

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES
UNITAT DE MICROBIOLOGIA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
Y MOLECULAR DE HONGOS
QUERATINOFÍLICOS: EL ORDEN
ONYGENALES**

Tesis doctoral
Maria Solé Ollé

INDICE

Pag.

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Los hongos queratinofílicos	2
1.1.1. Ecología de los hongos queratinofílicos	2
1.1.1.1 Factores abióticos	3
1.1.1.2 Factores bióticos	4
1.1.1.3 Los hongos queratinofílicos como potenciales patógenos	5
1.1.2. Fisiología.....	7
1.1.2.1 Queratinolisis.....	7
1.1.2.2 Degradación de la celulosa.....	7
1.2. Taxonomía de los hongos queratinofílicos	8
1.2.1 El orden Onygenales	8
1.2.2 Antecedentes históricos de las familias Gymnoascaceae y Onygenaceae	15
1.2.3 Morfología y estructura de los Onygenales	22
1.3. Técnicas de biología molecular en la taxonomía fúngica	23
1.3.1. Secuenciación del ADN ribosómico	24
1.4. Filogenia molecular	25
1.4.1. Métodos basados en distancias genéticas.....	26
1.4.2. Métodos basados en caracteres conservados.....	27

2. OBJETO E INTERÉS 29

3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 32

3.1. Origen, recolección y conservación de las muestras de suelo.....	33
3.2. Aislamiento de hongos queratinolíticos	33
3.2.1. Obtención de cultivos puros	34

3.2.2.	Conservación de los cultivos	34
3.3.	Estudios morfológicos.....	35
3.3.1.	Estudios culturales	35
3.3.2.	Técnicas morfológicas	37
3.3.2.1.	Microscopía óptica.....	37
a.	Preparación directa.....	37
b.	Microcultivo	38
3.3.2.2.	Microscopía electrónica de barrido.....	38
a.	Montaje directo previa desecación de la muestra	39
b.	Método del punto crítico.....	39
3.4.	Métodos moleculares	41
3.4.1.	Extracción de ADN.....	41
3.4.2.	Amplificación del gen 18S del ARNr	43
3.4.3.	Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ARNr	44
3.4.4.	Análisis de restricción	44
3.4.5.	Secuenciación de los productos de la PCR.	45
3.4.6.	Alineamiento de secuencias nucleotídicas	45
3.4.7.	Depósito y obtención de secuencias de bases de datos Internacionales	46
3.4.8.	Análisis filogenético.....	47
3.4.8.1.	Método de las distancias genéticas o <i>neighbour-joining</i>	47
3.4.8.2.	Método de máxima parsimonia (basado en caracteres conservados).....	47

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48

4.1.	Molecular phylogeny of <i>Amauroascus</i>, <i>Auxarthron</i> and morphologically similar onygenalean fungi. Solé M., Cano J. & Guarro J. <i>Mycological Research</i> 106 (4): 388-396 (2002)	50
------	--	----

4.2.	Two new species of <i>Auxarthron</i> mophologically and genetically close to <i>Auxarthron kuehnii</i>. Solé M., Cano J., Stchigel A.M. & Guarro J. <i>Studies in Mycology</i> 47 : 97-102 (2002).....	62
------	--	----

4.3. **Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera.** Solé M., Cano J., Pitarch L.B., Stchigel A.M. & Guarro J. *Studies in Mycology* **47**: 141-152 (2002)..... 72

4.4. ***Pseudoamauroascus*, a new genus of the Onygenales (Ascomycota)** Cano J., Solé M., Pitarch L.B. & Guarro J. *Studies in Mycology* **47**: 173-180 (2002)..... 88

4.5. ***Castanedomyces australiensis* gen. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil.** Cano J., Solé M., Pitarch L.B. & Guarro J. *Studies in Mycology* **47**: 165-172 (2002)..... 98

5. DISCUSIÓN GENERAL..... 109

6. CONCLUSIONES..... 115

7. BIBLIOGRAFÍA..... 118

8. ANEXOS..... 135

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada gracias al soporte económico de las becas recibidas durante su elaboración, beca de la Fundación Reddis y beca predoctoral de la URV.

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a una de las personas más importantes en la elaboración de esta tesis, el doctor J. F. Cano, por la confianza que siempre ha depositado en mi y por enseñarme, ayudarme y animarme en todo momento para que este proyecto llegara a buen término.

Al doctor J. Guarro por su ayuda durante la realización de los trabajos, así como en el desarrollo de esta tesis y por enseñarme que siempre se pueden hacer más y mejores cosas.

A los doctores J. Gené y F.J. Pastor por su apoyo incondicional y por lo que me habéis enseñado a lo largo de estos años.

A la doctora M^a J. Figueras por haberme brindado la oportunidad de trabajar por primera vez en el apasionante mundo de la microbiología y creer en mis cualidades humanas y profesionales.

Al doctor F. Polo y a la Licenciada M. Inza por haberme iniciado en el mundo de la microbiología: ¡gracias por vuestro apoyo!

A todos los compañeros que han pasado por la unidad de microbiología, los antiguos por la experiencia y los nuevos por vuestra frescura, pero especialmente agradecer a los que con el tiempo habéis pasado de compañeros a amigos; a todos, gracias.

Agradecer especialmente al doctor Stchigel, por su amistad y ayuda en todo lo que he necesitado en estos años: sin ti esta tesis no hubiera sido posible.

A M. Calduch, por su amistad, ayuda desinteresada y apoyo, por haberse convertido en una gran amiga, esperando sea para siempre.

A C. Sanmartí, que puedo decirte que ya no sepas, gracias por tus risas y tu buen humor, gracias por ser tú y por tu ayuda, también en el laboratorio.

A L.B. Pitarch por ser una de las mejores compañeras de laboratorio que he tenido; gracias por todo.

A D. García, quién me lo iba a decir, cuando te vi por primera vez, que te convertirías en una buena amiga, gracias. Tu ejemplo me ha hecho mucho más fuerte.

A B. Fernández, gracias por hacerme reír y también por hacerme enfadar tu amistad ha sido importante y nunca olvidaré muchos detalles como... el día que nuestros hijos se conocieron.

También me gustaría agradecer su apoyo a todos los compañeros del departamento, profesores, becarios, técnicos y secretarias, porque con vosotros el día a día ha sido más llevadero. Especialmente a todos/as los que cada día hemos compartido la hora de comer.

Especialmente a la doctora C. González, gracias por tu apoyo y tus conversaciones en la hora de la fiambra. Eres una persona muy especial. A vosotras Vicky Linares y Ana Torres que me habéis demostrado que con empeño todo es posible.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia el apoyo que me ha brindado durante todos estos años, principalmente a mi marido Rafa, nadie como tu sabes lo que realmente he sufrido, tu apoyo y paciencia han sido muy importantes para mí, gracias por estar siempre a mi lado, sin ti esta tesis nunca se hubiera hecho realidad. A mi hija Judith, por ser la fuerza que me ha ayudado a permanecer firme en los momentos más difíciles de este último año.

A mis padres por todo lo que me habéis enseñado, por vuestro apoyo y ánimo en todo lo que he hecho.

A mis hermanos Jordi y Sergi, por todo lo que habéis hecho por mi, ayer, hoy y mañana, y por estar siempre a mi lado. Y también, gracias a ti Sabina por ser como eres.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS HONGOS QUERATINOFÍLICOS

Los hongos queratinofílicos son aquellos que tienen su hábitat en sustratos queratinizados. Algunos de ellos poseen la capacidad de degradar la queratina, denominándose entonces hongos queratinolíticos (Kunert, 2000). La mayoría pueden parasitar tejidos queratinizados del hombre y de otros animales, comportándose en algunos casos como hongos patógenos (dermatofitos). Utilizando la técnica del anzuelo de queratina descrita por Vanbreuseghem en 1952, se ha demostrado que el suelo es un importante reservorio para muchos de estos hongos. Mediante dicha técnica se han aislado numerosas formas perfectas o teleomorfas (fase sexual), teniendo algunas de estas como fase anamorfa (asexual) a especies de hongos dermatofitos. En su mayoría se incluyen dentro del orden Onygenales, concretamente en las familias *Onygenaceae*, *Gymnoascaceae* y *Arthrodermataceae* (Currah, 1985), y sus anamorfos o estados asexuales, se incluyen mayoritariamente en los géneros *Blastomyces* Costantin y Rolland, *Chrysosporium* Carmichael, *Malbranchea* Sacc., *Microsporum* Gruby, *Trichophyton* Malmstein, *Geomyces* Traaen. y *Oidiodendron* Robak.

1.1.1. Ecología de los hongos queratinofílicos

La queratina es una proteína que forma parte de numerosas estructuras de los animales, tales como pelos, plumas, lana, cuernos, pezuñas, uñas, etc., siendo un sustrato difícil de descomponer por la mayoría de los microorganismos del suelo debido a su estructura química compleja y sumamente resistente a la acción de agentes físicos y químicos (Mathison, 1964; Pugh y col., 1984), lo cual comporta una gran importancia a nivel ecológico así como en micología médica. La presencia de esta molécula en el suelo es importante para el desarrollo de las especies queratinofílicas, pero existen otros factores que condicionan o

afectan su distribución y supervivencia en la naturaleza. Según Garg y col. (1985) estos factores se pueden agrupar en dos categorías; factores abióticos y factores bióticos.

1.1.1.1. Factores abióticos

Dentro de los factores abióticos más importantes cabe señalar la **temperatura**. Los hongos queratinofílicos generalmente son mesofílicos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 25-27°C. Existen sin embargo excepciones, ya que se han aislado cepas de especies mesofílicas en ambientes extremos. Por ejemplo, se han aislado en suelos alpinos *Microsporum gypseum* (E. Bodin) Guiart y Grigoraki, *Trichophyton ajelloi* (Vanbreuseghem) Ajello y *T. terrestre* Durei y Frey (Batelli y col., 1978), o *Chrysosporium pannorum* (Link) S. Hughes en la Antártida (Pugh y Allsopp, 1982) . También se han descrito especies queratinofílicas psicrófilas, como por ejemplo *Keratinomyces ceretanicus* Punsola y Guarro, aislada de suelos de bosques de España (Punsola y Guarro, 1984) y Chile (Cano y Sigler, 1992), con una temperatura óptima de crecimiento de 15-17°C. Según Saez y Chauvier (1977) la temperatura más alta a la que algunos hongos queratinofílicos podrían desarrollarse es de 41°C, como es el caso de *Chrysosporium keratinophilum* D. Frey ex J.W. Carmichael

Otro factor abiótico importante es la **luz**, y más concretamente la luz UV, ya que inhibe la germinación de las esporas y, eventualmente, el crecimiento de las hifas. La inhibición de la germinación de las esporas por la luz visible (400-700 nm) fue estudiada por Buchniecek (1968). Según dicho autor, la exposición continuada a la luz tiene inicialmente un efecto fungistático, y posteriormente, fungicida. Ello explicaría el descenso en la frecuencia de dermatomicosis en el periodo estival (Garg y col., 1985).

En el suelo, la variación en la microbiota queratinofílica está condicionada por las variaciones de temperatura y luz que se producen. Esta variación es más marcada en regiones tropicales y subtropicales (Garg y col., 1985).

La supervivencia de los hongos queratinofílicos en el suelo está también directamente influenciada por los **factores edáficos** del mismo. Cabe destacar el pH (cuyo óptimo para el crecimiento de los hongos es de 6 a 9), la existencia de una fuente de nitrógeno próxima y accesible, la humedad (importante en los procesos de germinación, crecimiento y reproducción), y también es importante la presencia de materia orgánica en descomposición. Según las concentraciones de materia orgánica que se encuentren en el suelo, se pueden considerar dos grupos de hongos queratinofílicos: los dependientes de concentraciones de materia orgánica elevada, como es el caso de *M. Gypseum*, y de concentración baja de materia orgánica, *Trichophyton terrestre* (Durei & Frey) y un segundo grupo, cuya distribución no depende de dicha concentración, *T. ajelloi* (Vanbreuseghem) Ajello y *C. keratinophilum*. El tipo y la cantidad de ácidos grasos también afecta a la supervivencia de los hongos queratinofílicos, provocando generalmente una inhibición de su crecimiento (Hajini y col., 1970). La concentración de metales pesados presente en el suelo no parece afectar a la distribución de estos microorganismos, los cuales actuarían como acumuladores de los mismos, preferentemente en las hifas (Garg y col., 1985). Se ha descrito un efecto inhibitorio del NaCl en el crecimiento de los dermatofitos, y aunque la salinidad tolerada por los mismos no se ha determinado, estos se han aislado repetidamente en muestras de suelos procedentes de la costa mediterránea, los que poseen una salinidad entre 5.8 y 15.6% (Orrú y col., 1968).

1.1.1.2. Factores bióticos

La presencia de animales o restos de los mismos constituye el principal factor biótico que influye en la distribución de los hongos queratinofílicos. La asociación de las aves con la supervivencia y dispersión de los dermatofitos ha sido estudiada por diferentes autores (Ajello, 1953; Kuehn, 1960; Gierloff y Katic, 1961; Bühlmann y Reith, 1962; Dvorak y Otcenasek, 1964; Pugh, 1966; Rees, 1967-a,-b; Pugh y Evans, 1970; Hubalek, 1972, 1974, 2000, Hubalek y Balat, 1976). El que

estos hongos se encuentren asociados a los animales en general favorece la infección secundaria en el hombre (Garg y col., 1985).

1.1.1.3. Los hongos queratinofílicos como potenciales patógenos

Cuando ciertos hongos queratinofílicos que sobreviven en el suelo entran en contacto con un huésped susceptible, en condiciones ambientales y fisiológicas adecuadas, se puede producir la proliferación del mismo, sobre el huésped, dando una afectación denominada genéricamente tiña (Garg y col., 1985).

Se han descrito muchos hongos queratinofílicos como agentes causantes de infecciones en el hombre y animales. Los más conocidos, por su mayor incidencia, son los denominados dermatofitos. Los dermatofitos se agrupan en tres géneros/forma: *Epidermophyton* Sabour., *Microsporum* Gruby y *Trichophyton* Malmsten, los cuales causan infecciones en la piel denominadas “dermatofitosis”. La mayoría de ellos tienen una forma teleomorfa perteneciente al orden Onygenales (Currah, 1994). Las dermatofitosis, según su localización, se llaman onicomicosis o tinea unguinum (cuando se producen en las uñas), tinea corporis (en la piel) y tinea capitis (en el pelo) (Kane y col., 1997). Se han descrito otros géneros patógenos incluidos en el orden Onygenales, que tienen una menor incidencia y no son queratinofílicos, pero que pueden causar cuadros clínicos más graves tales como infecciones sistémicas. Entre estos se encuentran *Ajellomyces capsulatus* Kwon-Chung, McGinnis y Katz, que posee como anamorfo a *Histoplasma capsulatum* Darling, siendo el agente causal de la histoplasmosis, una micosis intracelular del sistema monocito-macrófago, que se caracteriza por provocar inflamación granulomatosa con una posterior necrotización y calcificación, y cuya diseminación suele ser fatal. Otra especie importante es *Ajellomyces dermatitidis* McDonough y Lewis, que posee a *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist y Stokes como anamorfo, siendo el causante de la blastomicosis, que se inicia como una infección pulmonar, diseminándose por vía sanguínea y que, en estadios más avanzados se ven afectados el sistema nervioso y diferentes órganos (Hoog de y col., 2000).

También se han descrito otros Onygenales como patógenos oportunistas, entre los que podemos destacar *Aphanoascus fulvescens* (Cooke) Apinis, del que se han descrito diferentes casos de infecciones cutáneas en el hombre (Marín y Campos, 1984; Guého y col., 1985) y en animales (Vanbreuseghem y de Vroey, 1979; Pal, 1995); *Gymnoascus dankaliensis* (Castell.) v. Arx, implicado en casos de otomicosis (Batista y col., 1960), lesiones de piel (Vanbreuseghem y de Vroey, 1966; Sanyal y col., 1971) y en onicomosis (Summerbell y col., 1989); y *Narasimhella hyalinospora* (Kuehn, Orr y Ghosh) v. Arx, documentada como la responsable de una infección pulmonar en un paciente con leucemia mieloide aguda por Iwen y col. (1999). Los géneros/forma *Chrysosporium* Carmichael y *Malbranchea* Sacc. también se encuentran asociados a determinadas patologías de la piel. Así *C. keratinophilum* ha sido aislado como responsable de onicomosis y de infecciones superficiales (Reboux y col., 1995); *C. pannicola* (Corda) v. Oorschort y Stalpers y *C. queensladicum* (Apinis y Rees) Sigler han sido aislados de infecciones de piel y onicomosis (Reboux y col., 1995); y *C. zonatum* Al-Musallam y Tan, aislado de una infección sistémica en un paciente con enfermedad granulomatosa crónica (Roilides y col., 1999). *Malbranchea* presenta una menor incidencia, pudiéndose destacar un caso de sinusitis debido a *Malbranchea pulchella* (Miehe) Sigler y Carmichael, descrito por Bendra y Corey (1994).

También se han citado diferentes especies queratinofílicas que pertenecen a diferentes órdenes y que, como los descritos hasta el momento, también son capaces de causar queratitis. Estos géneros son *Aspergillus* Link y *Fusarium* Link. También hay que destacar otros hongos queratinofílicos tales como *Piedraia hortae* (Brumpt) da Fonseca y de Area Leao, que provoca la denominada “piedra negra”, una invasión del pelo caracterizada por la formación de nódulos superficiales (Reboux y col., 1995). *Arthrographis kalrae* (Tewari y Macpherson) Sigler y Carmichael fue citado en 1939 por Cochet como causante de una onicomosis, y Tewari y Macpherson (1968), en una inoculación experimental en animales observaron un neurotropismo positivo, también

se ha reportado como responsable de queratitis (Perlman y Binnis, 1997) y micetoma (Degrave y col., 1997), habiendo sido aislada en dos pacientes inmunosuprimidos (Delage y col., 1998). También *Chrysosporium zonatum* (Al-Musallam y Tan) ha sido aislado de una infección sistémica en un paciente con enfermedad granulomatosa crónica (Roilides y col., 1999).

1.1.2.Fisiología

1.1.2.1. Queratinolisis

La degradación fúngica de la queratina consiste en un proceso mixto, bioquímico y mecánico. La degradación de los sustratos queratínicos se debe a la acción de enzimas proteolíticas llamadas queratinasas. La secreción de estas es inducida por la presencia de queratina en el sustrato (Siesenop y Böhm, 1995). Este proceso, es acompañado por diferentes adaptaciones morfológicas del hongo, las que facilitan la acción mecánica del mismo sobre dicho sustrato. La expresión morfológica de la queratinolisis en el pelo ha sido estudiada por diversos autores mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (Guarro y col., 1988; Fusconi y Filipello Marchisio, 1991; Cano y col., 1991; Filipello Marchisio y col., 1994), diferenciándose dos formas de ataque del pelo: **erosión superficial** y **penetración radial**. La **erosión superficial** consiste en la destrucción gradual del pelo desde fuera hacia dentro. Las hifas que realizan esta actividad pueden mantener su apariencia normal, o dilatarse formando ramas cortas, dando lugar a estructuras digitiformes. La **penetración radial** es un ataque en cualquier localización del pelo por varias hifas especializadas que penetran en el mismo formando un ángulo recto respecto al eje mayor del mismo. Estas últimas estructuras se denominan órganos perforantes (Filipello Marchisio, 2000).

1.1.2.2. Degradación de la celulosa

Históricamente se consideraba la degradación de la celulosa como una característica importante en la taxonomía de los Onygenales (Currah, 1985). Sin embargo, en la actualidad esta no es relevante, ya que la mayoría de los hongos celulolíticos pertenecen a la familia *Myxotrichaceae*, la cual se considera de posición incierta y que ha sido excluida del orden Onygenales (Eriksson y col., 2003).

1.2. TAXONOMÍA DE LOS HONGOS QUERATINOFÍLICOS

La taxonomía de los hongos queratinofílicos es muy compleja, ya que dentro de los mismos se encuentran diversos taxones, tales como los hifomicetos, incluyendo a los dermatofitos y a *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium* y *Scopulariopsis* Bainier, así como algunos celomicetos (Gugnani, 2000).

1.2.1. El orden Onygenales

Históricamente, y debido a su importancia clínica, se han estudiado separadamente a los dermatofitos del resto de los Onygenales, considerando como dermatofitos a un grupo de hongos estrechamente relacionados y que son los causantes de infecciones bien definidas como las dermatomicosis o dermatofitosis. Todos ellos se comportan como queratinolíticos, teniendo la capacidad de invadir tejidos *in vivo*. Los dermatofitos se reproducen asexualmente mediante la formación de mitosporas (conidios) uni o pluricelulares, siendo utilizadas las características morfológicas y culturales como principales criterios taxonómicos en la clasificación del grupo. Actualmente se aceptan dentro de los dermatofitos tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, mientras que un cuarto genero, *Keratinomyces* Vanbreus. es objeto de discusión entre los especialistas (Vanbreuseghem, 1952;

Georg y col., 1959; Ajello, 1968; Punsola y Guarro, 1984; Cano y Sigler, 1992; Simpanya, 2000).

Utilizando las técnicas del “anzuelo de queratina”, se describieron las formas teleomórficas de los géneros/forma *Microsporum* y *Trichophyton* como *Nannizzia* Stockdale y *Arthroderma* Currey ex Berkeley respectivamente (Currey, 1854; Stockdale, 1961). Posteriormente, Weitzman y col. (1986) sinonimizaron ambos géneros dejando cómo taxonómicamente válido a *Arthroderma*. El género *Arthroderma* actualmente se incluye en la familia *Arthrodermataceae*, del orden Onygenales, aunque los dermatofitos históricamente se han estudiado por separado, pertenecen al orden Onygenales que es el objeto de nuestro estudio.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los hongos queratinofílicos se encuentran dentro del orden Onygenales (Ascomycota), y actualmente agrupa un total de 39 géneros (Eriksson y col., 2003). El orden Onygenales ha sido estudiado por varios autores (Benjamin, 1956; Kuehn, 1958, 1959; Apinis, 1964, 1967 y Benny y Kimbrough, 1980). El estudio de dicho orden se ha basado siempre en las características morfológicas del ascoma. Una de las revisiones más completas ha sido la de Currah (1985). Dicho autor consideró como uno de los criterios taxonómicos más útiles la organización del peridio, diferenciando varios tipos (Fig.1), a pesar de que, posteriormente, otros autores llegaron a la conclusión que estas características no reflejaban la filogenia del grupo (Sugiyama y col., 1999). También estudió las características de las ascosporas y conidios, incluyendo también aspectos fisiológicos tales como la capacidad de degradación de diferentes sustratos, como la queratina y la celulosa. Según estos criterios propuso la división de los Onygenales en cuatro familias: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae*, y *Onygenaceae*. (Fig.2). Esta propuesta fue ampliamente aceptada, aunque con alguna excepción, como la de v. Arx en 1987, el cual establece una clasificación diferente, basada principalmente en la morfología de las ascosporas (forma, simetría, pigmentación, etc.), así como la ontogenia y el tipo de forma inicial de los ascos. Este autor no acepta el orden Onygenales, e incluye

algunas de las familias anteriormente citadas dentro del orden Eurotiales. Para dicho autor, el orden Eurotiales comprendería un total de cuatro familias: *Amauroascaceae*, *Eurotiaceae*, *Gymnoascaceae* y *Onygenaceae*. (Tabla 1).

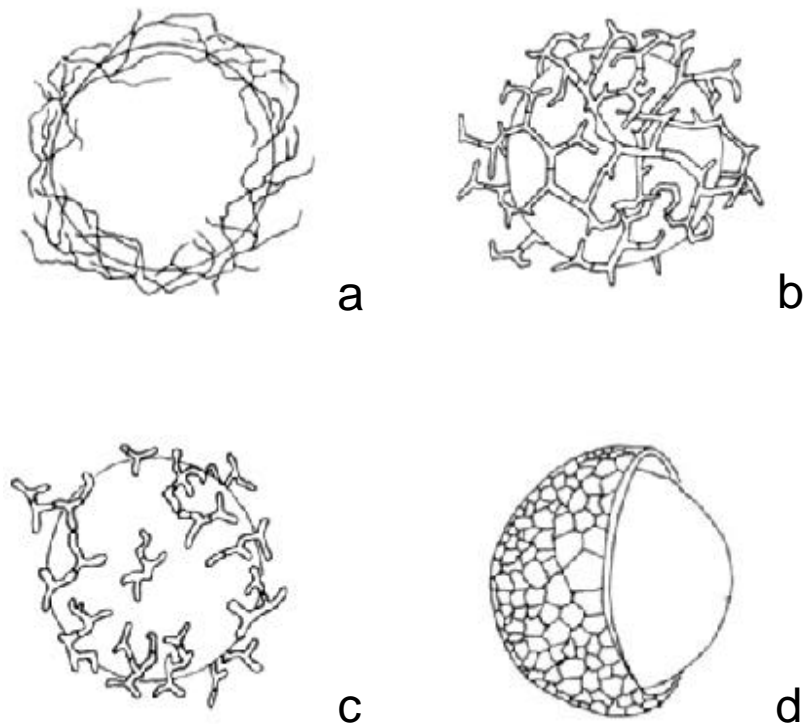


Figura 1. Tipos de peridio de los Onygenales según Currah (1985). a: telaperidio; b: reticuloperidio; c: incompositoperidio; d: cleistoperidio.

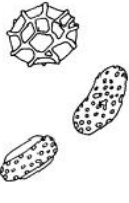
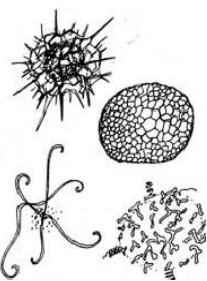
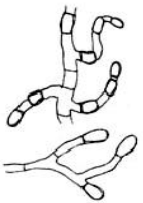
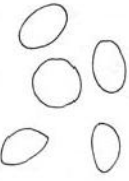
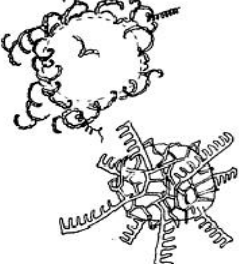





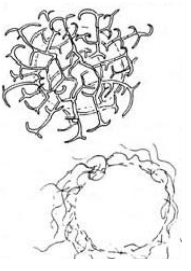

Family	Ascospores	Peridia and appendages	Anamorphs	Substrate and Habitats
ONYGENACEAE	 <p>pitted; spherical, oblate, allantoid.</p>		 <p>CHRYSOPORIUM MALBRANCHEA SPORENDONEMA</p>	<p>carnivore dung soil enriched with keratin or dung</p> <p>KERATIN</p>
ARTHRODERMATACEAE	 <p>smooth; oblate to oblate-discoid or oblate-convex.</p>		 <p>CHRYSOPORIUM MICROSPORIUM TRICHOPHYTON</p>	<p>decaying hoof, horn, feathers, hair and skin</p> <p>some are parasitic on animals</p>
MYXOTRICHACEAE	 <p>smooth or striate; fusiform, ellipsoid.</p>		 <p>GEOMYCES MALBRANCHEA OIDIODENDRON</p>	<p>processed or decaying plant materials</p> <p>CELLULOSE paper, straw, soil around the roots of plants</p>
GYMNOASCACEAE	 <p>smooth or slightly irregular ("lumpy"); often with polar and/or equatorial thickenings.</p>		 <p>absent or of un-named arthroconidia.</p>	<p>decaying vegetation soil rich in organic matter</p> <p>VARIABLE</p> <p>Various types of dung</p>

Figura 2. Esquema de las familias del orden Onygenales según Currah (1985).

Tabla 1. Clasificación del orden Onygenales según Currah (1985), y del orden Eurotiales según v. Arx (1987).

Currah 1985		Onygenales	
Arthrodermataceae	Onygenaceae	Gymnoascaceae	Myxotrichaceae
<i>Arthroderma</i>	<i>Ajellomyces</i>	<i>Acithea</i>	<i>Byussoascus</i>
<i>Ctenomyces</i>	<i>Amauroascus</i>	<i>Arachniotus</i>	<i>Myxotrichum</i>
<i>Nannizzia</i>	<i>Aphanoascus</i>	<i>Gymnascella</i>	<i>Pseudogymnoascus</i>
	<i>Apinisia</i>	<i>Gymoascoideus</i>	
	<i>Ascocalvatia</i>	<i>Gymnoascus</i>	
	<i>Auxarthron</i>		
	<i>Keratinophyton</i>		
	<i>Kuehniella</i>		
	<i>Nannizziopsis</i>		
	<i>Neogymnomyces</i>		
	<i>Neoxenophila</i>		
	<i>Onygena</i>		
	<i>Renispora</i>		
	<i>Shanorella</i>		
	<i>Spiromastix</i>		
	<i>Uncinocarpus</i>		
	<i>Pectinotrichum</i>		
	<i>Xynophila</i>		
Arx 1987		Eurotiales	
Amauroascaceae	Eurotiaceae	Gymnoascaceae	Onygenaceae
<i>Ajellomyces</i>	<i>Cristaspora</i>	<i>Arthroderma</i>	<i>Ascocalvatia</i>
<i>Amauroascus</i>	<i>Chaetosartorya</i>	<i>Ctenomyces</i>	<i>Byussoascus</i>
<i>Aphanoascus</i>	<i>Dichalena</i>	<i>Gymnoascus</i>	<i>Byssochlamys</i>
<i>Apinisia</i>	<i>Dichotomomyces</i>	<i>Leucothecium</i>	<i>Cephalotheca</i>
<i>Auxarthron</i>	<i>Emericella</i>	<i>Nannizzia</i>	<i>Eremascus</i>
<i>Keratinophyton</i>	<i>Eupenicillium</i>	<i>Narasimhella</i>	<i>Hamigera</i>
<i>Kuehniella</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Shanorella</i>	<i>Monascella</i>
	<i>Hemicarpenales</i>	<i>Spiromastix</i>	<i>Monascus</i>
	<i>Fennellia</i>	<i>Uncinocarpus</i>	<i>Myxotrichum</i>
	<i>Mallochia</i>	<i>Xynophila</i>	<i>Onygena</i>
	<i>Neosartorya</i>		<i>Penicillioopsis</i>
	<i>Saitoa</i>		<i>Pseudogymnoascus</i>
			<i>Renispora</i>
			<i>Talaromyces</i>
			<i>Thermoascus</i>
			<i>Trichocoma</i>

Así, la subdivisión en familias dentro del orden Onygenales o Eurotiales presenta cierta controversia. Actualmente, la propuesta más ampliamente seguida continúa siendo la de Currah (1985).

Los Onygenales, muestran diversos tipos de peridio, desde los típicamente cleistoteciales a los formados por un entramado laxo de hifas. Los miembros de los Onygenales presentan ascos prototunicados (considerando como ascos prototunicados a aquellos que poseen una pared fina y delicada, y rápidamente evanescente) con ocho ascosporas pequeñas (usualmente de una longitud de 8 μm), unicelulares, hialinas a ligeramente pigmentadas (nunca pardo oscuras o negras) (Fig.3.) (Sigler, 1993).

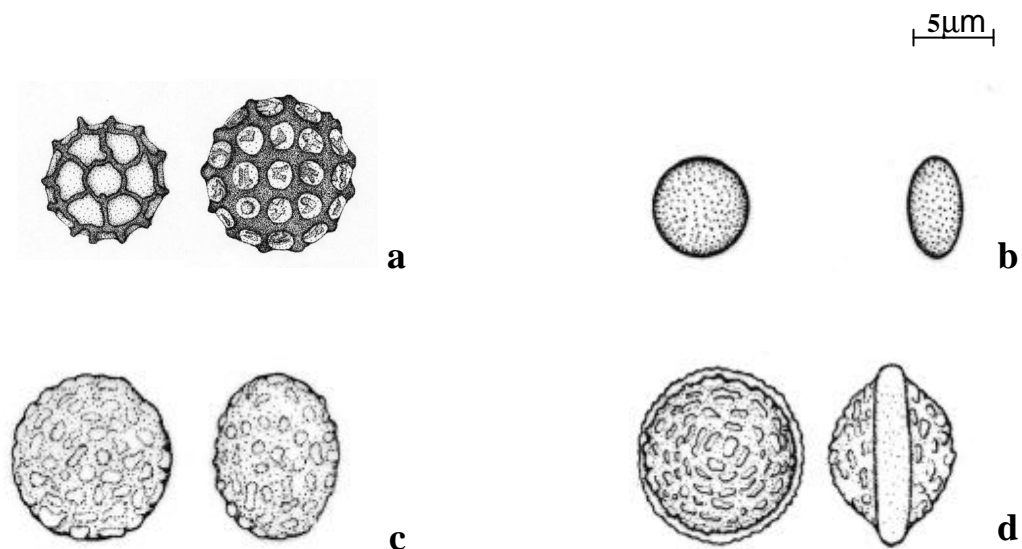


Figura 3. Algunas ascosporas morfológicamente representativas de los Onygenales. a: reticuladas; b: lisas; c: foveoladas; d: con cresta ecuatorial.

Los miembros de las familias *Arthrodermataceae* y *Onygenaceae* tienen la capacidad de degradar sustratos queratinizados, pudiéndose aislar a menudo de diferentes especies de mamíferos y aves. Las ascosporas de *Arthrodermataceae* son lisas, y sus anamorfos pertenecen a los géneros/forma *Trichophyton*, *Microsporum* o *Chrysosporium*. Las ascosporas de *Onygenaceae* tienen paredes reticuladas o foveoladas, y

sus anamorfos se incluyen en los géneros/forma *Chrysosporium*, *Histoplasma* Darling, *Blastomyces* Costantin y Rolland o *Malbranchea*. Los géneros incluidos en *Myxotrichaceae* presentan ascosporas fusiformes o elipsoidales, con paredes lisas o estriadas, tienen la capacidad de degradar celulosa, y la mayoría poseen como anamorfos a los géneros/forma *Geomyces* Traaen. o *Malbranchea*. Finalmente los miembros pertenecientes a la familia *Gymnoascaceae* presentan ascosporas lisas o rugosas, obladas, a menudo con engrosamientos polares. La ausencia de anamorfos bien desarrollados y la ausencia de afinidad por los sustratos queratinizados sugiere que algunos de sus miembros están estrechamente relacionados con los Eurotiales (Sigler, 1993).

Estudios moleculares recientes indican que la familia *Myxotrichaceae* debe excluirse del orden Onygenales, aunque su posición sigue siendo taxonómicamente incierta (Sugiyama y col., 1999; Vidal y col., 2000-b; Eriksson y col., 2003). En la última edición del "Outline of Ascomycota" (Eriksson y col., 2003), el orden Onygenales comprende las familias *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Onygenaceae*, *Ascospaeraceae* y *Eremascaceae* (Tabla 2). Debido a que las familias *Gymnoascaceae* y *Onygenaceae* son las más complejas, ya que poseen el mayor número de géneros dentro del orden y siendo las que plantean más problemas a nivel taxonómico, nos hemos centrado preferentemente en el estudio de las mismas en la presente tesis doctoral.

Tabla 2. Clasificación del orden Onygenales según Eriksson y col. (2003).

Onygenales				
Arthrodermataceae	Ascospaeraceae	Eremascaceae	Gymnoascaea	Onygenaceae
<i>Arthroderma</i> <i>Ctenomyces</i>	<i>Arrhenosphaera</i> <i>Ascospaera</i> <i>Bettsia</i>	<i>Eremascus</i>	<i>Acitheca</i> <i>Arachniotus</i> <i>Arachnomyces</i> <i>Gymnascella</i> <i>Gymnoascoideus</i> <i>Gymnoascus</i> <i>Kraurogymnocarpa</i> <i>Leucothecium</i> <i>Mallochia</i> <i>Narasimhella</i> <i>Orromyces</i>	<i>Ajellomyces</i> <i>Amauroascus</i> <i>Aphanoascus</i> <i>Apinisia</i> <i>Arachnotheca</i> <i>Ascocalvatia</i> <i>Auxarthron</i> <i>Bifidocarpus</i> <i>Byssonnygena</i> <i>Kuehniella</i> <i>Monascella</i> <i>Nannizziopsis</i> <i>Neoarachnotheca</i> <i>Neogymnomyces</i> <i>Onygena</i> <i>Pectinotrichum</i> <i>Polytolypa</i> <i>Renispora</i> <i>Shanorella</i> <i>Spiromastix</i> <i>Uncinocarpus</i> <i>Xanthothecium</i>
Onygenales de posición incierta				
<i>Eurotiomycetes</i> <i>Amaurascopsis</i> <i>Azureothecium</i> <i>Calypetrozyma</i> <i>Leiothecium</i> <i>Pisomyxa</i> <i>Samarospora</i> <i>Veronaia</i>				

1.2.2. Antecedentes históricos de las familias Gymnoascaceae y Onygenaceae

Estas familias incluyen a los hongos que degradan eficientemente la queratina, y entre los cuales se encuentran algunos de los más importantes patógenos humanos. Los miembros de estas familias se aíslan habitualmente de estiércol de aves y otros animales, especialmente de carnívoros, de suelos ricos en materia orgánica, y sustratos de queratina. Aparte de los hongos queratinofílicos, algunas de las especies incluidas tradicionalmente en la familia *Gymnoascaceae* son celulolíticas, y mientras que otras no atacan ninguno de estos dos sustratos (Currah, 1985).

Estas dos familias se estudian de forma independiente, distinguiendo dos grupos según la morfología de la especie tipo de cada familia: *Gymnoascus reesii* Baran. y *Onygena equina* Pers., respectivamente. Cronológicamente, el primero que se describe es el género *Onygena* Pers., que da nombre a la familia *Onygenaceae*, pero esta familia recibe históricamente poca atención (Malloch y Cain, 1971-a, 1971-b; Rammeloo, 1982) ya que la más extensamente estudiada es *Gymnoascaceae*. A pesar de que diferentes autores proponen la existencia de relaciones entre *Onygenaceae* y *Gymnoascaceae* (Matruchot y Dassonville, 1899; Fennell, 1973; Malloch, 1981), hasta la fecha nunca se ha realizado un estudio comparativo.

Familia *Gymnoascaceae*

La familia *Gymnoascaceae* fue propuesta por Baranetzky en 1872. Según este autor, la familia se caracterizaba por la ausencia de un peridio continuo. Este criterio tan simple permitía incluir en un único grupo a *Endomyces* Reess, *Saccharomyces* Meyen ex E. Hans, *Taphrina* Fr. y *Gymnoascus* Baran. Eidam (1880) excluyó los dos primeros por su similitud estructural y morfológica con otros grupos de hongos (Phycomycetes). Este autor incluyó en la familia al nuevo género *Ctenomyces* Eidam y creó dos subfamilias, basándose en las características tróficas “gymnoascaceae parasíticos”, donde incluyó *Ascomyces*, *Taphrina* y *Exoascus* Fuckel y “gymnoascaceae saprofiticos” donde incluyó al género coprófilo *Ascodesmis* Tiegh. y *Gymnoascus*.

Dicho autor también mencionaba que *Ascomyces*, *Ascodesmis*, *Exoascus* y *Taphrina* estaban estrechamente relacionados con los discomicetos, y *Gymnoascus* con los pirenomicetos.

Brefeld (1891) no aceptó la relación entre los *Gymnoascaceae* propuestos por Eidam, y situó a *Gymnoascus* en “carpoasci” (*carpoasci*, ascos dentro de un cuerpo fructífero), y a *Ascomyces* y *Taphrina* en “exoasci” (*exoasci*, ascos no cerrados en un cuerpo como tal).

Schroeter (1893) redefinió la familia, e incluyó en la misma a ascomicetos cleistoteciales con peridio formado por un entramado de hifas envolviendo los ascos. Este autor incluyó a *Amauroascus* Shröt, *Arachniotus* Shröt, *Ctenomyces*, *Gymnoascus* y *Myxotrichum* Kunze. Posteriormente, Masee (1895) planteó un concepto de familia basado en la ausencia de estructuras peridiales, y emplazó de nuevo a *Ascodesmis*, *Ascomyces* y *Taphrina* en la familia *Gymnoascaceae*, ubicando a los dos géneros últimos en una subfamilia a parte.

Matruchot y Dassonville (1899), siguiendo en parte las propuestas de Schroeter y Brefeld pero manteniendo una definición amplia para la familia, dividieron a *Gymnoascaceae* en tres “tribus”: *Endomycetees*, a la que pertenecía el género *Endomyces*; *Onygenees*, formada por el género *Onygena*; y *Gymnoascees*, que incluía a los géneros *Ctenomyces* y *Gymnoascus*.

Clements y Shear (1931) propusieron el nuevo orden Gymnoascales, caracterizado por “ascos libres o agrupados, sin hifas protectoras o limitados por una masa de hifas más o menos densa”. En este orden incluyeron cuatro familias: *Endomycetaceae*, *Schizosaccharomycetaceae*, *Monascaceae* y *Gymnoascaceae*. La familia *Gymnoascaceae* incluía los géneros *Amauroascus*, *Arachniotus*, *Conidiascus* Holterm, *Ctenomyces*, *Diplostephanus* Langeron, *Eidamella* Matr. y Dassonv., *Gymnoascus*, *Hexagonella* Stevens y Guba, *Lilliputia* Bound. y Pat., *Myrillium* Clem., *Myxotrichum*, *Penicilliopsis* Solms, y *Rollandina* Pat.

Benjamin (1956), no mencionó el orden Gymnoascales, y consideró como características definitorias de la familia *Gymnoascaceae* los

ascomas esféricos, limitados por un entramado laxo de hifas a menudo anastomosadas, con pared delgada o gruesa, envolviendo a los ascos, poseer hifas peridiales, cuando estaban presentes, de pared lisa o rugosa, simples o ramificadas o presentar apéndices; ascos dispuestos irregularmente, globosos o piriformes, octosporados, con pared evanescente; ascosporas unicelulares, globosas, obladas, ovoides o lenticulares, lisas u ornamentadas. La reproducción asexual era mediante la producción de conidios o clamidosporas. Este autor, incluyó en la familia *Gymnoascaceae* a los géneros *Amauroascus*, *Arachniotus*, *Arthroderma*, *Byssochlamys* Westling, *Ctenomyces*, *Eidamella*, *Gymnoascus*, *Myxotrichum*, *Pseudogymnoascus* Raillo y un nuevo género, *Shanorella* Benj. (Tabla 3). Benjamin también excluyó a numerosos géneros que eran considerados como pertenecientes a la familia por Clements y Shear (1931): *Carpenteles* Langeron, *Conidiascus*, *Diplostephanus*, *Hexagonella*, *Lilliputia*, *Myrillium* Clem., *Penicilliopsis* y *Rollandina*.

Kuehn (1958, 1959) incluyó el nuevo género *Pseudoarachniotus* Kuehn en dicha familia. Para este autor la definición de familia era similar a la anterior, pero daba especial importancia al tipo de conidiogénesis.

En 1964, Apinis, realizó una revisión de la familia, en base a las especies aisladas en Gran Bretaña, excluyendo a *Byssochlamys* por su conidiogénesis fialídica. Dicho autor propuso tres subfamilias atendiendo al tipo de peridio y a sus apéndices. La subfamilia *Gymnoascoideae* incluía a *Gymnoascus* (considerando a *Auxarthron* Orr y Kuehn y a *Pseudogymnoascus* como subgéneros del mismo), *Myxotrichum* y *Actinodendron* Orr y Kuehn. La subfamilia *Arthrodermoideae* incluía *Arthroderma*, *Ctenomyces*, *Nannizzia* y *Shanorella* y finalmente *Arachnoideae* incluía *Amauroascus* y *Arachniotus*.

