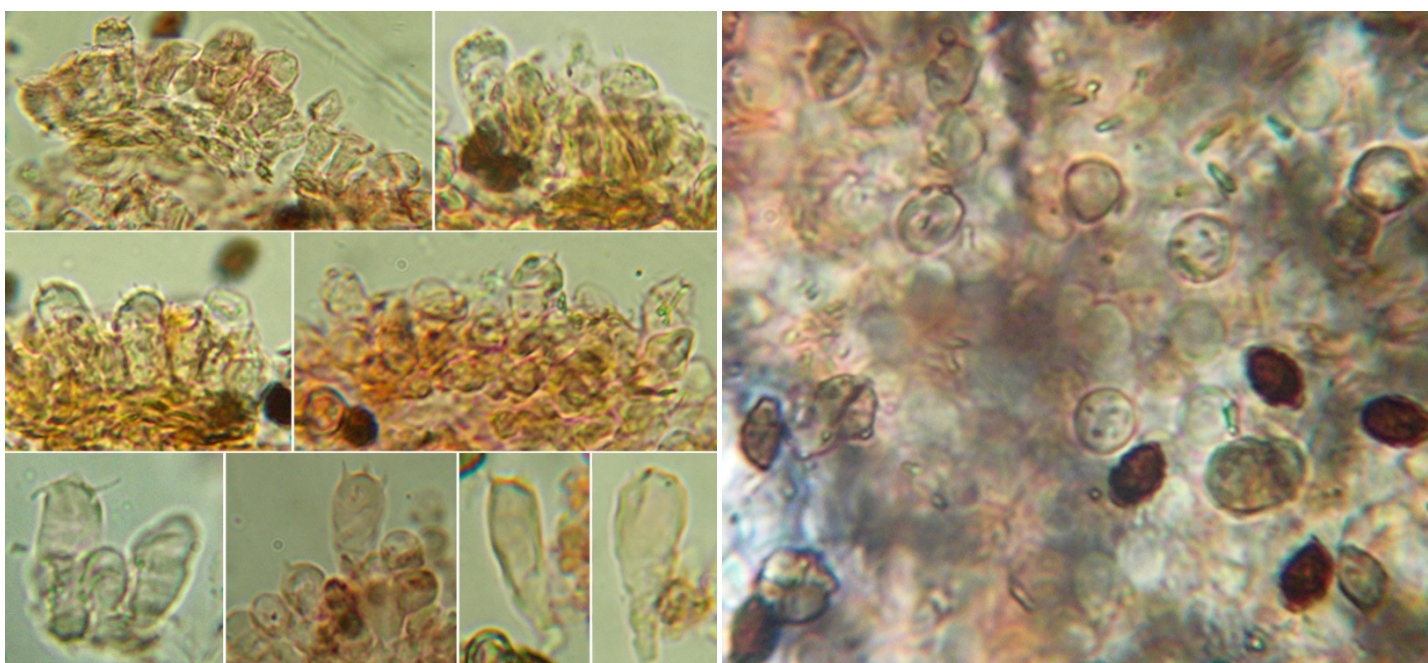


Fig. 8. Basidia in Congo red / Basidios en Rojo Congo P. Voto Fig. 9. Hymenium from above in Congo red / Himenio desde arriba en Rojo Congo P. Voto

PHYLOGENETIC NOTES

Previous studies with Bayesian Inference using ITS and LSU (Nagy *et al.* 2009) and with Maximum Likelihood analysis using concatenated ITS, LSU, TEF-1 α and beta-tubulin markers (Nagy *et al.* 2011) show a topology similar to that obtained in this study, where the genus *Coprinopsis* is sister to *Parasola*, while *Lacrymaria* is sister to the polyphyletic group that includes *Psathyrella* and *Coprinellus*.

Psathyrella has previously been documented to be a polyphyletic group (Padamsee *et al.* 2008) where, in this study, the different species are grouped as sister to the genera *Narcissea* and *Coprinellus*, suggesting that the morphological characters traditionally used to classify *Psathyrella* are homoplastic, and the boundaries between genera should be reevaluated by incorporating molecular analyses (Padamsee *et al.* 2008).

When *P. valdiviana* is included in the phylogeny of *Psathyrellaceae*, it groups with *Coprinellus* with good node support, being closer to *C. disseminatus*, *C. truncorum* and collections of the complex *C. radians* / *C. xanthothrix*.

Thus, based on morphological and molecular studies using ITS and LSU markers, *P. valdiviana* is combined with the genus *Coprinellus*.

MORPHOLOGICAL NOTES

The genus *Coprinellus* is characterized by a cellular (paraderm to hymeniderm) shape of the pileipellis elements and, usually, by a plicate pileus, deliquescence of gills, presence of hymenophysalides, polymorphism of basidia, and smoothness of spores. When exceptions occur in one of the latter characters the other ones generally are still sufficient for recognizing a *Coprinellus* species.

For instance, *C. disseminatus* (Pers.) J.E. Lange, *C. heptemerus* (M. Lange & A.H. Sm.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson and *C. impatiens* (Fr.) J.E. Lange are not deliquescent and some other species are only weakly deliquescent (Hongo 1960; Nagy *et al.* 2012; Reijnders 1979); also, two taxa worldwide, *C. deliquescens* (Bull.) P. Karst. and *C. verrucispermus* (Joss. & Enderle) Redhead, Vilgalys & Moncalvo, have ornamented spores.

Singer (1969) therefore came across a *Coprinellus* species lacking more than one of them, actually many: absence of deliquescence, pileus only '*leniter radialiter rugoso*' in his own words, absence of evident hymenophysalides (he only reported basidia $19.5 - 20 \times 7.5 - 9 \mu\text{m}$, hyaline, 4-spored, without any more comment). The inequality of the hymenial surface alone, with long protruding basidia amongst short basidia, as we could somewhat hardly find given the unsatisfactory revivification of the material, may have hardly suggested him a clue to a coprinoid taxon as some species of *Psathyrella* also, for instance in sect. *Spintrigerae* (also treated as genus *Candolleomyces*), are known to possess such varying basidia as well.

Later on, Redhead *et al.* (2001) remarking that in coprinoid taxa '*pleurocystidia may be absent or sparse in small deliquescent species or medium sized non-deliquescent species*' may have offered another feeble clue. In fact Singer (1969) had described his non deliquescent material with '*haud constanter praesentibus vel admodum sparsis*' pleurocystidia and robust basidiomes with $60 - 64 \times 6 - 12 \text{ mm}$ large stipes which frame his species well in Redhead *et al.*'s (2001) second case. Actually several taxa of *Coprinellus* have absent to rare or inconstant pleurocystidia.

Unfortunately Singer (1969) did not describe in detail the morphism of basidia and made no mention of hymenophysalides and pileocystidia. His words '*Epicute Psathyrellarum, Lacrymariarum modo typice evoluta*' may possibly attest his not noticing any pileocystidia when observing the pileipellis and his considering the species a *Lacrymaria* which he then treated not as a genus separate from *Psathyrella*.

An uncertainty remains whether lageniform caulocystidia are present or not. At the current state of knowledge we believe that these cells are absent.

From the bidimensional spores and the absence of pileocystidia we treat this taxon as morphologically belonging to *Coprinellus* section *Domestici* (Singer) D.J. Schaf.

In conclusion, although an unusual psathyrelloid member of *Coprinellus* with no strongly consistent parameters to drive its morphological identification towards the correct generic classification, we propose, by combining molecular and morphological observations, to transfer *P. valdiviana* to the genus *Coprinellus*.

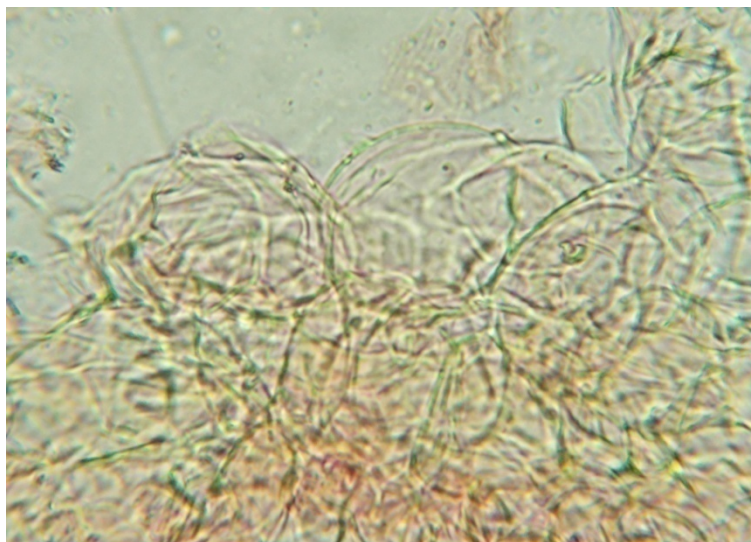
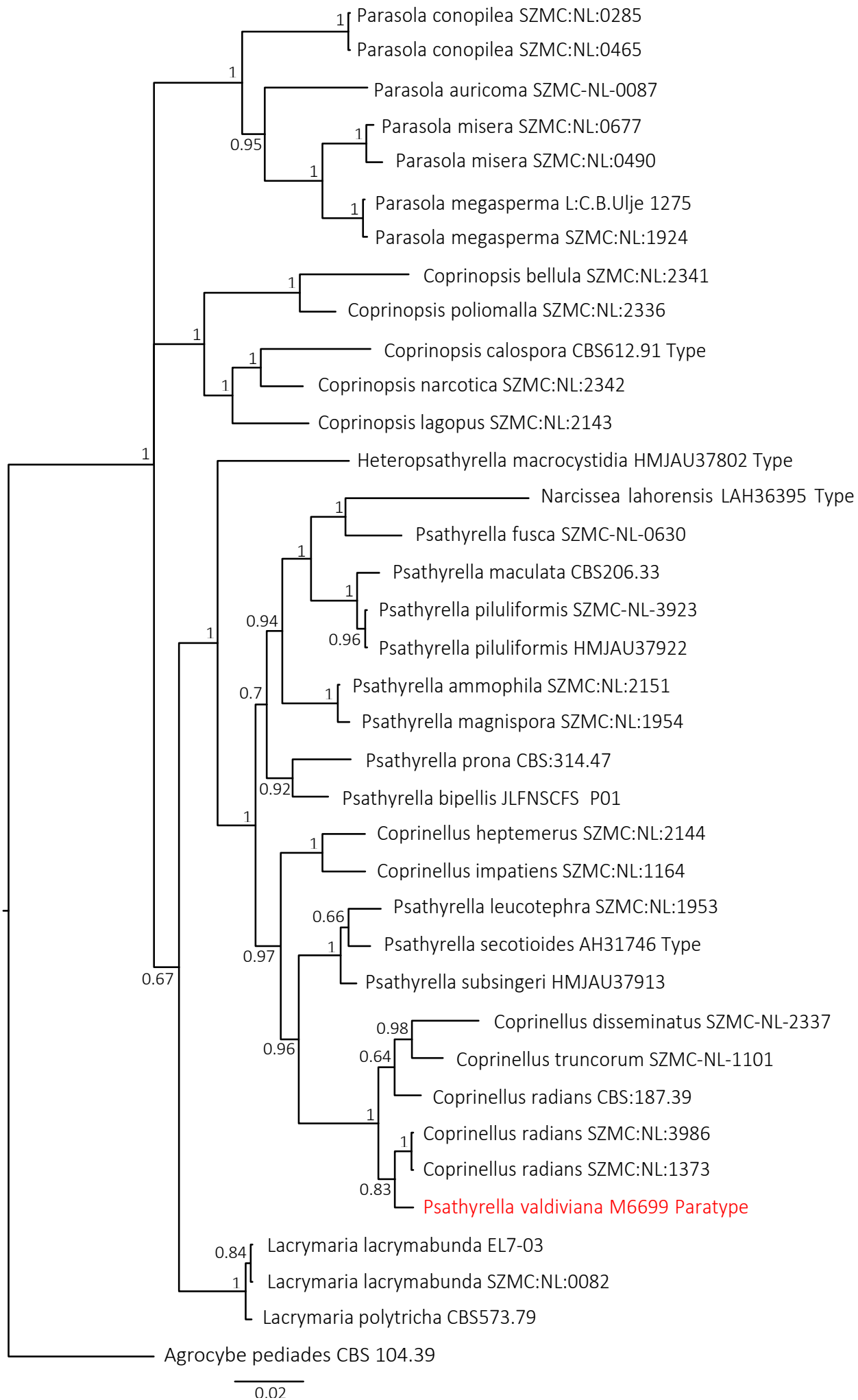