Benny y Kimbrough (1980) consideraron 3 subfamilias dentro de *Gymnoascaceae*, también separadas en base a las características de sus hifas peridiales. Este sistema coincidía bastante con la propuesta de Apinis (1964). *Arachnoideae* incluía *Amauroascus*, *Arachniotus*, *Arachnotheca* v. Arx, *Byssosascus* v. Arx, *Renispora* Sigler y Carmichael, y

Narashimella Thirum. y Mathur. *Arthrodermidae* incluía *Ajellomyces* Donough y Lewis, *Apinisia* La Touche, *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Shanorella* y *Spiromastix* Kuehn y Orr. *Auxarthron*, *Ctenomyces* y *Pseudogymnoascus*, debido a sus hifas peridiales muy diferentes de las vegetativas, los emplazaba en la subfamilia *Gymnoascoideae*. Este sistema de subfamilias no tenía en cuenta la morfología de las ascosporas.

Tabla 3. Diferentes clasificaciones de la familia *Gymnoasceae* propuestas entre 1956 y 1980.

Benjamin 1956		
<i>Amauroascus</i> <i>Byssochlamys</i> <i>Gymnoascus</i> <i>Shanorella</i>	<i>Arachniotus</i> <i>Ctenomyces</i> <i>Myxotrichum</i>	<i>Arthroderma</i> <i>Eidamella</i> <i>Pseudogymnoascus</i>
Kuehn 1958,1959		
<i>Amauroascus</i> <i>Byssochlamys</i> <i>Gymnoascus</i> <i>Pseudogymnoascus</i>	<i>Arachniotus.</i> <i>Ctenomyces</i> <i>Myxotrichum</i> <i>Shanorella.</i>	<i>Arthroderma</i> <i>Eidamella</i> <i>Pseudoarachniotus</i>
Apinis 1964		
Arachnoideae	Arthrodermoideae	Gymnoascoideae
<i>Amauroascus</i> <i>Arachniotus</i>	<i>Arthroderma</i> <i>Ctenomyces</i> <i>Shanorella</i>	<i>Actinodendron</i> <i>Gymnoascus</i> <i>Myxotrichum</i>
Benny y Kimbrough 1980		
Arachnoideae	Arthrodermoideae	Gymnoascoideae
<i>Amauroascus</i> <i>Arachniotus</i> <i>Arachnotheca</i> <i>Byssosascus</i> <i>Narasimhella</i> <i>Renispora</i>	<i>Ajellomyces</i> <i>Apinisia</i> <i>Arthroderma</i> <i>Nannizzia</i> <i>Shanorella</i> <i>Spiromastix</i>	<i>Auxarthron</i> <i>Ctenomyces</i> <i>Gymnoascus</i> <i>Myxotrichum</i> <i>Pectinotrichum</i> <i>Pseudogymnoascus</i>

Familia Onygenaceae

La familia *Onygenaceae* fue propuesta por Fries en 1849, siendo *Onygena* su género tipo. Sin embargo, en 1897 Fisher consideró a dicho

género cómo incluido en los Gymnoascales. Clements y Shear (1931) incluían la familia *Onygenaceae* en el orden Tuberales, junto con *Elaphomycetaceae* y *Tuberaceae*. Estos autores consideraron que *Onygenaceae* comprendía únicamente a los géneros *Dendrosphaera* Pat., *Onygena* y *Trichocoma* Jungh. En 1935 Boedijn llevó a cabo una revisión de la familia, dividiéndola en tres subfamilias monogénicas: *Dendrosphaeroidae* (*Dendrosphaera*), *Onygenoidae* (*Onygena*) y *Trichocomoideae* (*Trichocoma*) (Tabla 4). En 1971 Malloch y Cain, aportaron una definición nueva de la familia, y excluyeron los géneros que presentaban un cleistotecio con pie (“*stipitate*”) y cuyos anamorfos eran filídicos o anelídicos (*Dendrosphaera* y *Trichocoma*). Dichos autores describieron a los Onygenales de la siguiente manera: micelio hialino, a menudo con protuberancias ampuliformes; formas iniciales consistentes en hifas helicoidales largas y prominentes o en células hinchadas; ascomas de diferente tamaño, con o sin pie, hialinos o ligeramente coloreados, nunca pardo oscuro o negros, de lisos a tomentosos con apéndices de diversos tipos, no ostiolados, variando frecuentemente en tamaño; ascos de subglobosos a globosos, en disposición irregular, no estipitados, evanescentes, formándose habitualmente en los extremos uncinados de las hifas ascógenas; ascosporas unicelulares, hialinas o ligeramente pigmentadas, nunca pardo oscuras ni negras, de tamaño variable, a menudo obladas, de lisas a rugosas, con crestas ecuatoriales en algunos géneros, sin poro germinativo. Los estadios conidiales fueron descritos simplemente como artroconidios o aleurioconidios. Frecuentemente aislados de sustratos con queratina, pero también de sustratos vegetales y del suelo. Estos autores incluyeron a *Aphanoascus* Zukal (*Keratinophyton* no era considerado un género diferente), *Arachnomyces* Masee y Salmon, *Ascocalvatia* Malloch y Cain, *Dichotomomyces* Saito ex Scott., *Onygena*, y *Xynophila* Malloch y Cain. *Pleuroascus* Masee y Salmon fue añadido posteriormente, en 1973, por Malloch y Benny.

Fennell (1973) consideraba incluidos en los *Onygenaceae* y los *Gymnoascaceae* a todos aquellos géneros que poseían cleistotecios y

que se aislaban frecuentemente de sustratos con queratina. Las características definitorias de familia, según este autor, eran muy similares a las propuestas por Malloch y Cain (1971). Ninguno de estos autores se refirió a los géneros *Ascocalvatia* ni a *Xynophila*.

Malloch (1979) estudió la similitud entre los anamorfos de los géneros pertenecientes a *Gymnoascaceae* y a *Onygenaceae*, sugiriendo la proximidad entre ellos. Para este autor, la característica definitoria de los anamorfos de la familia *Onygenaceae* consistía en que los conidios eran de ontogenia holoblástica o tállica, pero nunca enteroblástica (Fig.4).

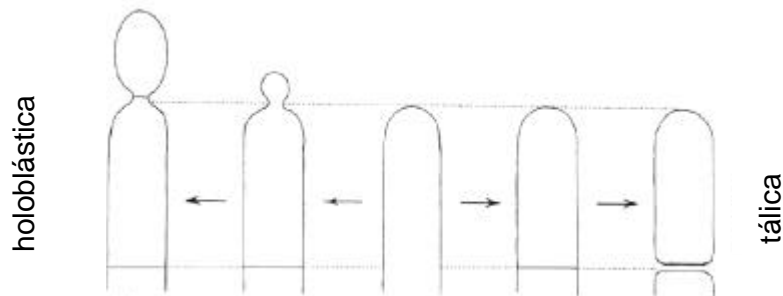


Figura 4. Tipos de conidiogénesis en la familia *Onygenaceae*

El mismo autor, en 1981, señaló que los *Gymnoascaceae* diferían de los *Onygenaceae* solo en la naturaleza del peridio, y sugirió que la familia *Onygenaceae* podría incluir géneros intermedios entre las dos familias. Benny y Kimbrough (1980) revisaron los géneros incluidos en *Onygenaceae*, reiterando esencialmente la definición propuesta por Malloch y Cain (1971).

Tabla 4. Clasificación de géneros pertenecientes a la familia *Onygenaceae* y familias relacionadas, desde 1935 a 1980.

Boedijn 1935		
Dendrosphaereceae	Onygenaceae	Trichocomaceae
<i>Dendrosphaera</i>	<i>Onygena</i>	<i>Trichocoma</i>
Malloch y Cain 1971		
Onygenaceae		
<i>Aphanoascus</i> <i>Dichotomomyces</i> <i>Xynophila</i>	<i>Arachnomyces</i> <i>Onygena</i>	<i>Ascocalvatia</i> <i>Thermoascus</i>
Benny y Kimbrough 1980		
Onygenales		
Dendrosphaeraceae	Gymnoascaceae	Onygenaceae
<i>Dendrosphaera</i>	<i>Ajellomyces</i> <i>Amauroascus</i> <i>Apinisia</i> <i>Arachniotus</i> <i>Arachnotheca</i> <i>Arthroderma</i> <i>Auxarthron</i> <i>Byussoascus</i> <i>Ctenomyces</i> <i>Gymnoascus</i> <i>Myxotrichum</i> <i>Nannizia</i> <i>Narasimhella</i> <i>Pectinotrichum</i> <i>Pseudogymnoascus</i> <i>Renispora</i> <i>Shanorella</i> <i>Spiromastix</i>	<i>Anixiospsis</i> <i>Aphanoascus</i> <i>Arachnomyces</i> <i>Ascocalvatia</i> <i>Dichotomomyces</i> <i>Diehliomyces</i> <i>Leucothecium</i> <i>Keratinophyton</i> <i>Neoxenophylla</i> <i>Onygena</i> <i>Pleuroascus</i> <i>Thermoascus</i> <i>Xanthothecium</i> <i>Xylogone</i> <i>Xynophila</i>

1.2.3. Morfología y estructura de los Onygenales

Según Currah (1985) los taxones incluidos dentro de los Onygenales presentan: peridios con diferente grado de estructuración, desde entramados de hifas indiferenciadas a estructuras cerradas (cleistotecios) delimitados por paredes membranáceas; ascos generalmente esféricos, con pared lisa y evanescente; ascosporas pequeñas, unicelulares y hialinas, o de tonos pálidos, con diferentes tipos de ornamentación

(fóveas, celdillas,...); anamorfos consistentes en aleurio o artroconidios, de secesión rexolítica; diferentes taxa tienen la capacidad de degradar la queratina, y están asociados a animales o a sus productos, incluyendo estiércol, plumas y huesos (Sigler, 1993).

1.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN TAXONOMÍA FÚNGICA

La limitación de los caracteres morfológicos para diferenciar hongos estrechamente relacionados, así como la laboriosidad requerida en su estudio y, en algunos casos, la insuficiente resolución que proporcionan a nivel taxonómico, ha propiciado el uso de las técnicas moleculares (Guarro y col., 1999). Hasta el momento han sido usadas numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos, desde las clásicas técnicas de ADN, basadas en la determinación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear (Kurtzman, 1994), hasta la hibridación ADN-ADN, para establecer la identidad o no de cepas morfológicamente similares (Vilgalys, 1988). En los últimos años las técnicas más utilizadas en la taxonomía fúngica son los métodos de electroforesis y secuenciación, siendo una de las técnicas más utilizadas, el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas. Entre los métodos electroforéticos se emplean de forma muy extendida el de RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism Analysis*). Esta técnica ha sido utilizada en taxonomía para la diferenciación molecular de cepas de una misma especie (Jackson y col., 1999; Blanz y col., 2000; Quirk y Kupinski, 2002), y también para revelar las conexiones anamorfo–teleomorfo (Gené y col., 1996). Con el mismo objetivo se ha usado la técnica de RAPD (*Random Amplification of polimorphic DNA*), además de realizar el “tipado” de distintos aislamientos de una misma especie; es decir, determinar la variabilidad intraespecífica (Kano y col., 1998; Boldo y col., 2003). Otra de las técnicas utilizadas para la identificación y tipado es la de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis*) (Gräser y col., 1999). En los últimos años se han descrito otras muchas técnicas con el objetivo de tipar y diferenciar entre especies cercanas, como las que se

basan en la amplificación de regiones repetidas en tandem como los microsatélites (Dalle y col., 2000; Lasker y Ran, 2004). Por lo que refiere a la secuenciación, son muchos los genes y regiones estudiadas hasta el momento, desde el análisis del ADN mitocondrial (Yamamoto y col., 1995) hasta el ADN nuclear, aunque siguen siendo los genes del ARN ribosomal los más estudiados. También, se han estudiado genes estructurales que codifican para proteínas, como la β -tubulina (O'Donnell, 1992), la actina (Cox y col., 1995), la quitina sintasa (Bowen y col., 1992; Szaniszló y Momany, 1993), el factor de elongación (EF-1 α) y la calmodulina (O'Donnell y col., 2000), entre otros.

1.3.1. Secuenciación del ADN ribosómico

Como ya se ha comentado anteriormente, el ADN ribosómico ha sido una de las regiones del ADN más utilizadas para realizar análisis filogenéticos de hongos (Hillis y Dixon, 1991; Bruns y col., 1992). La principal razón para ello se encuentra en que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas, y que estas copias están repetidas en tándem, (facilitando así su amplificación) (Guarro y col., 1999). En el ADN ribosómico existen fragmentos con distinto grado de conservación, lo que permite realizar estudios a diferentes niveles. Las regiones que se encuentran altamente conservadas nos permiten realizar estudios evolutivos a nivel de géneros y familias y suelen usarse para el diseño de cebadores universales. La heterogeneidad de estas secuencias nucleotídicas ha sido utilizada para clasificar filogenéticamente a los microorganismos (Hillis y Dixon, 1991; Bruns y col., 1991; Iwen y col., 2002). Entre las secuencias altamente conservadas de los genes de esta región se encuentran regiones variables, denominadas espaciadores (intrones), cuya función es desconocida. La tasa de variabilidad en estas regiones espaciadoras es más elevada que en los genes, pero sus secuencias se pueden alinear con confianza entre taxones estrechamente relacionados (Guarro y col., 1999). La heterogeneidad de estas

secuencias ha sido utilizada para separar géneros, y sobretodo especies (Summerbell y col., 1999; Stchigel y col., 2000; Vidal y col., 2000-a; Cano y col., 2002-a; Iwen y col., 2002). La región del ADNr (Fig.5) incluye el gen 18S (esta región también se denomina SSU), el espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S (también denominado LSU). Las regiones 18S, 5.8S, 28S están relativamente conservadas entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles (Iwen y col., 2002; Sugiyama y col., 2002; Untereiner y col., 2002).

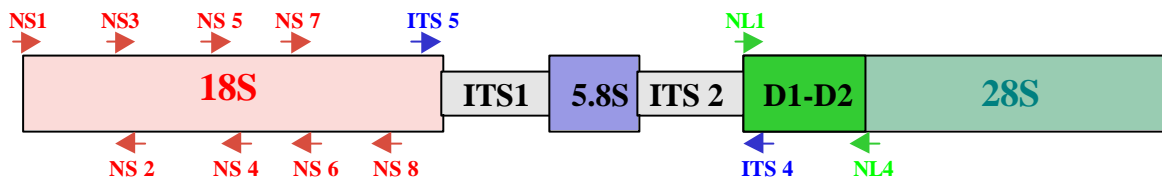


Figura 5. Representación esquemática de las regiones estudiadas del ADN ribosomal y los diferentes cebadores.

NS1:GTA,GTC,ATA,TGC,TTG,TCT,C; **NS2:**GGC,TGC,TGG,CAC,CAG,ACT,TGC;
NS3:GCA,AGT,CTG,GTG,CCA,GCA,GCC; **NS4:**CTT,CCG,TCA,ATT,CCT,TTA,AG;
NS5:AAC,TTA,AAG,GGA,ATT,GAC,GGA,AG; **NS6:**GCA,TCA,CAG,ACC,TGT,TAT,TGC,CTC;
NS7:GAG,GCA,ATA,ACA,GGT,CTG,TGA,TGC; **NS8:**TCC,GCA,GGT,TCA,CCT,ACG,GA;
ITS5:GGA,AGT,AAA,AGT,CGT,AAC,AAG,G; **ITS4:** TCC,TCC,GCT,TAT,TGA,TAT,GC. (White y col., 1990). **NL1:**GCA,TAT,CAA,TAA,GCG,GAG,GAA,AA; **NL4:** GGT, CCG, TGT, TTC, AAG, ACG, G. (O'Donnell, 1993).

1.4. FILOGENIA MOLECULAR

La filogenia molecular establece las relaciones evolutivas entre organismos basándose en la comparación de caracteres moleculares, fundamentalmente entre las secuencias de ADN. Los diferentes métodos de filogenia molecular asumen que las diferencias observadas entre secuencias homólogas de diferentes seres vivos son el resultado de procesos evolutivos específicos. Así pues, los diferentes métodos pretenden ser modelos de estos procesos evolutivos, y poder así

reconstruir las relaciones existentes entre esos organismos. Los métodos de filogenia molecular basados en secuencias de ADN se pueden diferenciar en dos grupos: los métodos basados en distancias genéticas y los métodos basados en caracteres conservados (Bruns y col., 1991; Hillis y Bull, 1993; Felsenstein, 1996; Berbee y Taylor, 1999).

1.4.1. Métodos basados en las distancias genéticas

Los métodos basados en distancias genéticas calculan para cada par de secuencias comparadas un índice de diferencia entre los mismos, denominado distancia genética. Con todas las distancias calculadas se elabora una matriz de distancias, que sirve para construir el árbol filogenético que mejor se ajuste a ellas, utilizando distintos algoritmos. Estos métodos basados en distancias genéticas tienen el inconveniente que reducen toda la información de la secuencia a un único número, asumiendo que este parámetro refleja la divergencia evolutiva existente. Por ello, estos métodos se consideran reduccionistas (Bowman y col., 1992).

Uno de los métodos basados en distancias genéticas es el método de "*neighbour-joining*", o del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987) (Fig.6), que agrupa entre sí a las secuencias con menor distancia genética entre ellas, siguiendo el principio de mínima evolución propuesto por Saitou y Imanishi (1989). Así, el árbol obtenido es aquel en el que la suma total de las longitudes de las ramas es la menor.

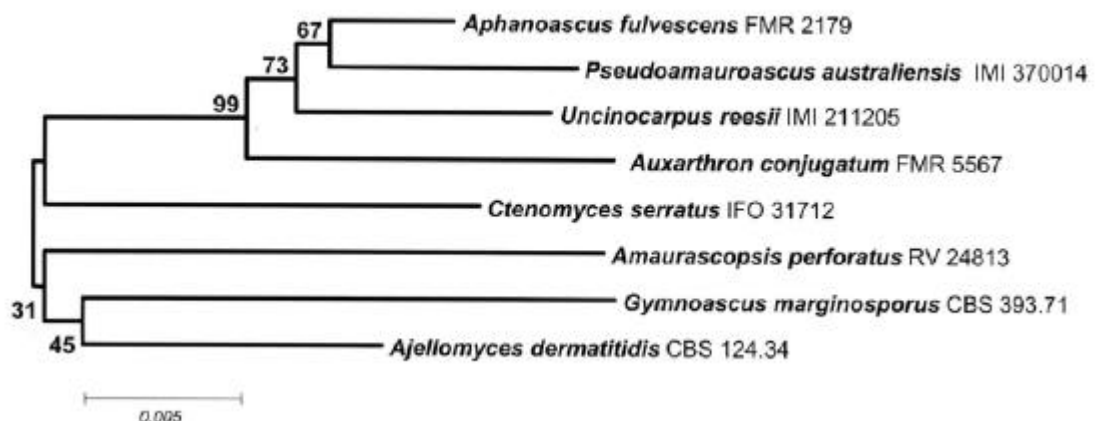


Figura 6. Tipo de árbol obtenido con el método de “*neighbour-joining*” (NJ).

1.4.2. Métodos basados en caracteres conservados

Los métodos basados en caracteres conservados consideran cada posición nucleotídica como un carácter independiente. Por tanto, cuando más largas son las secuencias que comparamos, habrá mayor número de caracteres, y se obtendrá más información. Este método, a partir del alineamiento de las secuencias, evalúa los cambios que han tenido lugar en cada posición nucleotídica entre las distintas secuencias, y establece las posibles relaciones filogenéticas siguiendo distintos criterios (DeSalle y col., 1994). A diferencia de los métodos basados en distancias genéticas, los métodos basados en caracteres conservados utilizan toda la información contenida en la secuencia, que no se minimiza al no haber conversión a distancias genéticas. Un inconveniente de estos métodos es el mayor requerimiento de tiempo y potencia de cálculo que necesita. Debido a esto, en muchas ocasiones no es posible realizar una búsqueda exhaustiva del mejor de todos los árboles posibles, siendo inevitable el uso de algoritmos de búsqueda heurística, los que permiten una estimación bastante aproximada de las relaciones filogenéticas que mejor se ajustan al criterio elegido, aunque sin garantizar que el árbol obtenido sea el mejor de todos los posibles (DeSalle y col., 1994).

El método basado en caracteres conservados más utilizado es el de máxima parsimonia (Czelusmiak y col., 1990; Swofford y Olsen, 1990) (Fig.7). En él se calcula el número de cambios evolutivos que requiere cada uno de los árboles posibles. A dicho número se le considera como la longitud del árbol. De todos los árboles posibles se selecciona el que requiere un menor número de cambios (el árbol de menor longitud). Una vez obtenido el árbol, es necesario determinar el grado de fiabilidad del mismo. Existen diferentes métodos para determinarla, de entre ellos uno de los más utilizados es el análisis de “*bootstrap*” (Felsenstein, 1985; Hillis

y Bull, 1993). Este método se basa en una reordenación al azar de los datos originales que genera una serie de árboles-réplica, y calcula el porcentaje de conservación de cada una de las ramas del árbol original a lo largo de los diferentes árboles-réplica. De esta forma establece el índice de “bootstrap” para cada rama del árbol original.

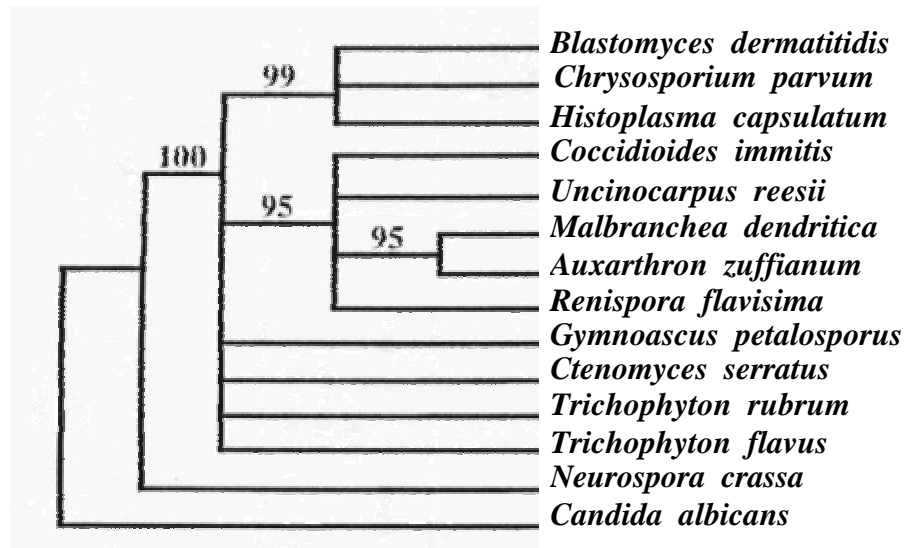


Figura 7. Ejemplo de árbol obtenido mediante el método de parsimonia.

2. OBJETO E INTERÉS

2. OBJETO E INTERÉS

Los Onygenales incluyen un gran número de hongos que se caracterizan por poseer como hábitat sustratos queratinizados. Algunos de ellos además son importantes patógenos humanos. Su taxonomía, hasta hace relativamente poco tiempo, se ha basado casi exclusivamente en criterios morfológicos, a partir de los cuales se han propuesto diferentes clasificaciones, todas ellas claramente artificiales. Estas propuestas no siempre han sido coincidentes entre sí, ya que los principales investigadores que han estudiado este orden han concedido una importancia diferente a características tales como la morfología de las ascosporas, la estructuración del peridio o la capacidad de degradar sustratos como la queratina o la celulosa. Si a ello le sumamos la posible subjetividad en la valoración de dichos criterios, no es de extrañar que se hayan publicado diferentes propuestas de clasificación. En la actualidad se dispone de técnicas más objetivas para el estudio de los hongos, tales como las técnicas moleculares, concretamente la secuenciación del ADN ribosomal. La correcta utilización de estas técnicas permite comprobar si los taxones estudiados han sido propuestos sobre bases sólidas o no, y complementar de esta forma los estudios morfológicos. El poder establecer relaciones filogenéticas entre estos organismos nos permitirá diseñar modelos taxonómicos y sistemas de clasificación más naturales.

Dos de los géneros del orden Onygenales que presentan la mayor diversidad de especies, y que plantean problemas taxonómicos, de difícil solución, son *Auxarthron* y *Amauroascus*. Ambos géneros son morfológicamente similares, y los límites entre ellos no han sido bien definidos, existiendo especies que presentan características intermedias. Dichas especies incluyen a: *Amauroascus pseudoreticulatus*, *Amauroascus kuehnii* y *Auxarthron pseudoauxarthron*. De ellas destaca *A. Kuehnii*, por presentar una elevada variabilidad morfológica.

El género *Gymnoascus* merece también una atención especial, ya que las diferentes propuestas taxonómicas son muy dispares. Éstas van

desde considerar únicamente la existencia de dos especies hasta estar integrado por un mayor número de especies.

En el presente trabajo nos proponemos como objetivo principal el estudiar morfológica y molecularmente algunos de los géneros del orden Onygenales, concretamente aquellos que actualmente plantean una mayor problemática en el ámbito taxonómico; para ello perseguimos los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Proponer criterios taxonómicamente estables para la clasificación de los Onygenales, basados principalmente en el análisis de las secuencias del DNA ribosómico y en la morfología de las estructuras de reproducción sexual.
- 2.- Determinar las relaciones filogenéticas existentes entre las especies de los géneros *Amauroascus* y *Auxarthron*, ambos caracterizados por presentar ascosporas esféricas y ornamentadas.
- 3.- Caracterizar la especie *Amauroascus kuehnii* a nivel molecular y morfológico.
- 4.- Proponer un esquema de clasificación para las especies del género *Gymnoascus* y otros géneros relacionados, basado en el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen ribosomal 5.8S y los espaciadores intergénicos circundantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La relación de cepas y especies estudiadas se detalla en el Anexo 1. Generalmente fueron aisladas durante el presente trabajo a partir de muestras de suelo. También fueron incluidas en el estudio numerosas cepas procedentes de diferentes colecciones de cultivos tales como: UAMH (University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Canada), IMI (CABI Bioscience, Egham, Gran Bretaña), CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda), RV (Institute de Medicine Tropicale "Prince Léopold", Belgica), IFO (Institute for Fermentation, Osaka, Japón) actualmente NBRC (National Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japón).

3.1. ORIGEN, RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Las muestras de suelo (aproximadamente 50-100 gramos) se recogían con la ayuda de espátulas estériles y se colocaban en bolsas de polietileno, que eran conservadas a 4°C en cámara frigorífica hasta su procesamiento en el laboratorio.

Las muestras fueron recolectadas principalmente en España y Australia.

3.2. AISLAMIENTO DE HONGOS QUERATINOFÍLICOS

Para el aislamiento de los hongos queratinofílicos se utilizó la técnica del anzuelo de queratina "*ToKaVa hair baiting method*", descrita por Vanbreuseghem (1952). Esta técnica consistía en depositar aproximadamente 20-30 g de suelo en placas de Petri estériles, formando una capa de aproximadamente un centímetro de grosor, se añadía después una cierta cantidad de agua esterilizada con la finalidad de conseguir un grado de humedad óptimo, y finalmente se colocaba la

fuelle de queratina previamente, autoclavada dos veces, y en días alternos. Como fuente de queratina se usó crin de caballo cortada en fragmentos de aproximadamente un centímetro de longitud. La temperatura de incubación fue de 25+/-3°C. Para evitar la desecación de los cultivos se iba adicionando periódicamente agua estéril. Los cultivos se observaban regularmente mediante el empleo de un microscopio estereoscópico para detectar crecimiento fúngico.

3.2.1. Obtención de cultivos puros

A partir del micelio que se desarrollaba en la superficie del substrato se recogía una porción con una aguja hipodérmica, y se colocaba en un portaobjetos con lactofenol o lactofenol azul algodón para su observación mediante un microscopio binocular de campo claro. Una vez observado el espécimen se procedía a aislar los hongos detectados en cultivos puros. Ascomas individuales se recogían mediante una aguja hipodérmica estéril y se inoculaban en placas de Petri de 5 cm de diámetro con agar con infusión de patata zanahoria (PCA) o agar con infusión de harina de avena (OA). Las placas se rotulaban pertinentemente y se incubaban en las mismas condiciones que el cultivo original.

3.2.2. Conservación de los cultivos

Los cultivos puros se conservaban en tubos de polietileno con el medio de cultivo más adecuado para cada especie inclinado en “pico de flauta”, preferentemente OA, PCA y agar infusión de patata y glucosa (PDA). Para la conservación durante periodos más largos se cubría totalmente el cultivo con aceite de vaselina o parafina líquida estéril. Estos cultivos se almacenaban a temperatura ambiente.

Las cepas también se conservaban en agua. Para ello se sembraban en placas con un medio de cultivo adecuado para la producción de ascomas, se incubaban en condiciones óptimas y una vez desarrolladas las colonias se cortaba el medio de cultivo con un bisturí estéril

delimitando cubos de unos 10 mm de lado. Posteriormente, dichos cubos se introducían en viales de cristal que contenían agua destilada estéril, se cerraban herméticamente y se almacenaban a temperatura ambiente.

Para conservar material en herbario se procedía a la desecación de las colonias en las que se había observado un crecimiento óptimo del hongo, en una estufa a 45-55°C. Una vez deshidratadas se almacenaban en sobres de papel encerado.

Tanto los holotipos como cultivos vivos de las cepas de interés se depositaban en colecciones internacionales de cultivos preferentemente en el International Mycological Institute (IMI, CABI), Egham, Gran Bretaña y el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Holanda.

3.3. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Para realizar una caracterización más detallada de las cepas problema se procedía en primer lugar a su estudio morfológico. Realizando un estudio macroscópico en cultivo de las colonias y, posteriormente el estudio morfológico microscópico.

3.3.1. Estudios culturales

Para la caracterización macroscópica de las colonias se utilizaban diferentes medios de cultivo: agar de Sabouraud glucosado (SDA; Pronadisa, Madrid, España), agar con extracto de malta (MEA; Difco, Detroit, USA), agar con infusión de patata y zanahoria (PCA; patata 20 g, zanahoria 20 g, agar 15 g, cloranfenicol 0.05 g, agua 1 l), agar con infusión de patata y glucosa (PDA; Pronadisa), agar avena (OA; Difco, Detroit, USA), agar con extracto de levadura y fitona (PYE; BBL, Cockeysville, USA) y medio de Takashio (TK; glucosa 2 g, peptona 1 g, SO₄Mg 1 g, PO₄H₂K 1 g, agar 20 g, cloranfenicol 1 mg, agua destilada 1 l; pH 7.0; Takashio, 1972).

Las colonias se incubaban a diferentes temperaturas (15°C, 25°C, temperatura ambiente, 37°C y 45°C), observando las características macroscópicas de las mismas a los 7, 14 y 21 días de su inoculación, y determinando las siguientes características:

- Diámetro
- Color (anverso y reverso) mediante el catálogo de Kornerup y Wanscher (1984).
- Textura (algodonosa, pulverulenta, granulosa, aterciopelada,...)
- Topografía (lisa, rugosa, radiada, cerebriforme, plana, elevada,..)
- Márgenes (enteros, fimbriados,...)
- Pigmento difusible (ausencia, presencia y color)
- Gotas de exudado
- Olor

Otras características que ocasionalmente se determinaban eran:

- Resistencia a la cicloheximida (actidiona)

Para determinar la resistencia a la cicloheximida de la cepa fúngica (a concentración 0.04%) se utilizaba medio Mycosel (MYC; Becton Dickinson and Company, Cockeysville, USA).

- Actividad queratinolítica y capacidad de originar órganos perforantes

Para poner en evidencia la capacidad queratinolítica se utilizaban diferentes técnicas:

- Se preparaban placas de Petri estériles que contenían 20 gramos aproximadamente de una mezcla de tierra y crin de caballo esterilizados tres veces en días alternos. A esta mezcla se le inoculaba una suspensión de esporas y micelio del hongo del que se pretendía detectar la capacidad queratinolítica.

- Determinada por la capacidad de digerir los pelos depositados en placas con medio PDA (Sigler y Carmichael, 1976).

- Técnica de Rebell y Taplin (1979). En este método se utilizaban placas de cristal a las que se les añadía 20 ml de agua destilada estéril, 1 ml de extracto de levadura al 10 % (Pronadisa); (previamente esterilizado

por filtración) y fragmentos de pelo humano prepuberal estéril, de aproximadamente 1 cm de longitud. Estas placas se sembraban con una suspensión de esporas de la cepa en estudio y se incubaban a 25 °C. La técnica además permite saber si el hongo es capaz de formar órganos perforantes.

- Actividad celulolítica

Se evaluaba la capacidad de digerir una membrana de celofán colocada en la superficie de una placa de Petri que contenía medio PDA, según el método descrito por Sigler y Carmichael (1976).

3.3.2. Técnicas morfológicas

Para caracterizar microscópicamente los hongos se han estudiado diferentes estructuras: **ascosporas** (color, forma, tamaño, ornamentación), **ascos** (tipo, forma), **ascoma** (color, forma, tamaño), **peridio** (tipo, forma, tamaño), **hifas peridiales** (grado de diferenciación, color, forma, tamaño, ramificación, grosor, ornamentación de la pared), **apéndices** (presencia, color, forma, tamaño, ramificación, grosor, ornamentación de la pared).

Para estudiar las estructuras descritas anteriormente se han utilizado diferentes técnicas.

3.3.2.1. Microscopía óptica

Las muestras fueron observadas con los siguientes microscopios Leitz Dialux 20EB, Leitz Laborlux, Zeiss ZP y Olympus BH2. El sistema que se utilizaba para realizar las microfotografías era una cámara digital Olympus DP10 acoplada a un microscopio Leitz Dialux 20 y el sistema de captación y procesamiento de imágenes es el programa "Analysis" (Soft Imaging System GMBH, Germany).

a. Preparación directa

Con una aguja hipodérmica estéril se recogía una porción de la colonia y se depositaba en un portaobjetos al que previamente se le

colocaba una gota de lactofenol-azul algodón (Panreac). Luego se depositaba un cubreobjetos y se procedía al estudio de dicha preparación. De cada una de las cepas fúngicas se realizaban preparaciones procedentes de los diferentes medios de cultivo.

Para la observación y la documentación gráfica de los mismos, se utilizó el microscopio Olympus BH-2 con dispositivo de contraste de fases y una cámara clara Olympus, para la determinación de la ornamentación de las ascosporas e hifas peridiales se utilizó la técnica de contraste interdifereencial (óptica de Nomarski).

Se utilizaron los objetivos de x4 y x10 para medir y fotografiar los ascomas, utilizándose los objetivos de x40 y x100, para realizar los dibujos de los microcultivos, siendo el último el único empleado en la observación de ascos y ascosporas.

b. Microcultivo

Una vez aislados los hongos en cultivo puro, se estudiaban las características de sus anamorfos, mediante la técnica del microcultivo. En una placa de Petri se depositaban tiras de papel de filtro estériles, sobre las cuales se depositaba un soporte de vidrio (varilla en forma de V o un portaobjetos) y finalmente otro portaobjetos perpendicular al soporte. A continuación se añadía una solución de glicerol al 20 % sobre el papel de filtro, para proveer un grado de humedad suficiente para el crecimiento fúngico. Se cortaban asépticamente bloques de 1 cm² del medio de cultivo mas adecuado (PDA, OA, etc.) y se colocaban sobre el portaobjetos superior, se inoculaban las cuatro aristas superiores de cada uno de estos y se depositaba un cubreobjetos estéril. Cuando se observaba un desarrollo apropiado del hongo, se hacían preparaciones, separando cuidadosamente el cubreobjetos del bloque de agar, y depositándolo sobre otro portaobjetos con líquido de montaje (lactofenol, etc).

3.3.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Diferentes estructuras fúngicas eran observadas mediante el microscopio electrónico de barrido, mayoritariamente las ascosporas, para

poder determinar su ornamentación. Se utilizaron dos técnicas para el montaje y la observación de las muestras:

a. Montaje directo previa desecación de la muestra:

Consistente en un secado al aire de los ascomas que se seccionaban y se depositaban abiertos sobre un portamuestras de aluminio (“*stub*”), al que previamente se le adhería un disco bi-adhesivo de carbono (para mejorar la conducción), quedando así fijados en el portamuestras. Posteriormente se procedía a la metalización de la muestra mediante vaporización de oro para proceder a la observación de la misma; las muestras se introducían en un metalizador Polaron Sputter Coater (Bal-Tec, Liechtenstein), donde se sometían a una atmósfera de gas argón y, siguiendo la técnica de *sputtering* (Echlin y Kaye, 1979) se recubría con una capa de 100-200 nm de espesor.

b. Método del punto crítico

Se siguió la técnica descrita por Figueras y Guarro (1988), que consistía en las siguientes fases:

- *Fijación*

Se seleccionaban las áreas de la colonia con crecimiento óptimo mediante el microscopio estereoscópico, y se cortaban mediante una hoja de bisturí estéril. Las muestras, de unos 5-7 mm de lado, se sumergían en una solución fijadora de 2-glutaraldehído al 2% v/v en tampón fosfato de concentración 0.1 M y pH 7.3-7.4 (Sabatini y col., 1963), contenida en viales de cristal. Para evitar que las muestras flotaran y aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el fijador, se agregaba una gota de Tween 80 (Carroll y Carroll, 1973). Los viales se colocaban dentro de un desecador y se sometían a la acción del vacío, generado por una bomba acoplada, durante una hora (Campbell, 1972; Hanlin, 1982; Rosing, 1982). Posteriormente, las muestras eran separadas del fijador por decantación cuidadosa y se lavaban durante 15 minutos con solución de tampón fosfato 0.1 M. Se llevaba a cabo una fijación secundaria mediante una solución de tetraóxido de osmio (O₄Os) 1% p/v en solución de tampón fosfato 0.1M (Palade, 1952).

· *Deshidratación*

Las muestras se deshidrataban progresivamente mediante concentraciones crecientes de etanol en agua. A continuación se indican dichas concentraciones y el tiempo de exposición durante los sucesivos pases hasta lograr su deshidratación completa:

Solución 30% v/v.....	15 minutos
Solución 50% v/v.....	15 minutos
Solución 70% v/v.....	15 minutos
Solución 80% v/v.....	15 minutos
Solución 90% v/v.....	15 minutos
Solución 96% v/v.....	15 minutos
Solución 100% v/v.....	60 minutos

(renovando el alcohol absoluto cada 20 minutos)

El siguiente paso consistía en la sustitución secuencial del etanol por acetato de amilo, empleando soluciones de concentración crecientes de este último en etanol absoluto. A continuación se describen las concentraciones y el tiempo que se empleaba para lograr dicha sustitución de disolventes.

Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:3 v/v	15 minutos
Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:2 v/v	15 minutos
Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:1 v/v	15 minutos
Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 2:1 v/v	15 minutos
Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 3:1 v/v	15 minutos
Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 4:1 v/v	15 minutos
Acetato de amilo puro	60 minutos

· *Secado*

Para secar las muestras se utiliza la técnica del punto crítico, previa sustitución del agua de la muestra por CO₂ (Anderson, 1953; Bartlet y Burstyn, 1975).

· *Montaje y metalización*

Las muestras ya secas se pegaban a un portamuestras de aluminio mediante plata coloidal o pegamento de secado rápido. Los bordes de la muestra se cubrían con plata coloidal para favorecer su conductividad.

· *Observación y fotografía de las muestras*

Las muestras ya procesadas se examinaban en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400 (Japón) del servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universidad Rovira y Virgili, Reus). Las microfotografías se obtenían empleando la película de 35 milímetros Kodak Tri-X Pan 400 ASA. La distancia de trabajo variaba entre los 8 y los 39 mm. El voltaje aplicado estaba comprendido entre 10 y 20 kV. Actualmente las fotografías se obtienen de forma digitalizada y son enviadas al usuario vía internet en formato .tif o .jpg.

3.4. MÉTODOS MOLECULARES

3.4.1. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN fúngico se han utilizado dos métodos de extracción: la extracción con nitrógeno líquido o bien la extracción con “*Pipette tips*”.

Extracción con nitrógeno líquido. Las cepas se inoculaban en 100 ml de caldo Sabouraud, contenidos en matraces de 250 ml, y se incubaban a 28°C en un agitador orbital a 250 r.p.m. Cuando el cultivo tenía suficiente biomasa se hacía un control de pureza del mismo, inoculando una suspensión del cultivo en placas de Petri con medio OA. El micelio se recuperaba por filtración a través de un tul previamente autoclavado. Se lavaba el micelio con agua destilada estéril, se secaba con papel de celulosa, se procedía a su congelación en nitrógeno líquido

y se pulverizaba con ayuda de un mortero previamente esterilizado en el autoclave. El polvo se incubaba durante una hora a 65°C en 2 ml de tampón de extracción (Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%, pH 8). El lisado era extraído con una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y el ADN se recuperaba mediante precipitación con isopropanol. El precipitado se lavaba con etanol al 70 % v/v, se secaba al vacío en un desecador del tipo DyNA Vap (Lab net, Woodbrige, NJ, USA), resuspendiéndose posteriormente en tampón TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, EDTA 0.1 mM) (Sambrook y col., 1989).

Pipette tips. El ADN fúngico se extraía usando la técnica descrita por Estruch y col., (1989) con algunas modificaciones (Cano y col., 2002-b). Las cepas se hacían crecer a 28°C en 0.8 ml de caldo Sabouraud que se dispensaba en tubos de microcentrifuga (*eppendorfs*) de 1.5 ml de capacidad, en un agitador orbital a 250 r.p.m. Cuando se había generado suficiente biomasa se procedía a hacer un control de pureza del mismo, inoculando una pequeña fracción de esta en placas de Petri con agar OA. El micelio se lavaba con agua destilada estéril para eliminar los restos de medio de cultivo y, después se procedía a su liofilización (Advantage Freeze Dryer, VirTis Company, NY). Posteriormente, el liofilizado se trituraba con la ayuda de unas puntas individuales y estériles que se adaptaban a la forma de la base del *eppendorf* (***pipette tips***), obteniendo así un fino polvo. Éste se resuspendía en 500 µl de tampón de extracción (50 mM TrisHCl pH 7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS) durante una hora a 65°C. El lisado se extraía con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y el ADN se recuperaba mediante precipitación con isopropanol. El pellet se lavaba con etanol al 70%, después se secaba al vacío y se resuspendía en tampón TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, EDTA 0.1 mM).

3.4.2. Amplificación del gen 18S del ARNr

Para la amplificación del fragmento correspondiente al gen 18S del ARNr se utilizaron los cebadores NS1 y NS 24UCB descritos por White y col. (1990) y Gargas y Taylor (1992) (Tabla 5).

Cada reacción de PCR se desarrolló en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción estaba compuesta por 100 mM Tris HCl, 500 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 10 pmol de cada cebador, 2.5 mM de cada desoxiribonucleótido (gene Amp dNTP Mix with dTTP, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.1-10 ng de ADN y 2.5 unidades de *Taq* polimerasa (AmpliTaq DNA polymerase, Applied Biosystems). Para cada reacción de PCR se realizaban controles negativos que contenían agua destilada estéril reemplazando el ADN fúngico.

El protocolo utilizado para la amplificación fue el descrito por Henrion y col. (1994) con algunas modificaciones (Gené y col., 1996). La reacción de PCR constaba de los siguientes pasos: un primer ciclo de desnaturalización de 5 min a 94°C; 30 ciclos, cada uno de los cuales constaba de tres fases: un paso de desnaturalización 1 minuto a 94°C, anillamiento de 1 minuto a 42°C, elongación 3 minutos a 72°C y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C. Las reacciones de amplificación se realizaban en un termociclador Perkin Elmer 2400 (Perkin-Elmer Cetus Co., Emeryville, CA). Una vez terminado el proceso de amplificación se tomaban 2 μ l de cada reacción para visualizar y analizar el producto resultante mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Boehringer Mannheim). Como marcador de peso molecular se usaba una mezcla de los marcadores "DNA molecular weight marker I" y "DNA molecular weight marker II" (Boehringer Mannheim).

El producto de PCR fue purificado mediante el kit GFXTM PCR DNA kit (Amersham biosciences, Piscataway, NJ) y congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.4.3. Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ARNr

Para la amplificación de la región ITS completa (ITS1, ITS2) y el gen 5.8S del ARNr se usaron los cebadores ITS 5 y ITS 4 (Tabla 5), descritos por White y col. (1990). El protocolo usado para la amplificación fue descrito por Gené y col. (1996). El programa de amplificación fue el siguiente: pre-desnaturalización de 5 minutos a 94°C; seguido de treinta ciclos de 30 segundos a 95 °C; 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C; a continuación un paso final de 72°C durante 7 minutos para completar la extensión. Los productos finales se analizaban por electroforesis en geles de agarosa al 2% (agarose MP; Boehringer-Mannheim). Para comprobar el tamaño de los amplificados se añadía en el primer y último pocillo de cada gel el marcador de peso molecular 100 bp Ladder (Invitrogen, Groningen, The Netherlands).

El producto de PCR se purificaba con el GeneClean II kit (Bio 101, Inc. La Jolla, USA), o con el kit comercial *GFXTM PCR DNA and gel band Purification kit* (Amersham Biosciences, NJ. USA.), y se almacenaba a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.4.4. Análisis de restricción

El análisis de restricción se realizó siguiendo el método descrito por de Hoog y col. (2000). Las enzimas que se utilizaron en las digestiones de los amplificados correspondientes al gen 5.8S y a las regiones ITS 1/2 fueron: *Ddel*, *HaeIII*, *Hdell*, *Hhal*, *Hinfl*, *Hpall*, *RsaI* y *TaqI*. Para el gen 18S del ARN ribosomal las enzimas utilizados fueron *Ddel*, *Hdell*, *Hhal*, *Hinfl*, *Hpall*, *RsaI* y *TaqI*. Se añadían 2 U de cada enzima de restricción a 8 µl del amplificado, se incubaban durante 2 h a 37°C. Las digestiones se comprobaban en geles de agarosa al 1.5 al 2% en el caso de los genes 5.8S y 18S respectivamente, durante 2-3h a 4-6 V/cm. Para cada digestión se obtenía un “bandeo” específico. Las longitudes de las bandas esperadas se mostraban en cada caso en forma de un mapa de restricción.

3.4.5. Secuenciación de los productos de la PCR

El protocolo usado para la secuenciación recomendado por la casa comercial, fue el “Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los cebadores ITS5 y ITS4, para secuenciar las regiones ITS y el gen 5.8S del ARNr, mientras que para el gen 18S se usaron los siguientes cebadores: NS1, NS19UCB, NS20UCB, NS21UCB, NS22UCB, NS23UCB y NS24UCB, descritos por White y col. (1990) y Gargas y Taylor (1992) (Tabla 5). La secuenciación se realizó mediante un secuenciador capilar ABIPrism310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Las secuencias consenso se obtenían utilizando el programa Autoassembler (Applied Biosystems).

Tabla 5 Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de las diferentes regiones del ADN ribosomal.

Cebador	Secuencia 5'- 3'	
NS1	GTA,GTC,ATA,TGC,TTG,TCT,C	White y col., 1990
NS19UCB	CCG,GAG,AAG,GAG,CCT,GAG,AAA,C	Gargas y Taylor, 1992
NS20UCB	CGT,CCC,TAT,TAA,TCA,TTA,CG	Gargas y Taylor, 1992
NS21UCB	GAA,TAA,TAG,AAT,AGG,ACG	Gargas y Taylor, 1992
NS22UCB	AAT,TAA,GCA,GAC,AAA,TCA,CT	Gargas y Taylor, 1992
NS23UCB	GAC,TCA,ACA,CGG,GGA,AAC,TC	Gargas y Taylor, 1992
NS24UCB	AAA,CCT,TGT,TAC,GAC,TTT,TA	Gargas y Taylor, 1992
ITS5	GGA,AGT,AAA,AGT,CGT,AAC,AAG,G	White y col., 1990
ITS4	TCC,TCC,GCT,TAT,TGA,TAT,GC	White y col., 1990

3.4.6. Alineamiento de secuencias

Las secuencias se alineaban utilizando el programa informático alineamiento múltiple Clustal W (versión 1.5) (Thompson y col., 1994) y Clustal X (Thompson y col., 1997). Los alineamientos se corrigieron

visualmente mediante procesador de textos cuando fue necesario. El porcentaje de similitud de las secuencias alineadas se calculó manualmente, estableciendo la diferencia de caracteres entre dos secuencias dividido por el total de caracteres. Los resultados se mostraban en forma de matriz de porcentajes de similitud entre secuencias (Tabla 6).

Tabla 6. Ejemplo de los porcentajes de similitud entre secuencias del gen 18S ARNr entre diferentes especies.

	<i>Aphanoascus fulvescens</i>	<i>Uncinocarpus reesii</i>	<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	<i>Auxarthron conjugatum</i>	<i>Ctenomyces serratus</i>	<i>Gymnoascus marginosporus</i>	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	<i>Amaurascopsis perforatus</i>
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Uncinocarpus reesii</i>	98.7	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	98.8	98.3	-	-	-	-	-	-
<i>Auxarthron conjugatum</i>	98.2	97.9	97.7	-	-	-	-	-
<i>Ctenomyces serratus</i>	97.5	96.8	96.8	97.0	-	-	-	-
<i>Gymnoascus marginosporus</i>	96.7	96.5	96.4	96.2	97.0	-	-	-
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	97.6	97.5	97.3	97.2	97.4	97.4	-	-
<i>Amaurascopsis perforatus</i>	97.0	96.7	96.9	96.4	96.9	96.6	97.3	-

3.4.7. Depósito y obtención de secuencias de bases de datos internacionales

Todas las secuencias obtenidas durante el desarrollo de esta tesis doctoral han sido depositadas en la base de datos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y GenBank. Otras secuencias empleadas en la misma han sido obtenidas de dichas bases de datos a

través de Internet mediante la siguiente página:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.4.8. Análisis filogenético

A partir de la alineación de las secuencias nucleotídicas de las diferentes cepas estudiadas y correspondientes a las regiones (ITS1-ITS2 gen 5.8S y 18S), se efectuó el análisis filogenético para tratar de reconstruir las relaciones evolutivas existentes entre las mismas. Por este motivo se utilizaron diferentes métodos.

3.4.8.1. Método de las distancias genéticas, o Neighbour-joining

Se tomaron los alineamientos y se analizaron mediante el programa MEGA 2.1 (Kumar y col., 2001), utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980), incluyendo las transiciones y transversiones. Los valores de confianza para cada agrupamiento se determinan con el análisis de “bootstrap” (1000 replicas) (Felsenstein, 1985).

3.4.8.2. Método de máxima parsimonia (basado en caracteres conservados)

Se aplicó el método de máxima parsimonia utilizando para ello el programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) en su versión 3.1.1. (Swofford, 1991) con la opción de búsqueda heurística bajo las siguientes condiciones: adicción de secuencias simple con la estrategia del *stepwise addition* y del *branch swapping algorithm* a través del TBR (tree-bisection reconnection). La fiabilidad de los agrupamientos se evaluó mediante el índice de bootstrap (300 réplicas).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha realizado un estudio taxonómico sobre los hongos queratinofílicos, concretamente de los pertenecientes al orden Onygenales. Como se ha detallado anteriormente, el orden Onygenales ha sido tratado por diferentes autores, pero los trabajos más importantes por sus propuestas taxonómicas han sido Currah (1985) y v. Arx (1987). Los criterios morfológicos aplicados por estos autores no eran coincidentes, por lo que la ubicación taxonómica de algunos géneros no está bien definida. Estudios moleculares posteriores, utilizando un número representativo de cepas recientemente aisladas, cepas tipo y de referencia han aportado nuevos criterios objetivos que, en algunos casos, han permitido clarificar la sistemática de alguno de estos géneros, y establecer nuevas propuestas taxonómicas.

Concretamente el presente estudio se ha centrado en los géneros *Amauroascus*, *Auxarthron* y *Gymnoascus*, todos ellos conteniendo numerosas especies, además de otros géneros morfológicamente relacionados. También se proponen los nuevos géneros *Castanedomyces* y *Pseudoamauroascus* para el orden Onygenales en base a los aislamientos procedentes de diferentes regiones geográficas.

4.1. **Molecular phylogeny of *Amauroascus*, *Auxarthron* and morphologically similar onygenalean fungi.** Solé M., Cano J. & Guarro J. *Mycological Research* 106: 388-396 (2002).

Molecular phylogeny of *Amauroascus*, *Auxarthron*, and morphologically similar onygenalean fungi

Maria SOLÉ, Josep CANO* and Josep GUARRO

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain.
 E-mail: jfel@astor.urv.es

Received 14 May 2001; accepted 10 January 2002.

Phylogenetic analyses of nucleotide data from the ITS and 5.8S rDNA gene region were performed on 37 strains of *Onygenales* representing all the accepted species of *Auxarthron* (9 strains), several species of *Amauroascus* (16 strains), and morphologically similar genera (3 strains of *Amauroscopsis*, 1 of *Apinisia*, 1 of *Shanorella*, 1 of *Mallochia*, 2 of *Nannizziopsis*, 1 of *Pectinotrichum*, and 3 of *Uncinocarpus*). The inferred phylogeny provided strong support for the monophyly of *Auxarthron*. We propose the new combinations *Auxarthron kuehnii* and *A. pseudoreticulatum* comb. nov. and provide a key to the accepted species of *Auxarthron*. Although this study demonstrated that *Amauroascus* is polyphyletic, relationships among the members of that genus could not be resolved in phylogenies inferred from the analyses of ITS sequences; the new combination *A. queenslandicus* comb. nov. is also proposed. Molecular data suggested that *Amauroscopsis reticulatus*, characterised by the absence of discrete ascomata and prominently echinulate ascospores, can be accommodated in *Mallochia*.

INTRODUCTION

The order *Onygenales* encompasses a large group of ascomycetes that usually grow on keratinous substrates. Some, the dimorphic fungi, are involved in severe human infections. The most comprehensive taxonomic revision of this group was by Currah (1985). Since then, however, numerous new taxa have been described and the taxonomy of these fungi has become more complex. New molecular techniques have contributed greatly to a better understanding of the phylogenetic relationships of these fungi (Sugiyama, Ohara & Mikawa 1999, de Hoog *et al.* 1998, Grasser *et al.* 1999, Vidal *et al.* 2000). However, some taxa of *Onygenales* still seem artificial and more work is required to ascertain natural relationships within this group.

Two of the largest and most complex genera are *Auxarthron* and *Amauroascus*. Both genera are similar morphologically and the boundaries between them are not clear, as some intermediate species exist. Currently there are seven species accepted in *Auxarthron* (Currah 1985) and 12 in *Amauroascus* (Currah 1985, Ito & Nakagiri 1995, Cano *et al.* 1996, Udagawa & Uchiyama 1999a, b).

Auxarthron includes a more or less homogeneous group of very similar species. Their ascomata are usually globose, with a peridium formed by a network

of interwoven, thick-walled hyphae, sometimes with long appendages. Their ascospores are spherical or oblate measuring 2.5–5 µm diam. The species are only differentiated by the type and length of ascomatal appendages. In contrast, *Amauroascus* is a heterogeneous group that includes species with ascospores with different types of ornamentation and ascomata with peridial hyphae that are variable in pigmentation and degree of differentiation with respect to the vegetative hyphae. Some species, such as *A. pseudoreticulatus*, *A. kuehnii*, and *Auxarthron pseudoauxarthron*, show intermediate features between these two genera (Currah 1985, Cano & Guarro 1989, Currah 1994). A few other genera, such as *Mallochia*, *Nannizziopsis*, *Amauroscopsis* and *Apinisia*, include species with similar features, which causes confusion in the delineation of these taxa.

In this study we analysed the nucleotide sequences of the ITS regions of the rDNA genes of 37 strains belonging to all the current species of *Auxarthron*, representative species of *Amauroascus*, and morphologically similar genera in order to establish a classification scheme based on their phylogenetic relationships.

MATERIAL AND METHODS

Strains

The strains used in this study, and their EMBL accession

* Corresponding author.

Table 1. Species of *Auxarthron* and *Amauroascus* and related genera used in this study.

Species	Strain	GenBank accession no.
<i>Amauroscopsis perforatus</i>	RV ¹ 24813 (T ²)	AJ 390377
<i>A. reticulatus</i>	IFO ³ 9196	AJ 271434
<i>A. reticulatus</i>	CBS ⁴ 392.61 (T)	AJ 271418
<i>Amauroascus aureus</i>	CBS 593.71	AJ 271431
<i>A. aureus</i>	IMI ⁵ 151274 (T)	AJ 271433
<i>A. kuehnii</i>	UAMH ⁶ 3115	AJ 271422
<i>A. kuehnii</i>	RV 22810	AJ 271424
<i>A. kuehnii</i>	FMR ⁷ 4053	AJ 271427
<i>A. kuehnii</i>	FMR 4054	AJ 271428
<i>A. kuehnii</i>	CBS 539.72 (T)	AJ 271417
<i>A. nutatus</i>	IFO 32600	AJ 271565
<i>A. nutatus</i>	CBS 181.70 (T)	AJ 271567
<i>A. niger</i>	IFO 32599 (T)	AJ 271563
<i>A. ablutus</i>	UAMH 2296	AJ 271421
<i>A. pseudoreticulatus</i>	UAMH 3569	AJ 271423
<i>A. pseudoreticulatus</i>	UAMH 3117 (T)	AJ 271420
<i>A. purpureus</i>	IFO 32622 (T)	AJ 271564
<i>A. volatilis-patellis</i>	IMI 155647	AJ 390378
<i>Amauroascus</i> sp.	RV 24809	AJ 271425
<i>Apinisia racovitzae</i>	CBS 151.65	AJ 271429
<i>Auxarthron californense</i>	UAMH 18891	AF 038352
<i>A. compactum</i>	CBS 200.64 (T)	AJ 271574
<i>A. conopogonum</i>	UAMH 3519	AJ 271573
<i>A. pseudoauxarthron</i>	IFO 31701 (T)	AJ 271572
<i>A. reticulatum</i>	UAMH 2006	AJ 271568
<i>A. thaxteri</i>	UAMH 3912 (T)	AJ 271571
<i>A. zuffianum</i>	IMI 76603	AJ 271570
<i>A. zuffianum</i>	UAMH 4566 (T)	AJ 271569
<i>A. sp.</i>	RV 26652	AJ 271426
<i>Mallochia echinulata</i>	IFO 9192	AJ 271562
<i>Namazziopsis albicans</i>	IMI 155645	AJ 271432
<i>N. vriesii</i>	CBS 407.71 (T)	AJ 131687
<i>Pectinatrichum lanense</i>	IMI 160413 (T)	AJ 390391
<i>Shanorella spirotricha</i>	CBS 305.56 (T)	AJ 271430
<i>Uncinocarpus vesicii</i>	IMI 211205	AJ 271419
<i>Uncinocarpus vesicii</i>	CBS 121.77 (T)	AJ 271566
<i>Uncinocarpus queenslandicus</i>	IMI 121675	AJ 390394

¹ RV, Institute de Medicine Tropicale 'Prince Léopold'.

² T, isolates derived from type specimen.

³ IFO, Institute for Fermentation Osaka.

⁴ CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

⁵ IMI, CABI Bioscience, Egham.

⁶ UAMH, University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton.

⁷ FMR, Facultad Medicina de Reus, Reus.

numbers, are listed in Table 1. When available, ex-type or authentic strains were used.

Morphological methods

The strains were grown on different media: Sabouraud dextrose agar (SDA; Pronadisa, Madrid, Spain), oatmeal agar (OA; Difco, Detroit.), potato carrot agar (PCA; potato 20 g, carrot 20 g, agar 15 g, chloramphenicol 0.05 g, water 1 l), potato dextrose agar (PDA; Pronadisa), phytone yeast extract agar (PYE; BBL, Cockeysville), and malt extract agar (MEA; Difco). Tolerance to cycloheximide (0.04%) was tested using the Mycosel medium (MYC; BBL, Cockeysville, USA). Keratinolytic capacity was determined after Ajello &

George (1957). The morphological structures were measured on water and lactophenol. Scanning electron microscopy (SEM) techniques were according to Figueras & Guarro (1988).

Molecular methods

DNA extraction

Fungal DNA was isolated as described by Estruch *et al.* (1989) with some modifications (Guillamón *et al.* 1996).

DNA amplification

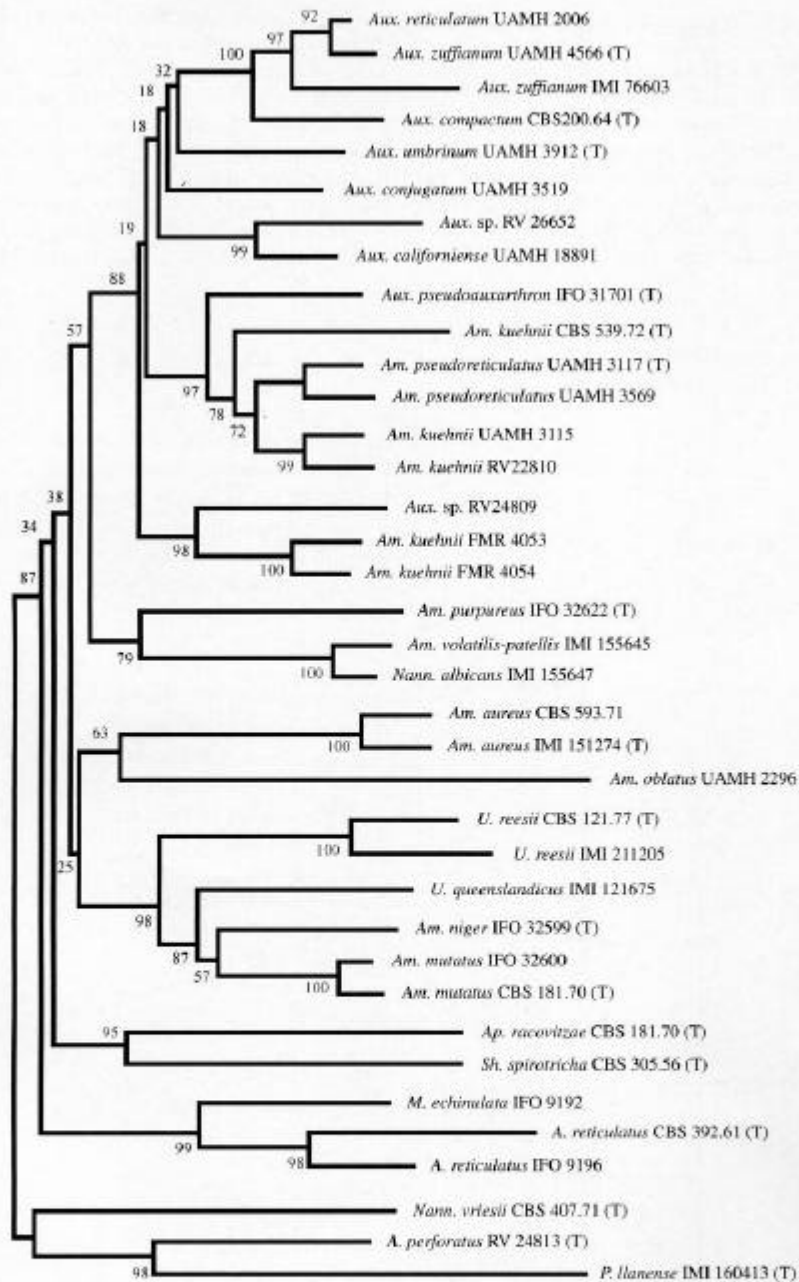
The fragment of the rDNA corresponding to the 5.8S gene and the ITS1 and ITS2 regions was amplified with the primers ITS-5 and ITS-4 (White *et al.* 1990) employing the protocol described by Henrion, Chevalier & Martin (1994) and modified by Gené *et al.* (1996). The products were purified using a GFX™ PCR DNA purification kit (Pharmacia Biotech) and stored at -20 °C until used in sequencing.

Sequencing analysis

The protocol for sequencing was the 'Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit' (Applied Biosystems, Gouda). Reactions were performed using the primers ITS-5 and ITS-4 and were run on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Consensus sequences were obtained using the Autoassembler program (Applied Biosystems). Sequences were aligned with Clustal W (version 1.5) program (Thompson, Rutherford & Bridge 1994). Adjustments for improvement were made by eye where necessary. Sequences have been deposited in the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and their accession numbers are listed in Table 1.

Phylogenetic analysis

Cladistic analyses using the neighbour-joining method (NJ) (Saitou & Nei 1987) were performed with the MEGA 1.0 computer program (Kumar, Tamura & Nei 1993), with Kimura 2-parameter model, including transitions and transversions and with pairwise deletion for the treatment of the handling gaps/missing data. Confidence values for individual branches were determined by bootstrap analyses (1000 replicates) (Swofford 1991). In the maximum parsimony analysis (MP) we used the PAUP software (version 3.1.1.). Heuristic searches were conducted under the following conditions: simple addition sequence with tree-bisection reconnection (TBR) branch swapping algorithm, starting trees obtained by stepwise addition, MULPARS option in effect, steepest descent option not in effect, MAXTREES setting 100, and branches having minimum length zero allowed to collapse yielding polytomies. Branch robustness was evaluated using 300 bootstrap replicates.



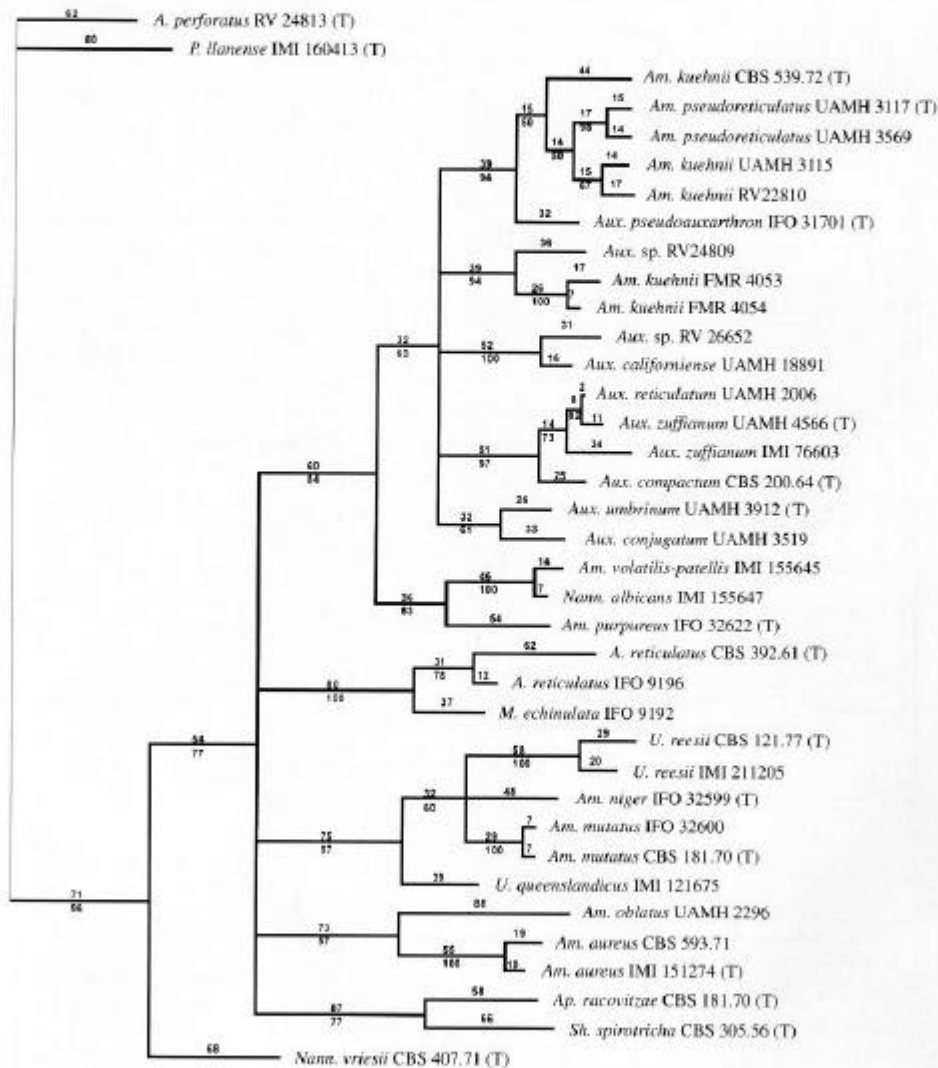
A., *Amaurascopsis*; *Am.*, *Amauroascus*; *Ap.*, *Apinisia*; *Aux.*, *Auxarthron*; *M.*, *Mallochia*; *Nann.*, *Nannizziopsis*; *P.*, *Pectinotrichum*; *Sh.*, *Shanorella*; *U.*, *Uncinocarpus*.

Fig. 1. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences from the gene 5.8S rDNA and ITS regions of species listed in Table 1. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap replication frequencies (1000 replications) are indicated at the internodes.

RESULTS AND DISCUSSION

The sequence similarity (S) among the species tested ranged from 75.4% (*Amauroascus* sp. RV 24809–*A. oblatum*) to 98.2% (*Auxarthron reticulatum*–*A. zuffianum*) (Table 2). The molecular analysis revealed that the genera with more than one species included in this study were polyphyletic (Figs 1–2), with the exception of *Auxarthron* (i.e. *Amauroascus*, *Amauroscopsis*, *Mallochia*, *Nannizziopsis*, and *Uncinocarpus*). That all

species of *Auxarthron* were included in a unique clade that received a bootstrap support of 88% in the NJ analysis is not surprising as all the species share very distinctive features (e.g. differentiated peridial hyphae and globose or oblate, reticulate ascospores). The heuristic search of the data produced the most parsimonious tree (Fig. 2) with the following parameters: tree length = 2302 steps, consistency index (CI) = 0.403, retention index (RI) = 0.483, rescaled consistency index (RC) = 0.195 and homoplasy index (HI)



A., *Amauroscopsis*; *Am.*, *Amauroascus*; *Ap.*, *Apinisia*; *Aux.*, *Auxarthron*; *M.*, *Mallochia*; *Nann.*, *Nannizziopsis*; *P.*, *Pectinotrichum*; *Sh.*, *Shanorella*; *U.*, *Uncinocarpus*.

Fig. 2. Parsimony heuristic phylogram obtained for 5.8S and ITS regions of species in Table 1. Bootstrap probability (300 replicates) is indicated below internodes and bp differences is indicated above internodes and branches. The tree statistics for the analysis are as follows: tree length = 2302 steps; consistency index (CI) = 0.403; retention index (RI) = 0.483, rescaled consistency index (RC) = 0.195 and homoplasy index (HI) = 0.597.

= 0.597; also the clades observed yielded similar results (i.e. the seven species of *Auxarthron* were placed in the same clade, with a bootstrap score of 65%). From their morphology, other strains that are currently considered to belong to *Amauroascus* spp. were also expected to be included in this clade. Two strains of *A. pseudoreticulatus* (UAMH 3117, UAMH 3569) were nested in this group together with the ex-type strain of *A. kuehni* (CBS 539.72) and two of the four strains previously identified as *A. kuehni* (UAMH 3115 and RV 22810). All of these formed a subclade which received a bootstrap support of 78% in the NJ analysis. The other two strains of *A. kuehni*, FMR 4053 and FMR 4054, formed another subclade together with the strain *Auxarthron* sp. RV 24809. A detailed morphological study of these five strains confirmed the molecular results, i.e. they show some morphological differences and probably do not represent a single species.

Although further studies are needed, *Amauroascus kuehni* is probably a complex taxon which requires a more precise definition to avoid confusion with morphologically similar species such as *A. pseudoreticulatus* and *Auxarthron pseudoauxarthron*. The close relationships of *Amauroascus pseudoreticulatus* and *A. kuehni* with *Auxarthron* species have been pointed out by other authors (Currah 1985, 1994, Cano & Guarro 1989).

From our molecular results and taking into account morphological criteria we propose the following new combinations.

***Auxarthron kuehni* (Arx) Solé, Cano & Guarro, comb. nov.**

Amauroascus kuehni Arx, *Persoonia* 6: 376 (1971).
Arachnotus reticulatus Kuehn, *Mycologia* 49: 57 (1957).

***Auxarthron pseudoreticulatum* (Currah) Solé, Cano & Guarro, comb. nov.**

Key to the genus *Auxarthron*

1	Ascomatal appendages longer than 150 µm	2
	Ascomatal appendages shorter than 150 µm or absent	5
2(1)	Ascospores globose	3
	Ascospores oblate	4
3(2)	Peridial cells measuring 4–12 × 4–5 µm; peridial projections with truncate ends; absence of diffusing pigment in culture	compactum
	Peridial cells measuring 12–24 × 2.5–3.5 µm; peridial projections with both truncate and acute ends; production of red diffusing pigment in culture	umbrinum
4(2)	Peridial appendages 72–375 µm long, with uncinuate ends; peridial hyphae 4.5–6 µm wide	californiense
	Peridial appendages 226–1550 µm long, straight, unbranched or hooked; peridial hyphae 2–3.5 µm wide	conjugatum
5(1)	Ascomatal appendages up to 150 µm long	6
	Ascomatal appendages absent	7
6(5)	Ascospores 2.5–3.5 µm in diam. Peridium formed by a lax network of finely asperulate hyphae; anamorph lacking	pseudoauxarthron
	Ascospores 5–6 µm in diam. Peridium formed by differentiated, closely anastomosed smooth hyphae; anamorph rarely observed	Malbranchea pseudoreticulatum
7(5)	Ascomata with peridial spine-like projections	8
	Ascomata without peridial projections	kuehni
8(7)	Peridial projections with blunt ends, 10–21 µm long	reticulatum
	Peridial projections with acute ends, 27–40 µm long	zuffianum

Amauroascus pseudoreticulatus Currah, *Mycotaxon* 24: 136 (1985).

At present the genus *Auxarthron* comprises nine species and the key is proposed for their identification.

The greater heterogeneity of *Amauroascus*, predicted by the morphological diversity of its species, was clear from the topology of the trees. The nine species of the genus included in the analysis were placed in five different clades interspersed with species of other genera. However, the relationships between the different clades were not resolved. Some of the resulting clades received only very weak bootstrap support. Two species, as mentioned above, were in the *Auxarthron* clade: *Amauroascus volatilis-patellis* clustered with *Nannizziopsis albicans* and *A. purpureus* to form a fairly well supported clade (79% in MP and NJ). However, the subclade made up of the two former species received a bootstrap support of 100% with both methods and the ITS sequences of the two strains are only differentiated in 21 nucleotide substitutions. This agrees with the similarity of the main morphological features of these two taxa. They share globose and hyaline ascospores, a poorly differentiated peridium and a *Chrysosporium* anamorph. Therefore, there are no consistent differences between these two species to maintain them in separate genera. *Nannizziopsis albicans* had previously been included in *Amauroascus* and *Arachnotheca*. However, Guarro, Cano & de Vroey (1991), underlining the taxonomic importance of the lack of pigmentation of its ascospores, placed this species in the *Nannizziopsis*. The same authors left *Amauroascus volatilis-patellis* within *Amauroascus* because its ascospores were considered slightly pigmented (Guarro *et al.* 1991). The phylogenetic relationships of the two species with *A. purpureus*, shown in this study, are surprising because this species has very peculiar characteristics that are unique to the genus, such as purple ascospores and ascospores with frilled rims. It was isolated recently

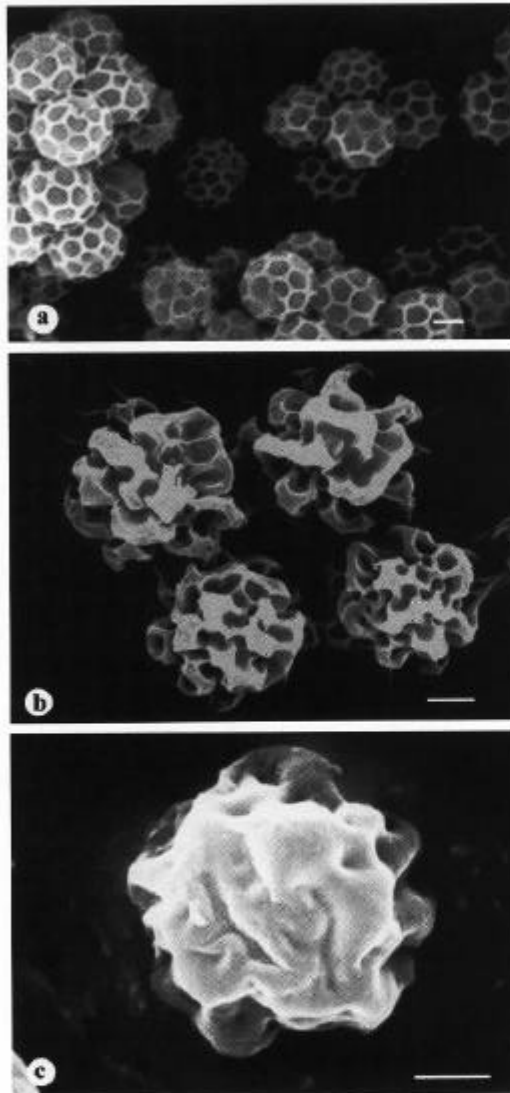


Fig. 3. a, *Auxarthron kuehni* (UAMH 3115), ascospores (SEM). b, *Amauroascus niger* (IFO 32599), ascospores (SEM). c, *Mallochia reticulata* (IFO 9196), ascospores (SEM). Bars = 1 μ m.

from a cultivated soil sample in Japan (Ito & Nakagiri 1995) and so far only this strain exists. The type species of *Nannizziopsis*, *N. vriesii*, appeared widely separated from *N. albicans*, so that genus clearly seems artificial. *Amauroascus niger*, the type species of *Amauroascus*, together with two strains of *A. mutatus*, were placed in the same clade as *Apinisia queenslandica*. This group, with a high bootstrap score (87% NJ), was sister to a clade formed by the two strains of *Uncinocarpus reesii*. In the MP analysis, all these species were in the same clade with a high bootstrap support (97%). *Apinisia queenslandica* was recently placed in *Uncinocarpus*

(Sigler, Flis & Carmichael 1998). However, in our study this species exhibits a greater number of bp differences from *Uncinocarpus reesii* (115 bp of difference) than from *Amauroascus niger* (88 bp of difference). *A. niger* (Fig. 3b) and *A. mutatus* (Currah 1985: fig. 40a) have ascospores with pronounced protrusions similar to those of *Apinisia queenslandica* (Sigler *et al.* 1998: fig. 6) and different from those of the other species of *Amauroascus*, which are reticulate (Fig. 3b). It therefore seems logical to include *Apinisia queenslandica* within *Amauroascus* and that this genus should be limited to those species with this type of ascospores. Consequently, the following new combination is proposed:

Amauroascus queenslandicus (Apinis & R. G. Rees) Solé, Cano & Guarro, *comb. nov.*

Apinisia queenslandica Apinis & R. G. Rees, *Trans. Br. mycol. Soc.* **67**: 524 (1976).

Brauniospora reticulata Guarro & Punsola, *Persoonia* **13**: 387 (1987).

Uncinocarpus queenslandicus (Apinis & R. G. Rees) Sigler, *Can. J. Bot.* **76**: 1632 (1998).

Uncinocarpus thus becomes monotypic with *U. reesii*, which has discoid ascospores, as the only species. Vidal *et al.* (2000) have recently suggested excluding the third species, *U. orissi*, arguing a closer phylogenetic relationship with *Aphanoascus*.

In our study, *Amauroascus aureus* (2 strains) and *A. oblatius* constituted a separate cluster that received only weak support (63% NJ) and which was not significantly separated from the other clades. *Apinisia racovitzae* and *Shanorella spirotrichia* also formed a clade that was highly supported by the NJ method (95%) and quite well supported by the MP method (77%). Both species have ascomata with helicoidal peridial hyphae and can be differentiated from each other by the morphology of their peridia.

The peridium of *Shanorella* is pale yellow and formed by septate, thick-walled, smooth cells, which disarticulate at maturity, while that of *Apinisia* constitutes an envelope of thin-walled hyphae that lack any obvious differentiation from the vegetative hyphae. They can also be distinguished by the morphology of their ascospores. In *A. racovitzae* they are globose, thick-walled and finely and irregularly punctate-reticulate, while in *Shanorella*, they are oblate and minutely pitted.

Our study also revealed that there is a close relationship between *Mallochia echinulata* and *Amauroscopsis reticulatus*. Together they formed a consistent clade (99% NJ and 100% MP). This agreed with the morphology of these species. In both, ascomata are absent and the asci are formed in small, mostly irregular areas in the fasciculate mycelial mat. In addition, the ascospores are ornamented with prominent blunt, cone-shaped spines (Currah 1985: fig. 41b), which are features that have never been observed in the other species of *Amauroascus*. Guarro, Gené & de Vroey (1992) included *A. reticulatus* in *Amauroscopsis* on the basis of the

sheath that surrounds the ascospores (Fig. 3c), which was considered typical for this genus. However, in our phylogenetic trees the type species of *Amauroscopsis*, *A. perforatus*, and *A. reticulatus* are placed distant from each other, suggesting that the two species are probably not congeneric. A more detailed examination of these species confirm that the main morphological features of *Amauroscopsis reticulatus* are closer to *Mallochia* than *Amauroscopsis*, accordingly the following new combination is proposed:

***Mallochia reticulata* (Kuehn & Goos) Solé, Cano & Guarro, comb. nov.** (Fig. 3c)

Pseudoarachniotus reticulatus Kuehn & Goos, *Mycologia* **52**: 40 (1960).

Amauroascus reticulatus (Kuehn & Goos) Arx, *Persoonia* **6**: 375 (1971).

Amauroscopsis reticulatus (Kuehn & Goos) Guarro & Gené, *Mycotaxon* **45**: 174 (1992).

Pectinotrichum llanense was clearly separated from the other species studied using both methods of sequence analysis. This species is morphologically similar to *Auxarthron*, characterised by ascomata formed by peridial hyphae enlarged at septa, pectinate formations directed toward the outside of the peridium and globose to ovoid, smooth ascospores. Currah (1994) considered this species to belong to *Auxarthron*. However, this study and that of Sugiyama *et al.* (1999) do not agree with this statement and support its placement in a separate genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundació Ciència i Salut, Reus, Spain. We wish to thank the curators of the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), Institute for Fermentation Osaka (IFO), Cabi Bioscience, Surrey, UK (IMI), Centraalbureau voor Schimmecultures (CBS), Institute de Medicine Tropicale "Prince Léopold" (RV) and K. Ullig (Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice, Poland) for providing strains.

REFERENCES

- Ajello, L. & George, L. K. (1957) *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* **8**: 3-17.
- Arx, J. A. von. (1971) On *Arachniotus* and related genera of the *Gymnoascaceae*. *Persoonia* **6**: 371-380.
- Arx, J. A. von. (1986) *Mallochia*, a new genus of the *Eurotiales*. *Persoonia* **13**: 185-188.
- Cano, J. & Guarro, J. (1989) Two new keratinophilic ascomycetes from Spain. *Studies in Mycology* **31**: 61-67.
- Cano, J., Vidal, P., Guarro, J., Castañeda Ruiz, R. F. & de Vroey, C. H. (1996) Three new species of *Amauroascus* from tropical regions. *Mycological Research* **100**: 343-348.
- Currah, R. S. (1985) Taxonomy of the *Onygenales*: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. *Mycotaxon* **24**: 1-216.
- Currah, R. S. (1988) An annotated key to the genera of the *Onygenales*. *Systema Ascomycetum* **7**: 339-350.
- Currah, R. S. (1994) Peridial morphology and evolution in the protunicate ascomycetes. In *Ascomycete Systematics* (D. L. Hawksworth, ed.): 281-293. Plenum Press, New York.
- Estruch, J. J., Antuña, C., Ferrer, S. & Ramón, D. (1989) Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. *Revista Iberica de Micología* **6**: 62-66.
- Figueras, M. J. & Guarro, J. (1988) A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* **80**: 298-306.
- Gené, J., Guillamón, J. M., Guarro, J., Pujol, I. & Ullig, K. (1996) *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterisation and antifungal susceptibility. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 49-57.
- Gräser, Y., El Fari, M., Vilgaly, R., Kuijpers, A. F. A., de Hoog, G. S., Presber, W. & Tietz, H.-J. (1999) Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Medical Mycology* **37**: 105-114.
- Guarro, J., Cano, J. & de Vroey, C. (1991) *Nannizziopsis* (*Ascomycotina*) and related genera. *Mycotaxon* **42**: 193-200.
- Guarro, J., Gené, J. & de Vroey, C. (1992) *Amauroscopsis*, a new genus of Eurotiales. *Mycotaxon* **45**: 171-178.
- Guillamón, J. M., Cano, J., Ramón, D. & Guarro, J. (1996) Molecular differentiation of *Keratinomyces* (*Trichophyton*) species. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 223-227.
- Henion, B., Chevalier, G. & Martin, F. (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* **98**: 37-43.
- Hoog, G. S., de Bowman, B., Gräser, Y., Haase, G., El Fari, M., Gerrits van den Ende, A. H. G., Melzer-Krick, B. & Untereiner, W. A. (1998) Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. *Medical Mycology* **36**: 52-56.
- Ito, T. & Nakagiri, A. (1995) *Amauroascus purpureus*, a new species of the *Amauroascaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon* **55**: 347-352.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (1993) *MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis*. Version 1.0. Pennsylvania State University Park, PA.
- Orr, G. F., Kuehn, H. H. & Plunkett, O. A. (1963) A new genus of the *Gymnoascaceae* with swollen peridial septa. *Canadian Journal of Botany* **41**: 1439-1456.
- Orr, G. F. & Kuehn, H. H. (1971) Notes on *Gymnoascaceae*. I. A review of eight species. *Mycologia* **63**: 1-190.
- Orr, G. F. & Kuehn, H. H. (1972) Notes on *Gymnoascaceae*. II. Some *Gymnoascaceae* and keratinophilic fungi from Utah. *Mycologia* **64**: 55-72.
- Rammeloo, J. (1982) *Onygena mutata* Quélet, an earlier name for *Amauroascus verrucosus* (Eidam) Schroeter (*Gymnoascaceae*). *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* **52**: 241-243.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Samson, R. A. (1972) Notes on *Pseudogymnoascus*, *Gymnoascus* and related genera. *Acta Botanica Neerlandica* **21**: 517-527.
- Schroeter, J. (1893) *Die Pilze Schlesiens*. Kryptogamen-Flora. *Schelesien* **3**: 210-213.
- Sigler, L., Flis, A. L. & Carmichael, J. W. (1998) The genus *Uncinocarpus* (*Onygenaceae*) and its synonym *Brunneaospora*: new concepts, combinations and connections to anamorphs in *Chrysosporium*, and further evidence of relationship with *Coccidioides immitis*. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1624-1636.
- Sugiyama, M., Ohara, A. & Mikawa, T. (1999) Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequence. *Mycoscience* **40**: 251-258.
- Swofford, D. L. (1991) *PAUP: phylogenetic analysis using parsimony*. Version 3.1.1. Distributed by Illinois of Natural History Survey.
- Thompson, V., Rutherford, M. A. & Bridge, P. D. (1994) Molecular differentiation of two races of *Fusarium oxysporum*. *Letters Applied Microbiology* **18**: 193-196.