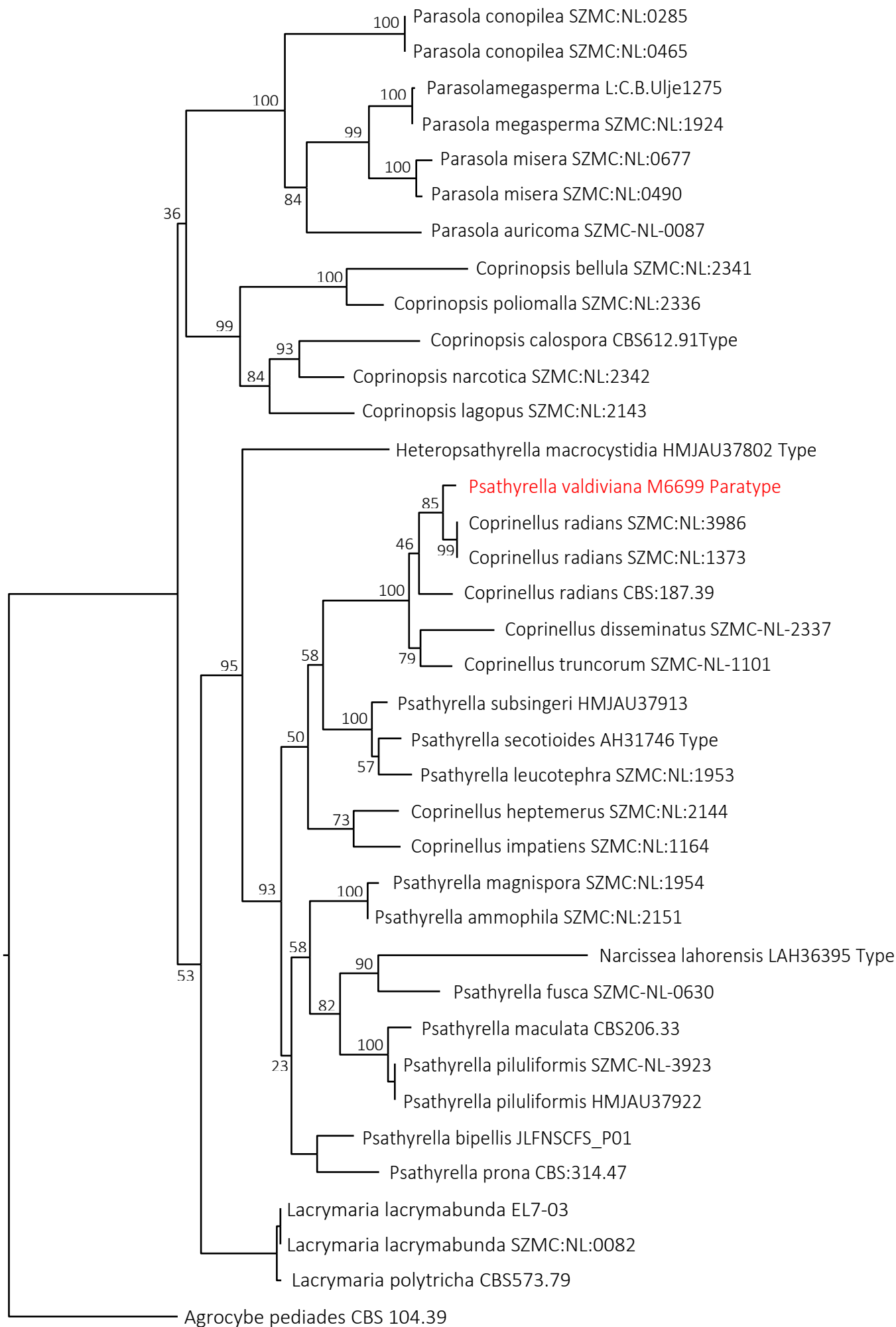
Fig. 10. Pileipellis in Congo red /
Pileipellis en Rojo Congo