Molecular phylogeny of onygenalean fungi

396

- Udagawa, S. & Uchiyama, S. (1999a) Taxonomic studies on new or critical fungi of non-pathogenic *Onygenales* 1. *Mycoscience* **40**: 277-290.
- Udagawa, S. & Uchiyama, S. (1999b) Taxonomic studies on new or critical fungi of non-pathogenic *Onygenales* 2. *Mycoscience* **40**: 291-305.
- Vidal, P., Vinuesa, M., Sánchez-Puelles, J. M. & Guarro, J. (2000) Phylogeny of the anamorphic genus *Chrysosporium* and related taxa based on rDNA internal transcribed spacer sequences. In *Biology of the Dermatophytes and the Other Keratinophilic Fungi* (R. S. K. Kushwaha & J. Guarro, eds): 22-29. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to the methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. Sninsky & T. J. White, eds): 315-322. Academic Press, New York.

Corresponding Editors: R. S. Currah & D. L. Hawksworth

4.1. Filogenia molecular de los géneros *Amauroascus*, *Auxarthron* y otros géneros relacionados morfológicamente

Objetivo: Este trabajo se centra en el análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S del ARNr de 37 cepas de Onygenales, 9 de las cuales pertenecían a especies del género *Auxarthron*, algunas especies representativas del género *Amauroascus* (16 cepas) y otros géneros morfológicamente relacionados (*Amauroscopsis*, *Apinisia*, *Mallochia*, *Nannizziopsis*, *Pectinotrichum*, *Shanorella* y *Uncinocarpus*), para establecer las relaciones filogenéticas existentes entre ellos.

Artículo: “**Molecular phylogeny of *Amauroascus*, *Auxarthron*, and morphologically similar onygenalean fungi**”. Maria Solé, Josep Cano & Josep Guarro. *Mycological Research* 106: 388-396 (2002).

En el estudio de la región 5.8S y los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 del ADNr de los géneros *Amauroascus* y *Auxarthron* se ha puesto de manifiesto que ambos son genéticamente muy próximos. Los géneros con más de una especie, incluidos en este estudio y morfológicamente relacionados con *Auxarthron*, han resultado ser claramente polifiléticos, mientras que el género *Auxarthron* es claramente monofilético, ya que todas las especies se encuentran en la misma rama o agrupamiento, con un elevado soporte estadístico (índice de *bootstrap* del 88%). Dentro de este agrupamiento se incluyeron también dos especies que previamente habían sido consideradas problemáticas por sus características morfológicas, y que tradicionalmente han sido incluidas en el género *Amauroascus*: *A. kuehnii* y *A. pseudoreticulatus*. Según nuestros resultados, debemos considerar que estas dos especies pertenecen al género *Auxarthron*, ya que estas se encuentran mucho más próximas tanto genética como morfológicamente a la especie tipo del género *Auxarthron* que a la del género *Amauroascus*. En consecuencia, hemos propuesto las siguientes nuevas combinaciones:

Auxarthron kuehnii (Arx) Solé, Cano y Guarro y *Auxarthron pseudoreticulatum* (Currah) Solé, Cano y Guarro, incluyéndose un total de nueve especies en el género *Auxarthron* de las cuales se detalla una clave de identificación.

También se detectó una gran heterogeneidad a nivel molecular y morfológico de las cepas incluidas dentro de la especie *Amauroascus kuehnii*, discutiendo la necesidad de llevar a cabo un estudio más detallado de las cepas de esta especie.

Se proponen nuevas combinaciones en el género *Amauroascus*: *Uncinocarpus queenslandicus* se considera como una especie de *Amauroascus*, ya que la ornamentación de sus ascosporas es parecida a las de este género. Presentan protusiones similares a las que se observan en otras especies del género. Además dicha especie se encuentra genéticamente más relacionada con *Amauroascus* que con *Uncinocarpus*.

En este estudio también se muestra una estrecha relación genética entre *Mallochia echinulata* y *Amauroscopsis reticulatus*, ya que forman un agrupamiento altamente soportado. La morfología de estas especies es muy similar, ya que su ascoma está muy poco diferenciado o ausente y la morfología de sus ascosporas también es similar, ambas poseen ascosporas ornamentadas con prominencias en forma cónica. Estas características no se muestran en ninguna otra especie del género *Amauroascus*, por lo que se propone la nueva combinación *Mallochia reticulata*.

Algunas especies de géneros relacionados morfológicamente con *Auxarthron*, tales como *Apinisia racovitzae* y *Shanorella spirothricha* pero que presentan características diferenciales que pueden ser consideradas importantes (como son el tipo de ascoma o la presencia de apéndices peridiales característicos, etc.) se correlacionan molecularmente con esta distinción morfológica, ya que presentan distancias genéticas significativas con respecto a *Auxarthron*.

4.2. **Two new species of *Auxarthron* morphologically and genetically close to *Auxarthron kuehnii*.** Solé M., Cano J., Stchigel A.M. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:97-102 (2002).

Two new species of *Auxarthron* morphologically and genetically close to *A. kuehnii*

M. Solé, J. Cano*, A. M. Stehigel and J. Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain

Abstract: *Auxarthron kuehnii* is a keratinophilic species of the *Onygenales* with morphological features intermediate between those of *Auxarthron* and *Amauroascus*. We examined numerous strains from various sources, all identified as *A. kuehnii* by various authors, and we observed important variations in the main phenotypic characters. A sequence analysis based on the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region and the intervening 5.8S rDNA gene of these strains confirmed that the taxon was heterogeneous. On this basis, we propose two new species, *Auxarthron concentricum* and *Auxarthron chlamydosporum*. *A. concentricum* can be clearly distinguished from *A. kuehnii* in that it has yellow colonies and a distinct pattern of ascospore wall reticulation. *A. chlamydosporum* can be distinguished by its anamorph consisting of arthroconidia that develop into chlamydospore-like cells.

Key words: *Auxarthron kuehnii*, *Auxarthron chlamydosporum*, *Auxarthron concentricum*.

Introduction

The complex formed by the species of the genera *Amauroascus* Schroeter and *Auxarthron* Orr & Kuehn and the species of other morphologically similar genera is one of the largest groups of fungi of the order Onygenales. Traditionally this group has included those species characterized by having gymnothecial ascomata with the peridial hyphae more or less differentiated from the vegetative hyphae, and globose ascospores with reticulate walls (Currah, 1985). Distinguishing the two main genera that constitute the complex (i.e. *Amauroascus* Schroeter and *Auxarthron* Orr & Kuehn) on the basis of morphological criteria is controversial because there are several intermediate species. Traditionally, the distinction between the genera has been considered to subsist in the presence of well-differentiated thick-walled peridial hyphae, frequently with long appendages, in *Auxarthron*, and poorly differentiated peridial hyphae in *Amauroascus*. In a recent study, we compared the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S rDNA region sequences of a considerable number of species of both genera, as well as of several morphologically similar species from other genera (Solé *et al.*, 2002). The results showed that *Auxarthron* was a monophyletic group while *Amauroascus* was clearly polyphyletic. The same study also revealed that those species that had previously been considered to be intermediate, that is, *Amauroascus pseudoreticulatus* Currah and *Amauroascus kuehnii* v. Arx, would be better classified as *Auxarthron*. *Auxarthron kuehnii*, however, ap-

peared to be a heterogeneous taxon. In the phylogenetic tree inferred in that study, strains that had been identified by several authors as *A. kuehnii* were placed in different clades. In the present study, in order to clarify the taxonomy of *A. kuehnii*, we studied the main morphological features of the strains involved and sequenced their ITS region and 5.8S rDNA genes. We also studied several strains of *A. kuehnii* and other morphologically similar species from different culture collections.

Material and methods

Morphological study

The techniques used in the morphological study were described in Cano *et al.* (this publication page 165-172).

Molecular methods

The strains used in this study and their GenBank accession numbers are shown in Table 1. We studied 12 strains of *A. kuehnii*, one of *Amauroascus oblatum*, two of *Auxarthron pseudoreticulatum* and one of *Auxarthron pseudoauxarthron*.

DNA extraction. Fungal DNA was extracted as described by Estruch *et al.* (1989) with some modifications (Cano *et al.*, this publication page 165-172).

DNA amplification. The ITS regions and 5.8 S rDNA gene were amplified as described by Gené *et al.* (1996) with a Perkin Elmer 2400 thermal cycler

* Corresponding author: Dr. J. Cano. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain. E-mail: jfcl@astor.urv.es

Table 1. Strains studied. Name on the right are those recognized as currently correct.

SPECIES	STRAIN	ORIGIN	GenBank accession	ac-
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i> *	CBS 539.72 (T)	Dung	AJ271417	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16190	dust and bat guano, USA	AJ426454	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16191	-----	AJ426455	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	CBS 632.72	dung, California, USA	AJ426453	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16193	soil, Dugway, Utah, USA	AJ426457	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16192	soil, Dugway, Utah, USA	AJ426456	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	UAMH 3115	dung, Arizona, USA	AJ271422	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	RV 22810	Soil, S. California, USA	AJ271424	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron concentricum</i>	FMR 4054 (T)	River sediments, Girona, Spain	AJ271428	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron concentricum</i>	FMR 4053	River sediments, Girona, Spain	AJ271427	
<i>Amauroascus</i> sp. = <i>Auxarthron chlamydosporum</i>	RV 24809 (T)	soil, Kuriange, Burundi	AJ271425	
<i>Amauroascus</i> sp. = <i>Auxarthron chlamydosporum</i>	FMR 7680	soil, Jordan	AJ426458	
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Amauroascus oblatum</i>	UAMH 2296	sputum, Missouri, USA	AJ271421	
<i>Auxarthron pseudoauxarthron</i>	IFO 31701	domestic rabbit dung	AJ271572	
<i>Amauroascus pseudoreticulatus</i> = <i>Auxarthron pseudoreticulatum</i>	UAMH 3569	dog dung, Texas, USA	AJ271423	
<i>Amauroascus pseudoreticulatus</i> = <i>Auxarthron pseudoreticulatum</i>	UAMH 3117 (T)	lizard dung, Chihuahua, Mexico	AJ426452	

Abbreviations used: T = ex-type strain; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures; FMR = Facultat Medicina de Reus; IFO = Institute for Fermentation Osaka; IHEM = Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur, Mycology section; UAMH = University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium; RV = Institute de Medicine Tropicale "Prince Léopold". *The current correct species names for the strains included in this work are on the right-hand side of the equals sign.

(Perkin-Elmer Cetus Co., Emeryville, CA). The ITS5 and ITS4 primers (White et al., 1990) were used. The amplification programme consisted of a pre-denaturation at 94°, 5 min; 30 cycles at 95°C, 30 s; 50°, 1 min and 72°, 1 min; and a final incubation at 72°C for 7 min. The final products were analysed by electrophoresis on 2% agarose MP (Roche Diagnostics, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). The product was purified using a GFX TM PCR DNA purification kit (Amersham Biosciences, Piscataway NJ, USA) and stored at -20°C until used in sequencing.

DNA sequencing: The protocol used for sequencing was the "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Gouda, The Netherlands). Reactions were performed using the ITS-5 and ITS-4 primers and were run on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). The consensus sequences were obtained using the Autoassembler program (Applied Biosystems). The sequences were aligned with the Clustal.W (version 1.5) multiple sequence alignment program (Thompson et al., 1994) and then adjusted visually where necessary. Pairwise percent similarity was calculated manually from the aligned sequences as the number of identical characters divided by the total

Phylogenetic analysis: Phylogenetic analyses using the neighbour-joining (NJ) method (Saitou & Nei, 1987) were performed with the MEGA 2.1 computer program (Kumar et al., 2001). The tree was constructed using the Kimura two-parameter distance model (Kimura, 1980) with the 'pairwise deletion of

gaps' option. The robustness of branches was assessed by bootstrap analysis with 1000 replicates.

Results and discussion

The total length of the sequence from the 5' end of primer ITS 5 to the 3' end of primer ITS 4 ranged from 548 to 634 bp. From these sequences, 142 sites were parsimony-informative and they were used to infer the tree. The sequence similarity among the species tested ranged from 79.1 to 98.6 % (Table 2).

Auxarthron kuehnii, based on an isolate from bat dung dust collected in Georgia, U.S.A., was originally named *Arachniotus reticulatus* by Kuehn (Kuehn, 1957). Later, von Arx (1971) changed the epithet when this species was transferred into *Amauroascus*, since in that genus the epithet "reticulatus" was already occupied. The species was originally described as having yellow to light brown, globose cleistothecia measuring 176–883 µm in diameter. Its peridial hyphae were described as smooth or tuberculate, septate, and light yellow, but often showing segments tinged brown to dark brown. Its ascospores were globose, hyaline, and reticulate, measuring 2.8–3.2 µm in diameter (Kuehn, 1957). When von Arx (1971) studied the ex-type strain, he observed no ascomata and only mentioned the presence of an anamorph. Currah (1985) examined several strains, including the ex-type, and described the ascospores as pale yellowish brown, measuring 3.5–4.2 µm in diam. In our observation, the type strain (CBS 539.72) (Figs. 2, 4-e) has the following features: ascomata globose to subglobose, pale yellow and 300–600 µm in diam.; peridial hyphae hya

TWO NEW SPECIES OF AUXARTHRON

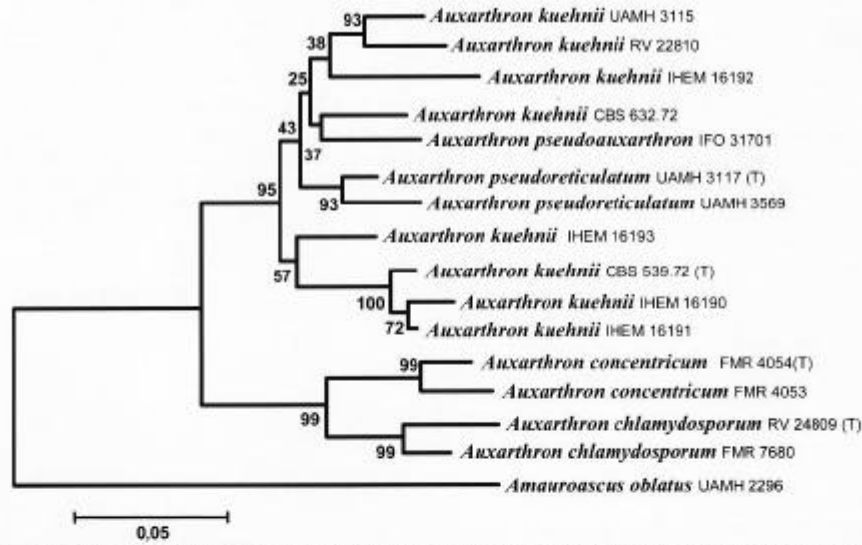


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences from the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region and 5.8S rDNA gene of the 16 strains listed in table 1. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap replication frequencies are indicated in the internodes.

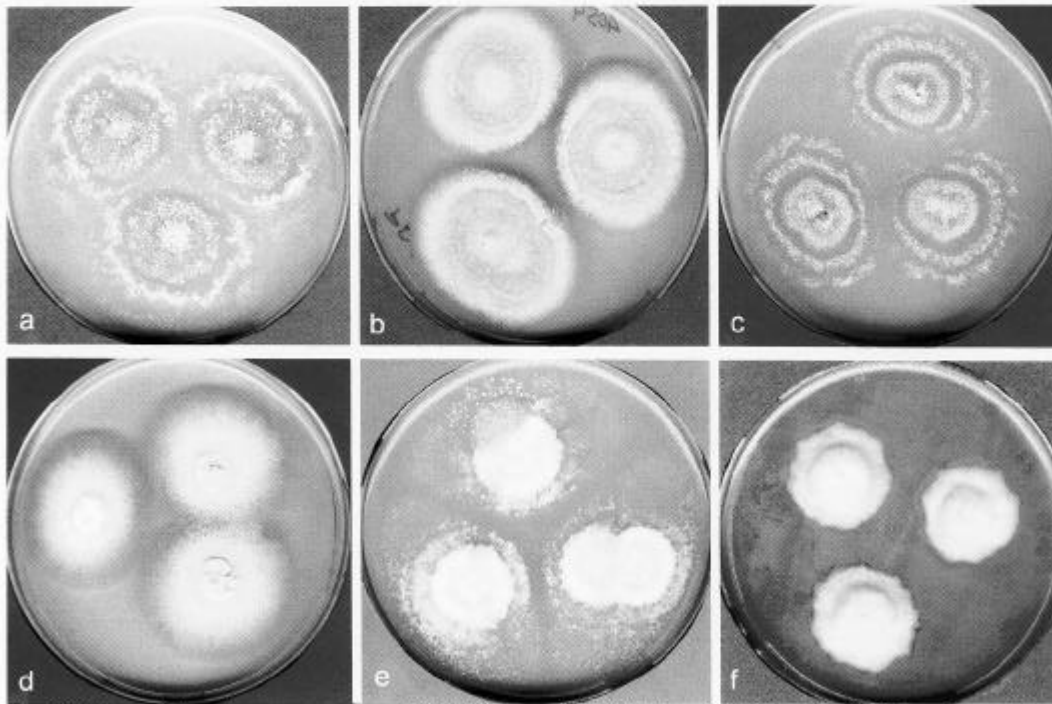


Fig. 2. Colonies of *Auxarthron concentricum* IMI 387183, a: on PDA 18 d, b: on OA 18 d. Colonies of *Auxarthron chlamydosporum* RV 24809, c: on PDA 18 d, d: on OA 18 d. Colonies of *Auxarthron kuehni* CBS 539.72, e: on PDA 18 d, f: on OA 18 d.

SOLÉ ET AL.

line to light yellow, smooth, septate and 2.5-3.2 μm broad; asci subglobose to pyriform, 9-10 \times 6.5-8 μm ; ascospores globose, broadly regularly reticulate, 4-4.5 μm ; *Malbranchea* anamorph present with regularly alternate arthroconidia 2-9.5 \times 1.5-3 μm . Most of the sixteen strains examined in the present study had similar peridial hyphae and ascospore ornamentation, but some basic morphological differences were also easily recognised. These significance of these differences was corroborated by sequence analysis.

In the phylogenetic tree (Fig.1), *Amauroascus ob-latus* Cano & Guarro was at a considerable distance from the other species tested and it could be considered an outgroup. There were two main clades in the in-group. The largest included *A. pseudoauxarthron* and *A. pseudoreticulatum*, as well as most of the *A. kuehnii* strains tested. The isolates in this clade that were identified as species other than *A. kuehnii* were morphologically distinctive, mainly because they had strongly differentiated peridial hyphae. However, this ITS study did not clearly resolve the phylogenetic relationship between these two species and several strains morphologically identified as *A. kuehnii*. The two isolates of *A. pseudoreticulatum* tested were grouped with a bootstrap index of 93% and were placed in the same clade as most of the *A. kuehnii* isolates, including the type strain.

The only available isolate of *Auxarthron pseudoauxarthron* Orr & Kuehn clustered with *A. kuehnii* strain CBS 632.72 to form a small clade that received desultory bootstrap support of 37%. The molecular data seem to indicate that *A. pseudoauxarthron* and *A. pseudoreticulatum* shared a common ancestor with *A. kuehnii* and its relatives. An unexpected finding was that several strains (UAMH 3115, RV 22810, IHEM 16192 and CBS 632.72) received as *A. kuehnii* and morphologically indistinguishable from the ex-type strain, were placed into a weakly supported clade with *A. pseudoauxarthron* and *A. pseudoreticulatum* rather than in the clade containing the ex-type.

The second main clade was split into two subclades, each of which was represented by two strains. A detailed study of these fungi revealed that each subclade represented an undescribed species of *Auxarthron*. The morphological features of these species bear some resemblance to those of the type of *A. kuehnii*, although there are enough different features to allow the isolates distributed to the two subclades to be conveniently described as different species. One of the new species (FMR 4053, FMR 4054) forms yellow colonies on PDA (Fig. 2-a), while the colonies formed by the type strain of *A. kuehnii* are brown (Fig. 2-e). The ornamentation of the ascospores is also different. All these species have a reticulate wall, but in the new species, the meshes of the reticulum are polygonal with very narrow, pronounced ridges (Figs. 3-f, 4-c).

In *A. kuehnii*, on the other hand, they are circular with broad, flattened ridges (Fig. 4-e). The second species (RV 24809, FMR 7680) is characterized by floccose (mainly in the centre), white to orange colonies (Fig. 2-c) and a *Malbranchea* anamorph (Figs. 5-c, 6). This anamorph has two types of arthroconidia, and those produced in lateral branches are usually remarkably narrow. In general, the conidia soon become strongly swollen and form long chains of chlamydospore-like cells.

We consider that these two taxa are sufficiently different from the other species of *Auxarthron* to be proposed as new species:

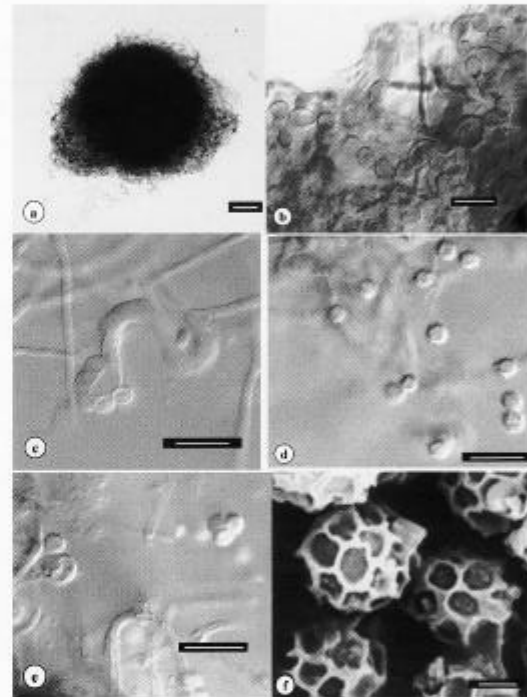


Fig. 3. *Auxarthron concentricum* IMI 387183. a. Ascoma. b. Peridial hyphae. c. Ascumata initials. d, f. Ascospores. e. Asci and ascospores. Scale bars: a = 200 μm ; b-e = 10 μm ; f = 1 μm .

Auxarthron concentricum Solé, Cano & Guarro, sp. nov. (Figs. 2-4)

Anamorph: *Malbranchea* sp.

Etym.: *concentricum* (L)-concentric, referring to the morphology of the colonies in PDA medium

Coloniae in "PDA" effusae, paulatim crescunt, et amulos concentricos et densos cum abundantibus ascomatibus formant, planae, in centro elevatae, flavae; reversum flavobrunneum. Ascumata superficialia, confluentia.

TWO NEW SPECIES OF AUXARTHRON

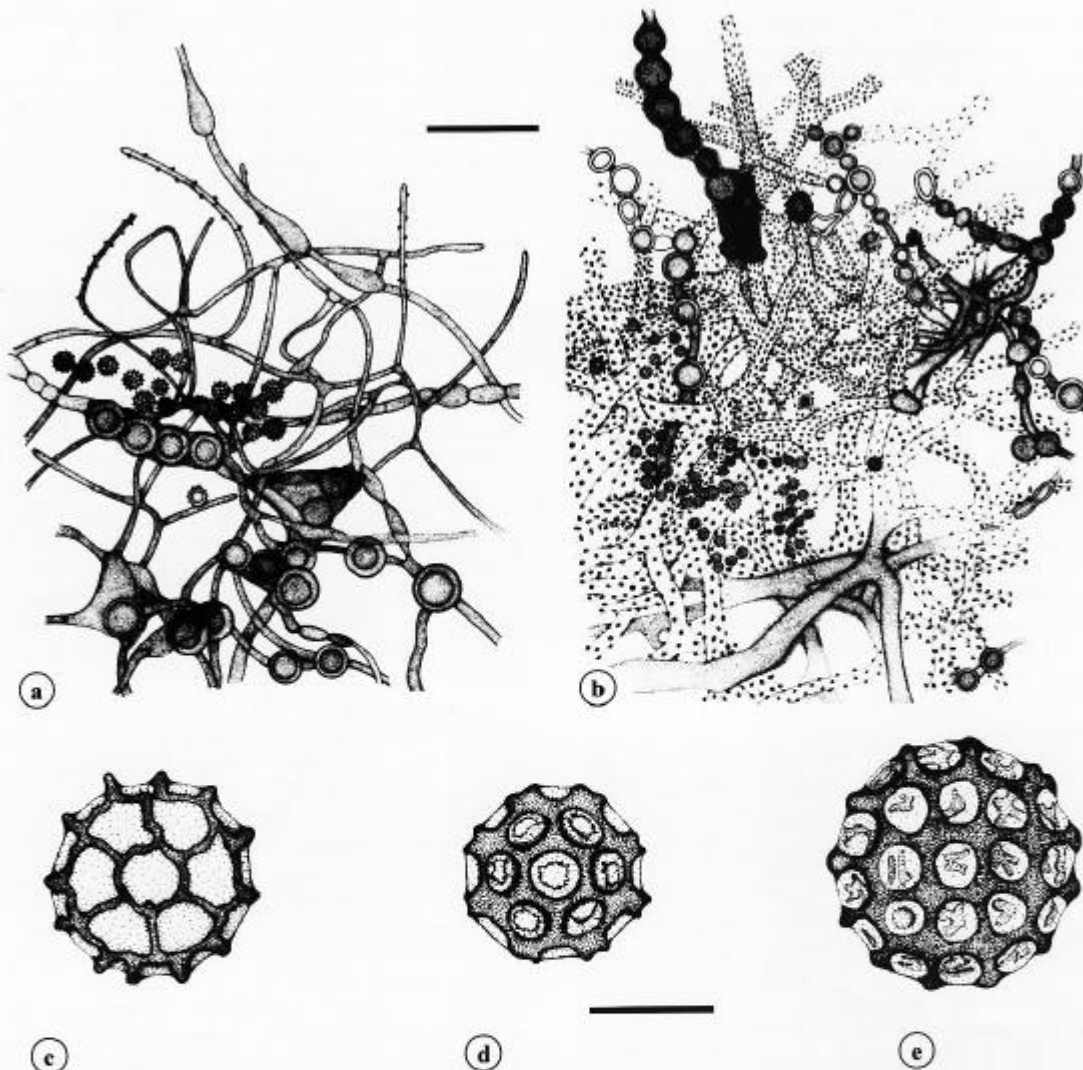


Fig. 4. Detail of the peridium of *Auxarthron concentricum* IMI 387183 (a) and *Auxarthron chlamydosporum* RV 24809 (b). Ascospores of *Auxarthron concentricum* IMI 387183 (c), *Auxarthron chlamydosporum* RV 24809 (d) and *Auxarthron kuehni* CBS 539.72 (e). Scale bars: a, b = 25 μm ; c-e = 2 μm .

globosa, flava vel brunnea 350–400 μm diam. Hyphae peridii dilute brunneae vel atrobrunneae, incrassatae, septatae, 1.5–2 μm diam., asperulae, ramosae et anastomosantes, reticulum laxum formantes. Asci octospori globosi, 5–6 μm diam., evanescentes. Ascosporae hyalinae vel dilute brunneae, globosae, 2.5–4 μm diam., incrassatae, regulariter reticulatae.

Anamorphosis: arthroconidia cylindrica, discreta, hyalina, laevia 8–7x 3–4 μm

HOLOTYPE: IMI 387183 isolatus ex solo, 11/02/1991, Hispania

Colonies on PDA attaining 50–57 mm diam in 21 d at room temperature, zonate, umbonate, cottony and pas-

tel yellow (3A4) in the centre, velvety to powdery and yellow (2A6) elsewhere, producing abundant ascospores throughout the colony; reverse yellowish brown (5D6) in the centre and yellowish brown (5F6) elsewhere. Vegetative mycelium consists of hyaline, branched, smooth-walled, septate, 2–4 μm diam hyphae. Ascospores appear as swollen side branches arising from aerial hyphae. Ascospores superficial, solitary, often confluent, globose, yellow to brown, 350–400 μm in diam.; peridial hyphae pale yellow to red brown or dark brown, thick- and smooth-walled, septate, very narrow, 1.5–2 μm in diam., branched and anastomosed to form a loosely

SOLÉ ET AL.

reticulate network. Mature ascomata frequently have thick walled racquet hyphae with inflations measuring 9-10 x 15-18 μm and chains of chlamyospores connected to the peridial hyphae. In old ascomata, very pleomorphic, dark hyphae are present; these often have irregular swellings and may aggregate into ropes. Under low magnification they are observed as small, dark-brown patches distributed irregularly over the surface of the ascoma. Asci 8-spored, globose, 5-6 μm diam., hyaline, with evanescent walls. Ascospores hyaline to pale brown, brown in mass, globose 2.5-4 μm in diam., thick-walled, regularly reticulate, with polygonal meshes, and narrow and conspicuous ridges.

Anamorph: Arthroconidia borne on the primary hyphae and on short or long, straight and occasionally curved lateral branches. Conidia cylindrical, hyaline, yellow in mass, smooth- and thick-walled, 8-7 x 3-4 μm .

HOLOTYPE: IMI 387183. Isotype FMR 4054, the Muga river sediments, Girona, Spain. Living culture: FMR 4053 the Muga river sediments, Girona, Spain. Colonies on oatmeal agar (OA), potato carrot agar (PCA) and malt extract agar (MEA) had similar features to those on PDA.

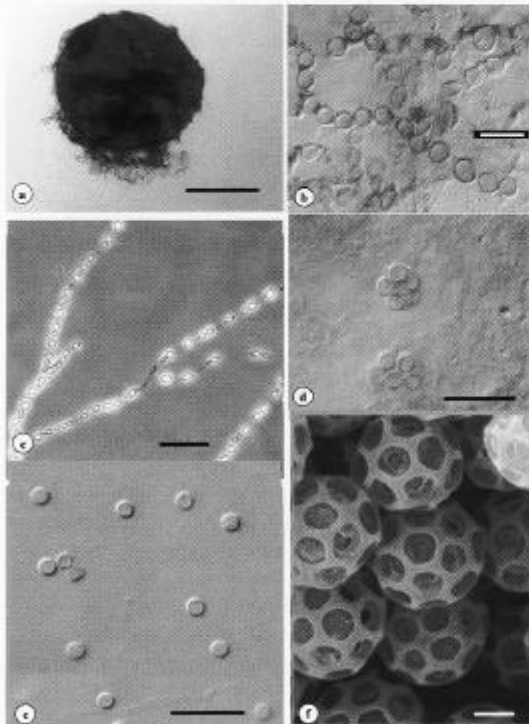


Fig. 5. *Auxarthron chlamyosporum* RV 24809. a. Ascoma. b. Peridial hyphae. c. Chains of chlamyospore-like conidia. d. Asci. e, f. Ascospores. Scale bars: a = 200 μm ; b-e = 10 μm ; f = 1 μm .

Strongly keratinolytic. Tolerant to cycloheximide.

At 37°C, colonies on PDA were similar to those grown at 25°C, ascomata were produced after 15 days; at 15°C the colonies showed a more restricted growth than at 25°C. At 45°C growth was nil.

Auxarthron chlamyosporum Solé, Cano & Guarro, sp. nov. (Figs. 2, 4-6).

Anamorph: *Malbranchea* sp.

Etym.: *chlamyosporum* (L)- chlamyospores, referring to the morphology of the anamorph.

Coloniae in "PDA" in centro floccosae, ascomata abundantia, primo alba, deinde albo-aurantiaca formantes; reversum incoloratum. Ascomata superficialia, confluentia, globosa, rubro-brunnea, 500-700 μm diam. Hyphae peridii rubrobrunneae, incrassatae, septatae, 2-3 μm diam., tuberculatae, ramosae et anastomosantes, reticulum laxum formantes. Asci octospori, globosi, 5-7 μm diam., evanescentes. Ascosporae dilute brunneae, globosae, 3-4.5 μm diam., incrassatae, regulariter reticulatae. Anamorphosis: Arthroconidia, cylindrica, laevia, dilute brunnea, 5.5-9 x 1-1.5 μm . Arthroconidia ex hyphis principalibus lata, 5-8 x 2-4 μm , dilute brunnea, laevia, aliquando doliiformia, subglobosa vel irregularia, 5-9 x 4.5-8 μm .

HOLOTYPE: IMI 387184 isolatus ex solo, 8th, July, 1968, Kuriange, Burundi.

Colonies on PDA attaining 56-60 mm diam in 21 d at room temperature, floccose (mainly in the centre), white at first and orange-white later (5A2), producing abundant mature ascomata and scarce conidia; reverse colourless. Ascomata discrete or confluent, globose, 500-700 μm diam., initially white, becoming reddish brown to dark brown; peridial hyphae reddish-brown, branched and anastomosed to form a loosely reticulate network, thick-walled, tuberculate, septate, 2-3 μm in diam. Some hyphae become expanded and dark, with numerous chlamyospores of different sizes and shapes connected to the outer portion of the peridial hyphae. Asci 8-spored, globose, 5-7 μm in diam., evanescent. Ascospores light brown, reddish brown in mass, globose, 3-4.5 μm in diam., thick-walled, regularly reticulate, with circular meshes.

Anamorph: Arthroconidia dimorphic; as formed from narrow, flexuose lateral branches they are one-celled, cylindrical, sometimes slightly curved, pale brown, and smooth, 5.5-9 x 1-1.5 μm . As formed from broad primary hyphae, they are one-celled, cylindrical, 5-8 x 2-4 μm , pale brown, and smooth. Frequently both type of the conidia become enlarged, subglobose or broadly barrel-shaped, sometimes ir-

regularly shaped, thick-walled, 5–9 x 4.5–8 µm, pale brown and occasionally two-celled.

HOLOTYPE: IMI 387184. Living strains: RV 24809, from soil, Burundi; FMR 7680 from soil, Jordan.

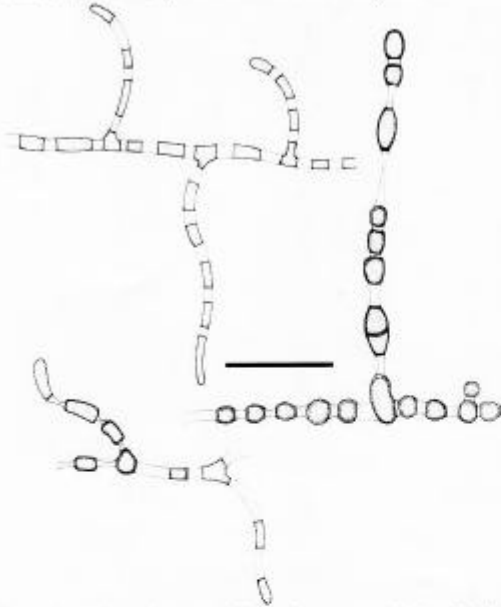


Fig. 6. *Auxarthron chlamydosporum* RV 24809. *Malbranchea* anamorph. Scale bar = 10 µm

Colonies on PCA and MEA are similar in diam. to those on PDA. Colonies on OA attaining 30–33 mm diam. in 21 d at room temperature. The rest of the morphological features are similar in all the media tested.

Strongly keratinolytic. Tolerant of cycloheximide.

At 37°C, colonies on PDA were similar to those grown at 25°C; at 15°C the colonies showed restricted growth (25–30 mm diam. in 21 days). At 45 °C, growth was nil.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundació Ciència i Salut, Reus, Spain. We wish to thank the curators of the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), the Institute for Fermentation Osaka (IFO), Scientific Institute of Public Health (IHEM), the Institut de Médecine Tropicale "Prince Léopold" (RV) and the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) for providing strains and J.M. Escolá (Universitat Rovira i Virgili) for reviewing the Latin diagnoses.

Literature cited

- ARX, J.A. VON, 1971 — On *Arachniotus* and related genera of the *Gymnoascaceae*. — *Persoonia* **6**: 371–380.
- CURRAH, R.S., 1985 — Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. — *Mycotaxon*, **24**: 1–216.
- ESTRUCH, J.J., ANTUSA, C., FERRER, S. & RAMÓN, D., 1989 — Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. — *Rev. Ibér. Micol.* **6**: 62–66.
- GENÉ, J., GUILLAMÓN, J.M., GUARRO, J., PUJOL, I. & ULFIG, K., 1996 — Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. — *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**: 49–57.
- KIMURA, M., 1980 — A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. — *J. Mol. Evol.* **16**: 111–120.
- KUEHN, H.H., 1957 — Observations on *Gymnoascaceae*. IV. A new species of *Arachniotus* and a reconsideration of *Arachniotus trisporus*. — *Mycologia* **49**: 55–67.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. & NEI, M., 2001 — MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1. Analysis software, Bioinformatics. — Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987 — The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. — *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- SOLE, M., CANO, J. & GUARRO, J., 2002 — Molecular taxonomy of *Amauroascus*, *Auxarthron* and other related genera of the Onygenales. — *Mycol. Res.* **106**: 388–396.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J., 1994 — CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. — *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J., 1990 — Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. — Pp. 315–322. In INNIS, M.A., GELDFAND, D.H., SNINSKY, J.J. & WHITE T.J. (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. — Academic Press, New York.

4.2. *Dos nuevas especies de Auxarthron morfológica y genéticamente relacionadas a Auxarthron kuehnii*

Objetivo: En este estudio se pretende clarificar la taxonomía de la especie *Auxarthron kuehnii* y especies relacionadas, mediante el estudio de sus características morfológicas y la secuenciación del gen 5.8S y las regiones ITS1-ITS2 del ADNr.

Artículo: “ **Two new species of *Auxarthron* mophologically and genetically close to *Auxarthron kuehnii*.**” Solé M., Cano J., Stchigel A.M. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:97-102 (2002).

Este estudio pretendía dar respuesta al problema planteado en el anterior trabajo, ya que parecía probable que debido a la descripción general de *Auxarthron kuehnii* se podían incluir a otras especies morfológicamente relacionadas, como parecía indicar el estudio molecular. Para ello se llevó a cabo un estudio morfológico y molecular más exhaustivo, empleando el mayor número de cepas disponibles de la especie.

Se han estudiado un total de 12 cepas que respondían al patrón morfológico típico de *Auxarthron kuehnii*, entre ellas la cepa tipo, y también se han incluido cepas de algunas especies morfológicamente relacionadas, tales como *Amauroascus oblatum*, *Auxarthron pseudoauxarthron* y *Auxarthron pseudoreticulatum*. El análisis de este trabajo mostró que algunas de las cepas previamente identificadas como *Auxarthron kuehnii* se encontraban filogenéticamente distantes de la cepa tipo. Se observaban diferentes “clusters” con buenos soportes estadísticos (índice de “bootstrap”), cuyos integrantes presentaban diferencias morfológicas consistentes con respecto a la cepa tipo. Como resultado de este trabajo se proponen dos nuevas especies para la Ciencia: *Auxarthron concentricum* Solé, Cano y Guarro y *Auxarthron chlamydosporum* Solé, Cano y Guarro. Estas dos especies se distinguen

morfológicamente de *Auxarthron kuehnii* tanto por sus características culturales como microscópicas.

Auxarthron concentricum presenta colonias formadas por anillos concéntricos de crecimiento, la pigmentación de la colonia es de tonos rojizos, dependiendo del medio de cultivo. Microscópicamente, es de destacar su peculiar ascoma, que presenta engrosamientos de sus hifas peridiales y forma hifas en raqueta, con presencia de cadenas de clamidosporas conectadas a las hifas peridiales en la madurez del mismo, ascomas con una rápida pleomorfización y hifas muy pigmentadas. Su anamorfo está representado por macroconidios muy peculiares.

Auxarthron chlamydosporum se caracteriza por poseer colonias flocosas (en forma de copos), ascomas blanquecinos que al madurar se oscurecen hasta tonos amarronados. Microscópicamente, las hifas peridiales que forman el ascoma son tuberculadas, y algunas de ellas al madurar evolucionan hacia estructuras más pigmentadas, con numerosas clamidosporas de diferentes formas y tamaños.

4.3. **Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera.** Solé M., Cano J., Pitarch L.B., Stchigel A.M. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:141-152 (2002).

Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera

M. Solé, J. Cano*, L. B. Pitarch, A.M. Stchigel & J. Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain

Abstract: A phylogenetic study based on the analysis of the sequences of the ITS region and 5.8S rDNA gene of 24 strains belonging to 11 morphologically similar genera of Onygenales has been performed. The analysis supports the morphological evidence of synonymization of the genera *Arachniotus*, *Gymnascella*, *Gymnoascoideus* and *Narasimhella* with *Gymnoascus*. The new species *Gymnoascus armeniacus* characterised by smooth, oblate, ascospores and the new genus and species *Testudomyces verrucosus* based on two strains previously described as *Gymnoascus reticulatus*, are proposed. *Gymnoascus alatosporus* is considered a synonym of *Acanthogymnomycetes princeps*. A key to the accepted species of *Gymnoascus* is provided.

Key words: *Arachniotus*, *Gymnascella*, *Gymnoascus*, *Narasimhella*, *Testudomyces*.

Introduction

Gymnoascus Baranetzky, one of the largest genera of the order Onygenales, has been reviewed by several authors (Orr *et al.*, 1963-a; Apinis, 1964; Currah, 1985 and von Arx, 1986). In the last revision, 14 species were accepted (von Arx, 1986). Later, two more species were reported, *Gymnoascus arxii* Cano & Guarro (Cano & Guarro, 1989) and *Gymnoascus boliviensis* Guarro, Ulfig & de Vroey (Guarro *et al.*, 1992). According to von Arx (1986), the genus is characterised by expanding, lemon yellow, ochraceous, orange or red colonies, ascomata with a peridium composed of a loose network of hyaline and pigmented hyphae and pigmented and oblate ascospores. In the same monograph, von Arx also accepted, as a separate genus, *Narasimhella* Thirumalachar & Mathur, a morphologically very similar genus that is distinguished by its bivalvate and hyaline ascospores. These decisions were not followed by Currah (1985). This author maintained the genus *Gymnoascus* only for the type species, *Gymnoascus reessii* Baranetzky, and *Gymnoascus intermedius* Orr, while placing the other species accepted by von Arx into three different genera, *Arachniotus* Schroeter, *Gymnascella* Peck and *Gymnoascoideus* Orr & Ghosh. *Narasimhella* spp. were placed into *Gymnascella*.

To evaluate the different taxonomic proposals for these fungi and to examine phylogenetic relationships

in the group, we performed a molecular phylogenetic analysis of the sequences of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS)1, 5.8 S and ITS2 regions of representative strains of the genera mentioned.

Material and methods

Morphological study. The culture media used in the morphological study were Sabouraud peptone-glucose agar ("Sabouraud dextrose agar," SDA; Pronadisa, Madrid, Spain), malt extract agar (MEA; Difco, Detroit, MI, USA), potato carrot agar (PCA; potato 20 g, carrot 20 g, agar 15 g, chloramphenicol 0.05 g, water 1 l, home-made), potato glucose agar ("potato dextrose agar," PDA; Pronadisa), and oatmeal agar (OA; Difco). The incubation temperatures used were 15°C, room temperature (20-25°C), 37°C and 45°C.

Resistance to cycloheximide (0.04%) was determined by observing the ability of strains to grow on the culture medium Mycosel (MYC; Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, USA). Keratinolytic activity was gauged by observing the capacity of isolates to digest prepubertal hair sprinkled on PDA plates (Sigler & Carmichael, 1976). Colony colour was evaluated in accordance with Korerup & Wanschler (1984). Scanning electron microscopy (SEM) techniques were those of Figueras & Guarro (1988).

Molecular methods

Strains used in this study and their EMBL accession numbers are shown in Table 1.

DNA extraction. Fungal DNA was extracted as described by Estruch *et al.* (1989) with some

*Corresponding author: Dr. J. Cano. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain. E-mail: jfcl@astor.urv.es

Table 1. Strains used in this study. The name now accepted by the present authors appears after the = sign.

SPECIES	STRAIN	GenBank accession
<i>Auxarthron reticulatum</i>	UAMH 2006	AJ271568
<i>Gymnoascus alatosporus</i> = <i>Acanthogymnomycetes princeps</i>	IMI 169642(T)	AJ315840
<i>Gymnoascus arxii</i> = <i>Aphanoascus orissi</i>	IMI 326523	AJ315843
<i>Gymnascella aurantiaca</i> = <i>Gymnoascus aurantiacus</i>	UAMH 3138	AJ315834
<i>Gymnoascus boliviensis</i>	IMI 351986	AJ315828
<i>Gymnascella citrina</i> = <i>Gymnoascus citrinus</i>	CBS 863.72	AJ315836
<i>Gymnascella confluens</i> = <i>Gymnoascus confluens</i>	IMI 100873	AJ315837
<i>Gymnascella dankaliensis</i> = <i>Gymnoascus dankaliensis</i>	IMI 119450	AJ315832
<i>Gymnascella confluens</i> = <i>Gymnoascus desertorum</i>	CBS 634.72	AJ315838
<i>Gymnascella littoralis</i> = <i>Gymnoascus littoralis</i>	CBS 454.73	AJ315833
<i>Gymnascella marginospora</i> = <i>Gymnoascus marginosporus</i>	CBS 393.71	AJ315824
<i>Gymnascella nodulosa</i> = <i>Gymnoascus nodulosus</i>	FMR 3781	AJ315831
<i>Gymnoascus petalosporus</i>	IFO 323.89	AJ315829
<i>Gymnoascus punctatus</i>	CBS 279.64	AJ315825
<i>Gymnoascus reessii</i>	FMR 6562	AJ315830
<i>Chrysosporium merdarium</i> anamorph of <i>Gymnoascus uncinatus</i>	CBS 408.72	AJ390384
<i>Auxarthron reticulatum</i> = <i>Testudomyces verrucosus</i>	CBS 500.86	AJ315841
<i>Arachniotus ruber</i> = <i>Gymnoascus ruber</i>	IMI 100913(T)	AJ315839
<i>Gymnoascus udagawae</i>	IFO 8921(T)	AJ315835
<i>Gymnascella hyalinospora</i> = <i>Gymnoascus armeniacus</i>	CBS 125.78	AJ315827
<i>Gymnascella hyalinospora</i> = <i>Gymnoascus hyalinosporus</i>	CBS 548.72(T)	AJ315826
<i>Neogymnomycetes demonbreunii</i>	UAMH 3382(T)	AJ315842
<i>Shanorella spirotricha</i>	CBS 305.56(T)	AJ271430
<i>Uncinocarpus reessii</i>	IMI 211.205	AJ271419

modifications (Cano *et al.*, this publication page 165-172). The strains were grown at 28°C in 0.8 ml of Sabouraud broth contained in 1.5 ml microfuge tubes in an orbital shaker at 250 rpm. The cultures were tested for purity by inoculating a small portion of the mycelium suspension on OA agar plates just before DNA extraction. The mycelium was washed with distilled water, lyophilised and ground to a fine powder by using individual pipette tips in 1.5 ml microcentrifuge tubes. The powder was incubated for 1h at 65°C in 500 µl of extraction buffer (50 mM TrisHCl pH 7.2, 50 mM ethylenediamine tetraacetic acid [EDTA], 3% sodium dodecyl sulfate [SDS]). The lysate was extracted with phenol:chloroform:isoamyl alcohol solution (25:24:1) and DNA was recovered by isopropanol precipitation. The pellet was washed with 70% v/v ethanol, dried under vacuum and resuspended in TE buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, EDTA 0.1 mM).

DNA amplification

The nuclear ribosomal ITS1- 5.8S - ITS2 region was amplified as described by Gené *et al.* (1996) with a Perkin Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus Co., Emeryville, CA, USA). The primers ITS5 and ITS4 were used (White *et al.*, 1990). The amplification programme consisted of pre-denaturation at 94°C, 5 min; 30 cycles at 95°C, 30 s; 50°C, 1 min and 72°C, 1 min; and a final incubation at 72°C for 7 min to complete the last extension. The final products were analysed by electrophoresis on 2% agarose MP (Roche Diagnostics, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). The product was

purified using a GFX™ PCR DNA purification kit (Amersham Biosciences, Piscataway NJ, USA) and stored at -20°C until used in sequencing.

DNA sequencing

The protocol used for sequencing was the "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Gouda, The Netherlands). Reactions were performed using the primers ITS5 and ITS4 and were run on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). The consensus sequences were obtained using the Autoassembler program (Applied Biosystems). The sequences were aligned using Clustal W (version 1.5) of the multiple sequence alignment computer program (Thompson *et al.*, 1994). Adjustments for improvement were made by eye where necessary. Pairwise percent similarity was calculated manually from the aligned sequences as the number of identical characters divided by the total.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses using the Neighbour-joining method (NJ) (Saitou & Nei, 1987) were performed with the MEGA 2.1 software (Kumar *et al.*, 2001) generated by the Kimura-2-parameter distance model (Kimura, 1980), including transitions and transversions and with pairwise deletion for the treatment of the handling gaps/missing data. Confidence values for individual branches were determined by bootstrap analyses (1000 replicates) (Felsenstein, 1985).

Results and discussion

Nucleotide sequences of the 5.8 S and ITS regions were determined for each specimen listed in Table 1. The total sequence length, from 5' end of the ITS1 region to the 3' end of the ITS 2 region, ranged from 559 (*Auxarthron reticulatum*) to 615 bp (*Testudomyces verrucosus*). The total number of variable sites was 402. The nucleotide composition as a percentage of the sequences was: A, 21.0; T, 23.1; C, 28.1; G, 27.8.

The sequence similarity (S) among the species tested ranged from 73.8 % (*Shanorella spirotricha* - *Testudomyces verrucosus*) to 99.6% (*Gymnoascus confluens*-*Gymnoascus desertorum*) (Table 2).

From these sequences, 306 sites were parsimony-informative and they were used to infer the trees. The phylogenetic analysis was carried out using the neighbour-joining (NJ) method (Fig 1 A, B, C). The results obtained show that the majority of strains included by von Arx (1986) and Currah (1985) in the genera *Gymnascella*, *Gymnoascus*, *Narasimhella* and *Arachniotus* formed a monophyletic clade supported by a bootstrap value of 89%. Only *Gymnoascus arxii*, *Gymnoascus alatosporus* Natarajan and *Gymnoascus reticulatus* Zukal were excluded from this clade. The core group consisted of two clusters. One of them (59% of bootstrap, S 89.1%) included *Gymnoascus reessii* Baranetzky and *Gymnoascus boliviensis* and the other (99% bootstrap) subtended the rest of species.

Evaluation of Currah's taxonomic scheme

Currah (1985) re-evaluated *Gymnascella* and recognized thirteen species in it, making it the largest genus in the Onygenales. He separated *Gymnascella* and *Gymnoascus* mainly by the morphology of the peridial hyphae. In the species placed into *Gymnascella*, these hyphae are thin-walled, similar to vegetative hyphae, or have some distinctly shaped and irregularly thick-walled elements. They are usually pale yellow to brown. In *Gymnoascus*, Currah placed species with thick-walled, yellow to reddish brown and conspicuously roughened peridial hyphae. As mentioned above, he restricted *Gymnoascus* to *G. reessii*, the type species, and *G. intermedius*. Von Arx (1986) considered these two species indistinguishable. Currah (1985) also considered some taxa morphologically close to *Gymnoascus* as separate, including the monotypic genera *Arachniotus* and *Gymnoascoideus*. *Arachniotus ruber* (van Tieghem) Schroeter is characterised by orange to red ascospores and orange to yellow ascospores with a double equatorial rim, while *Gymnoascoideus petalosporus* Orr, Roy and Ghosh forms petaloid ascal clusters and abundant arthroconidia. Analysis of ITS sequences in the present study did not support the separate status of

these genera (Fig. 1 A). The species of *Gymnascella* formed two well-defined clusters paraphyletic to *Gymnoascus* and *Arachniotus*. The first one was divided in two subclusters; one of them included *Arachniotus ruber*, along with *Gymnascella confluens* (Sartory & Bainier) Currah and *Gymnascella desertorum* (Moustafa) Arx (S 99.6%). The last two species were considered identical by Currah and our molecular data support this. This small group has a bootstrap support of 100%. Its common feature is the presence of reddish ascospores with an equatorial depression or furrow, a feature that does not fit the generic description of *Gymnascella*. Another six species of this genus, namely, *Gymnoascus udagawae* von Arx, *Gymnascella citrina* (Massee & Salmon) Orr, Ghosh & Roy, *G. littoralis* (Orr) Currah, *G. aurantiaca* Peck, *G. dankaliensis* (Castellani) Currah and *G. nodulosa* (Ghosh, Orr & Kuehn) Currah were placed in the other subcluster. The other three species of *Gymnascella* tested, together with *Gymnoascoideus petalosporus*, *Gymnoascus boliviensis*, *Gymnoascus reessii* and *Uncinocarpus uncinatus* Eidam, were placed in the second cluster. The acceptance of the monotypic *Gymnoascoideus* also seems highly questionable as was argued by von Arx (1987). *Gymnoascoideus petalosporus* is very similar to *Gymnoascus boliviensis*, differing in only 13 bp in the region studied (S 98.0%). Both *G. petalosporus* and *G. boliviensis* have ascospores arranged in a petaloid pattern in the asci and produce numerous arthroconidia in culture. In NJ, these two species grouped with 59% bootstrap support with *Gymnoascus reessii*, with *G. boliviensis* differing from this species in 74 bp and *G. petalosporus* differing in 78 bp. *Gymnoascus reessii* appeared to form a subcluster with *Uncinocarpus uncinatus* but this grouping received a low bootstrap support (44%). *U. uncinatus* was recently discussed by Udagawa & Uchiyama (2000a) and on the basis of the presence of a lattice-like peridium, coiled ascospores, it was considered better accommodated in *Gymnoascus* than in *Uncinocarpus*.

Two recent studies based on analysis of sequences of the SSU rDNA (Sugiyama *et al.*, 1999) and LSU rDNA genes (Sugiyama & Mikawa, 2001) did not support Currah's taxonomic scheme. In the first study, *Gymnascella hyalinospora* (Kuehn, Orr & Ghosh) Currah and *Gymnoascoideus petalosporus* were placed in the same group, which was revealed as being genetically closer to *Gymnoascus reessii* than to other species of *Gymnascella*, e.g., to *G. aurantiaca* Peck. All these species, however, consistently clustered with a high bootstrap support. In the second study the topology of the tree was different, showing *Gymnascella hyalinospora* grouping with *Gymnoascus reessii* and *Gymnoascoideus petalosporus* while *Gymnascella citrina* and several other species of

SOLE ET AL.

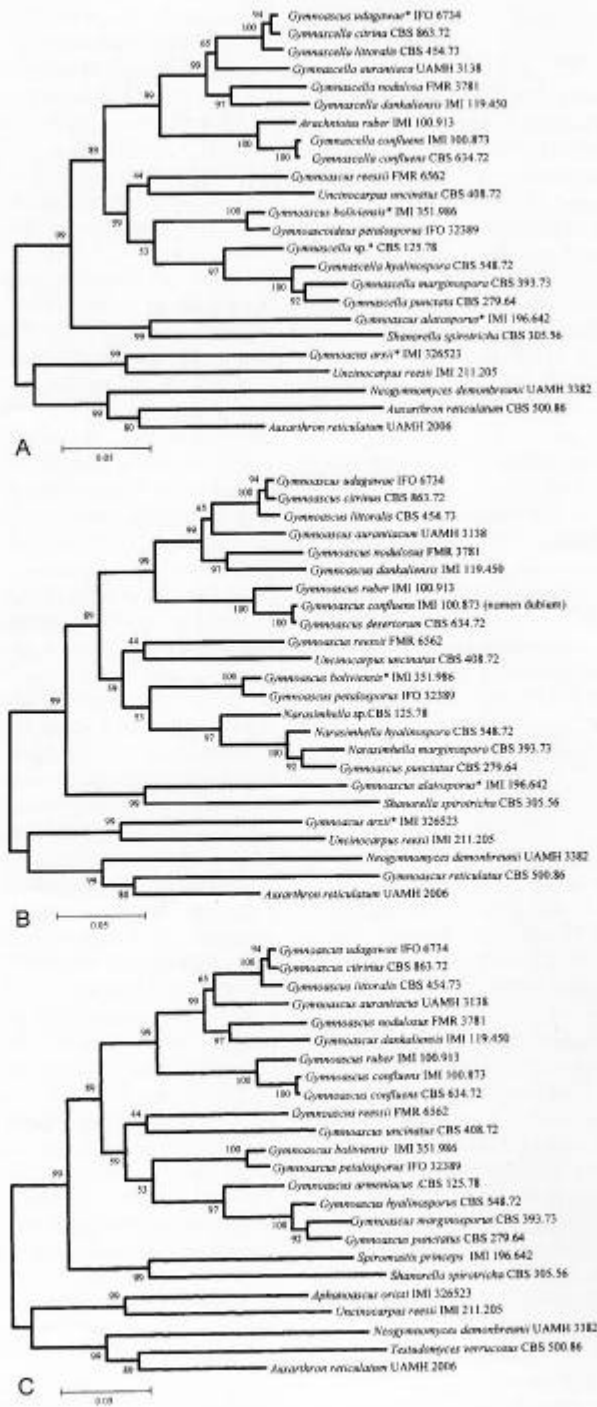


Fig 1. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences of the 5.8 S rDNA gene and ITS regions of the 23 species included in this study. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap replication frequencies are indicated above the internodes. The names of species used were according to the taxonomic schemes of Currah (A), von Arx (B) and the present authors (C).

Gymnascella, e.g., *G. aurantiaca*, formed a separate clade.

Von Arx's taxonomic scheme

Von Arx (1986) had a broader concept of *Gymnoascus* than Currah did; he considered *Arachniotus*, *Gymnascella* and *Gymnoascoideus* to be synonyms. However, he accepted *Narasimhella*, which he distinguished from *Gymnoascus* by its unequally bivalvate, hyaline ascospores, obovate asci formed from croziers, and frequently stipitate ascomata. He included three species in the genus, *N. marginospora* (Kuehn & Orr) Arx, *N. poonensis* Thirumalachar & Mathur and *N. hyalinosporea* (Kuehn, Orr & Ghosh) Arx. According to Currah (1985), the first two species are identical.

Our molecular analyses did not support a distinction between *Narasimhella* and *Gymnoascus*. For example, *N. marginospora* was genetically closer to *Gymnoascus punctatus* (Dutta & Ghosh) Arx than to *Narasimhella hyalinosporea* (Fig.1). *N. marginospora* and *G. punctatus* differ only in 24 bp, and *N. marginospora* and *N. hyalinosporea* differ only in 27 bp. The unequally bivalvate ascospores considered to be a key feature of *Narasimhella* by von Arx (1986) are not always observed in these organisms; for example *Narasimhella* sp. strain CBS 125.78, which von Arx included in *N. marginospora*, has smooth ascospores (Figs. 2,3). This strain is further discussed below.

Our proposal

Taking into account the discrepancies between the two dominant morphological taxonomic schemes for the Onygenales and our molecular analysis as well as those of Sugiyama *et al.* (1999) and Sugiyama & Mikawa (2001), we have elaborated a new proposal (Fig. 1C). It is based on a combination of molecular and morphological data. Our decision is that it is most reasonable to consider all the species included in the main monophyletic group in our analysis as belonging to a single genus. The name *Gymnoascus* has nomenclatural priority and therefore *Arachniotus*, *Gymnascella*, *Gymnoascoideus* and *Narasimhella* should be considered synonyms.

This proposal unifies the previous proposals and implies a minimum of nomenclature changes. Only two new combinations are needed, and they are now made below.

Gymnoascus hyalinosporus (Kuehn, Orr & Ghosh) Solé, Cano & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 4h)

= *Pseudoarachniotus hyalinosporus* Kuehn, Orr & Ghosh, Mycopathol. Mycol. Appl. 14:215,1961 (basionym)

= *Arachniotus hyalinosporus* (Kuehn, Orr & Ghosh) Apinis, Mycol. Pap. 96: 41, 1964

= *Narasimhella hyalinosporea* (Kuehn, Orr & Ghosh) v. Arx, Persoonia 6: 373, 1971

= *Rollandina hyalinosporea* (Kuehn, Orr & Ghosh) Roy *et al.*, in Subramanian (Ed.), Taxonomy of Fungi (Proc. int. Symp. Madras, 1973), 1:221, 1978

= *Gymnascella hyalinosporea* (Kuehn, Orr & Ghosh) Currah, Mycotaxon 24:84, 1985

Gymnoascus marginosporus (Kuehn & Orr) Solé, Cano & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 4k)

= *Pseudoarachniotus marginosporus* Kuehn & Orr, Mycopathol. et Mycol. Appl. 19:257, 1963 (basionym)

= *Arachniotus marginosporus* (Kuehn & Orr) Udagawa, Trans. Mycol. Soc. Jap. 10:103, 1970

= *Narasimhella poonensis* Thirumalachar & Mathur, Sydowia 19: 184, 1965

Uchiyama *et al.* (1995) described the new species *Gymnascella japonica* Uchiyama, Kamiya & Udagawa characterized by colonies with a very restricted growth, yellow to orange ascomata and irregularly shaped and often inequilateral ascospores with a tuberculate wall. On the basis of the criteria established here we consider this species to belong to *Gymnoascus* and the following new combination is proposed:

Gymnoascus japonicus (Uchiyama, Kamiya et Udagawa) Solé, Cano & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 4i)

= *Gymnascella japonica* Uchiyama, Kamiya et Udagawa, Mycoscience 36:211, 1995 (basionym)

A detailed examination of the strain *Narasimhella* sp. CBS 125.78 revealed that it is different from the species hitherto described and therefore it is proposed as a new species.

Gymnoascus armeniacus Solé, Cano & Guarro, *sp. nov.* (Figs. 2, 3, 4a).

Etym.: *armeniacus* (L)- tangerine, referring to the colour of the colonies

Coloniae in agar "PDA", in centro elevatae, radiato-sulcatae, brunneocaurantiacae, cum marginibus granulosis. Ascomata discreta vel confluentia, globosa, 400-750 µm diam., initio flava, cum maturant, brunnea. Peridii hyphae hyalinae, laeviae vel tuberculatae, crasse tunicatae, 3.2-4 µm diam. Asci octospori, subglobosi, evanescentes, 7-9 x 6-8 µm. Ascospores hyalinae vel pallide brunneae, lenticulares, 3.2-4 x 1.5-2.5 µm, laeviae. Anamorphosis abest.

HOLOTYPUS: IMI 386570, *isolatus ex macropi stercore, India.*

SOLE ET AL.

Colonies on PDA attaining 50-53 mm diam in 21 d at room temperature, elevated in the central area, folded radially, yellowish brown (5D6) at 30 d, marginal zone with granulation; big (4 mm diam) greyish green (29C5) exudate drops were produced after 30 d of incubation. Reverse colour greyish orange (5B6), centre yellowish brown (5D6). Ascospores distinctly stipitate, discrete or confluent, globose, 400-750 µm diam, yellow to light tangerine at maturity. Peridial hyphae hyaline, smooth to tuberculate, thick-walled, 3.2-4 µm broad. Asci 8-spored, evanescent, subglobose, 7-9 x 6-8 µm diam, hyaline to pale yellow. Ascospores hyaline to pale brown, lenticular, 3.2-4 x 1.6-2.4 µm, smooth, without rim or furrow. Anamorph lacking.

Colonies on PCA attaining 34-40 mm diam in 21 d at room temperature, elevated in central part, white and slightly powdery at first, becoming yellowish white (4A2) with mature orange spots, cottony and strongly funiculose, margin regular and defined; reverse light orange (5A5). Ascospores maturing within 25-30 d, forming irregular flocculi (3-5 mm diam.) uniformly distributed on the colony. Colonies on OA 35-40 mm diam in 21 d at room temperature, plane, hyaline, no ascospores produced. Reverse greyish orange (5B6), yellowish brown (5D6) at centre.

At 37° C the growth rates and features are similar to those seen at room temperature. At 15° C colony growth is relatively slow (22-25 mm diam. in 21 days). There is no growth at 45° C. The species is keratinophilic and tolerant of cycloheximide.

HOLOTYPE: IMI 386570, kangaroo dung, India. Living culture: CBS 125.78 (deposited as *Gymnascella hyalinuspora*).

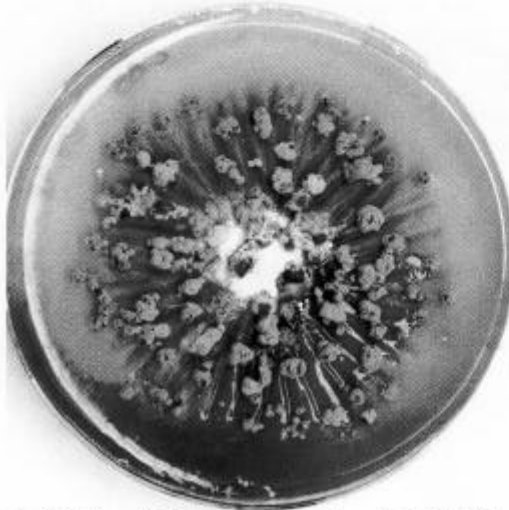


Fig. 2. Colony of *Gymnoascus armeniacus* (IMI 386570) on 2% potato dextrose agar at 30 days incubation at 25°C in 10 cm Petri dishes.

This species is morphologically similar to *G. hyalinuspora*, although the ascospores of the latter have irregularly lobate-reticulate walls, best seen under SEM, that under light microscopy appear to be covered with scattered warts.

According our molecular analysis, three species previously considered to belong to *Gymnoascus* should be excluded from this genus. *Gymnoascus arxii*, which is currently considered a species of *Aphanoascus*, is one of them (Cano *et al.*, this publication page 153-164). This species shows pale brown to orange, discoid ascospores, with thickenings at the poles and a shallow equatorial groove ornamented with evenly distributed small pits. Its ascospores have a peridium at first made up of a tenuous mesh of hyphae, eventually becoming flattened and turning into a hyaline to pale beige membranous peridium composed of a layer of flattened cells. These features are never observed in *Gymnoascus*. Based on the ornamentation of its ascospores, its *Chrysosporium* anamorph, and its keratinophilic activity, Sigler *et al.* (1998) transferred this species to *Uncinocarpus*. That proposal, however, is not supported by molecular analysis. *Gymnoascus alatosporus*, a species only known from a single strain isolated from the rhizosphere of *Pennisetum typhoides* Trim in India, was also excluded from the *Gymnoascus* clade. We have examined this strain, and consider it to be identical to *Acanthogymnomycetes princeps* (Udagawa & Uchiyama) Udagawa & Uchiyama, a recently proposed genus (Udagawa & Uchiyama, 2000b). Its ascospores are yellow to pale brown, oblate, with a broad equatorial rim and polar thickenings, narrowly sulcate with linear ridges and finely punctate over the entire surface. *Acanthogymnomycetes* differs from *Spiromastix* Kuehn & Orr, in the following characters: it forms two kinds of ascospores with a broad equatorial rim and polar thickenings, narrowly sulcate with linear ridges and finely punctate over the entire surface. The third species excluded from the *Gymnoascus* clade was that represented by the strain CBS 500.86, isolated from soil in Spain. In a previous study, we identified this strain as *Gymnoascus reticulatus* Zukal (Cano *et al.*, 1987) because of its similarity to a strain from a decaying cow hoof isolated by von Arx (1986) and later placed under this name. Unfortunately, the type specimen of *G. reticulatus* is lost and a comparison was not possible. In any case, a more detailed study of our strain revealed that it is morphologically very different from *Gymnoascus* spp. Its ascospores are darker than those of *Gymnoascus* spp., and they have a type of ornamentation that is unique in the Onygenales. When young, they have a wide equatorial rim, which collapses when mature and becomes an incomplete rim with numerous pronounced protuberances. This peculiar morphology

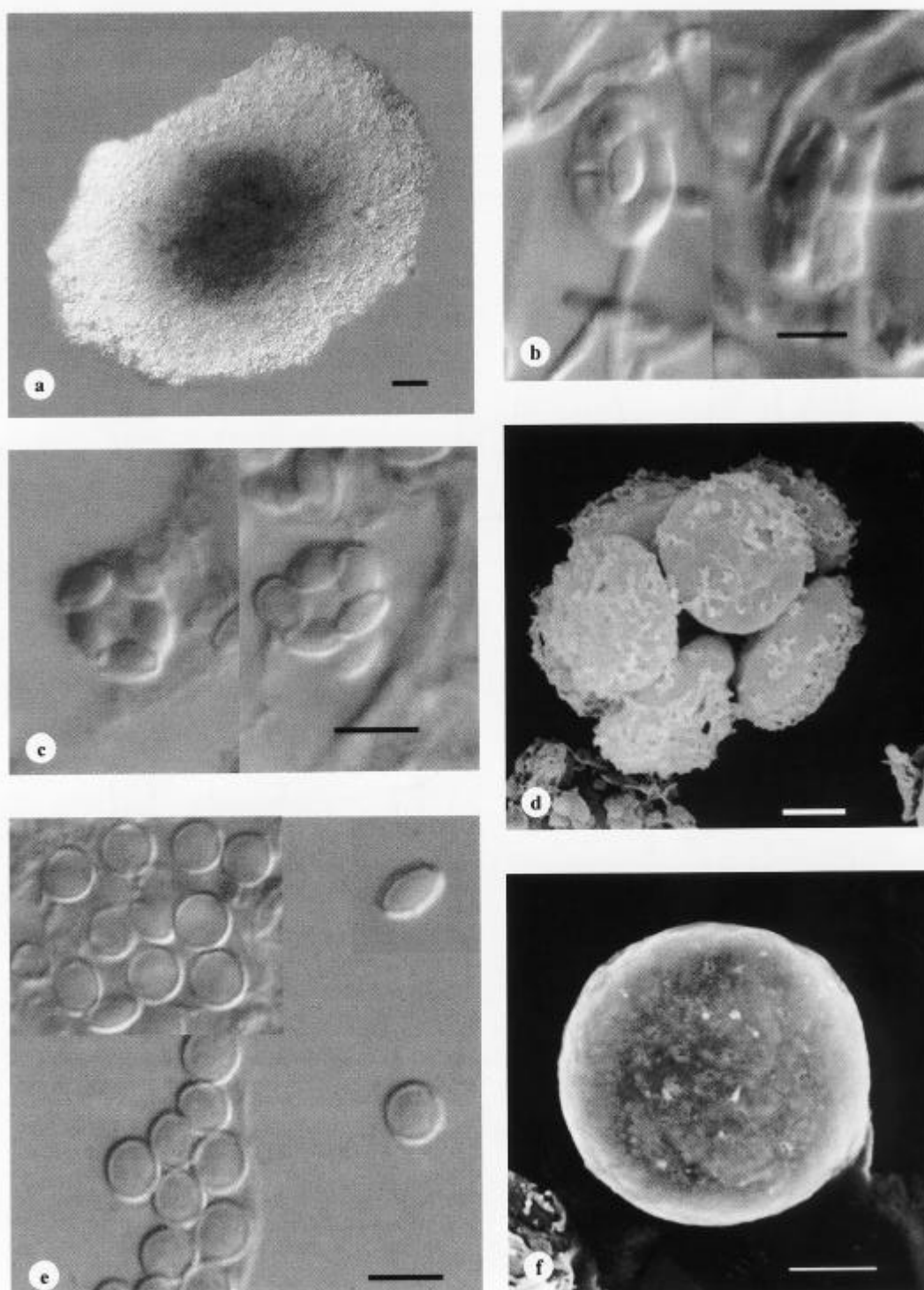


Fig 3. *Gymnoascus armeniacus* (IMI 386570). a. Ascoma. b. Ascomata initials. c,d. Asci. e,f. Ascospores. a-c,e: Nomarsky microscopy; d,f: Scanning electron microscopy. Scale bars: a = 100 μm ; b,c,e = 5 μm ; d = 2 μm ; f = 1 μm .

SOLE ET AL.

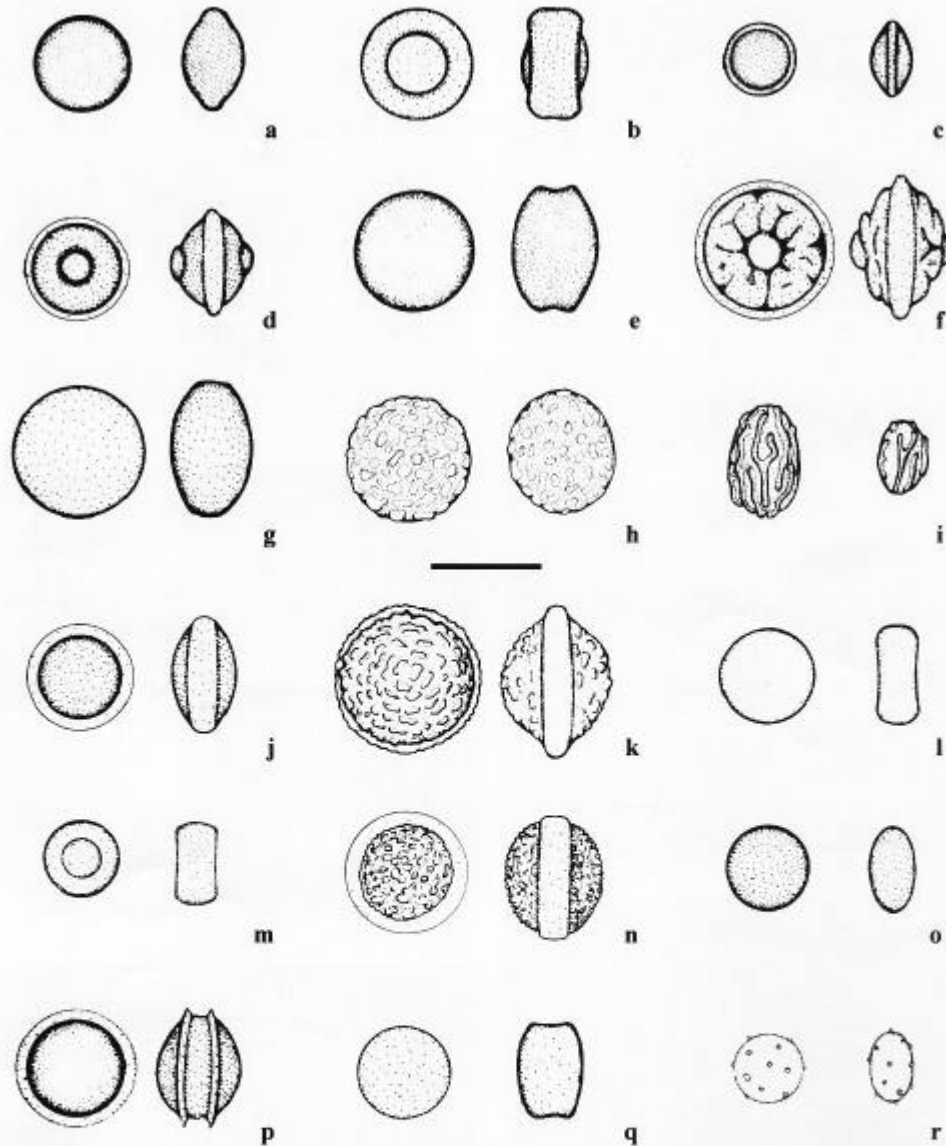


Fig 4. Ascospores of *Gymnoascus* spp. a. *G. armeniacus*. b. *G. aurantiacus*. c. *G. boliviensis*. d. *G. confluens*. e. *G. citrinus*. f. *G. dankaliensis*. g. *G. devroeyi*. h. *G. hyalinosporus*. i. *G. japonicus*. j. *G. littoralis*. k. *G. marginosporus*. l. *G. nodulosus*. m. *G. petalosporus*. n. *G. punctatus*. o. *G. reessii*. p. *G. ruber*. q. *G. uncinatus*. r. *G. udagawae*. Scale bar: 5 μ m.

seems to correlate with the great phylogenetic distance seen between this species and the others included in the present study. The ITS sequence of this species differs from that of *G. reessii*, the type species of *Gymnoascus*, in 138 bp. We have studied a second strain (CBS 626.88), also isolated from soil in Spain, which has the same features. Therefore, we propose a new genus and species to accommodate these strains

TESTUDOMYCES Solé, Cano & Guarro, *gen. nov.*

Etym.: *Testudo* (L)- turtle, referring to the morphology of the ascospores under SEM;

Ascomata discreta, globosa, rubro-brunnea ad maturitae. Hyphae peridiales hyalinae vel rubrobrunneae septatae, ramosae. Asci globosi vel obovati, octosporati, cum pariete tenui sed resistente. Ascosporae lenticulares, verrucosae cum crista aequatoriali, cum maturant, rubrobrunneae

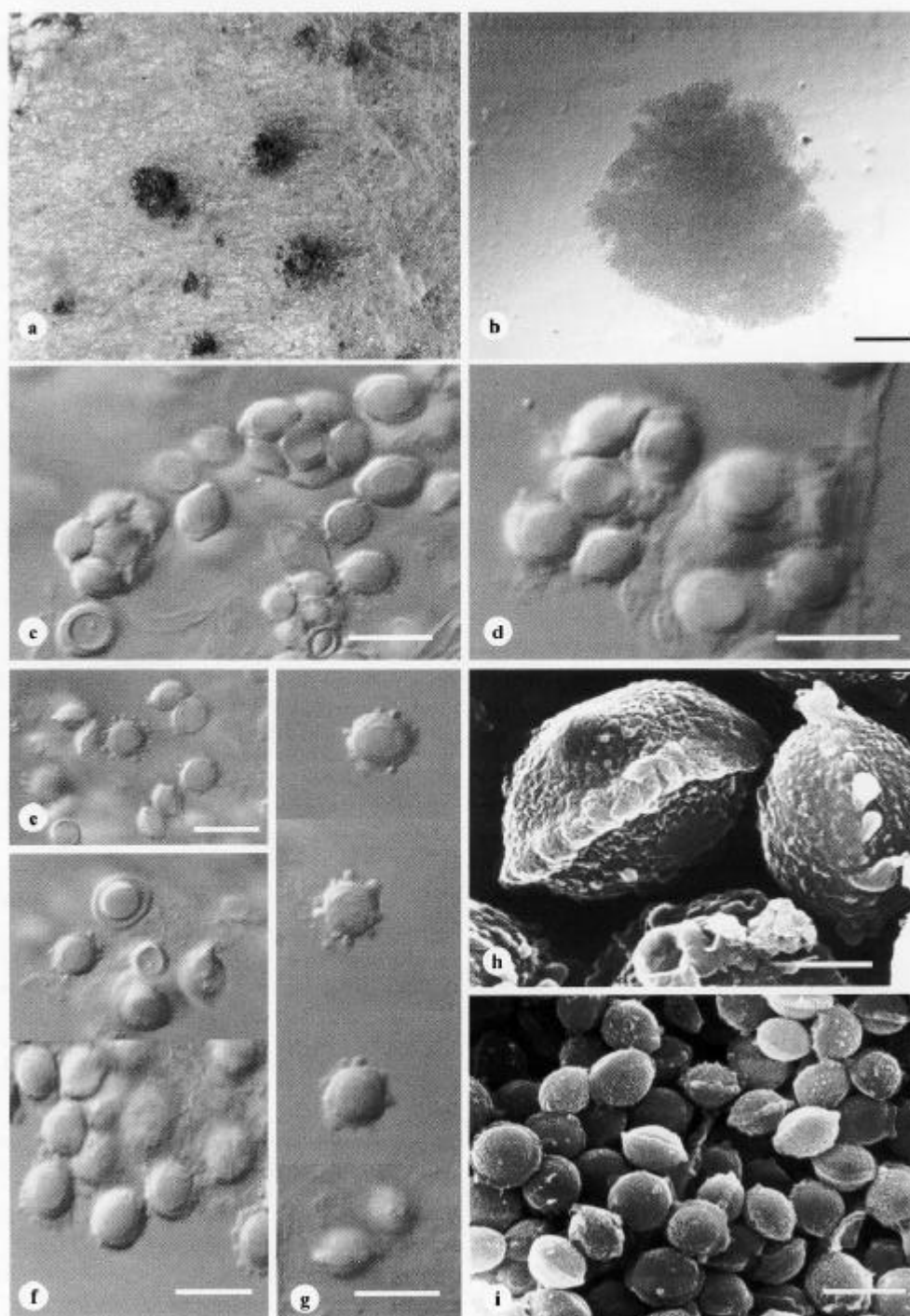


Fig 5. *Testudomyces verrucosus* (CBS 500.86). a. Ascomata on PDA. b. Ascoma. c,d. Asci and ascospores, e-i. Ascospores. a: Stereo microscopy; b-g: Nomarski microscopy; h,i: Scanning electron microscopy. Scale bars: b = 200 μm ; c-g, i = 10 μm ; h = 1 μm . (The original source of Figs. 4h and 4i is Cano *et al.*, 1987).

SOLE ET AL.

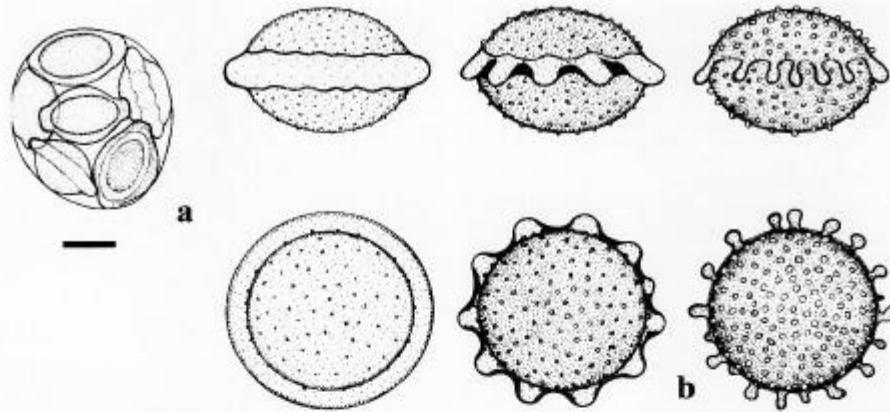


Fig. 6. *Testudomyces verrucosus*. (CBS 500.86). a. Ascus. b. Different stages of ascospore ornamentation. Scale bar: 10 μm

Species typica: *Testudomyces verrucosus* Solé, Cano & Guarro

Ascomata discrete, globose, reddish brown when mature. Peridial hyphae hyaline to reddish brown, septate and branched. Asci spherical to obovate, 8-spored, evanescent. Ascospores lenticular, verrucose, with an equatorial rim with protuberances, reddish brown when mature.

Testudomyces verrucosus Solé, Cano & Guarro, *sp. nov.* (Figs. 5, 6)

Etym.: Latin, verrucosus = warted, referring to the ornamentation of the ascospores.

Coloniae in agar "PDA", in centro elevatae, albae. Ascomata discreta, globosa, 300-1500 μm diam., initio alba, cum maturant, rubrobrunnea. Hyphae peridiales hyalinae vel rubrobrunneae, 3-4.5 μm , septatae, ramosae, paulum compactae. Asci numerosi, botryoides, sessiles, globosi vel obovati 15-20 μm vel 17-22 x 14-17 μm , octospori, cum pariete tenui sed resistente. Ascospores lenticulares, verrucosae cum crista aequatoriali, cum maturant, rubrobrunneae, 6-8 x 4.5-6 μm .

Anamorphosis abest.

HOLOTYPE: IMI 331.244 isolatus ex solo, l' Adzubia, Alicante, Spain.

Colonies on PDA attaining 50-60 mm diam in 21 days at room temperature, white in the center and light yellow (4A5) over the rest, plane and elevated in the center, velvety, with uncoloured exudate drops of 1 mm diam. Reverse yellowish white (2A2) in the marginal zone, reddish yellow (4A6) in the centre and reddish yellow (4B6) in the intervening area. Ascomata discrete, globose, 300-1500 μm in diameter, white and lanose when young, reddish brown when mature; ascomatal initials formed on aerial hyphae,

small, composed of coiled branches. Peridial hyphae hyaline to reddish brown, 3-4.5 μm broad, septate and branched, usually sparse, occasionally nearly absent. Asci very numerous, botryose, sessile, spherical or obovate, 15-20 μm or 17-22 x 14-17 μm , 8-spored, with a thin, but rather persistent wall. Ascospores reddish brown, lenticular, slightly verrucose, 6-8 x 4.5-6 μm , with an equatorial rim that collapses when mature, becoming incomplete and bearing numerous conspicuous protuberances (Fig 6). Anamorph lacking.

HOLOTYPE: IMI 331244 from garden soil, l'Adzubia, Alicante, Spain, February 1986. Living strains: FMR 918 (=CBS 500.86), FMR 2226 (=CBS 626.88) from forest soil, Vallbona, Castellón, Spain, April 1987.

Colonies on MEA, OA, PCA and SDA are similar to those grown on PDA. Colonies grown at 37°C are similar to those grown at room temperature, while 15°C colonies are slightly restricted in diameter (22-25 mm diam. in 21 days). There is no growth at 45°. The species is keratinophilic and tolerant of cycloheximide.

Gymnoascus reticulatus, according to the original description by Zokal (Zokal, 1887) in German, translated by von Arx (1986), is characterised by orange-reddish ascomata covered with a network of hyphae. These hyphae are about 5 μm broad, distinctly septate, and reddish; asci are botryose, nearly spherical, and about 13 μm ; ascospores are lenticular, yellow, and thick-walled about 6.4 μm diam. In view of this description, *G. reticulatus* is very different from *Auxarthron reticulatum* (Zokal) Orr and Plunkett, with which it has sometimes been confused (Currah, 1985). *Auxarthron reticulatum* has very small (2.2-3.6 μm diam) globose and reticulate ascospores

and its peridial hyphae form a relatively structured peridium (Figs. 3-5 in Orr *et al.*, 1963-b).