P. Voto

Fig. 11. Bayesian phylogram obtained from the ITS+LSU sequence concatenated alignment of 36 collections. species. *Agrocybe pediades*, voucher CBS 104.39, was used as outgroup taxon. Values for clades that are supported in the Bayesian (posterior probabilities, BPP) analyses are indicated and BPP ≥ 0.90 are given above clade branches /

Árbol filogenético bayesiano obtenido a partir del alineamiento concatenado de las secuencias ITS+LSU de 36 especies recolectadas. *Agrocybe pediades*, voucher CBS 104.39, se utilizó como outgroup. Se indican los valores de los clados soportados en los análisis bayesianos (probabilidades posteriores, BPP) y BPP ≥ 0.90 sobre las ramas de los clados.





0.02

Fig. 12. ML phylogram obtained from the ITS+LSU sequence concatenated alignment of 36 collections. *Agrocybe pediades*, voucher CBS 104.39, was used as outgroup taxon. Values for clades that are supported in Maximum Likelihood (ML bootstrap percentage, MLB) analyses are indicated and $MLB \geq 70\%$ are given above clade branches /

Árbol filogenético ML obtenido a partir del alineamiento concatenado de las secuencias ITS+LSU de 36 colecciones. *Agrocybe pediades*, voucher CBS 104.39, se utilizó como outgroup. Se indican los valores de los clados soportados en los análisis de máxima verosimilitud (porcentaje de MLbootstrap, MLB) y $MLB \geq 70\%$ sobre las ramas de los clados

Table 1. Specimens included in this study, herbarium codes and GenBank accession code. Collection numbers followed by one asterisk are selected from Nagy *et al.* (2011), those followed by two asterisks from Nagy *et al.* (2012), those followed by three asterisks from Nagy *et al.* (2009) /

Especímenes incluidos en este estudio, códigos de herbario y código de acceso a GenBank. Los números de colección seguidos de un asterisco se han seleccionado de Nagy *et al.* (2011), los seguidos de dos asteriscos de Nagy *et al.* (2012), los seguidos de tres asteriscos de Nagy *et al.* (2009)

Species / especies	Collection / Origin / colección / origen	ITS	LSU
<i>Agrocybe pediades</i> (Fr.) Fayod	CBS 104.39	MH855969	MH867465
<i>Coprinellus disseminatus</i> (Pers.) J.E. Lange	SZMC-NL-2337 *	FM878017	FM876274
<i>C. heptemerus</i> (M. Lange & A.H. Sm.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson	SZMC:NL:2144 *	FM163178	FM160731
<i>C. impatiens</i> (Fr.) J.E. Lange	SZMC:NL:1164 *	FM163177	FM160732
<i>C. radians</i> (Desm.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson	CBS:187.39 / France	MH855978	MH867475
<i>C. radians</i>	SZMC:NL:3986 / Hungary	JN943117	JN159594
<i>C. radians</i>	SZMC:NL:1373 / Hungary	JN943118	JN159596
<i>C. truncorum</i> (Scop.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo	SZMC-NL-1101 *	FM878006	JN159562
<i>Coprinopsis bellula</i> (Uljé) P. Roux & Eyssart.	SZMC:NL:2341 *	FM163176	FM160680
<i>C. calospora</i> (Bas & Uljé) Redhead, Vilgalys & Moncalvo	CBS612.91 type / The Netherlands	GQ249275	GQ249284
<i>C. lagopus</i> (Fr.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo	SZMC:NL:2143 *	FM163179	JX118772
<i>C. narcotica</i> (Batsch) Redhead, Vilgalys & Moncalvo	SZMC:NL:2342 *	FM163180	FM160729
<i>C. poliomalla</i> (Romagn.) Doveri, Granito & Lunghini	SZMC:NL:2336 *	FM163182	FM160727
<i>Heteropsathyrella macrocystidia</i> T. Bau & J.Q. Yan	HMJAU37802 type / China	NR_173319	NG_079684
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i> (Bull.) Pat.	EL7-03 / Sweden	DQ389724	
<i>L. lacrymabunda</i>	SZMC:NL:0082	FM163183	FM160726
<i>L. pyrotricha</i> (Holmsk.) Konrad & Maubl.	CBS573.79 *	GQ249280	GQ249289
<i>Narcissea lahorensis</i> Usman & Khalid	LAH36395 type / Pakistan	OK161264	OK161242
<i>Parasola auricoma</i> (Pat.) Redhead, Vilgalys & Hopple	SZMC-NL-0087 *	FM163185	JQ045871
<i>P. conopilea</i> (Fr.) Örstadius & E. Larss.	SZMC:NL:0465 / Hungary***	FM163223	FM160686
<i>P. conopilea</i>	SZMC:NL:0285 / Hungary*	FM163225	FM160684
<i>P. megasperma</i> (P.D. Orton) Redhead, Vilgalys & Hopple	SZMC:NL:1924 / Hungary*	FM163208	FM160701
<i>P. megasperma</i>	L:C.B.Ulje 1275 / Netherlands	KY928618	KY928637