Even though *Arachniotus* is considered a synonym of *Gymnoascus* in the present work, we consider that the recently described *Arachniotus insolitus* Udagawa & Uchiyama (Udagawa & Uchiyama, 2000-a) should be excluded. We were unable to observe the holotype of this species, but according to the very complete description made by the authors it is evident that some important morphological characters of this taxon are not typical in *Gymnoascus*. The most important feature that separates *A. insolitus* from *Gymnoascus* is the presence of oblate and pitted ascospores, which are

reminiscent of those of *Uncinocarpus* sensu Sigler *et al.* (1998) or *Aphanoascus*.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundació Ciència i Salut, Reus, Spain. We wish to thank the curators of the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), the Institute for Fermentation Osaka (IFO), CABI Bioscience (IMI), and the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) for providing strains and J.M. Escolà (Universitat Rovira i Virgili) for reviewing the Latin diagnoses.

Key to *Gymnoascus* species

1. Colonies restricted; ascomata yellow; ascospores irregular in shape; *G. japonicus*
Above characters not combined 2
2. Ascospores with an equatorial depression or furrow 3
Ascospores without such features 4
3. Equatorial depression of the ascospores distinctly deep *G. ruber*
Equatorial depression of the ascospores shallow *G. confluens*
4. Ascospores 3-4 µm long 5
Ascospores 4-8 µm long 11
5. Ascospores hyaline to pale yellow *G. hyalinusporus*
Ascospores yellow, yellow orange or reddish brown 6
6. Ascospores arranged in a petaloid pattern in the ascus; arthroconidia abundant 7
Ascospores not arranged as above; arthroconidia scarce or lacking 8
7. Ascomata forming dense, orange-white aggregations; ascospores with a distinct equatorial thickening *G. boliviensis*
Ascomata discrete to confluent, brown to greenish brown; ascospores with no equatorial thickening *G. petalosporus*
8. Ascomata formed by thick-walled, well differentiated peridial hyphae with appendages 9
Ascomata formed by peridial hyphae poorly differentiated from vegetative hyphae and without appendages 10
9. Ascomata with uncinuate appendages; *Chrysosporium* anamorph *G. uncinatus*
Ascomata with curved, hooked and branched appendages; anamorph lacking *G. reessii*
10. Ascospores yellow-orange, smooth or slightly rough, with an equatorial thickening band *G. marginosporus*
Ascospores hyaline, smooth, without equatorial thickenings *G. armeniacus*
11. Ascospores with equatorial thickenings 12
Ascospores without distinct equatorial thickenings 14
12. Ascospores 6-8 x 4.5-5.5 µm, with a distinct narrow equatorial thickening and with polar thickenings *G. dankaliensis*
Ascospores smaller, without polar thickenings 13
13. Colonies restricted; ascomata yellow to orange-brown; ascospores with a narrow equatorial thickening *G. littoralis*
Colonies expanding; ascomata pale to bright pink becoming rusty orange; ascospores with a broad equatorial band *G. punctatus*

SOLE ET AL.

14. Ascospores lemon-yellow with polar thickenings *G. citrinus*
Ascospores of different colour, without polar thickenings 15
15. Ascospores oblate, yellow-orange to orange or reddish-brown; arthroconidia present *G. devroeyi*
Ascospores discoid, yellow to golden-yellow; aleuroconidia present or not 16
16. Colonies on PDA orange to ochraceous; ascospores with irregular polar surfaces *G. aurantiacus*
Colonies on PDA lemon yellow or pale; ascospores smooth 17
17. Colonies restricted; peridial hyphae with irregularly thick-walled elements with broad swellings and constrictions at septa; ascospores measuring 3.8-5.2 x 2.1-2.3 µm, arranged in a petaloid pattern in the ascus *G. nodulosus*
17. Colonies expanding; peridial hyphae undifferentiated from vegetative hyphae; ascospores measuring 4.5 x 2.3-3.5 µm, not arranged in a petaloid pattern *G. udagawae*

Abbreviations used: T = ex-type strain; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures; FMR = Facultat Medicina de Reus; IFO = Institute for Fermentation Osaka; IMI = Cabi Bioscience; UAMH = University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium.

Literature cited

- APINIS, A.E., 1964 — Revision of British Gymnoascaceae. — Mycol. Pap. **96**: 1–56.
- ARX, J.A. VON, 1986 — The ascomycete genus *Gymnoascus*. — Persoonia **13**: 173–183.
- ARX, J.A. VON, 1987 — A re-evaluation of the Eurotiales. — Persoonia **13**: 273–300.
- CANO, J., GUARRO, J. & FIGUERAS, M.J., 1987 — Some keratinophilic fungi from Spain. — Mycopathologia **100**: 163–167.
- CANO, J. & GUARRO, J., 1989 — Two new keratinophilic Ascomycetes from Spain. — Stud. Mycol. **31**: 61–67.
- CURRAH, R.S., 1985 — Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. — Mycotaxon **24**: 1–216.
- ESTRUCH, J.J., ANTUNA, C., FERRER, S. & RAMON, D., 1989 — Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. — Rev. Iberoam. Micol. **6**: 62–66.
- FELSENSTEIN, J., 1985 — Confidence limits in phylogenies: An approach using the bootstrap. — Evolution **39**: 783–791.
- FIGUERAS, M.J. & GUARRO, J., 1988 — A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. — Mycologia **80**: 298–306.
- GUARRO, J., ULFIG, K. & VROEY, C.H. DE, 1992 — A new keratinophilic *Gymnoascus* from Bolivian soil. — Mycotaxon **45**: 317–322.
- GENÉ, J., GUILLAMÓN, J.M., GUARRO, J., PUJOL, I. & ULFIG, K., 1996 — Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormoglyphiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. — Antonie Leeuwenhoek **70**: 49–57.
- KIMURA, M., 1980 — A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. — J. Mol. Evol. **16**: 111–120.
- KORNERUP, A. & WANSCHER, J.H., 1984 — Methuen handbook of colour. — Methuen Ltd., London.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. & NEI, M., 2001 — MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1. — Analysis software, Bioinformatics, Sint-Mariens-Latem, Belgium.
- ORR, G.F., KUEHN, H.H. & PLUNKETT, O.A., 1963 a — The genus *Gymnoascus* Baranetzky. — Mycopathol. Mycol. Appl. **21**: 1–18.
- ORR, G.F., KUEHN, H.H. & PLUNKETT, O.A., 1963 b — A new genus of the Gymnoascaceae, with swollen peridial septa. — Can. J. Bot. **41**: 1439–1456.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987 — The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. — Mol. Biol. Evol. **4**: 406–425.
- SIGLER, L., & CARMICHAEL, J.W., 1976 — Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. — Mycotaxon **4**: 349–488.
- SIGLER, L., FLIS, A.L. & CARMICHAEL, J.W., 1998 — The genus *Uncinocarpus* (Onygenaceae) and its synonym *Brunneospora*: new concepts, combinations and connections to anamorphs in *Chrysosporium*, and further evidence of relationship with *Coccidioides immitis*. — Can. J. Bot. **76**: 1624–1636.
- SUGIYAMA, M., OHARA, A. & MIKAWA, T., 1999 — Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequences. — Mycoscience **40**: 251–258.
- SUGIYAMA, M. & MIKAWA, T., 2001 — Phylogenetic analysis of the non-pathogenic genus *Spiromastix* (Onygenaceae) and related onygenalean taxa based on large subunit ribosomal DNA sequences. — Mycoscience **42**: 413–421.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J., 1994 — CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. — Nucleic Acids Res. **22**: 4673–4680.
- UCHIYAMA, S., KAMIYA, S. & UDAGAWA, S., 1995 — Five onygenalean fungi from Japan. — Mycoscience **36**: 211–220.
- UDAGAWA, S. & UCHIYAMA, S., 2000-a — Taxonomic studies on new or critical fungi of non-pathogenic Onygenales 3. — Mycoscience **41**: 303–311.
- UDAGAWA, S. & UCHIYAMA, S., 2000-b — *Acanthogymnomycetes*, a new genus of gymnothecial Ascomycetes with setae and sulcate ascospores. — Mycotaxon **76**: 411–418.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J., 1990 — Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. — Pp. 315–322. In: PCR protocols: a guide to the methods and applications. Eds. M.A. INNIS, D.H. GELDFAND, J.J. SNINSKY, & T.J. WHITE. — Academic Press, New York.
- ZUKAL, H., 1887 — Über einige neue Ascomyceten. — Verh. zool.-bot. Ges. Wien. **37**: 39–46.

4.3. Filogenia molecular de *Gymnoascus* y géneros relacionados

Objetivo: Llevar a cabo un estudio filogenético del género *Gymnoascus* y géneros afines, comparar los resultados con los principales esquemas de clasificación del grupo y formular nuevas propuestas taxonómicas para establecer un sistema de clasificación más natural. Para ello se realizó el análisis de las secuencias de los espaciadores ITS1 e ITS2 y la región 5.8S del ADNr de diferentes cepas representativas del género *Gymnoascus* y de otros géneros relacionados o que tradicionalmente han pertenecido al mismo.

Artículo: “**Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera**”. Solé M., Cano J., Pitarch L.B., Stchigel A.M. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:141-152 (2002).

En este estudio se pretendía determinar las relaciones filogenéticas entre las especies pertenecientes al género *Gymnoascus* y géneros morfológicamente similares (ver Tabla 1, del artículo). En el mismo se incluyeron todas aquellas especies que fueron consideradas, en algún momento, pertenecientes a dicho género (Currah, 1985; v. Arx, 1986), así como otros taxones que presentaban características morfológicas similares. El árbol resultante (ver Figura 1, del artículo) muestra que la mayoría de las especies de los géneros *Gymnascella*, *Gymnoascoideus*, *Gymnoascus*, *Narasimhella* y *Arachniotus* forman un grupo monofilético bien soportado estadísticamente (87% de índice de bootstrap). Por lo tanto, estos resultados están en concordancia con el concepto definido por von Arx (1986), de que las características morfológicas del peridio no son fiables como criterio taxonómico para la distinción entre géneros de la familia *Gymnoascaceae*, (debido a que las mismas varían con las condiciones de cultivo), en contraposición a Currah (1985), quién aceptaba los géneros mencionados como diferentes de *Gymnoascus*. Tras el examen de las características morfológicas de los taxones en

cuestión, se propone considerar a los géneros *Arachniotus*, *Narasimhella*, *Gymnascella* y *Gymnoascoideus* como sinónimos de *Gymnoascus*. Esta propuesta de unificación conlleva un escaso número de cambios nomenclaturales, proponiéndose las siguientes combinaciones nuevas: *G. hyalinosporus* (Kuehn, Orr y Gosh) Solé, Cano y Guarro, *G. marginosporus* (Kuehn y Orr) Solé, Cano y Guarro, y *G. japonicus* (Uchiyama, Kamiya y Udagawa) Solé, Cano y Guarro.

Se considera que *G. arxii* debe ser transferido al género *Aphanoascus* Zukai como *A. orissi* (B. Sur y G.R.Ghosh) Cano y Guarro. Esta propuesta se encuentra sustentada tanto molecular como morfológicamente, dado que este taxon exhibe un peridio rudimentario formado por células aplanadas y ascosporas anaranjadas o parduscas, con engrosamientos polares y un surco ecuatorial poco profundo ornamentado con pequeñas depresiones (SEM), y anamorfo perteneciente a *Chrysosporium*, características que nunca han sido descritas para el género *Gymnoascus*. *Gymnoascus alatosporus*, otra especie excluida del género, se considera morfológicamente indistinguible de *Spiromastix princeps* Udagawa y Uchiyama, posteriormente renombrada como *Acanthogymnomyces princeps* Udagawa y Uchiyama (Udagawa y Uchiyama, 2000).

La cepa CBS 125.78 de *Gymnascella hyalinospora* ha servido de base para la nueva especie *Gymnoascus armeniacus* Solé, Cano y Guarro. Dicha especie es morfológicamente similar a *G. hyalinosporus*, pero se pueden diferenciar una de otra por la ornamentación de sus ascosporas, observable mediante microscopía electrónica de barrido.

Otro aislamiento (CBS 500.86), identificado previamente como *Gymnoascus reticulatus* por Cano y col. (1987), ha servido de base para la propuesta del nuevo género y especie: *Testudomyces verrucosus* Solé, Cano y Guarro. Dicha especie es fácilmente distinguible de todos los otros Onygenales por sus esporas oscuras y su peculiar ornamentación, única dentro del orden. El anillo ecuatorial, que es ancho cuando las ascosporas son jóvenes, se colapsa al madurar, dando origen a un anillo incompleto, con protuberancias de gran tamaño. Estas diferencias morfológicas se

ven reflejadas en el árbol filogenético, difiriendo su secuencia nucleotídica respecto de la de *G. reessii* (la especie tipo del género) en casi 140 pb.

Por último, se propone una clave dicotómica para el total de las trece especies aceptadas en el género.

4.4. *Pseudoamauroascus*, a new genus of the Onygenales
(Ascomycota) Cano J., Solé M., Pitarch L.B. & Guarro J. Studies in
Mycology 47:173-180 (2002).

Pseudoamauroascus, a new genus of the Onygenales (Ascomycota)

J. Cano*, M. Solé, L.B. Pitarch & J. Guarro.

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain.

Abstract: The new genus and species *Pseudoamauroascus australiensis*, was isolated from Australian soil. This fungus is distinguished from other known taxa by producing the following combination of characters: white, spherical ascospores formed by a network of thin, hyaline hyphae indistinguishable from vegetative hyphae; oblate, brown ascospores ornamented with a reticulum of conspicuous and anastomosed crests; and a *Malbranchea* anamorph. Sequence analysis of the 18S rDNA and 5.8S rDNA genes supports the separation of this fungus from all taxa bearing some morphological similarity.

Key words: *Pseudoamauroascus*, *P. australiensis*, Onygenales.

Introduction

During a continuing study of soil-borne microfungi from different geographic regions, we isolated an interesting fungus from Australian soil using the hair baiting technique. The fungus had a clear affiliation with the order Onygenales, yet was inconsistent with any genera currently included in this order. A detailed study of the fungus growing on its natural substrate and in axenic culture revealed sufficient differences from existing taxa to warrant the proposal of a new genus in the Onygenales (Currah, 1985; von Arx, 1986). The most distinctive feature of this fungus is its peculiar ascospores, which are brown and oblate with a very pronounced reticulum formed by conspicuous and anastomosed crests. It also possesses a *Malbranchea* anamorph. In order to assess if the morphological differences from similar genera corresponded to genetic differences, we performed a comparative molecular study sequencing the 18S rDNA and 5.8S rDNA and ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions of the proposed new fungus and some related taxa.

Materials and methods

Sample locality and fungal isolation. Soil samples were collected at Mount Lofty, near Adelaide, South Australia, in Australia in March 1994. Collections were taken mainly from the superficial layer of soil

with sterilised polyethylene bags. Prior to their study in the laboratory, the samples were placed in a refrigerator at 4-6°C. The hair baiting method described by Vanbreuseghem (1952) was used for the isolation of the keratinophilic fungi, with horsehair used as the source of keratin.

Morphological study. The techniques used in this study were the same as those described in Cano *et al.* (this publication page 165-172). Briefly, the culture media used for colony description were Sabouraud dextrose agar (SDA), oatmeal agar (OA), potato carrot agar (PCA), potato dextrose agar (PDA), phyton yeast extract agar (PYE), Sabouraud diluted salts medium (TK) and malt extract agar (MEA) (Cano *et al.*, 2002).

Tolerance to cycloheximide (0.04 %) was tested using the Mycosel medium (MYC; BBL, Cockeysville, USA). Keratinolytic capacity was determined after Ajello and Georg (1957).

Strains and DNA extraction. The strains used in this study and the GenBank accession numbers of the sequences are shown in Table 1. Fungal DNA was isolated as described by Cano *et al.* (this publication page 165-172).

DNA amplification. In the amplification of the fragment corresponding to the 18S rDNA gene we used the primers NS1 and NS24 (White *et al.*, 1990), and for the ITS regions and 5.8S rDNA gene the primers ITS 5 and ITS 4 (White *et al.*, 1990). The protocol used for amplification was described by Henrion *et al.* (1994) with some modifications (Gené *et al.*, 1996). The product was purified using the GeneClean kit (Bio 101, Joshua Way Vista, CA, USA) and stored at -20°C until used in sequencing.

*Corresponding author: Dr. J. Cano. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain. E-mail: jfc1@astor.urv.es

Table 1. Strains of the different genera used in this study.

Name	Strain	Ribosomal gene	GenBank accession
<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	IMI 370014	5.8S	AJ 131787
<i>Auxarthron pseudoreticulatum</i>	UAMH 3117(T)	5.8S	AJ271420
<i>Auxarthron kuehnii</i>	UAMH 3115	5.8S	AJ271422
<i>Auxarthron kuehnii</i>	RV 22810	5.8S	AJ271424
<i>Auxarthron kuehnii</i>	FMR 4053	5.8S	AJ271427
<i>Amauroascus oblitus</i>	UAMH 2296	5.8S	AJ271421
<i>Amauroascus purpureus</i>	IFO 32622	5.8S	AJ 271564
<i>Nannizziopsis albicans</i>	IMI 155645	5.8S	AJ271432
<i>Amauroascus volatilis-patellis</i>	UAMH 3406	5.8S	AJ390378
<i>Mallochia echinulata</i>	IFO 9192	5.8S	AJ 271562
<i>Auxarthron sp</i>	RV 24809	5.8S	AJ 271425
<i>Auxarthron pseudoauxarthron</i>	IFO 31701	5.8S	AJ 271572
<i>Amaurascopsis perforatus</i>	RV 24813(T)	5.8S	AJ 390377
<i>Aphanoascus keratinophilus</i>	IMI 319010	5.8S	AJ133436
<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	IMI 370015	18S	AJ131788
<i>Uncinocarpus reesii</i>	IMI 211205	18S	L 27991
<i>Auxarthron conjugatum</i>	FMR 5567	18S	AJ 315174
<i>Amaurascopsis perforatus</i>	IMI 350687	18S	AJ 315171
<i>Ctenomyces serratus</i>	IFO 31712	18S	U 29391
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	CBS 124.34	18S	X 59420
<i>Gymnoascus marginosporus</i>	CBS 393.71	18S	AJ 315168
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	FMR 2179	18S	AJ 315172

Abbreviations used: T = ex-type strain; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures; FMR = Facultad Medicina de Reus; IFO = Institute for Fermentation Osaka; IMI = Cabi Bioscience, UK; UAMH = University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium; RV = Institut de Médecine Tropicale "Prince Léopold".

Table 2. Pairwise sequence similarity (%) of the 18S rDNA of taxa of Table 1.

	<i>Aphanoascus fulvescens</i>	<i>Uncinocarpus reesii</i>	<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	<i>Auxarthron conjugatum</i>	<i>Ctenomyces serratus</i>	<i>Gymnoascus marginosporus</i>	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	<i>Amaurascopsis perforatus</i>
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Uncinocarpus reesii</i>	98.7	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	98.8	98.3	-	-	-	-	-	-
<i>Auxarthron conjugatum</i>	98.2	97.9	97.7	-	-	-	-	-
<i>Ctenomyces serratus</i>	97.5	96.8	96.8	97.0	-	-	-	-
<i>Gymnoascus marginosporus</i>	96.7	96.5	96.4	96.2	97.0	-	-	-
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	97.6	97.5	97.3	97.2	97.4	97.4	-	-
<i>Amaurascopsis perforatus</i>	97.0	96.7	96.9	96.4	96.9	96.6	97.3	-

Restriction analysis was according to de Hoog *et al.* (2000). The enzymes used for restricting the ITS, 5.8S 18S regions were the same as those given by Cano *et al.* (this publication page 165-172).

DNA sequencing. The protocol used for sequencing utilized the "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Gouda, The Netherlands). Reactions for the ITS regions and 5.8S rDNA gene were performed according to Solé *et al.* (this publication page 141-152). For sequencing the 18S rDNA fragment we used eight different primers: NS1, NS2, NS19UCB, NS20UCB, NS21UCB, NS22UCB, NS23UCB and NS24UCB (White *et al.*, 1990; Gargas & Taylor, 1992) and the products were run on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). The consensus sequences were obtained using the Autoassembler program (Applied Biosystems). The sequences were aligned with Clustal W (version 1.5) of multiple sequence alignment computer program (Thompson *et al.*, 1994). Any necessary adjustments for improvement were made by eye.

Phylogenetic analysis. Sequence analyses using the Neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) were performed with the MEGA 2.1 computer program (Kumar *et al.*, 2001) with the Kimura two-parameter model, including transitions and transversions and with pairwise deletion for the treatment of the handling gaps/missing data. Confidence values for individual branches were determined by bootstrap analyses (1000 pseudoreplicates).

Results and discussion

TAXONOMY

PSEUDOAMAUROASCUS Cano, Solé & Guarro, *gen. nov.*

Etym.: *Pseudo* (L) -similar to the genus *Amauroascus*. *Ascomata non ostiolata, sphaerica, alba. Peridium hyphis anastomosantibus, non differentatis, laevibus, hyalinis contextum. Asci octospori, globosi vel subglobosi, hyalini vel brunnei, evanescentes. Ascospores unicellulares, oblate, subhyalinae vel brunneae, irregulariter reticulatae. Anamorphosis: Malbranchea sp.*

Species typica: Pseudoamauroascus australiensis Cano, Solé & Guarro

Ascomata non-ostiolate, spherical, white. Peridium composed of a network of anastomosed, undifferentiated, smooth, hyaline hyphae. Asci 8-spored, globose to subglobose, hyaline to brown, evanescent. Ascospores one celled, oblate, subhyaline to brown, irregularly reticulate.

Anamorph: *Malbranchea* sp.

Pseudoamauroascus australiensis Cano, Solé & Guarro *sp. nov.* (Figs 1,2)

Etym.: *australiensis* latinized from the name Australia referring to the country of the type locality.

Fungus homothallicus. Coloniae in agarum cum decocto tuberorum et carotarum (PCA) 20 mm diam. post 14 dies, albae, cottoneae. Ascomata in medio immersa, numerosa, globosa, solitaria, alba, 900-1100 µm diam. Peridium hyphis non differentatis, hyalinis, septatis, ramosis, tenuitunicatis, laevibus, 3-4 µm latis contextum. Asci octospori, globosi vel subglobosi, hyalini vel flavi, evanescentes, 7-9 x 7-8 µm diam. Ascospores unicellulares, oblate, subhyalinae vel brunneae cum maturant, irregulariter reticulatae, 4-4.5 x 3-4 µm. Ceratinophilica. Anamorphosis: Arthroconidia hyalina vel subhyalina, tenuitunicata, laevia, (3.5-) 4-6 x 2.1-2.5 (-3.5) µm. Holotypus: IMI 370014 isolatus ex solo, Mount Lofty, Australia, III/1994.

Homothallic. Colonies on PCA restricted, attaining 20 mm diam in 14 days at 25°C, white, cottony, with numerous ascomata, located mainly on submarginal region. Vegetative hyphae septate, hyaline, simple or branched, thin- and smooth-walled, straight and 2 - 3.5 µm in diameter. Racquet hyphae present. Ascomata immersed in the aerial mycelium, globose, discrete, 900-1100 µm in diam, white, maturing after 21 days. Peridium composed of a network of undifferentiated, hyaline, septate, branched, thin walled, 3-4 µm broad hyphae. Asci 8-spored, globose to subglobose, hyaline to yellow, evanescent, 7-9 x 7-8 µm. Ascospores unicellular, oblate, 4-4.5 x 3-4 µm, subhyaline to brown when mature; wall irregularly reticulate, formed by conspicuous and anastomosed ridges, 5-8 conspicuously demarcated meshes per spore diameter in face view, reticulations polygonal, 2.5-6 µm wide and 0.5-1.5 µm high; on the spore surface within each mesh lacuna there is another, much smaller reticulum seen only under scanning electron microscopy. Keratinophilic.

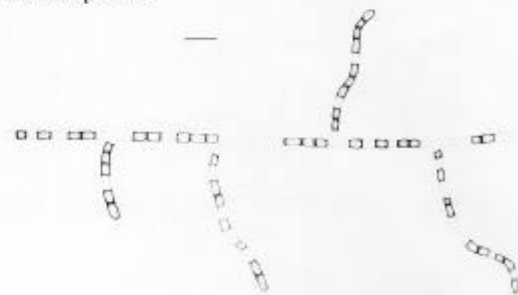


Fig 2. *Malbranchea* anamorph of *Pseudoamauroascus australiensis* (IMI 370014). Scale bar = 10 µm.

CANO ET AL.

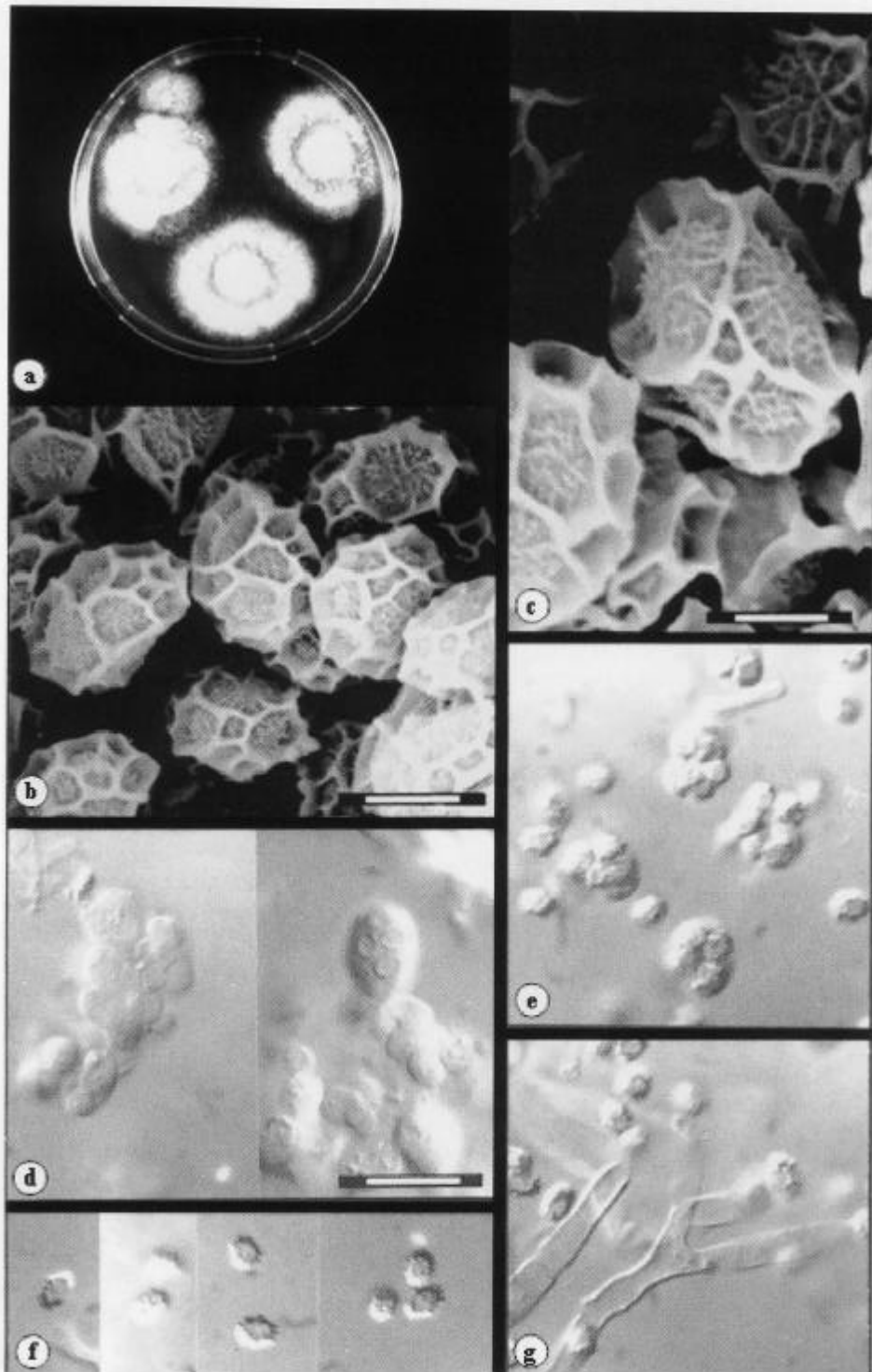


Fig. 1. *Pseudoamauroascus australiensis* (IMI 370014). a. Colony on 2% potato dextrose agar after 21 days incubation at 25°C in 10 cm Petri dishes. b,c,f. Ascospores. d. Initial forms. e. Asci. g. Peridial hyphae b,c: Scanning electron microscopy. Scale bars: b = 2 μ m; c = 1 μ m; d-g = 10 μ m.

176

Anamorph: Arthroconidia borne on the main hyphae and on straight or slightly arcuate lateral branches, cylindrical, hyaline to subhyaline, thin- and smooth-walled, solitary or in chains, (3.5-) 4-6 x 2.1-2.5 (-3.5) μm . Terminal conidia solitary and clavate (3-) 4.5-5 (-6) x 2-2.5 (-3) μm .

HOLOTYPE: from soil, Mont Lofty, Australia, III/1994 (IMI 370014) **Isotype:** FMR 5482. **Ex type culture:** UAMH 8392.

Colonies on PDA attaining 15-25 mm diam. in 14 days at 25 °C, densely cottony in the centre and scarcely cottony over the rest, flat, elevated in the centre, white in the centre and yellowish white (4A2; Kornerup & Wanscher, 1984) in the margin; reverse reddish yellow (4B7).

Colonies on OA attaining a diam. similar to that of colonies on PDA, scarcely cottony in the centre with small granulations over the rest of the colony, flat, umbonate at the centre, white; reverse white.

Colonies on TK with features similar to those seen on OA. The reverse is pale yellow (3A3) in the centre and yellowish white (3A2) on the margin.

Colonies on PYE similar to those on PDA, but with crateriform central portion and with reverse brownish yellow (5C7) in the centre and light yellow (4A4) on the margin. No growth was observed at 12°C or 45°C. At 37°C the growth was very restricted, 18-19 mm diam. The fungus was moderately keratinolytic and did not show cellulolytic capacity. It was tolerant of cycloheximide.

Discussion

The new genus *Pseudoamauroascus* shows a certain resemblance to *Amauroascus* Schroeter in its peridium, which is composed of a network of undifferentiated hyaline hyphae. On the other hand, the ascospores of the new taxon are oblate, which is not usual in *Amauroascus* spp. The latter genus only has one species with oblate ascospores, *Amauroascus oblatum* Cano & Guarro (Cano & Guarro, 1989). This species has very small ascospores (2.25-3 x 2-2.5 μm), ornamented with a very regular reticulation. In the phylogenetic tree obtained from the analysis of the ITS regions and 5.8S rDNA gene (Fig. 3), *A. oblatum* was placed at a great distance from the new taxon, which would support the placement of these species in different genera. The ornamentation pattern of the ascospores of *P. australiensis* is similar to that of the *Amauroascus purpureus* Ito & Nakagiri (Ito & Nakagiri, 1995), but in this species the ascospores are globose with frilled rims that give giving an irregularly reticulate appearance, similar to that seen on a rumpled sheath. Additionally, the ascomata of *Amauroascus purpureus* are purple. *A. purpureus* was shown by sequence analysis not to be closely related to *P. australiensis* (Fig. 3).

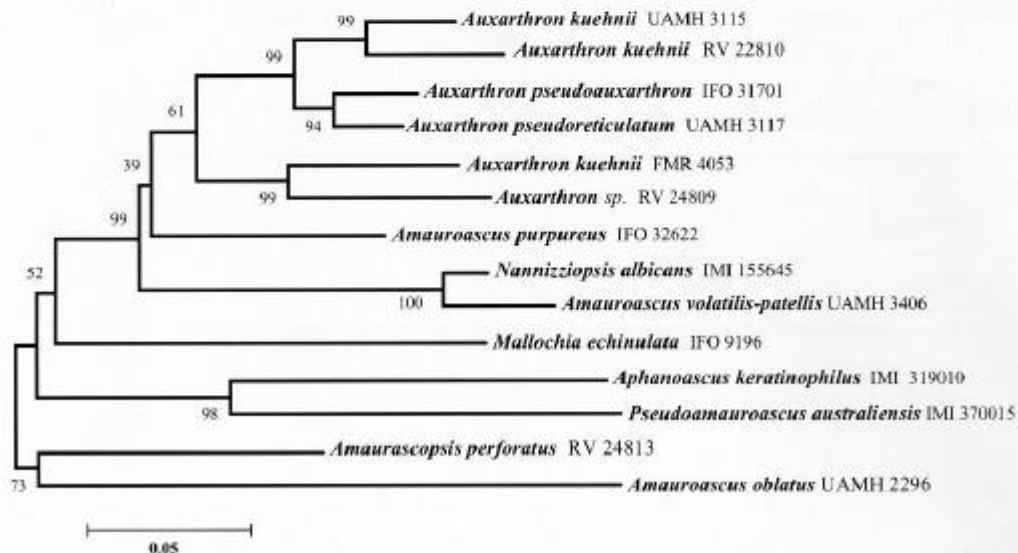


Fig 3. Neighbour-joining unrooted tree based on nucleotide sequences of the ITS region and 5.8S rDNA gene of different species morphologically similar to *Pseudoamauroascus australiensis*. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap replication frequencies are indicated in the internodes.

CANO ET AL.

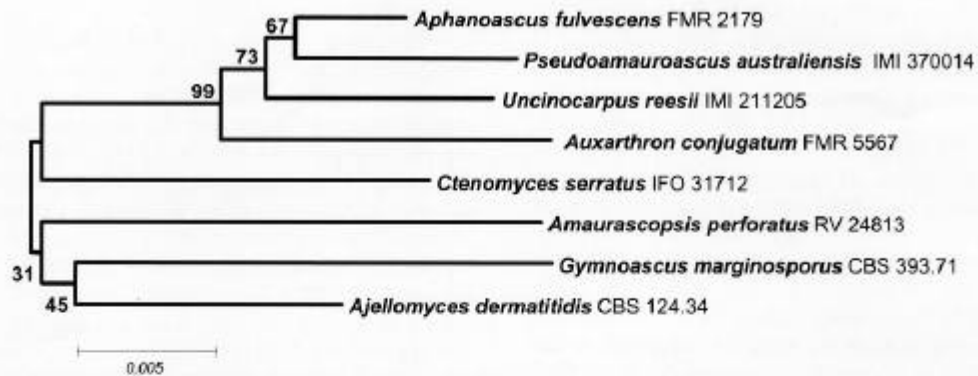


Fig 4. Neighbour-joining unrooted tree based on nucleotide sequences of the 18S rDNA gene of different genera related with *Pseudoamauroascus*. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap replication frequencies are indicated in the internodes.

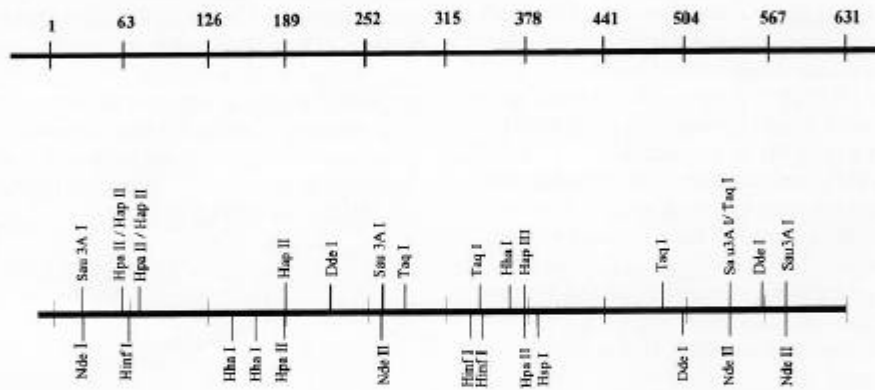


Fig.5. *Pseudoamauroascus australiensis* (IMI 370014). Restriction map of the ITS region and 5.8S rDNA gene.

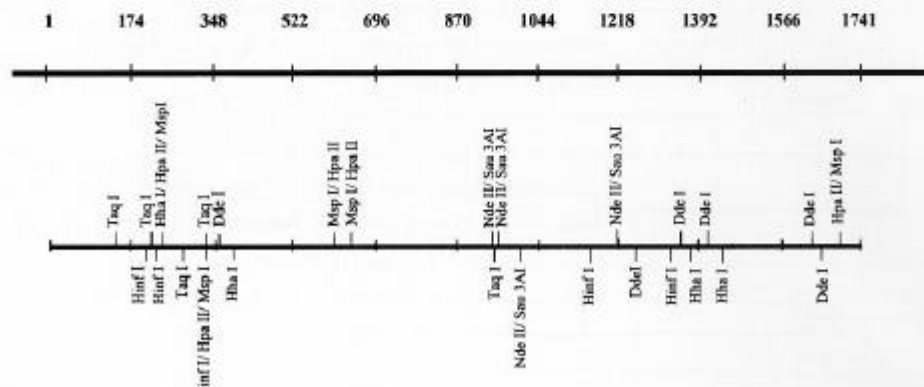


Fig.6. *Pseudoamauroascus australiensis* (IMI 370014). Restriction map of the 18S rDNA gene.

Another morphologically similar genus is *Aphanoascus* Zukai, particularly *A. keratinophilus* Punsola & Cano (Cano & Guarro, 1990) since its ascospores are subglobose to oblate, with a reticulate-alveolate wall and with small verrucae inside the meshes of the reticulum. But the species of *Aphanoascus* are clearly morphologically differentiated from *P. australiensis* because all of them have a pseudoparenchymatous or membranous peridium. Fig. 4 shows the phylogenetic tree obtained from the 18S rDNA sequence analysis of several species of Onygenales. *Pseudoamauroascus australiensis* clustered with *Uncinocarpus reesii* Sigler & Orr and *Aphanoascus fulvescens* (Cooke) Apinis. The three species share oblate ascospores with pitted or reticulate ornamentation. They can be clearly distinguished by the types of peridium they form. Peridia are membranaceous in *Aphanoascus*, poorly differentiated in *Pseudoamauroascus* and absent in *Uncinocarpus* Sigler & Orr. *Auxarthron kuehni* (Arx) Solé, Cano & Guarro, which showed the peridium most similar to that of the new species, was placed in a different cluster. This suggests that the type of peridium formed has low taxonomic value, i.e., that the characters that are traditionally used to distinguish genera in this fungal group relatively readily undergo evolutionary convergence.

The analysis of ITS and 5.8S rDNA sequences confirmed the differences separating the new taxon from the other 11 species of Onygenales tested (Fig 3). In the phylogenetic tree, *P. australiensis* formed a cluster with *Aphanoascus keratinophilus* with a 100% of bootstrap value. The two species, however, were phylogenetically very distant from each other (116 bp). Restriction maps for relevant ribosomal DNA regions are shown in Figs. 5 and 6.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundació Ciència i Salut. We wish to thank the curators of the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), the Institute for Fermentation Osaka (IFO), the Cabi Bioscience (IMI), the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), and the Institute de Medicine Tropicale "Prince Léopold" (RV) for providing strains and J.M. Escolà (Universitat Rovira i Virgili) for reviewing the Latin diagnoses.

Literature cited

- AIELLO, L. & GEORG, L.K., 1957 — *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* — *Mycopathol. Mycol. Appl.* **8**: 3–17.
- ARX, VON J.A., 1987 — A re-evaluation of the Eurotiales. — *Persoonia* **13** part 3: 273–300.
- CANO, J. & GUARRO, J., 1989 — Two new keratinophilic Ascomycetes from Spain. — *Stud. Mycol.* **31**: 61–67.
- CANO, J. & GUARRO, J., 1990 — The genus *Aphanoascus*. *Mycol. Res.* **94**: 355–377.
- CURRAH, R.S., 1985 — Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. — *Mycotaxon* **24**: 1–216.
- GARGAS, A. & TAYLOR, J.W., 1992 — Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. — *Mycologia* **84**: 589–592.
- GENÉ, J., GUILLAMÓN, J.M., GUARRO, J., PUJOL, I. & ULFIG, K., 1996 — Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. — *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 49–57.
- HENRION, B., CHEVALIER, G. & MARTIN, F., 1994 — Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. — *Mycol. Res.* **98**: 37–43.
- HOOG, G.S. DE, GUARRO, J., GENÉ, J. & FIGUERAS, M.J., 2000 — Atlas of clinical fungi, 1126 p. — Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- ITO, T. & NAKAGIRI, A., 1995 — *Anauroascus purpureus*, a new species of the Amauroscaceae (Ascomycotina). — *Mycotaxon* **55**: 347–352.
- KORNERUP, A. & WANSCHER, J.H., 1984 — *Methuen Handbook of Colour*. — Methuen Ltd., London.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. & NEI, M., 2001 — MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1. Analysis software, Bioinformatics. — Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987 — The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. — *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J., 1994 — CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. — *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- VANBREUSEGHEM, R., 1952 — Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. — *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **32**: 173–178.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J., 1990 — Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T.J. (Eds). *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. — Academic Press, New York.

4.4. *Pseudoamauroascus* un nuevo género de los Onygenales (ascomycota)

Objetivo: Se describe un nuevo género en el orden Onygenales, y se estudia la situación taxonómica del mismo discutiendo las relaciones existentes con diferentes géneros en base al análisis de secuencias del ADNr.

Artículo: “*Pseudoamauroascus*, a new genus of the onygenales (ascomycota)” Cano J., Solé M., Pitarch L.B. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:173-180 (2002).

Se describe el nuevo género *Pseudoamauroascus* a partir de una cepa aislada de muestras de tierra de origen australiano mediante el método del anzuelo de queratina.

Este género presenta un peridio similar al género *Amauroascus*, formado por un entramado de hifas indiferenciadas. Ambos géneros se diferencian sin embargo por la morfología de sus ascosporas, ya que el patrón de reticulación de la superficie de las ascosporas del género nuevo es irregular, formado por crestas, y no se observa en ninguna especie de *Amauroascus*. Tras el estudio del gen 5.8S del ARNr y las regiones ITS1 e ITS2 de *Pseudoamauroascus*, y de diferentes especies de *Amauroascus*, *Auxarthron* y otros géneros morfológicamente relacionados, se verificó que dichos géneros están filogenéticamente muy distantes. La ornamentación de las ascosporas de la especie tipo que aquí se describe, *Pseudoamauroascus australiensis* Cano, Solé y Guarro, es similar a la que presenta *Amauroascus purpureus* Ito y Nakagiri, pero las ascosporas de esta última presentan un reticulado con borde sinuoso (“*frilled rims*”) y son esféricas. También es fácil la distinción entre ambas especies por sus ascomas, ya que en el caso de *Amauroascus purpureus* es de color púrpura (como indica la etimología de la especie) y el de *P. australiensis* es de color blanquecino. Otro género con el que guarda

cierta similitud es *Aphanoascus*, concretamente *Aphanoascus keratinophilus* Punsola y Cano. Ambas especies presentan ascosporas de subglobosas a obladas, con una pared reticulada-alveolada y con pequeñas verrugas dentro de los alvéolos. Pero se diferencian claramente en que las especies de *Aphanoascus* tienen un peridio pseudoparenquimático (o membranáceo) y *Pseudoamauroascus*, como fue mencionado, presenta un peridio formado por un entramado de hifas indiferenciadas.

Con el objetivo de intentar estudiar las relaciones filogenéticas entre *Pseudoamauroascus* y otros géneros de Onygenales, se han analizado las secuencias del gen 18S del ARNr, el que al presentar un mayor grado de conservación lo que lo hace idóneo para dicha finalidad. Se han comparado las secuencias del nuevo taxon con las de las cepas de *Uncinocarpus*, *Aphanoascus*, *Auxarthron*, *Ctenomyces*, *Amauroscopsis*, *Gymnoascus* y *Ajellomyces*. Según este estudio, el nuevo género está molecularmente más relacionado con *Uncinocarpus* y *Aphanoascus*, concretamente con las especies *U. reesii* Sigler y Orr y *A. fulvescens* (Cooke) Apinis que con el resto de géneros del orden Onygenales. Esto se correlaciona perfectamente con las características morfológicas, ya que las tres especies presentan ascosporas ornamentadas con un patrón de reticulación con foveas, pero que se pueden diferenciar entre ellos por el tipo de peridio que presentan.

4.5. ***Castanedomyces australiensis* gen. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil.** Cano J., Solé M., Pitarch L.B. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:165-172 (2002).

Castanedomyces australiensis, gen. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil

J. Cano*, M. Solé, L. B. Pitarch & J. Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, 43201 - Reus, Tarragona, Spain

Abstract: *Castanedomyces australiensis* gen. nov., sp. nov., isolated from Australian soil, is described and illustrated. The outstanding characteristics of this new taxon are pilose, globose, non-ostiolate ascomata, with a membranous peridium and numerous seta-like appendages, and lenticular ascospores with a tuberculate wall and an equatorial crest. A comparative sequence analysis of the 18S rDNA gene of representative species of some morphologically related genera demonstrated a close relationship of *Castanedomyces* with *Aphanoascus*, another onygenalean genus which also possesses a membranous peridium, a feature found in only a few Onygenalean genera.

Key words: *Castanedomyces australiensis*, taxonomy, keratinophilic fungi

Introduction

During our studies on keratinophilic fungi from different geographical regions and habitats, an interesting keratinophilic ascomycete was isolated from a soil sample from Australia. The species features pilose ascomata with a membranous peridium, as well as lenticular ascospores. This unusual combination of characteristics is not known so far in the Ascomycota. For this reason, in combination with confirmation of its distinctiveness in molecular studies, it is considered a new genus of the order Onygenales and is described below.

The Onygenales have been extensively studied by various authors (Benny & Kimbrough, 1980; Currah, 1985, 1988, 1994, 1995 and von Arx, 1987). The most comprehensive study to date is the review of Currah (1985). Currah accepted 29 onygenalean genera. Since then, ten more genera have been described. They are: *Orromyces* Sur and Ghosh (Ghosh & Sur, 1985), *Mallochia* v. Arx and Samson (1986), *Monascella* Guarro and v. Arx (1986), *Brunneospora* Guarro and Punsola (Guarro *et al.*, 1987), *Byssoomygena* Guarro, Punsola and Cano (1987), *Amaurascopsis* Guarro, Gené and De Vroey (1992), *Gymnostellatospora* Udagawa, Uchiyama and Kamiya (1993), *Polytolypa* Scott and Malloch (Scott *et al.*, 1993), *Bifidocarpus* Cano, Guarro and Castañeda (1994) and *Neoarachnotheca* Ulfig, Cano and Guarro (Cano *et al.*, 1997). Some of these genera have recently been excluded

from the Onygenales or otherwise removed from consideration in this context. *Monascella* was shown to be related to the Pezizales (Stchigel *et al.*, 2001), *Gymnostellatospora* was included in the Myxotrichaceae, a family of uncertain position (Eriksson, 1999; Vidal *et al.*, 2000), and *Brunneospora* and *Orromyces* were considered synonyms of *Uncinocarpus* by Sigler *et al.* (1997). The type of peridium has been considered a key character in the taxonomy of these fungi. The majority of Onygenales produce gymnothecia, i.e., ascomata with an incomplete peridium formed by interwoven hyphae. Only the genera *Aphanoascus* Zúkal and *Arachnomyces* Malloch and Cain have a pseudoparenchymatous peridium. Our taxon, which also has a pseudoparenchymatous peridium, is clearly morphologically different from these two genera. Analysis of 18S rDNA sequences supports its distinction from these and other related genera.

Materials and methods

Sample origin and fungal isolation

Soil samples were collected in Mount Lofty in Australia, during the autumn of 1994. Collections were made mainly from the A₀ soil horizon, using previously sterilised polyethylene bags, closed by a rubber band. On returning to the laboratory the materials were stored at 4-7°C until used. The hair baiting method described by Vanbreuseghem (1952) was used for the isolation of the keratinophilic fungi.

Morphological study

The strains were grown on Sabouraud dextrose agar (SDA; Pronadisa, Madrid, Spain), oatmeal agar

* Corresponding author: Dr. J. Cano. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, 43201-Reus, Tarragona, Spain. E-mail: jfc@astor.urv.es

TABLE 1. Strains of the different genera used in this study.

SPECIES	STRAIN	Accession n° EMBL
<i>Arthroderma curreyi</i>	CBS 138.26	AJ315165
<i>Ctenomyces serratus</i>	IFO 61712	U 29391
<i>Gymnoascus petalosporus</i>	UAMH 4152	U 29392
<i>Arachniotus ruber</i>	IMI 100913	AJ315166
<i>Arachnomyces minimus</i>	CBS 324.70 (T)	AJ315167
<i>Narasimbella marginospora</i>	CBS 393.71(T)	AJ315168
<i>Gymnoascus reesii</i>	FMR 6562	AJ315169
<i>Byssosascus striatosporus</i>	CBS 642.66(T)	AJ315170
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	CBS 124.34	X 59420
<i>Amauroscopsis perforatus</i>	FMR 5489	AJ315171
<i>Aphanosascus fulvescens</i>	FMR 2179	AJ315172
<i>Apinisia queenslandia</i>	IMI121675 (T)	AJ315173
<i>Auxarthron conjugatum</i>	FMR 5567	AJ315174
<i>Brunneospora reticulata</i>	IMI 315744 (T)	AJ315175
<i>Byssoscygna ceratinophila</i>	IMI 370021	AJ315176
<i>Castanedomycetes australiensis</i>	IMI 370015 (T)	AJ315177
<i>Pectinotrichum llanense</i>	FMR 3779	AJ315178
<i>Renispora flavissima</i>	IMI 241796	U 29393
<i>Uncinocarpus reesii</i>	IMI 211205	L 27991
<i>Neurospora crassa</i>	FMR 5141	X04971

* T type strain — * CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures — * FMR Facultat Medicina de Reus — * IFO Institute for Fermentation Osaka — * IMI CABI Bioscience — * UAMH University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium

(OA; Difco, Detroit., USA), potato carrot agar (PCA; potato 20 g, carrot 20 g, agar 15 g, chloramphenicol 0.05 g, water 1L), potato dextrose agar (PDA; Pronadisa), phytone yeast extract agar (PYE; BBL, Cockeysville, USA), Sabouraud diluted salts medium (Takashio's medium, TK), (Takashio, 1972) and malt extract agar (MEA; Difco). Growth rate was determined between 12-45°C on OA and at room temperature (22-25°C) for all media. Tolerance to cycloheximide (0.04 %) was tested using the Mycosel medium (MYC; BBL, Cockeysville, USA). Keratinolytic capacity was determined as per Ajello and Georg (1957). Cellulolytic ability was determined as the capacity to digest a cellophane membrane placed over the surface of a PDA petri dish (Sigler & Carmichael, 1976). Colour notations in parentheses are from Korerup and Wanscher (1984). The morphological structures were measured in water and lactophenol. Scanning electron microscopic (SEM) techniques were according to Figueras and Guarro (1988).

Molecular methods

Strains and DNA extraction: The strains used in this study and their EMBL accession numbers are shown in Table 1. When available, type or authentic strains were used. Fungal DNA was isolated as described by Estruch *et al.* (1989) with some modifications (Guillamón *et al.*, 1996). The strains were grown at

28°C in 0.8 ml of Sabouraud broth contained in 1.5 ml microcentrifuge tubes and shaken at 250 rpm. The mycelium was washed with distilled water and lyophilised and ground to a fine powder by macerating it with single-use pipette tips in 1.5 ml microcentrifuge tubes. The powder was incubated for 1h at 65°C in 500 µl of extraction buffer (50 mM Tris HCl pH 7.2, 50 mM ethylenediamine tetraacetic acid [EDTA], 3% sodium dodecyl sulphate [SDS]). The lysate was extracted with phenol:chloroform:isoamyl alcohol solution (25:24:1) and DNA was recovered by isopropanol precipitation. The pellet was washed with 70% v/v ethanol, vacuum dried and resuspended in TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, EDTA 0.1 mM).

DNA amplification: The fragment of the rDNA corresponding to the 18S gene was amplified using the primers NS1 and NS24 (White *et al.*, 1990). The protocol used for the amplification was that described by Henrion *et al.* (1994) with some modifications (Gené *et al.*, 1996). The product was purified by the GFX™ PCR DNA purification kit (Amersham Biosciences, Piscataway NJ, USA) and stored at -20°C until used in sequencing.

Restriction analysis: Restriction analysis was performed according to de Hoog *et al.* (2000). For the fragment consisting of the internal transcribed spacers (ITS)1 and ITS2 and the intervening 5.8 S nuclear ribosomal DNA gene, the enzymes used in digestions

were *HinfI*, *HaeIII*, *RsaI*, *DdeI*, *TaqI*, *HdeII*, *HhaI* and *HpaII*. For the 18S rDNA gene the enzymes used were *HinfI*, *RsaI*, *DdeI*, *TaqI*, *HdeII*, *HhaI* and *HpaII*.

Sequencing and phylogenetic analysis

The protocol used for sequencing was the "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Gouda, The Netherlands). Reactions were performed using the primers NS1, NS2, NS19UCB, NS20UCB, NS21UCB, NS22UCB, NS23UCB and NS24UCB (White *et al.*, 1990; Gargas & Taylor, 1992) and were run on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). The consensus sequences were obtained using the Autoassembler program (Applied Biosystems). The sequences were aligned with the multiple sequence alignment computer program Clustal W, version 1.5 (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic analyses using the Neighbour-joining method (NJ) (Saitou & Nei, 1987) were performed with the MEGA 1.0 computer program (Kumar *et al.*, 1993). Confidence values for individual branches were determined by bootstrap analyses (1000 pseudoreplicates). In the parsimony analysis, we used PAUP (version 3.1.1.) (Swofford, 1991) with the heuristic search option. The robustness of branches was assessed by bootstrap analysis with 1000 replicates.

Results and discussion

TAXONOMY

CASTANEDOMYCES Cano, Pitarch & Guarro, *gen. nov.*

Ascomata solitaria, non ostiolata, sphaerica vel subsphaerica, rubrobrunnea. Peridium cum textura angulari. Appendices recti vel flexuosi cum basi semisphaerica. Asci globosi vel subglobosi, hyalini, evanescentes, octospori. Ascospores unicellulares, brunneae, lenticulares, cum cristis equatorialibus, tuberculosae. Status asexualis ignotus.

SPECIES TYPICA: *Castanedomyces australiensis, sp. nov.*

Ascomata solitary, non-ostiolate, more or less globose, brownish-red. **Peridium** pseudoparenchymatous with texture angularis. **Appendages** straight to flexuose, tapering to the apex, with a hemispherical base. **Asci** globose to subglobose, hyaline, evanescent, 8-spored. **Ascospores** unicellular, light brown, lenticular, with a prominent equatorial crest and with a tuberculate wall. **Anamorph** unknown.

ETYMOLOGY: named after Rafael Castañeda, an eminent Cuban mycologist.

Type species: *Castanedomyces australiensis, sp. nov.*

Castanedomyces australiensis Cano, Pitarch & Guarro, *sp. nov.* Figs. 1-7

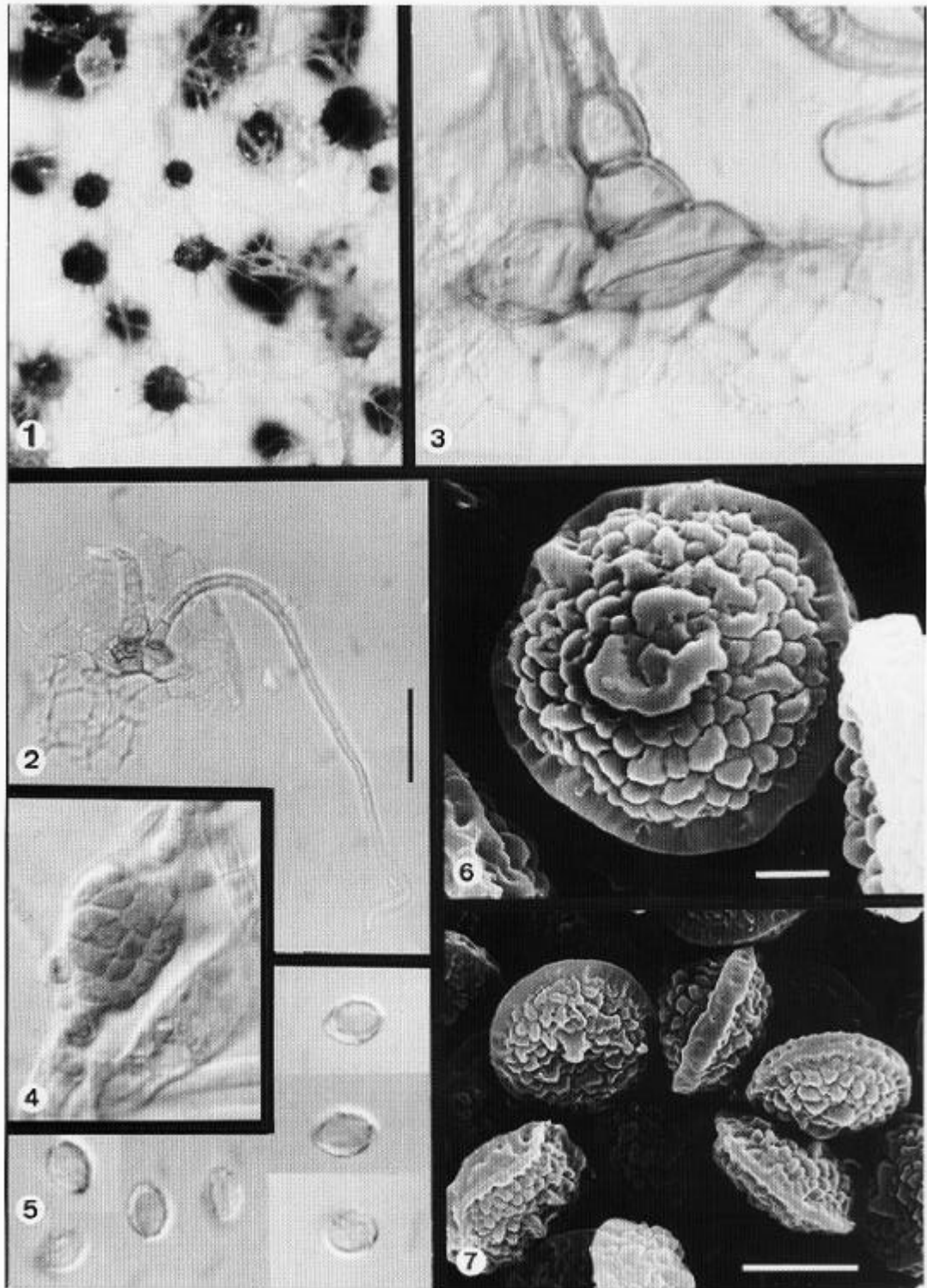
ETYMOLOGY: *australiensis* relative to Australia.

Coloniae in agaris cum decocto tuberorum et carotarum "PCA" 30-40 mm post 14 dies, flavae, cottonae, funiculos in centro coloniae formantibus; reversum colore simili superficiei. Mycelium compositum ex hyphis hyalinis et subhyalinis, ramosis, septatis, laevibus, 2-2.5 µm crassis. Post 9-10 dies videntur formae initiales, antheridia et ascogonia symmetrice intricata. Post 10-12 dies incubationis in centro et in submargine coloniae videntur ascomata in mycelio aereo immersa. Ascomata solitaria, numerosa, non ostiolata, globosa, cum appendicibus, flava vel brunneorubra, 130-185 µm diam.; paries peridialis 4-10 µm crassa, cum 2-3 stratis, cum textura angularis, cellulis flavobrunneis 5-9 µm diam. formata. Peridium flavorubrum, cum textura angularis, 4-5 µm crassum. Appendices numerosi, flavorubri, cum basi hemisphaerica, 8-10 µm diam., in tota ascomatis superficie occurrentes, solitarii vel bini, 60-70 µm longi, in parte media 7-8 µm crassi, septati, in basi leniter rugosi et in cetero laeves; aliqui ramificationes simplices prope basim habent. Asci octospori, globosi vel subglobosi, hyalini, evanescentes, 11-13 x 11-12 µm diam. Ascospores unicellulares, lenticulares, subhyalinae vel rubrobrunneae, tuberculosae, cum cristis equatorialibus et cum incrassationibus polaribus, 6-7 x 4-5 µm. Status asexualis ignotus.

Holotypus: ex solo, Mount Lofty, South Australia, III/1994, IMI 370015. **Isotypus:** FMR 5484.

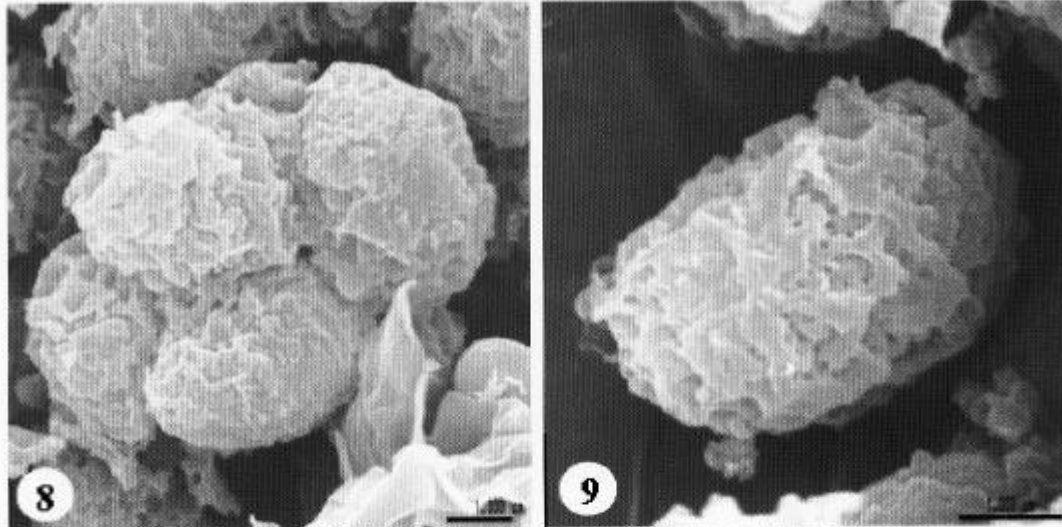
Colonies on potato carrot agar (PCA) reaching 30-40 mm diam. in 14 days at 25°C, yellowish-white (M. 4A2-4A3), cottony; reverse yellowish-white (M. 4A2-4A3). **Mycelium** composed of hyaline to subhyaline hyphae, branched, septate, smooth, 2-2.5 µm wide, forming funicles in the centre of the colony. **Ascomatal** initials coiled, appearing after 9-10 days of incubation. **Ascomata** superficial to immersed in the aerial mycelium, maturing after 10-12 days of incubation in the central and submarginal zones of the colony, solitary, more or less globose, pilose, brownish-red, 130-185 µm diam; peridium 4-10 µm thick, 2-3 layered, structured as a textura angularis composed of 5-9 µm diam., brownish-yellow cells. **Appendages** brownish-red, with a broad hemispherical base, single or in pairs, up to 15 in number, distributed over the surface of the ascomata, 60-70 µm long, tapering towards the apex, 7-8 µm diam. in the midregion, septate, slightly roughened at the base, smooth over the remainder of the surface, sometimes with a second appendage branching away near the base. **Asci** 8-spored, globose to subglobose, hyaline, evanescent, 11-13 x 11-12 µm. **Ascospores** unicellular, lenticular, subhyaline to reddish-brown, with a prominent equatorial crest and polar

CANO ET AL.



Figs. 1-7 *Castanedomyces australiensis* (FMR 5484). Fig. 1, ascomata on PCA, (50 x). Figs. 2, 3, appendages (N) (2: bar = 25 μ m; 3: bar = 10 μ m). Fig. 4, initial forms (N) (bar = 10 μ m). Fig. 5, ascospores (N) (bar = 10 μ m). Figs. 6, 7, ascospores (SEM) (6: bar = 1 μ m; 7: bar = 3 μ m).

168



Figs. 8,9. *Byssoomyces ceratinophila* (IMI 370021). Fig.8, ascus (bar = 1 μ m). Fig. 9, ascospores (bar = 1 μ m).

thickenings and with a tuberculate-granulose wall, 6-7 x 4-5 μ m. **Anamorph** unknown.

HOLOTYPE: from soil, Mount Lofty, Australia, III/1994 (IMI 370015). **Isotype:** FMR 5484. **Ex type culture:** UAMH 8386.

Colonies on OA and TK similar to those on PCA. Growth on PDA, SDA and PYE more restricted than on PCA, 15-25 mm diam. after 14 days of incubation, colonies yellowish-white (M. 4A2-4A3), with regular margin, dense, cottony. No growth at 12°C or at 45°C, at 37°C more restricted growth than at 25°C (18-20 mm in 14 days). Intolerant of cycloheximide. Slightly keratinolytic, not cellulolytic.

A restriction map of the ITS1/ITS2 and 5.8 S rDNA gene is shown in Fig. 10. The length of this fragment is 595 bp. In nucleic acid base composition, it contains 138 A, 150 C, 157 G, and 150 T. In location, ITS1 extends from positions 29-236, 5.8S from 237-410, and ITS2 from 411-544. The restriction map of the 18 S rDNA gene is shown in Fig. 11. This gene is 1741 bp long, consisting of 450 A, 366 C, 464 G, and 461 T.

Discussion

The major characteristics of the keratinophilic fungus *C. australiensis* unequivocally show that it is a member of Onygenales (Currah, 1985) or of the Eurotiales as defined in a broad sense (von Arx, 1987) to include the onygenalean fungi. *C. australiensis*, however, shows a combination of features that makes it difficult to place it accurately in any of the existing genera of these orders. The presence of ascomata with a membranous peridium is unusual in Onygenales; such structures are otherwise only present in

Aphanoascus and *Arachnomyces*. *Aphanoascus*, like *Castanedomyces*, includes species with lenticular ascospores showing an equatorial crest and polar thickenings (Cano & Guarro, 1990). Figure 12 shows the tree that was obtained when the 18S rDNA sequences of *C. australiensis* and of 19 related species were compared using NJ. The tree demonstrates that *C. australiensis* is phylogenetically distant from the other species. It clustered with *Aphanoascus fulvescens*; the branch containing both organisms had a bootstrap value of 98%. In the 18S region, the two species only differ by 15 nucleotides (Figure 13).

Ascomatal appendages are present in other genera of Onygenales such as *Uncinocarpus* Sigler & Orr, *Auxarthron* Orr & Kuehn, *Ajellomyces* McDonough & Lewis and *Ctenomyces* Eidam. In these genera, however, the peridium is incomplete, i.e., it is made up of interwoven, anastomosed hyphae. Additionally, none of these genera have ascospores with equatorial crests. Phylogenetically, all are widely divergent from the cluster formed by *A. fulvescens* and *C. australiensis*. Ascospores with equatorial crests and thickened poles are found in some species of *Gymnoascus* Baranetzky, particularly *G. citrinus* (Masse and Salmon) v. Arx and *G. dankaliensis* (Castellani) v. Arx, but these species can be distinguished from *C. australiensis* by peridial morphology. *Arachnomyces*, has a parenchymatous peridium and also produces appendages similar to those of *Castanedomyces*. But the peridium of *Arachnomyces* is made up of two distinct cell layers, an outer dark layer and an inner hyaline layer, and its ascospores do not have equatorial crests or polar thickenings (Malloch & Cain, 1970). Additionally, the arthroconidial anamorph *Onychocola* Sigler is present in one species of *Arachnomyces*. This genus is placed

latter feature corroborates the inclusion of this species in this clade.

Our analysis excluded *Bysoascus*, the only member of the Myxotrichaceae considered, from the Onygenales. This agrees with the findings of Sugiyama *et al.* (1999). Eriksson (1999) considered the Myxotrichaceae to be a family of uncertain position.

The members of the Onygenales included in this study were divided into four clades. With the exception of the clade formed by *Ajellomyces dermatitidis* and *Amaurascopsis perforatus*, all were supported with high bootstrap values. These clades only correlate partially with the traditional taxonomic scheme of Currah (1985), who divided the Onygenales into four families, the Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. He had considered primarily their ascospore morphologies, the nature and occurrence of anamorphs and the enzymatic capacities possessed by the various taxa. *Ajellomyces*, included by Currah in the Onygenaceae, is morphologically very different from the other members of the family, and, as was mentioned before, is also phylogenetically distant. The polyphyly of Onygenaceae had been mentioned previously (Sugiyama *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2000). The clade formed by *Arthroderma curreyi* and *Ctenomyces serratus* corresponds with the Arthrodermataceae *sensu* Currah, and the clade formed by *Gymnoascus ruber*, *Gymnoascus petalosporus*, *Gymnoascus reesii* and *Narasimhella marginospora* corresponds with the Gymnoascaceae. However, in our opinion, this latter family is superfluous because its circumscription is the same as that of the genus *Gymnoascus* (Sole *et al.*, this publication page 141-152). Currah (1994) proposed the inclusion of *Gymnoascus* (*Gymnoascoideus*) *petalosporus* in the family Arthrodermataceae, but our results do not support this statement. We have demonstrated (Solé *et al.*, 2002) that the genus *Uncinocarpus* *sensu* Sigler (1997) is clearly polyphyletic because the type species, *Uncinocarpus reesii*, is in a separate clade from that formed by *Uncinocarpus queenslandicus* and its synonym *Brunneospora reticulata*. We must also note the placement of *Pectinotrichum ilanense* in a separate cluster from that embracing *Auxarthron*. This finding disagrees with Currah (1994), who proposed the new combination *Auxarthron ilanense*. The distinctiveness of *Pectinotrichum* has also been indicated by Sugiyama *et al.* (1999) after analysis of rRNA genes, and by Solé *et al.* (2002) after examination of the ITSs regions.

The results obtained with parsimony analysis (Fig. 13) were similar to those obtained with NJ. The main difference was that NJ placed *Amaurascopsis perforatus* and *Ajellomyces dermatitidis* together (Fig.

12) in the Onygenales clade, albeit with a low bootstrap value (31%), while parsimony showed these species rooted separately (Fig. 13).

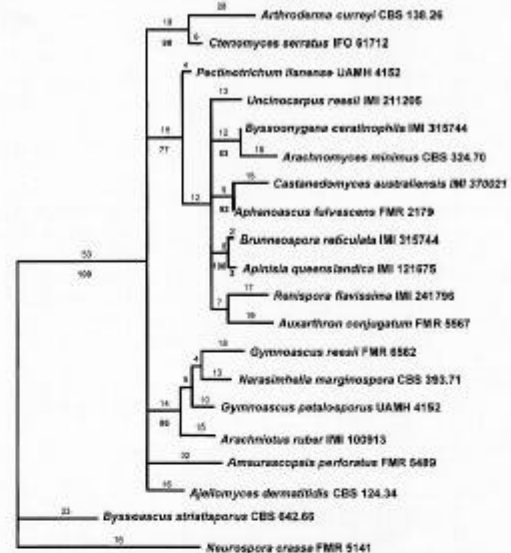


Fig. 13. Phylogenetic tree from the 18S rDNA gene using PAUP 3.1.1. heuristic option. Branch lengths are indicated above the branches in the tree. Bootstrap values (percentages of 1000 bootstrap replicates) are indicated in bold below the branches of the tree.

Acknowledgements

This work was supported by grant PM95-0160 from CICYT (Ministerio de Educación y Ciencia) and the Fundació Ciència i Salut, Reus, Spain. We wish to thank the curators of the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), CABI Bioscience (IMI), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), and the Institute for Fermentation, Osaka (IFO) for kindly providing strains, J.M. Escalá (Universitat Rovira i Virgili) for reviewing the Latin diagnoses and Ms Carme Sanmartí and Susana de Haro for technical assistance.

Literature cited

- ABBOTT, P., SIGLER, L. & CURRAH, R.S., 1996 — Delimitation, typification, and taxonomic placement of the genus *Arachnomyces* — *Systema Ascomycetum* **14**: 79-85.
- AJELLO, L. & GEORG, L.K., 1957 — *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* — *Mycopathol. Mycol. Appl.* **8**: 3-17.
- ARX, J.A. VON, 1987 — A re-evaluation of the *Eurotiales* — *Persoonia* **13**: 273-300.
- ARX, J.A. VON & SAMSON, R.A., 1986 — *Mallochia*, a new genus of the *Eurotiales* — *Persoonia* **13**: 185-188.
- BENNY, G.L. & KIMBROUGH, J.W., 1980 — A synopsis of the orders and families of Plectomycetes with keys to genera — *Mycotaxon* **12**: 1-91.
- CANO, J. & GUARRO, J., 1990 — The genus *Aphanoascus*. — *Mycol. Res.* **94**: 355-377.

CANO ET AL.

- CANO, J., GUARRO J. & CASTAÑEDA RUIZ, R.F., 1994 — Studies on keratinophilic fungi. IV. *Bifidocarpus*, a new genus of the Eurotiales. — *Mycotaxon* **52**:53-57.
- CANO, J., ULFIG, K., GUILLAMÓN, J.M., VIDAL, P. & GUARRO, J., 1997 — Studies on keratinophilic fungi. IX. *Neoarachnotheca* gen. nov. and a new species of *Namizziopsis* — *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 149-158.
- CURRAH, R.S., 1985 — Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. — *Mycotaxon* **24**: 1-216.
- CURRAH, R.S., 1988 — An annotated key to the genera of the Onygenales. — *Systema Ascomycetum* **7**: 1-12.
- CURRAH, R.S., 1994 — Peridial morphology and evolution in the protunicate Ascomycetes. — Pp. 281-293 *In*: HAWKSWORTH, D.L. (ed.) *Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties*. — Plenum Press, New York (U.S.A.).
- CURRAH, R.S., 1995 — Ecological data and the systematics of the Onygenales. Pp. 68-72. *In*: Proc. 3rd Intern. Symp. Mycol. Soc. Japan, 1995 — Nat. Hist. Mus. Inst., Chiba, Japan.
- ERIKSSON, O.E., 1999 — Outline of Ascomycota — *Myconet* **3**: 1-88.
- ESTRUCH J.J., ANTUÑA C., FERRER S. & RAMÓN, D., 1989 — Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. — *Rev. Iber. Micol.* **6**: 62-66.
- FIGUERAS, M.J. & GUARRO, J., 1988 — A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. — *Mycologia* **80**: 298-306.
- GARGAS, A. & TAYLOR, J.W., 1992 — Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. — *Mycologia* **84**: 589-592.
- GENÉ, J., GUILLAMÓN, J.M., GUARRO, J., PUJOL, I. & ULFIG, K., 1996 — *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterisation and antifungal susceptibility. — *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 49-57.
- GHOSH, G.R. & SUR, B., 1985 — Keratinophilic fungi from Orissa, India III — Two records. — *Kavaka* **12**: 63-69.
- GUARRO, J. & ARX, J.A. VON, 1986 — *Monascella* a new genus of Ascomycota. — *Mycologia* **78**: 869-871.
- GUARRO, J., PUNSOLA, L. & CANO, J., 1987 — *Byssomygena ceratinophila*, gen. et sp. nov. a new keratinophilic fungus from Spain. — *Mycopathologia* **100**: 159-161.
- GUARRO, J., PUNSOLA, L. & FIGUERAS, M.J. 1987 — *Brunneospora reticulata*, gen. nov. spec. nov. A keratinophilic ascomycete from Spain. — *Persoonia* **13**: 387-390.
- GUARRO, J., GENÉ, J. & DE VROEY, CH., 1992 — *Amaurascopsis*, a new genus of Eurotiales. — *Mycotaxon* **45**:171-178.
- GUILLAMÓN, J.M., CANO, J., RAMÓN, D. & GUARRO, J., 1996 — Molecular differentiation of *Keratinomyces* (*Trichophyton*) species. — *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 223-227.
- GHOSH, G.R. & SUR, B., 1985 — Keratinophilic fungi from Orissa, India III — Kavaka **12**: 63-69.
- HENRION, B., CHEVALIER, G. & MARTIN, F., 1994 — Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. — *Mycol. Res.* **98**: 37-43.
- HOOG, G.S. DE, GUARRO J., GENÉ, J. & FIGUERAS, M.J., 2000 — Atlas of clinical fungi, 1126 p. — Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, The Netherlands. Universitat Rovira I Virgili, Reus, Spain.
- KORNERUP, A. & WANSCHER, J.H., 1984 — *Methuen Handbook of Colour*. — Methuen Ltd., London.
- KUMAR, S., TAMURA, K. & NEI, M., 1993 — MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, v.1.0. — The Pennsylvania State University: University Park, Pennsylvania.
- MALLOCH, D. & CAIN, R.F., 1970 — The genus *Arachnomyces*. — *Can. J. Bot.* **48**: 839-845.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987 — The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. — *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SCOTT, J. A., MALLOCH, D.W. & GLOER, J.B., 1993 — *Polytolypa*, an undescribed genus in the Onygenales. — *Mycologia*, **85**: 503-508.
- SIGLER, L. & CARMICHAEL, J.W., 1976 — Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. — *Mycotaxon* **4**: 349-488.
- SIGLER, L., ABBOTT, S.P. & WOODDYEY, A.J., 1994 — New records of nail and skin infection due to *Onychocola canadensis* and description of its teleomorph *Arachnomyces nodosetatus* sp. nov. — *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 275-285.
- SIGLER, L., FLIS, A.L. & CARMICHAEL, J.W., 1997 — The genus *Ucinocarpus* (Onygenaceae) and its synonym *Bromespora*: new concepts, combinations and connections to anamorphs in *Chrysosporium*, and further evidence of relationship with *Coccidioides immitis*. — *Can. J. Bot.* **76**: 1624-1636.
- SOLE, M., CANO, J. & GUARRO, J., 2002 — Molecular taxonomy of *Amauroascus Auxarthron* and other related genera of the Onygenales. — *Mycol. Res.* **106**: 388-396.
- STCHIGEL, A.M., CANO, J., MACCORMACK, W. & GUARRO, J., 2001 — *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. — *Mycol. Res.* **105**: 377-382.
- SUGIYAMA, M., OHARA, A. & MIKAWA, T., 1999 — Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequences. — *Mycoscience* **40**: 251-258.
- SWOFFORD, DL., 1991 — PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony v. 3.1.1. — A computer program distributed by Illinois Natural History Survey.
- TAKASHIO, M., 1972 — Etudes des phénomènes de reproduction liés au vieillissement et au rajeunissement des cultures de champignons. — *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **53**: 427-580.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J., 1994 — CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. — *Nucl. Acid Res.* **22**: 4673-4680.
- UDAGAWA, S., UCHIYAMA, S. & KAMIYA, S., 1993 — *Gymnostellatospora*, a new genus of the Myxotrichaceae. — *Mycotaxon* **48**: 157-164.
- VANBREUSEGHEM, R., 1952 — Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. — *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **32**:173-178.
- VIDAL, P., VINUESA, M.A., SANCHEZ-PUELLES, J.M. & GUARRO, J., 2000 — Phylogeny of the anamorphic genus *Chrysosporium* and related taxa based on rDNA internal transcribed spacer sequences. Pp. 22-29. *In*: KUSHWAHA, R.K.S. & GUARRO, J (Eds). *Biology of the dermatophytes and other keratinophilic fungi*. — *Rev. Iber. Mycol.*, Bilbao, Spain.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J., 1990 — Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. *In*: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J. & WHITE, T.J. (Eds). *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. — Academic Press, New York.

4.5. *Castanedomyces australiensis* gen. nov., sp. nov. un hongo queratinofílico de suelo australiano

Objetivo: Se propone al nuevo género monotípico *Castanedomyces* del orden Onygenales, en base a un aislamiento de una muestra de suelo procedente de Australia. Se ha realizado un estudio morfológico y molecular del género, discutiendo las relaciones existentes con otros géneros de dicho orden.

Artículo: ***Castanedomyces australiensis* gen. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil.** Cano J., Solé M., Pitarch L.B. & Guarro J. *Studies in Mycology* 47:165-172 (2002).

En este trabajo se describe e ilustra un género y especie nuevos para la Ciencia, aislado a partir de una cepa aislada de una muestra de tierra procedente de Australia. Este nuevo género para los Onygenales se denominó *Castanedomyces* Cano, Pitarch y Guarro, siendo la especie tipo *Castanedomyces australiensis*. Una de las características más relevantes es el peridio de tipo membranáceo, que no es un carácter común entre los Onygenales. En general, los miembros de este orden poseen ascomas delimitados por un entramado de hifas, a excepción de los géneros *Aphanoascus* y *Arachnomyces*, los que presentan un ascoma con paredes pseudoparenquimáticas o membranáceas. Para determinar la relación taxonómica con otros géneros del orden se realizó el estudio de las secuencias del gen 18S del ARNr. En dicho trabajo se incluyeron 20 especies del orden, y se analizaron mediante el método de “neighbour-joining”. Este estudio reveló que *Castanedomyces* está alejado filogenéticamente del resto de especies analizadas, siendo el género más próximo *Aphanoascus* (con un índice de bootstrap del 98%). El nuevo género se caracteriza por poseer apéndices en el ascoma. Esta característica también la presentan otros géneros tales como *Uncinocarpus*, *Auxarthron*, *Ajellomyces* y *Ctenomyces*, pero en todos ellos el peridio nunca es membranáceo; además, ninguno de estos géneros

presenta ascosporas con una cresta ecuatorial, que es otra de las características distintivas de *Castanedomyces*. Dentro de los Onygenales se encuentran algunas especies que presentan ascosporas con cresta ecuatorial y polos aplanados, pero son fácilmente diferenciables de *Castanedomyces* por la morfología de su ascoma.

Los Onygenales incluidos en este trabajo se dividen en cuatro grupos: a excepción de *Ajellomyces dermatitidis* y *Amaurascopsis perforatus*, todos estos agrupamientos están altamente soportados con un elevado índice de *bootstrap*, pero solo se correlacionan parcialmente con el esquema taxonómico tradicional propuesto por Currah (1985), que divide a los Onygenales en cuatro familias, Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae y Onygenaceae, considerando la morfología de las ascosporas, la naturaleza y tipo de anamorfo y sus capacidades enzimáticas. *Ajellomyces*, que fue incluido por Currah en los Onygenaceae, es morfológicamente muy diferente de otros miembros de la familia, y se encuentra filogenéticamente alejado. El hecho de que Onygenales sea un orden polifilético ha quedado demostrado también en otros estudios anteriores (Sugiyama y col., 1999; Vidal y col., 2000-b).

5. DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los Onygenales son uno de los grupos de hongos más fascinantes que existen. Pertenecen a la división Ascomycota y agrupan a una gran diversidad de taxones. Muchos de ellos presentan la rara habilidad de degradar la queratina, característica poco común dentro del reino de los hongos, lo que les hace indispensables para su descomposición en los diversos ecosistemas (escamas, pelos, uñas, cuernos, etc.). Pero ocasionalmente pueden atacar al hombre, causándole importantes infecciones superficiales, las dermatofitosis. Pertenecen también a los Onygenales otros importantes patógenos sistémicos, tales como los hongos dimórficos: *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* y *Blastomyces*. Estos hongos presentan un conjunto de características morfológicas típicas, como son gimnotecios con ascos más o menos esféricos, de paredes delgadas y evanescentes, y ascosporas pequeñas, esféricas o lenticulares, y estructuras asexuales poco diferenciadas (incluidas generalmente en *Chrysosporium* o *Malbranchea*). La observación detallada de estas características permite clasificar fácilmente a estos hongos como pertenecientes al orden Onygenales; sin embargo, su inclusión en alguna de sus familias ya no resulta tan sencillo. La delimitación en las familias que se ha propuesto tradicionalmente para este orden es confusa. Recientemente, Leclerc y col. (1994) demostraron que las delimitaciones entre las familias no eran consistentes, ya que algunos miembros de *Onygenaceae* estaban filogenéticamente más relacionados con miembros de la familia *Gymnoascaceae* que con otros géneros incluidos en la primera. En este mismo sentido, Sugiyama y col. (1999) demostraron que *Onygenaceae* era claramente polifilética. Otros trabajos recientes han puesto de manifiesto la limitación de los caracteres morfológicos para establecer una clasificación natural en los Onygenales (Currah, 1994, 1997; Sugiyama y Mikawa 2001; Untereiner y col., 2002; Sugiyama y col., 2002). De todo ello se desprende que la taxonomía del orden Onygenales resulta artificial, por lo que se plantea la necesidad de realizar esfuerzos para intentar elaborar una clasificación más natural

(Guarro y Cano, 2002). Diferentes autores están de acuerdo en que, para ello, se necesitan nuevas aproximaciones que tengan en cuenta además de la morfología características bioquímicas, ecológicas y, especialmente, el análisis de las secuencias nucleotídicas (Untereiner y col., 2002; Sugiyama y Mykawa, 2001). Sin embargo la tarea no parece fácil, ya que trabajos recientes que han utilizado el análisis de secuencias han dado resultados contradictorios. Así, Sugiyama y col. (2002) consideran que se debería aceptar la familia *Amauroascaceae* establecida por v. Arx (1987), mientras que según otros no debería ser así (Currah, 1994). Aunque hasta la realización de la presente tesis la mayoría de los autores han seguido los criterios de Currah (1985), los últimos esquemas de clasificación de los ascomicetos siguen considerando 5 familias, incluyendo también *Amauroascaceae* (Eriksoon 2003, 2004-a). En lo que si están de acuerdo dichos autores es en el análisis de múltiples genes para inferir la estructura filogenética más probable de los Onygenales (Sugiyama y col., 2002; Untereiner y col., 2002).

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios sobre la filogenia de los Onygenales, entre otros (Cano y col., 2002-a,-b; Sugiyama y col., 2002; Sigler y col., 2002; Untereiner y col., 2002). En estos estudios se han analizado las secuencias de diferentes regiones de ADN ribosómico, tales como el gen 18S (SSU), los espaciadores intergénicos ITS2-ITS2 y el gen 5.8S del ARNr, así como el gen 28S. Eriksoon y col. de la Universidad de Umea, en su publicación periódica *Notes on Ascomycete Systematics* vienen revisando los trabajos taxonómicos sobre Onygenales, y en su último número (Eriksoon, 2004-b) mencionan que el estudio de la estructura secundaria de la región ITS2 es el elemento más útil para inferir la filogenia del orden. Un ejemplo claro de este tipo de estudios es el realizado por estos mismos autores sobre el género *Aphanoascus* (comunicación personal), obteniendo unos resultados similares a los observados por estudios realizados mediante el análisis de las secuencias (Cano y col., 2002-a).

Sin embargo, dichas estructuras no han sido estudiadas por ningún otro autor.

Debido a la problemática actual de la sistemática del orden a nivel supragenérico, parece más acertado intentar proponer una taxonomía basada en el establecimiento de relaciones filogenéticas a nivel de género, siendo innecesario la división en familias, que resulta artificial. En consecuencia, el objetivo principal de la presente tesis, ha sido proponer una base estable para la taxonomía de los Onygenales centrada en el análisis de las secuencias el ADN ribosómico, pero sin dejar de lado la morfología que, a nuestro entender, es también fundamental.