<i>P. misera</i> (P. Karst.) Redhead, Vilgalys & Hopple	SZMC:NL:0490 / Hungary***	FM163209	FM160700
<i>P. misera</i>	SZMC:NL:0677 / Hungary*	FM163211	FM160698
<i>Psathyrella ammophila</i> (Durieu & Lév.) P.D. Orton	SZMC:NL:2151 *	FM163220	FM160689
<i>P. bipellis</i> (Quél.) A.H. Sm.	JLFNSCFS_P01 /USA	MN022506	MN028521
<i>P. fusca</i> (J.E. Lange) A. Pearson	SZMC-NL-0630*	FM878030	FM876288
<i>P. leucotephra</i> (Berk. & Broome) P.D. Orton	SZMC:NL:1953 *	FM163226	FM160683
<i>P. maculata</i> (C. S. Parker) A. H. Sm.	CBS206.33 *	GQ249281	GQ249290
<i>P. magnispora</i> Heykoop & G. Moreno	SZMC:NL:1954 *	FM163227	FM160682
<i>P. piluliformis</i> (Bull.) P.D. Orton	HMJAU37922 / China	MG734716	MW413364
<i>P. piluliformis</i>	SZMC-NL-3923 *	FN396136	FN396185
<i>P. prona</i> (Fr.) Gillet	CBS:314.47 /France	MH856268	MH867805
<i>P. secotioides</i> G. Moreno, Heykoop, Esqueda & Olariaga	AH31746 type / Mexico	KR003281	KR003282
<i>P. subsingeri</i> T. Bau & J.Q. Yan	HMJAU37913 type / China	MG734725	MW301098
<i>P. valdiviana</i> Singer	M6699 Paratype / Chile	ON228706	OQ730407

REFERENCES

- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**(suppl_2), W465–W469. doi: 10.1093/nar/gkn180. Epub 2008 Apr 19. PMID: 18424797; PMCID: PMC2447785.
- Eidler D, Klein J, Antonelli A, Silvestro D (2021) raxmlGUI 2.0: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution* **12**(2):373–377. doi: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>
- Hongo T (1960) The *Agaricales* of Japan 1-3. *Acta Phytotax. Geobot.* **18**:129–146
- Nagy LG, Házi J, Vágvölgyi C, Papp T (2012) Phylogeny and species delimitation in the genus *Coprinellus* with special emphasis on the haired species. *Mycologia* **104**(1):254–275
- Nagy LG, Kocsubé S, Papp T, Vágvölgyi C (2009) Phylogeny and character evolution of the coprinoid mushroom genus *Parasola* as inferred from LSU and ITS rrdnA sequence data. *Persoonia* **22**:28–37
- Nagy LG, Walther G, Házi J, Vágvölgyi C, Papp T (2011) Understanding the Evolutionary Processes of Fungal Fruiting Bodies: Correlated Evolution and Divergence Times in the *Psathyrellaceae*. *Syst. Biol.* **60**(3):303–317
- Padamsee M, Matheny PB, Dentinger BT, McLaughlin DJ (2008) The mushroom family Psathyrellaceae: evidence for large-scale polyphyly of the genus *Psathyrella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**(2), 415–429
- Posada D(2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* **25**(7):1253–6. doi: 10.1093/molbev/msn083. Epub 2008 Apr 8. PMID: 18397919.
- Redhead SA, Vilgalys R, Moncalvo J-M, Johnson J, Hopple JS Jr (2001) *Coprinus* Persoon and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon* **50**(1):203–241
- Reijnders AFM (1979) Developmental anatomy of *Coprinus*. *Persoonia* **10**:383–424
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, **61**(3):539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys029. Epub 2012 Feb 22. PMID: 22357727; PMCID: PMC3329765
- Tamura, K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution* **38**(7):3022–3027. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Voto P (2019) Novelties in the family *Psathyrellaceae*. Part I. *Rivista Micologica Romana, Boll. Amer* **107**(2):94–95
- Voto P (2023) Key to *Psathyrellaceae*. A.M.E.R. Onlus, *Associazione Micologica Ecologica Romana* https://www.ameronlus.it/documenti/Key_to_Psathyrellaceae.xlsx (last accessed on April 10, 2023)

***Psathyrella valdiviana*, revisión del paratipo y estudio de su posición dentro de Psathyrellaceae basado en un análisis filogenético con dos marcadores moleculares**

Palabras claves:

Basidiomycota

Agaricales

Filogenia

Taxonomía

Resumen: Se estudió y secuenció el paratipo de *Psathyrella valdiviana*, Singer M669, depositado en el herbario SGO (Santiago, Chile). Sus características macromorfológicas, descritas por Singer, la asignan a taxones psathyrelloides, mientras que las basidiosporas verrugosas recuerdan al género *Lacrymaria*. Un análisis filogenético de dos marcadores apoya su posicionamiento dentro de *Coprinellus*.

INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX se publicaron varias especies descritas en el género *Psathyrella*, que se caracterizaban por un hábito psathyrelloide y esporas marrones notoriamente ornamentadas. Como estos taxones quedaron en el olvido tras ser publicados, Voto (2019) retomó los estudios morfológicos asociándolos preliminarmente al género *Lacrymaria*.

Hoy en día han surgido nuevos estudios taxonómicos del género *Psathyrella*, en donde, Eberhardt *et al.* (2021) revisaron a *Psathyrella splendens* Corner y *Psathyrella verrucispora* Corner, identificándolas como sinónimos de *Hebeloma parvisporum* Sparre Pedersen, Læssøe, Beker & U. Eberh., y, por otro lado, renombraron a *Psathyrella flavidifolia* Corner como *Hebeloma flavidifolium* (Corner) Beker & U. Eberh.

En el presente trabajo se vuelve a examinar *Psathyrella valdiviana*, tras medio siglo de olvido. Sus datos filogenéticos sugieren su relación con taxones de *Coprinellus* (entre los que se encuentran algunas especies con esporas verrugosas como *C. deliquescens*) que, en 1969, Singer no tenía medios para profundizar más los estudios según los conocimientos de la época, y sin el apoyo del análisis filogenético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio morfológico

El material seco fue estudiado por Voto (las basidiosporas también por Dibán) tras rehidratarlo con amoníaco al 30% o KOH al 5% y, cuando fue necesario para la documentación de imágenes, se tiñó con rojo Congo; las esporas se observaron y fotografiaron en agua o KOH al 5%.

La abreviatura [n/m/p] indica "n" basidiosporas medidas a partir de "m" basidiomas de "p" colecciones. El tamaño de las basidiosporas se registró como (a) b - c (d), donde: a = valor mínimo extremo, el intervalo b - c contiene al menos el 80% de los valores calculados, y d = valor máximo extremo; Q indica la relación largo/ancho de las esporas individuales.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

La extracción de ADN y la secuenciación de los genes ITS, LSU y *tef1* de Singer M6699 (SGO, paratipo de *P. valdiviana*) se llevaron a cabo en el laboratorio Alvalab (España). Se utilizaron los partidores ITS1F - ITS4 y LR0R - LR5 para la amplificación de las regiones ITS y LSU, respectivamente. La secuenciación de la región *tef1* no tuvo éxito.

Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos

Para complementar los estudios morfológicos del espécimen, se realizaron estudios moleculares. Para ello, se descargó de GenBank las secuencias ITS y LSU de 36 colecciones de especies de la familia Psathyrellaceae incluyendo al outgroup, el cual se utilizó a *Agrocybe pediades* (Tabla 1). Para asegurar una correcta identificación de cada especie de GenBank, éstas se escogieron basándose principalmente en los estudios filogenéticos de la familia Psathyrellaceae de Nagy *et al.* (2009, 2011, 2012).

Se realizó un alineamiento individual de las regiones ITS y LSU. Posteriormente, las secuencias se concatenaron en el software Mega 11 (Tamura *et al.* 2021) y se eliminaron las regiones no informativas utilizando la plataforma Phylogeny.fr (Dereeper *et al.* 2008), lo que dio como resultado una longitud de 1895 caracteres.

Se analizó el modelo de sustitución de nucleotídica que mejor se ajustaba a las secuencias concatenadas en el programa jModelTest (Posada 2008), dando como resultado el modelo GTR + GAMMA + I (-lnL = 7800.6). El análisis filogenético se realizó utilizando dos enfoques: se realizó un análisis de verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap en la plataforma RaxML GUI (Edler *et al.* 2020), y un análisis bayesiano con 1000000 generaciones en el programa MrBayes 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012).

RESULTADOS

Para este estudio se generaron dos nuevas secuencias, una ITS y otra LSU, que se obtuvieron de la colección M6699, paratipo de *P. valdiviana*, conservada en el herbario SGO (Santiago, Chile). Sus números de acceso GenBank se indican después del número de herbario (Tabla 1).

El análisis filogenético incluyó 30 especies de la familia Psathyrellaceae representadas en 7 géneros, como *Coprinellus*, *Coprinopsis*, *Heteropsathyrella*, *Lacrymaria*, *Narcissea*, *Parasola* y *Psathyrella*, para evaluar con qué género se agrupa *Psathyrella valdiviana*. La reconstrucción filogenética mediante ambos enfoques agrupa a los géneros *Coprinopsis*, *Lacrymaria*, *Heteropsathyrella* y *Parasola* en grupos monofiléticos con buen soporte de nodos (BPP > 0.9; ML > 95%), mientras que *Psathyrella* permanece polifilética, agrupándose con *Coprinellus* y *Narcissea*. Sin embargo, *P. valdiviana* se agrupa en un clado dentro del género *Coprinellus* (BPP = 1; ML = 100%), junto con *C. disseminatus*, *C. truncorum* y tres colecciones del complejo *C. radians* / *C. xanthothrix* registradas en GenBank bajo el nombre de *C. radians* (fig. 11 y fig. 12).

Como los árboles filogenéticos combinados de los análisis bayesiano y ML son ligeramente diferentes, se decidió publicar ambos por separado. A efectos de este estudio, en ambos casos la posición del ejemplar de *P. valdiviana* M6699 es la misma: está anidado en un clado que contiene sólo taxones de *Coprinellus*, lo cual es concordante con las similitudes encontradas en la plataforma BLAST con ambos genes analizados.

Se observa que la posición de los tres ejemplares identificados como *C. radians* utilizados en este análisis en ambas filogenias es incierta, y se agrupan con *P. valdiviana*. En GenBank hay un gran número de secuencias identificadas como *Coprinellus* (cf./aff.) *radians* y *Coprinellus* (cf./aff.) *xanthothrix* que, junto con otro gran número de secuencias denominadas como *Coprinellus* sp., están algo entremezcladas. Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo, se limitó únicamente a señalar que *P. valdiviana* se encuentra agrupada entre estas tres secuencias, junto con las de *C. disseminatus* y *C. truncorum*.

En consecuencia, *Psathyrella valdiviana* se asigna al género *Coprinellus*.

TAXONOMÍA

Coprinellus valdivianus (Singer) Voto, Dibán & Maraia, comb. nov. [IF 555955]

Basiónimo: *Psathyrella valdiviana* Singer, Beihefte zur Nova Hedwigia 29: 185 (1969)

Revisión morfológica de Singer M6699 (SGO), Chile, Hueycolla, 50 m. s.n.m., 4.V.1967, paratipo; GenBank: ITS ON228706, LSU OQ730407; material que no se rehidrata perfectamente bien.

Basidiosporas [49/1/1]: 8.00 – 10.00 × 5.70 – 6.45 µm, Q = (1.34) 1.38 – 1.73 (1.86), en promedio 1.56; ornamentadas con crestas reticuladas rectas a curvadas, o angulosas, delgadas a gruesas, de hasta 4.0 µm de longitud y con verrugas redondeadas a algo irregulares de 0.5 – 0.6 (0.7) µm de altura, y hasta 3 µm de diámetro; en vista frontal son elípticas, con base redondeada a veces subtruncada, mientras que en vista lateral son amigdaliformes, a veces elípticas, y profundamente aplanadas sobre el apéndice hilar, ápice plano o tubular sobresaliendo hasta 1.2 (2.0) µm y termina con un poro germinativo de (1.4) 2.0 – 2.5 (2.9) µm de ancho cuya membrana está a menudo hinchada; inicialmente son hialinas y lisas, en la madurez marrón rojizo oscuro en agua, y marrón grisáceo en KOH al 5%.

Basidios: principalmente clavados alargados de 20.0 – 29.0 × 7.7 – 9.0 µm, a clavados cortos de 15.5 – 17.5 × 6.5 – 7.0 µm, a veces clavado-capitados de 20.0 – 24.0 × 9.8 – 10.0 µm, tetraesporados, esterigmas de hasta aprox. 3.8 µm de longitud; superficie himenial irregular con basidios hundidos a sobresalientes; himenofisáldas no detectadas o indistintas.

Queilocistidios: 38.0 – 80.0 × 7.5 – 10.0 µm, lageniformes, lageniformes-capitados y a veces con un cuello delgado a estrangulado de 2.5 – 5.0 µm de ancho, delgadamente utriformes, subcilíndricos, algunos cilíndrico-capitados o clavados alargados; paracistidios poco visibles.

Pleurocistidios: solo se encontró uno subcilíndrico y uno cilíndrico-utriforme, $38.0 - 42.0 \times 10.0 \mu\text{m}$, hialinos.

Pileipellis (en el centro y en el margen del píleo): un paradermo con células irregulares, pediceladas a pedunculadas, clavadas a elipsoidales o irregularmente redondeadas, de $25.0 - 61.0 \times 15.0 - 47.0 \mu\text{m}$; subpelliscon hifas fibuladas, filamentosas, de $20.0 - 29.0 \mu\text{m}$ de ancho en la capa superior, de $6.0 - 18.0 \mu\text{m}$ de ancho en la inferior.

Pileocistidios: no se han encontrado.

Caulopellis: formado por hifas paralelas, filamentosas, a menudo incrustadas y fibuladas.

Caulocistidios (en el ápice del pie): formados por grupos de células elipsoides a poco clavadas o subglobosas, de hasta $18.0 \times 16.0 \mu\text{m}$, a menudo terminando una cadena de células gruesas ramificadas con una única hifa de soporte; entre ellas se encuentran algunas células terminales finamente clavadas a cilíndricas, por ejemplo, de $45.0 \times 7.5 - 11.5 \mu\text{m}$. Un se encontró un cistidio solitario lageniforme-subcapitado, de $95 \times 11 \mu\text{m}$, ápice de $9.5 \mu\text{m}$ de ancho, el cual estaba flotando desprendido (fig. 6, arriba a la derecha), por lo que no hay certeza de que se trate de un caulocistidio, o muy probablemente de un queilocistidio desprendido y caído del borde de la lamela.