Como ya se ha comentado, los géneros incluidos en los Onygenales se separaban tradicionalmente en función de sus características morfológicas, ocupando un lugar central la estructura del peridio, que ha sido considerado fundamental para la delimitación de los mismos (Currah, 1997). Sin embargo, existen algunos casos en que la delimitación entre géneros en base de las características morfológicas no resulta clara, como en el caso de los géneros *Amauroascus* y *Auxarthron*. También se encuentran limitaciones a la utilización exclusiva de los caracteres morfológicos para la delimitación de especies dentro de determinados géneros, especialmente aquellos más complejos. En la presente tesis se han revisado algunos de estos géneros problemáticos, proponiendo algunos cambios taxonómicos importantes.

Dos de los géneros más conflictivos a nivel morfológico, ya que se separan únicamente por el grado de diferenciación de las células del peridio, son *Auxarthron* y *Amauroascus*. Por otra parte, ambos géneros agrupan a un número importante de especies (15), difíciles de separar entre sí, algunas de las cuales presentan características morfológicas intermedias entre ambos géneros. Para intentar esclarecer las relaciones filogenéticas entre dichos géneros, e intentar delimitar las especies que los integran, se han estudiado 25 especies en medios de cultivo estandarizados.

El estudio de las secuencias del gen 5.8S y los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 del ADNr puso de manifiesto que diferentes

géneros incluidos en el estudio (*Amauroscopsis*, *Amauroascus*, *Apinisia*, *Shanorella*, *Mallochia*, *Nannizziopsis*, *Pectinotrichum* y *Uncinocarpus*) eran polifiléticos, mientras que el género *Auxarthron* era claramente monofilético. Todas las especies de este género se encontraban en la misma rama o agrupamiento, con un elevado soporte estadístico. En consecuencia, hemos propuesto mantener al género *Auxarthron* como válido y dividir el género *Amauroascus* en un conglomerado de nuevos géneros, con un número reducido de especies en cada uno de ellos. El género *Amauroascus* debería limitarse a la especie tipo *A. niger*, y a las especies *A. aureus*, *A. mutatus*, *A. oblatus*, *A. purpureus*, *A. queenslandicus* y *A. volatillis-patellis*, que tienen unas características morfológicas comunes tales como el tipo y estructuración del peridio, así como la morfología de sus ascosporas. Sin embargo, hacen falta más estudios que incluyan un mayor número de cepas y más genes, para delimitar los posibles géneros dentro del complejo *Amauroascus*.

Precisamente, las dos especies de *Amauroascus* más conflictivas son *A. kuehnii* y *A. pseudoreticulatus*, debido a que presentan un peridio más diferenciado que el resto de especies del género, pero no lo suficiente como para ser consideradas como especies de *Auxarthron*. El estudio molecular reveló que deberían de ser integradas en este último género. Otro de los aspectos que nos permitió resolver el análisis de las secuencias fue el poder evidenciar la existencia de otras especies dentro del complejo *Auxarthron kuehnii*. Habíamos observado que las cepas de *A. kuehnii* presentaban una importante variabilidad morfológica: así por ejemplo, la cepa IMI 387183 presentaba un ascoma peculiar, con engrosamientos en las hifas peridiales, formaba hifas en raqueta y sus hifas son muy pigmentadas. El estudio molecular nos demostró que se trataba de una nueva especie, a la que denominamos *Auxarthron concentricum*.

Con la adición de estas nuevas especies, el género queda constituido por nueve especies. En esta tesis se aporta una clave dicotómica para la identificación de las mismas. Sin embargo, recientemente Sigler y col. (2002) han publicado dos nuevas especies,

Auxarthron filamentosum (Sigler, Hamblenton y Flis) y *Auxarthron alboluteum* (Sigler y Hamblenton).

El género *Gymnoascus* es uno de los géneros más complejos de los Onygenales, ya que incluye un gran número de especies. V. Arx (1986) y Currah (1985) en sus revisiones del orden, trataron dichos géneros de una forma muy diferente. El primero, utilizando un criterio más convergente, no aceptó algunos géneros relacionados con *Gymnoascus* y los consideró como sinónimos del mismo, por lo que el número de especies aumentó considerablemente. Currah, en cambio, se basó en criterios de divergencia y aceptó nuevos géneros tales como *Gymnoascoideus*, *Gymnascella*, *Arachniotus*, etc. como relacionados pero distintos a *Gymnoascus*, limitando a dicho género solo a dos especies (*G. reessii* y *G. intermedius*). En el presente trabajo basado en el estudio de las secuencias del gen 5.8S y de los ITS1-ITS2 del ADNr, se ha revisado críticamente ambas propuestas, poniendo de manifiesto las inconsistencias de las mismas, lo que ha llevado a formular una nueva propuesta. Se considera a *Gymnoascus* en un sentido amplio, y se acepta en el a un total de 18 especies. Se aporta una clave dicotómica para la identificación de las mismas. También se esclarece la posición taxonómica de un taxon interesante, que había sido publicado erróneamente como *Auxarthron reticulatum* (CBS 500.86), una especie confusa, y que en la presente tesis se propone como el nuevo género *Testudomyces*.

Finalmente, en base a aislamientos recientes procedentes de diferentes partes del mundo, hemos propuesto los géneros *Castanedomyces* y *Pseudoamauroascus* como nuevos para la ciencia.

Como conclusión final se puede decir que, en la elaboración de la presente tesis y de los artículos de ella derivados, la utilización conjunta de caracteres morfológicos y moleculares ha sido fundamental para la obtención de los objetivos planteados. Ambos criterios se han complementado perfectamente, y la utilización de uno solo de ellos no habría permitido resolver la mayoría de problemas planteados.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. A partir del análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las especies del género *Auxarthron* y *Amauroascus* podemos concluir que el primero es monofilético, en tanto que el segundo es polifilético.

2. A partir del análisis de las secuencias de la región ITS y de un detallado estudio morfológico, se proponen las siguientes nuevas combinaciones: *Auxarthron kuehnii* (Arx) Solé, Cano y Guarro, *Auxarthron pseudoreticulatum* (Currah) Solé, Cano y Guarro, *Amauroascus queeslandicus* (Apinis y R.G .Rees) Solé, Cano y Guarro y *Mallochia reticulata* (Kuehn y Goos) Solé, Cano y Guarro.

3. El estudio de las características morfológicas de un gran número de cepas de *Auxarthron kuehnii* y el posterior análisis de secuencias de la región ITS, permite confirmar que se trata de un taxon filogenéticamente heterogéneo. A raíz del presente estudio se proponen como nuevas especies para la Ciencia *Auxarthron concentricum* Solé, Cano y Guarro y *Auxarthron chlamydosporum* Solé, Cano y Guarro.

4. Del estudio de la filogenia molecular, basada en el análisis de las secuencias nucleotídicas de la región ITS, de las diferentes especies pertenecientes al género *Gymnoascus* y otros morfológicamente relacionados, se proponen nuevos criterios para la taxonomía del género *Gymnoascus*, considerando los géneros *Arachnietus*, *Gymnascella*, *Gymnoascoideus* y *Narasimhella* como sinónimos del mismo. Se proponen las nuevas combinaciones *Gymnoascus hyalinosporus* (Kuehn, Orr y Ghosh) Solé, Cano y Guarro y *Gymnoascus japonicus* (Uchiyama, Kamiya y Udagawa) Solé, Cano y Guarro.

5. De acuerdo con el citado análisis, tres especies pertenecientes a *Gymnoascus* son excluidas: *Gymnoascus arxii*, que se transfiere a *Aphanoascus*; *Gymnoascus alatosporus*, se sinonimiza con *Acanthogymnomyces princeps*, y *Gymnoascus reticulatus* se propone como un nuevo género para la Ciencia: *Testudomyces*, con *T. verrucosus* como especie tipo.

6. En base a la morfología de las ascosporas, las características culturales y el análisis de la secuencia de la región ITS, se propone a *Gymnoascus armeniacus* Solé, Cano y Guarro como nueva especie para la Ciencia, a partir de la cepa CBS 125.78.

7. Se proponen dos nuevos géneros para la Ciencia: *Castanedomyces* Cano, Pitarch y Guarro, y *Pseudoamauroascus* Cano, Solé y Guarro.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Ajello, L.** (1953). The dermatophyte *M. gypseum* as a saprophyte and parasite. *J. Invest. Dermatol.* **21**:157-171.
- Ajello, L.** (1968). A taxonomic review of the dermatophytes and related species. *Sabouraudia* **6**:147-159.
- Anderson, T.F.** (1953). Techniques for the preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **13**:130-134.
- Apinis, E.A.** (1964). A revision of British Gymnoascaceae. *Mycol. Pap.* **96**:1-56.
- Apinis, E.A.** (1967). *Dactilomyces* and *Thermoascus*. *Trans. Brit. mycol. soc.* **50**:573-582.
- Arx, von J.A.** (1986). The ascomycete genus *Gymnoascus*. *Persoonia* **13**:173-183.
- Arx, von J.A.** (1987). A re-evaluation of the Eurotiales. *Persoonia* **13**:273-300.
- Baranetzky, J.** (1872). Entwicklungsgeschichte des *Gymnoascus reessii*. *Bot. Zeit.* **30**:145-160.
- Bartlet, A.A. y Burstyn, H.P.** (1975). A review of the physics of critical point drying. *Proceedings of the 8th Annual IITRI-SEM Symposium 1*, pp.305-316, Chicago.
- Batelli, G., Bianchedi, M., Frigo, W., Amorati, P., Mantovani, A.C. y Pagliani, A.** (1978). Survey of keratinophilic fungi in alpine marmot (*Marmota marmota*) burrow soil and in adjoining soils. *Sabouraudia* **16**:83-86.
- Batista, A.C., da Silva Maia, H. y Cavalcanti, W.** (1960). Otomicose produzida por *Waldemaria pernambucensis* n. gen. , n. sp. *Atlas Inst. Micol. (Recife)* **1**:5-12.
- Bendra, T. y Corey, J.P.** (1994). *Malbranchea pulchella* fungal sinusitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **110**:501-504.

- Benjamin, R.K.** (1956). A new genus of the Gymnoascaceae with a review of the other genera. *Aliso* **3**:301-328.
- Benny, G.L y Kimbrough, J.W.** (1980). A synopsis of the orders and families of plectomycetes with keys to genera. *Mycotaxon* **12**:1-91.
- Berbee, M.L. y Taylor, J.W.** (1999). Fungal phylogeny. En *Molecular Fungal Biology*, pp 21-77 Ed. R.P. Oliver y M. Schweizer. Cambridge University press. Cambridge.
- Blanz, P., Buzina, W., Ginter, G. y Gräser, Y.** (2000). Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. *Mycoses*. **43**:suppl. 1:11-19.
- Boedijin, K.B.** (1935). On the morphology and cytology of *Trichocoma paradoxa*. *Ann. Jard. Bot. Britenzorg*. **44**:243-266.
- Boldo, X.M., Villa-Tanaca, L., Zúñiga, G. y Hernández-Rodríguez, C.** (2003). Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and Multilocus enzyme electrophoresis Analyses. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4799-4804.
- Bowen, A.R., Chen-Wu, J.L., Momany, M., Young, R., Szanislo, P.J. y Robbins, P.W.** (1992). Classification on fungal chitin synthases. *Proc.Natl. Acad.sci.USA* **89**:519-523.
- Bowman, B.H., Taylor J.W. Brownlee, A.G., Lee, J. Lu, S.D. y White T.J.** (1992). Molecular evolution of the fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* **9**:285-296.
- Brefeld, O.** (1891). Untersuchungen aus em Gesamtgebiete der Mycologie. Mykologie X: Ascomycetum II. **10**:158-160.
- Bruns, T.D., White T.J. y Taylor, J.W.** (1991). Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **22**:525-564.

-
- Bruns, T.D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D.S., Lane, D.J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T.M., Weisburg, W.G. y Sogin, M.L.** (1992). Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* **1**:231-241.
- Buchnicek, J.** (1968). Inhibition of germination in the spores of *Trichophyton mentagrophytes* caused by visible light. *Folia Fac. Ser. Nat. Brun.* **5**:23-28.
- Bühlmann, X y Reith, H.** (1962). Über die Erkennung und Bedeutung von Dermatomykosen bei Haustieren, Schweizer. *Arch. Tierheilk.* **104**:537-545.
- Campbell, R.** (1972). Ultrastructure of conidium ontogeny in the deuteromycete fungus. *Stachybotrys atra* Corda. *New phytologist* **71**:1143-1149.
- Cano, J. y Sigler, L.** (1992). Re-evaluation of the synonymy between *Keratinomyces ceretanicus* and *Trichophyton ajelloi*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**:327-331.
- Cano, J., Guarro, J. y Figueras, M.J.** (1987). Some keratinophilic fungi from Spain. *Mycopathologia* **100**:163-167.
- Cano, J., Guarro, J. y Figueras, M.J.** (1991). Study of the invasion of human hair *in vitro* by *Aphanoascus* spp. *Mycoses* **34**:145-152.
- Cano, J., Sagués, M., Barrio, E., Vidal, P., Castañeda, R. F., Gené, J. y Guarro, J.** (2002-a). Molecular taxonomy of *Aphanoascus* and description of two new species from soil. *Stud. Mycol.* **47**:153-164.
- Cano, J., Solé, M., Pitarch, L.B. y Guarro, J.** (2002-b). *Castanedomyces australiensis* gen.nov. sp.nov. A keratinophilic fungus from Australian soil. *Stud. Mycol.* **47**:165-172.
- Carroll, F.E. y Carroll, G.C.** (1973). Senescence and death of conidiogenous cell in *Stemphylium botryosum* Wallroth. *Arch. Microbiol.* **94**:109-124.

-
- Clements, F.E. y Shear, C.L.** (1931). The genera of Fungi. Hafner Publishing Co, New York.
- Cochet, G.** (1939). Sur un nouveau champignon arthrosporé (*Arthrographis langeroni* n.g.,n.sp.) agent pathogène d'une onychomycose humaine. *Annals Parasit. Hum. Comp.* **17**:97-102.
- Cox, G.M., Rude, T.H., Dykstra, C.C. y Perfect J.R.** (1995). The actin gene from *Cryptococcus neoformans*: structure and phylogenetic analysis. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 261-266.
- Currah, R.S.** (1985). Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnosaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon* **24**:1-216.
- Currah, R.S.** (1994). Peridial morphology and evolution in the protunicate Ascomycetes. En: Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties, Ed.D.L. Hawsworth Plenum Press, New York (U.S.A.).
- Currah, R.S.** (1997). Taxonomy of saprophytic and pathogenic fungi in the *Onygenales*. Annual Report of the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis. Pp. 44-54. Chiba University, Japan.
- Currey, F.** (1854). On two new fungi. *Quart. Jour. Micro. Sci.* **2**:240-242.
- Czelusmiak, J., Goodman, M., Monnief, N.D. y Kehoe, S.M.** (1990). Maximum parsimony approach to construction of evolutionary trees from aligned homologous sequences. *Methods Enzymol.* **183**:601-615.
- Dalle, F., Franco, N., Lopez, J., Vagner, O., Caillot, D., Chavaret, P., Cuisenier, B., Aho, S., Lizard, S. y Bonnin, A.** (2000). Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4554-4559.
- Degrave, B., Joujoux, J.M., Danduraud, M. y Guillot, B.** (1997). First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. *J. Am. Acad. Derm.* **37**:318-320.

-
- Delage, A., Lauraire, M.C., Eglin, G., Degrave, B., Dandurand, M. y Guillot, B.** (1998). Deux observations de mycoses dues à *Arthrographis langeronii* chez des malades immunocompromis du Sud de la France. *J. Mycol. Méd.* **8**:205-208.
- DeSalle, R., Wray, C. y Absher, R.** (1994). Computational problems in molecular systematics. En: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Ed. B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner, y R. Desalle, Basell: Birkhüudser Verlag Basel.
- Dvorak, J. y Otcenasek, M.** (1964). Geophilic, zoophilic and antropophilic dermatophytes. A review. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **23**:294-296.
- Echlin, P. y Kaye, G.** (1979). Thin films for high electron microscopy and X-ray microanalysis. *Scanning Electron. Microsc.* **2**:21-30.
- Eidam, E.** (1880). Beitrag zur kenntnis der Gymnoascaceen. *Cohn's Beitr. Biol. Pflanzen.* **3**:267-305.
- Eriksson, O.E., Baral, H.O., Currah, R.S., Hansen, K., Kurtzman C.P., Rambold G. y Laessoe T.** (2003). Outline of Ascomycota. *Myconet V*:9.
- Eriksson, O.E., Baral, H.O., Currah, R.S., Hansen, K., Kurtzman C.P., Rambold G. y Laessoe T.** (2004-a). Outline of Ascomycota. *Myconet V*:10.
- Eriksson, O.E., Baral, H.O., Currah, R.S., Hansen, K., Kurtzman C.P., Rambold G. y Laessoe T.** (2004-b). Notes on ascomycete systematics. *Myconet V*:10.
- Estruch, J.J., Antuña, C., Ferrer, S. y Ramón, D.** (1989). Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. *Rev. Ibér. Micol.* **6**:62-66.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Felsenstein, J.** (1996). Infering phylogenies from protein by parsimony, distance and likelihood methods. *Methods Enzymol.* **266**:418-427.

-
- Fennell, D. I.** (1973). Plectomycetes: Eurotiales. En: The Fungi. Vol IVA C. Ainsworth and A.S. Sussman (eds). Academic press, New York and London.
- Figueras, M.J. y Guarro, J.** (1988). A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* **80**:298–306.
- Filipello Marchisio, V.** (2000). Keratinophilic fungi: Their role in nature degradation of keratinic substrates. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:86-92.
- Filipello Marchisio, V., Fusconi, A. y Rigo, S.** (1994). Keratinolysis and its morphological expresión in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia* **127**:103-115.
- Fisher, E.** (1897). Ascomyceten:Tuberaceen und Hemiasceen En: Rabenhorst's K.-Fl. Von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz. 1 Abt. 5.
- Fusconi, A. y Filipello Marchisio, V.** (1991). Ultrastructural aspects of the demolition of human air *in vitro* by *Chrysosporium tropicum* Carmichael. *Mycoses* **34**:153-165.
- Fries, E.M.** (1849). Summa vegetabilium Scandinaviae. Sectio posterior.
- Garg, A.P., Sudha Gandotra, Mukerji K.G. y Pugh, G.J.F.** (1985). Ecology of keratinophilic fungi. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* **94**:149-163.
- Gargas, A. y Taylor, J.W.** (1992). Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* **84**:589-592.
- Gené, J., Guillamón, J.M., Guarro, J., Pujol, I. y Ulfing, K.** (1996). *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterization and antifungal susceptibility. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **70**:49–57.

-
- Georg, L.K., Kaplan, W., Ajello, L., William, W.M. y Tilden Evelyn, B.** (1959). The parasitic nature of the soil fungus *Keratinomyces ajelloi*. *J. Invest. Dermatol.* **32**:539-544.
- Gierlof, B. y Katic, I.Chr.H.** (1961). Om anvendelse af griseofulvin specielt i veterinariet praksis. *Nord. Vet. Med.* **13**:571-592.
- Gräser, Y., Kuijpers, A.F.A., Presber, W. y de Hoog, G.S.** (1999). Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* **37**:315-330.
- Guarro, J., Figueras, M.J. y Cano, J.** (1988). Degradación del pelo humano *in vitro* por *Trichophyton mentagrophytes*. *Microbiología SEM.* **4**:29-37.
- Guarro, J., Gené, J. y Stchigel, A.M.** (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.
- Guarro, J. y Cano, J.** (2002). Phylogeny of Onygenalean fungi of medical interest. *Stud. Mycol.* **47**:1-4.
- Guého, E., Villard, J. y Guinet, R.** (1985). A new human case of *Anixiopsis stercoraria* mycosis: discussion of its taxonomy and pathogenicity. *Mykosen* **28**:430-436.
- Gugnani, C.H.** (2000). Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:109-114.
- Hajini, G.H., Khandari, K.C., Mohapatra, L.N. y Bhutani L.K.** (1970). Effect of hair oil and fatty acids on growth of dermatophytes and their *in vitro* penetration of human scalp air; *Sabouraudia* **8**:174-176.
- Hanlin, R. T.** (1982). Conidiogenesis in *Spinifer meineckellus*. *Mycologia* **74**:236-241.
- Henrion, B., Chevalier, G. y Martin, F.** (1994). Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* **98**:37-43.

- Hillis, D.M. y Bull, J.J.** (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**:182-192.
- Hillis, D.M. y Dixon, M.T.** (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**:411-426.
- Hoog de, G.S., Guarro, J., Gené, J. y Figueras, M.J.** (2000). Atlas of Clinical fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- Hubalek, Z.** (1972). Keratinophilic fungi on wild birds. *Mykosen* **15**:207-211.
- Hubalek, Z.** (1974). Fungi associated with free living birds in Czechoslovakia and Yugoslavia: *Acta Sci. Nat. Brun.* **8**:1-62.
- Hubalek, Z.** (2000). Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:93-103.
- Hubalek, Z. y Balat, F.** (1976). Seasonal distribution of keratinolytic fungi in the nests of tree sparrow (*Passer montanus* L.) Zentralb Bakteriol parasitenkol Infektionkr Myg Zweite-Naturwiss; *Abt Allg Land wirtsch Tech. Mikrobiol.* **131**:179-197.
- Iwen, P.C., Tarantolo, S.R., Sigler, L., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Lackner, R.P., Mccarthy, D.I. y Hinrichs, S.H.** (1999). Pulmonary infection caused by *Gymnascella hyalinospora* in a patient with acute myelogenous leukemia. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3375-3378.
- Iwen, P.C., Hinrichs, S.H. y Rupp, M.E.** (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol.* **40**:87-109.
- Jackson, J.C., Barton, R.C. y Evans, E.G.V.** (1999). Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J. Clin. Microbiol.* **37-4**:931-936.

- Kane, J., Summmerbell, R., Sigler, L., Krajden, S. y Land, G.** (1997). Laboratory Handbook of Dermatophytes. Belmont, Ca (USA), Star Publishers.
- Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Takahashi, H., Tsujimoto, H. y Hasegawa, A.** (1998). Differentiation of *Microsporium* species by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses* **41**:229-233.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.
- Kornerup, A. y Wanscher, J.H.** (1984). Methuen Handbook of Colour. Methuen Ltd., London.
- Kuehn, H.H.** (1958). A preliminary survey of the Gymnoascaceae I. *Mycologia* **51**:417-439.
- Kuehn, H.H.** (1959). A preliminary survey of the Gymnoascaceae II. *Mycologia* **51**:655-692.
- Kuehn, H.H.** (1960). Observations on Gymnoascaceae. VIII. A new species of *Arthroderma*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **13**:189-197.
- Kumar, S., Tamura, K. Jakobsen, I.B. y Nei, M.** (2001). MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1. Analysis software, *Bioinformatics* **17**:244-245.
- Kunert, J.** (2000). Physiology of keratinophilic fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:77-85.
- Kurtzman, C.P.** (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* **10**:1727-1740.
- Lasker, B.A. y Ran, Y.** (2004). Analysis of polymorphic microsatellite markers for typing *Penicillium marneffeii* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1483-1490.

-
- Leclerc, M.C., Philippe, H. y Guého, E.** (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparison. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:331-341.
- Malloch, D.** (1979). Plectomycetes and their anamorphs. En *The whole fungus*. W.B. Kendrick (ed.) **1**:153-166. National Museums of Canada, Ottawa.
- Malloch, D.** (1981). The plectomycete centrum. En: *Ascomycete systematics. The luttrellian concept*. D.R. Reynolds (ed). Springer –Verlag. New York.
- Malloch, D. y Benny, G.L.** (1973). California ascomycetes: four new species and a new record. *Mycologia* **65**:648-660.
- Malloch, D. y Cain, R.F.** (1971-a). New genera of the Onygenaceae. *Can. J. Bot.* **49**:839-846.
- Malloch, D. y Cain, R.F.** (1971-b). Four new genera of cleistothecial ascomycetes with hyaline ascospores. *Can. J. Bot.* **49**:847-854.
- Marín, G. y Campos, R.** (1984). Dermatofitosis por *Aphanoascus fulvescens*. *Sabouraudia* **22**:311-314.
- Massee, G.** (1895). *British fungus flora IV*. George Bell and Sons, London.
- Mathison, G.E.** (1964). The microbiological decomposition of keratin. *Ann. Soc. Belgi. Med. Trop.* **44**:767-792
- Matruchot, L. y Dassonville, C.** (1899). Sur le *Ctenomyces serratus* Eidam, aux champignons des Teignes. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **15**:305-310.
- O'Donnell, K.** (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **22**:213-240.

-
- O'Donnell, K.** (1993). *Fusarium* and its near relatives. En The Fungal Holomorph: mitotic, meiotic, and pleomorphic speciation in fungal systematics (D.R. Reynolds, J.W. Taylor, eds); 225-233. CAB: International.Wallingford.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T. y Cigelnik, E.** (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**:61-78.
- Orrú, A., Pinetti, P. y Aste, N.** (1968). Variazioni della frequenza di isolamento de dermatofili cheratinofili terricci dalle sabbi di alcuni litorali della Sardegna centromeridionale nei diversi periodi del anno. *Ras. Med. Sarda.* **71**:665-676.
- Pal, M.** (1995). *Aphanoascus fulvescens*: first report of its isolation from canine dermatitis in India. *Rev. Iberoam. Micol.* **12**:1.
- Palade, G.E.** (1952). A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* **95**:285.
- Perlman, E.M. y Binns, L.** (1997). Intense photophobia caused by *Arthrographis kalrae* in a contact lens-wearing patient. *Am. J. Ophthalmol.* **123**:547-549.
- Pugh, G.J.F.** (1966). Fungi on birds in India. *J. Indian Bot. Soc.* **45**:296-303.
- Pugh, G.J.F. y Allsopp, D.** (1982). Microfungi on Signy Island, South Orkney Islands. *Br. Antarct. Surv. Bull.* **57**:55-67.
- Pugh, G.J.F. y Evans, M.D.** (1970). Keratinophilic fungi associated with birds.I. Fungi isolated from feathers, nests and soils. *Trans. Br. mycol. Soc.* **54**:233-240.
- Pugh, G.J.F., Grag, A.P. y Smith, S.N.** (1984). Inhibition of the keratinophilic fungus *Chrysosporium keratinophilum*. En: International Biodeterioration Conf. Washington D.C. USA.
- Punsola, L. y Guarro, J.** (1984). *Keratinomyces ceretanicus* sp.nov., a psychrophilic dermatophyte from soil. *Mycopathologia* **85**:185-190.

-
- Quirk, J.T. y Kupinsky, J.M.** (2002). Interspecific mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia* **94**:1078-1086.
- Rammeloo, J.** (1982). *Onygena mutata* Quelet, an earlier name for *Amauroascus verrucosus* (Eidam) Schroeter (Gymnoascaceae). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **52**:241-243.
- Rebell, G. y Taplin, D.** (1979). Dermatophytes their recognition and identification. University of Miami press. USA.
- Reboux, G., Comparot, S., Kirchgesner, V. y Barale, T.** (1995). À propos de 19 souches de *Chrysosporium* isolées au Centre Hospitalier Universitaire de Besançon. Bilan de 10 années: 1984-1994. *J. Mycol. Méd.* **5**:105-110.
- Rees, R.G.** (1967-a). Keratinophilic fungi from Queensland. I. Isolations from animal hair and scales. *Sabouradia* **5**:165-172.
- Rees, R.G.** (1967-b). Keratinophilic fungi from Queensland.II. Isolations from feathers of wild birds. *Sabouradia* **6**:14-18.
- Roilides, E., Sigler, L., Bibashi, E., Katsifa, H., Flaris, N. y Panteliadis, C.** (1999). Disseminated infection due to *Chrysosporium zonatum* in a patient with chronic granulomatous disease and review of non-*Aspergillus* fungal infections with this disease. *J. Clin. Microbiol.* **37**:18-25.
- Rosing, W.C.** (1982). Ultrastructure of ascus and ascospore development in *Chaetomium brasiliense*. *Mycologia* **76**:67-73
- Sabatini, D.D., Bensch, K. y Barrneti, R.J.** (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cell ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* **17**:19.
- Saez, H. y Chauvier, G.** (1977). The prevalence of keratinophilic fungi on the hair of primates without clinical skin disorders. *Sci. Tech. Anim. Lab.* **2**:83-87.

-
- Saitou, N. y Imanishi, T.** (1989). Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* **6**:514-525.
- Saitou, N. y Nei, M.** (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406– 425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor laboratory Press (USA).
- Sanyal, M., Thammaya, A. y Basu, N.** (1971). Studies on Gymnoascaceae.I. *Arachniotus flavoluteus* in cases of dermatophytoses. *Bull. Calcuta School Trop. Med.* **19**:86-87.
- Schroeter, J.** (1893). Die Pilze Schlesiens. En: *Cohn's Kryptogamen Fl. Schles.* **3**:210-213.
- Siesenop, V. y Böhm, K.H.** (1995). Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. *Mycoses* **38**:205-209.
- Sigler, L.** (1993). Perspectives on Onygenales and their Anamorphs by a Traditional Taxonomist. En: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and pleomorphic Speciation in fungal Systematics* (D.R. Reynolds y J.W. Taylor, eds). Wallingford: CAB International.
- Sigler, L. y Carmichael, J.W.** (1976). Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon* **4**:349- 488.
- Sigler, L. , Hambleton, S., Flis, A.L. y Paré, J.A.** (2002). *Chlamydosauromyces punctatus* gen. & sp. nov. (*Onygenaceae*) from the skin of a lizard.
- Simpanya, M.F.** (2000). Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:1-12.

- Stchigel, A.M., Sagués, M., Cano, J. y Guarro, J.** (2000). Three new thermotolerant species of *Corynascus* from soil, with a key to the known species. *Myc. Res.* **104**: 879-887.
- Stockdale, P.M.** (1961). *Nannizzia incurvata* gen.nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporium gypseum* (Bodin) Guiart and Griorakis. *Sabouradia* **1**:41-48.
- Sugiyama, M. y Mikawa, T.** (2001). Phylogenetic analysis of the non-pathogenic genus *Spiromastix* (Onygenaceae) and related onygenalean taxa based on large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* **42**:413-421.
- Sugiyama, M., Ohara, A. y Mikawa, T.** (1999). Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequences. *Mycoscience* **40**:251-258.
- Sugiyama, M., Summerbell, R.C. y Mikawa, T.** (2002). Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit (SSU) and large subunit (LSU) ribosomal DNA sequences. *Stud. Mycol.* **47**:5-23.
- Summerbell, R.C., Kane, J. y Kraiden, S.** (1989). Onychomycosis, tinea pedis and tinea manuum caused by non-dermatophytic filamentous fungi. *Mycoses* **32**:609-619.
- Summerbell, R.C., Haugland, R. y Gupta, A.K.** (1999). Ribosomal RNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:4004-4011.
- Swofford, D.L.** (1991). *PAUP: phylogenetic analysis using parsimony*. Version 3.1.1. Distributed by Illinois of Natural History Survey.
- Swofford, D.L. y Olsen, G.J.** (1990). Phylogeny reconstruction. En: Molecular Systematics. Ed. D.M. Hillis y C. Moritz. Sinauer associates Inc. Sunderland, Massachusetts.

- Szaniszlo, P.J. y Momany, M.** (1993). Chitin, chitin synthase and chitin synthase conserved regions homologues in *Wangiella dermatitidis*, p229-242. En: B.Marseca, G.S. Kobayashi y H Yamaguichi (ed) Molecular biology and its application to medical mycology. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Takashio, M.** (1972). Etudes des phénomènes de reproduction liés au vieillissement et au rajeunissement des cultures de champignons. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* **53**:427-580.
- Tewari, R.P. y Macpherson, C.R.** (1968). Pathogenicity and neurologic effects of *Oidiodendron kalrai* for mice. *J. Bact.* **95**:1130-1139.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876-4882.
- Udagawa, S. y Uchiyama, S.** (2000). Taxonomic studies on new or critical fungi of non-pathogenic Onygenales3. *Mycoscience* **41**:303-311.
- Untereiner, W.A., Scott, J.A., Naveau, F.A., Currah, R.S. y Bachewich, J.** (2002). Phylogeny of *Ajellomyces*, *Polytolypa* and *Spiromastix* (Onygenaceae) inferred from rDNA sequence and non-molecular data. *Stud. Mycol.* **47**:25-35.
- Vanbreuseghem, R.** (1952). Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **32**:173-178.
- Vanbreuseghem, R. y Vroey, C. de** (1966). Gymnoascacées isolées de lésions cutanées en République de Somalie. *Ann. Soc. Belge Méd Trop.* **52**:243-495.

- Vanbreuseghem, R. y Vroey, C. de** (1979). Dermatophyte infection by *Anixiopsis stercoraria* in a wild boar (*Sus scrofa*). *Mykosen* **23**:183-187.
- Vidal, P., Sánchez Puelles, J.M., Milan, D. y Guarro, J.** (2000-a). *Chrysosporium fluviale*, a new keratinophilic species from river sediments. *Mycol. Res.***104**:244-250.
- Vidal, P., Vinuesa, M. de los A., Sánchez-Puelles, J.M. y Guarro, J.** (2000-b). Phylogeny of the anamorphic genus *Chrysosporium* and related taxa based on rDNA internal transcribed spacer sequences. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**:22-29.
- Vilgalys, R.** (1988). Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology* **78**:698-702.
- Weitzman, I., McGinnis, M.R., Padhye, A.A. y Ajello, L.** (1986). The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. *Mycotaxon* **25-2**:505-518.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. Eds., M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. J.Sninsky, and T.J. White. Academic Press, New York.
- Yamamoto, H., Naruse, A., Ohsaki, T. y Sekiguchi, J.** (1995). Nucleotide séquence and characterization of the large mitochondrial rRNA gene of *Penicillium urticae*, and its comparison with those and other filamentous fungi. *J.Biochem.***117**:888-896.

8. ANEXO

Anexo I

Espece	Cepa	Nº GenBank	Region rDNA
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	CBS ¹ 124.34	X 59420	18S
<i>Amauroscopsis perforatus</i>	RV ² 24813(T ³)	AJ 390377	5.8S ITS1/2
<i>Amauroscopsis perforatus</i>	IMI ⁴ 350687	AJ 315171	18 S
<i>Amauroscopsis perforatus</i>	RV 24813 (T)	AJ 390377	5.8S ITS1/2
<i>Amauroscopsis perforatus</i>	IMI 350687	AJ 315171	18S
<i>Amauroscopsis reticulatus</i>	IFO ⁵ 9196	AJ 271434	5.8S ITS1/2
<i>Amauroscopsis reticulatus</i>	CBS 392.61(T)	AJ 271418	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus aureus</i>	CBS 593.71	AJ 271431	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus aureus</i>	IMI 151274 (T)	AJ 271433	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i>	UAMH ⁶ 3115	AJ 271422	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i>	RV 22810	AJ 271424	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i>	CBS 539.72 (T)	AJ 271417	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Amauroascus oblatius</i>	UAMH 2296	AJ 271421	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron concentricum</i>	FMR ⁷ 4054 (T)	AJ 271428	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron concentricum</i>	FMR 4053	AJ 271427	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	CBS 539.72 (T)	AJ 271417	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	⁸ IHEM 16190	AJ 426454	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16191	AJ 426455	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	CBS 632.72	AJ 426453	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16193	AJ 426457	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	IHEM 16192	AJ 426456	5.8S ITS1/2

Espece	Cepa	Nº GenBank	Region
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	UAMH 3115	AJ 271422	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus kuehnii</i> = <i>Auxarthron kuehnii</i>	RV 22810	AJ 271424	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus mutatus</i>	IFO 32600	AJ 271565	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus mutatus</i>	CBS 181.70	AJ 271567	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus niger</i>	IFO 32599 (T)	AJ271563	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus oblatu</i>	UAMH 2296	AJ 271421	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus oblatu</i>	UAMH 2296	AJ 271421	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus pseudoreticulatus</i>	UAMH 3569	AJ 271423	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus pseudoreticulatus</i> = <i>Auxarthron pseudoreticulatum</i>	UAMH 3569	AJ 271423	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus pseudoreticulatus</i> = <i>Auxarthron pseudoreticulatum</i>	UAMH 3117 (T)	AJ 426452	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus purpureus</i>	IFO 32622 (T)	AJ 271564	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus</i> sp. = <i>Auxarthron chlamydosporum</i>	RV 24809 (T)	AJ 271425	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus</i> sp. = <i>Auxarthron chlamydosporum</i>	FMR 7680	AJ 426458	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus</i> sp.	RV 24809	AJ 271425	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus volatilis-patellis</i>	IMI 155647	AJ 390378	5.8S ITS1/2
<i>Amauroascus volatilis-patellis</i>	UAMH 3406	AJ 390378	5.8S ITS1/2
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	FMR 2179	AJ 315172	18S
<i>Aphanoascus keratinophilus</i>	IMI 319010	AJ 133436	5.8S ITS1/2
<i>Apinisia queenslandica</i>	IMI 121675 (T)	AJ 315173	18S
<i>Apinisia racovitzae</i>	CBS 151.65	AJ 271429	5.8S ITS1/2
<i>Arachniotus ruber</i>	IMI 100913	AJ 315166	18S
<i>Arachniotus ruber</i> = <i>Gymnoascus ruber</i>	IMI 100913(T)	AJ 315839	5.8S ITS1/2

Espece	Cepa	Nº GenBank	Region
<i>Arachnomyces minimus</i>	CBS 324.70 (T)	AJ 315167	18S
<i>Arthroderma curreyi</i>	CBS 138.26	AJ 315165	18S
<i>Auxarthron californiense</i>	UAMH 18891	AF 038352	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron compactum</i>	CBS 200.64 (T)	AJ 271574	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron conjugatum</i>	FMR 5567	AJ 315174	18S
<i>Auxarthron conjugatum</i>	UAMH 3519	AJ 271573	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron kuehnii</i>	UAMH 3115	AJ 271422	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron kuehnii</i>	RV 22810	AJ 271424	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron kuehnii</i>	FMR 4053	AJ 271427	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron pseudoauxarthron</i>	IFO 31701(T)	AJ 271572	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron pseudoreticulatus</i>	UAMH 3117(T)	AJ 271420	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron reticulatum</i>	UAMH2006	AJ 271568	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron reticulatum</i> = <i>Testudomyces verrucosus</i>	CBS 500.86	AJ 315841	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron</i> sp.	RV 24809	AJ 271425	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron</i> sp.	RV 26652	AJ 271426	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron thaxteri</i>	UAMH 3912(T)	AJ 271571	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron zuffianum</i>	IMI 76603	AJ 271570	5.8S ITS1/2
<i>Auxarthron zuffianum</i>	UAMH 4566(T)	AJ 271569	5.8S ITS1/2
<i>Brunneospora reticulata</i>	IMI 315744	AJ 315175	18S
<i>Byssosascus striatosporus</i>	CBS 642.66(T)	AJ 315170	18S
<i>Byssonygena ceratinophila</i>	IMI 370021	AJ 315176	18S
<i>Castanedomyces australiensis</i>	IMI 370015 (T)	AJ 315177	18S
<i>Chrysosporium merdarium</i> anamorph of <i>Gymnoascus uncinatus</i>	CBS 408.72	AJ 390384	5.8S ITS1/2
<i>Ctenomyces serratus</i>	IFO 31712	U 29391	18S
<i>Ctenomyces serratus</i>	IFO 61712	U 29391	18S

Especie	Cepa	Nº GenBank	Region
<i>Gymnascella aurantiaca = Gymnoascus aurantiacus</i>	UAMH 3138	AJ 315834	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella citrina = Gymnoascus citrinus</i>	CBS 863.72	AJ 315836	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella confluens = Gymnoascus confluens</i>	IMI 100873	AJ 315837	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella confluens = Gymnoascus desertorum</i>	CBS 634.72	AJ 315838	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella dankaliensis = Gymnoascus dankaliensis</i>	IMI 119450	AJ 315832	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella hyalinospora = Gymnoascus armeniacus</i>	CBS 125.78	AJ 315827	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella hyalinospora = Gymnoascus hyalinosporus</i>	CBS 548.72(T)	AJ 315826	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella littoralis = Gymnoascus littoralis</i>	CBS 454.73	AJ315833	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella marginospora = Gymnoascus marginosporus</i>	CBS 393.71	AJ 315824	5.8S ITS1/2
<i>Gymnascella nodulosa = Gymnoascus nodulosus</i>	FMR 3781	AJ 315831	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus alatosporus = Spiromastix princeps</i>	IMI 169642(T)	AJ 315840	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus arxii = Aphanoascus arxii</i>	IMI 326523	AJ 315843	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus boliviensis</i>	IMI 351986	AJ 315828	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus marginosporus</i>	CBS 393.71	AJ 315168	18S
<i>Gymnoascus petalosporus</i>	IFO 323.89	AJ 315829	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus petalosporus</i>	UAMH 4152	U 29392	18S
<i>Gymnoascus punctatus</i>	CBS 279.64	AJ 315825	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus reessii</i>	FMR 6562	AJ 315169	18S
<i>Gymnoascus reessii</i>	FMR 6562	AJ 315830	5.8S ITS1/2
<i>Gymnoascus udagawae</i>	IFO 8921(T)	AJ 315835	5.8S ITS1/2
<i>Mallochia echinulata</i>	IFO 9192	AJ 271562	5.8S ITS1/2
<i>Nannizziopsis albicans</i>	IMI 155645	AJ 271432	5.8S ITS1/2

Espece	Cepa	Nº GenBank	Region
<i>Nannizziopsis vriesii</i>	CBS 407.71(T)	AJ 131687	5.8S ITS1/2
<i>Narasimhella marginospora</i>	CBS 393.71 (T)	AJ 315168	18S
<i>Neogymnomyces demonbreunii</i>	UAMH 3382(T)	AJ 315842	5.8S ITS1/2
<i>Neurospora crassa</i>	FMR 5141	X 04971	18S
<i>Pectinotrichum llanense</i>	IMI 160413 (T)	AJ 390391	5.8S ITS1/2
<i>Pectinotrichum llanense</i>	FMR 3779	AJ 315178	18S
<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	IMI 370014	AJ 131787	5.8S ITS1/2
<i>Pseudoamauroascus australiensis</i>	IMI 370015	AJ 131788	18S
<i>Renispora flavissima</i>	IMI 241796	U 29393	18S
<i>Shanorella spirotrichia</i>	CBS 305.56 (T)	AJ 271430	5.8S ITS1/2
<i>Uncinocarpus queenslandicus</i>	IMI 121675	AJ 390394	5.8S ITS1/2
<i>Uncinocarpus reesii</i>	IMI 211205	AJ 271419	5.8S ITS1/2
<i>Uncinocarpus reesii</i>	CBS 121.77 (T)	AJ 271566	5.8S ITS1/2
<i>Uncinocarpus reesii</i>	IMI 211205	L 27991	18S

El nombre aceptado en la actualidad se indica después del símbolo =

¹CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures,Utrecht.; ²RV Institute de Medicine Tropicale "Prince Léopold". ³T cepa tipo; ⁴IMI CABI Bioscience, Egham; ⁵IFO Institute for Fermentation Osaka (actualmente NBRC National Biological Resource Center, Chiba); ⁶UAMH University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton; ⁷FMR Facultad Medicina de Reus; ⁸IHEM Scientific Institute of Public Health. Louis Pasteur. Mycology section.