Fibras: encontradas con cierta dificultad (una fue fotografiada desde el estípite, fig. 7 izquierda).

NOTAS FILOGENÉTICAS

Estudios previos con Inferencia Bayesiana utilizando ITS y LSU (Nagy *et al.* 2009) y con análisis de Máxima Verosimilitud utilizando marcadores concatenados ITS, LSU, TEF-1 α y beta-tubulina (Nagy *et al.* 2011) muestran una topología similar a la obtenida en este estudio, donde el género *Coprinopsis* es hermano de *Parasola*, mientras que *Lacrymaria* es hermana del grupo polifilético que incluye a *Psathyrella* y *Coprinellus*.

Psathyrella ha sido previamente documentada como un grupo polifilético (Padamsee *et al.* 2008) donde, en este estudio, las diferentes especies se agrupan como hermanas de los géneros *Narcissea* y *Coprinellus*, sugiriendo que los caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados para clasificar *Psathyrella* son homoplásicos, y los límites entre géneros deberían ser reevaluados incorporando análisis moleculares (Padamsee *et al.* 2008).

Al incluir a *P. valdiviana* en la filogenia de Psathyrellaceae, se agrupa con *Coprinellus* con un buen soporte de nodos, estando más cerca de *C. disseminatus*, *C. truncorum* y colecciones del complejo *C. radians* / *C. xanthothrix*.

De esta manera, basándose en estudios morfológicos y moleculares con marcadores ITS y LSU, *P. valdiviana* se asigna al género *Coprinellus*.

NOTAS MORFOLÓGICAS

El género *Coprinellus* se caracteriza por la forma celular de los elementos del pileipellis (paradermis a himenodermis) y, normalmente, por un píleo marcadamente estriado, delicuescencia de las lamelas, presencia de himenofisáidas, polimorfismo de los basidios, y las esporas lisas. En caso de haber excepciones en uno de estos últimos caracteres, los demás suelen ser suficientes para reconocer una especie de *Coprinellus*.

Por ejemplo, *C. disseminatus* (Pers.) J.E. Lange, *C. heptemerus* (M. Lange & A.H. Sm.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson y *C. impatiens* (Fr.) J.E. Lange no son delicuescentes y algunas otras especies son solo débilmente delicuescentes (Hongo 1960; Nagy *et al.* 2012; Reijnders 1979); además, dos taxones de todo el mundo, *C. deliquescentes* (Bull.) P. Karst. y *C. verrucispermus* (Joss. & Enderle) Redhead, Vilgalys & Moncalvo, tienen esporas ornamentadas.

Singer (1969), por lo tanto, se encontró con una especie de *Coprinellus* que carecía de más de una de esas características: ausencia de delicuescencia, píleo solo "*leniter radialiter rugoso*" según sus propias palabras, ausencia de himenofisáidas evidentes (solo informó la presencia de basidios de $19.5 - 20 \times 7.5 - 9 \mu\text{m}$, hialinos, con 4 esporas, sin más comentarios). La desigualdad de la superficie himenial por sí sola, con basidios largos y sobresalientes entre basidios cortos, pudo sugerirle pobremente una pista sobre un taxón coprinoide, o sobre algunas especies de *Psathyrella*, por ejemplo, en sect. *Spintrigerae* (también tratada como género *Candolleomyces*), la cual posee basidios variables. Lo cual, en este estudio fue difícil de detectar dada la pobre rehidratación de la muestra.

Más tarde, Redhead *et al.* (2001) observaron que en los taxones coprinoides "*los pleurocistidios pueden estar ausentes o ser escasos en las especies delicuescentes pequeñas o en las especies no delicuescentes de tamaño medio*", lo que puede haber ofrecido otra débil pista. De hecho, Singer (1969) había descrito su material no delicuescente con pleurocistidios "*haud constanter praesentibus vel admodum sparsis*" y basidiomas robustos con 60 - 64 × 6 - 12 mm con estípites grandes, lo cual enmarca bien aquel ejemplar en el segundo caso de Redhead *et al.* (2001). En realidad, varios taxones de *Coprinellus* tienen pleurocistidios ausentes a raros o inconstantes.

Lamentablemente, Singer (1969) no describió en detalle la morfología de los basidios y no mencionó los himenofisálidas ni los pileocistidios. Es posible que sus palabras "*Epicute Psathyrellarum, Lacrymariarum modo typice evoluta*" indiquen que no encontró ningún pileocistidio al observar la pileipellis, y que consideró la especie como una *Lacrymaria*, que, a la vez, no consideró como un género separado de *Psathyrella*.

Sigue existiendo incertidumbre sobre la presencia o no de caulocistidios lageniformes. En el estado actual de conocimientos que cree que estas células están ausentes.

A partir de las esporas bidimensionales y la ausencia de pileocistidios, se considera morfológicamente a este taxón como perteneciente a *Coprinellus* sección *Domestici* (Singer) D.J. Schaf.

En conclusión, a pesar de ser un miembro psathyrelloide inusual de *Coprinellus* sin características fuertemente consistentes que conduzcan a una identificación morfológica correcta a nivel de género, se propone transferir *P. valdiviana* al género *Coprinellus*, en base a la combinación de las características morfológicas y moleculares.