

Universitat Rovira i Virgili

Facultat de Medicina y Ciències de la Salut

**TAXONOMÍA DE LOS HONGOS
ASCOMICETOS DEL SUELO**

Dania García Sánchez

Tesis Doctoral

2005

Para Carla.

Dedicada a la memoria del Dr. Miguel Rodríguez,
quien me transmitió con entusiasmo su vocación por la
micología.

El presente trabajo ha podido ser realizado gracias a las becas y al financiamiento de las siguientes

Instituciones:

Becas concedidas por l'Institut d' Estudis Avançats (1999IEA-01/3, 2000IEA-31)

Becas de recerca predoctoral de la Universitat Rovira i Virgili

Fundació Ciència i Salut

Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (CGL 2004-00425/BOS)

A todas éstas, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quisiera comenzar señalando que la presente tesis es consecuencia del infatigable quehacer del colectivo de investigadores de la Unitat de Microbiologia. Del trabajo de nuestros predecesores en el estudio de la micobiota del suelo (Fort, 1983; Punsola, 1985; Cano, 1989; Gené, 1994; Stchigel, 2000; Vidal, 2000; Rodríguez, 2003) hemos retomado metodologías y toda la experiencia acumulada en el transcurso de tantos años dedicados a la taxonomía de este fascinante, pero complejo grupo de microorganismos.

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que, de uno u otro modo, han hecho posible que nuestros esfuerzos llegaran a buen puerto:

Al Dr. Josep Guarro Artigas, maestro que nos ha guiado y exigido desde el ejemplo de su dedicación. Gracias por la dirección de la presente tesis, gracias por la confianza depositada en mí, por tus consejos, y por la paciencia infinita demostrada durante estos cinco años de enseñanzas y de trabajo. Sobre todo, gracias por la maravillosa experiencia que me has permitido vivir. Aquí he conseguido superar mis modestas expectativas profesionales y trazarme nuevos retos. Tengo otras muchas razones, pero esta vez lo tendré en cuenta "...las cosas importantes se explican en pocas palabras..." ¡MUCHAS GRACIAS!

Al Dr. José Cano Lira, por la codirección de esta tesis. Gracias además por permitirme largas discusiones taxonómicas y filosóficas, gracias por ayudarme a reconocer mi tozudez y por tratar de corregirla, en fin, gracias por tu amistad.

Al Dr. Alberto M. Stchigel, por la codirección de esta tesis. Gracias por tu ayuda diaria, sin la que este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por tu apoyo incondicional, para el resto de los motivos sobran las palabras.

A la Dra. María José Figueras Salvat, ejemplo de consagración, por estar siempre dispuesta a aclarar nuestras dudas y por ayudarnos a corregir nuestros errores. Gracias por tus valoraciones claras y certeras, tanto en el campo profesional como en el personal.

A la Dra. Josepa Gené Díaz, por su asesoramiento en los inicios del trabajo de aislamiento de hongos del suelo y por su inestimable ayuda en los temas de la taxonomía de los hongos conidiales. Gracias especialmente por tus palabras de aliento y por tus recomendaciones.

Al Dr. Rafael F. Castañeda Ruiz, por creer en mi capacidad y por permitirme trabajar a su vera. Gracias por tu ejemplo de constancia y por impregnarme de esa fascinación por la micología, que a tu lado se convirtió en algo más que vocación, pues ha delineado los últimos 10 años de mi vida. Tengo miles de razones más, así que miles de gracias amigo mío.

A la Dra. María Ofelia López Mesa, porque me indicó el camino para llegar a este punto, porque me convenció de que con dedicación lo conseguiría. Sobre todo, porque trató de enseñarme qué es lo más importante en la vida, recién lo estoy asimilando, gracias por todo.

...”-toda la gloria del mundo cabe en un
grano de maíz-...”

José Marí

Al Dr. Xavier Pastor, que invariablemente ha estado dispuesto a responder mis múltiples preguntas sobre clínica y sobre léxico. Gracias por el optimismo y las experiencias que me has transmitido durante todos estos años.

Al Dr. Emilio Mayayo, por su apoyo y familiaridad. Gracias por tu ejemplo, me has demostrado que aunque las circunstancias sean adversas lo importante es el empeño y la voluntad de seguir adelante. Gracias por tu amistad.

A los Dres. Isabel Pujol, Francisco Miró y José Manuel Guillamón por el afecto demostrado durante todo este tiempo.

Al Dr. Samir Abdullah, por sus consejos y criterios taxonómicos. Gracias por el ánimo y el convencimiento que me ha infundido sobre mi capacidad de seguir hacia delante.

A la Dra. Matilde Chacón y a las Licdas. Mabel Inza y Mercè Moncusí, por su inestimable ayuda en mis avatares de doctoranda. Gracias, porque siempre han estado dispuestas a escuchar y sobre todo a enseñar y a ayudar.

Mis agradecimientos a todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), gracias por sus palabras de aliento, gracias a todos los que me han tendido la mano en el momento oportuno aún sin haber clamado ayuda, gracias por confiar en que podría conseguirlo. Gracias en especial a Maritza Corrales que ha sido mi hilo conectivo con los avatares y logros de nuestra casa, el INIFAT, gracias por el tiempo que me has dedicado.

A mi compatriota y ejemplo de voluntad y firmeza, Kendra, porque también has sido un ejemplo a seguir, siempre mirando al futuro y trazando nuevas metas. A la Dra. Kendra. Rodríguez, gracias por todo.

Mis agradecimientos especiales a todos mis compañeros. Juntos hemos andado entre el espeso rosal del conocimiento y la investigación, compartiendo las espinas y las rosas. Lo más importante es que ¡Las rosas son preciosas!

A: Antonio, Aranxa, Belkys, “las Carmenes”, Carol, Carolina, Cori, Felix, Gisela, Josep, Kendra, Lara, “las Nurias”, Lucía, Lupe, Mabel, Marçal, María, Martita, Maty, Mery, Montse, Paco, Pilar, Rita, y Xavi.

A todos los que han sido mis hermanos en esta ribera del mundo, estando a mi lado en las verdes y en las maduras. Gracias por haber estado siempre ahí, dispuestos a escuchar y a tender la mano, ¿qué más les puedo decir? Espero que entendáis que no hay manera de corresponder con cuatro líneas todo lo que han significado para mí.

A: Belkys y Kevin, Cori y Alberto, Lidia y Pau y a Marc.

Gracias a todos y por todo.

Tiene el leopardo un abrigo
En su monte seco y pardo:
Yo tengo más que el leopardo,
Porque tengo.... **buenos amigos.**

José Martí

A mi “nueva familia”, porque así me he sentido entre ustedes, gracias. A José y Eugenia, a la abuela María y a los tíos Mary, Antonio y Florentina. A Anna, Olga y Rafa, Gema y Jose, Ramón y Laia, Antonio y Martha, a todos gracias.

A mi familia, a mis abuelos y a mis padres. Soy consecuencia de sus desvelos. Sin ustedes no hubiese sido posible, porque siempre han estado involucrados en mis quimeras y las han apoyado y compartido. Porque estar ahí ocupando mi puesto con mi retoño, ha sido pedir demasiado y no dudaron. A mi hermano Edgar, sin duda alguna, el mejor tío del mundo, gracias por tu paciencia y por tu apoyo. Gracias a todos por compartir desde la distancia mis sueños. A Raydel, gracias por estar ahí.

A ti Gerardo, mi tabla en el naufragio, y mi faro en la tormenta, mi compañero y amigo.

Especialmente a ti Carla, mi niña, por tu larga espera y tu cariño incondicional.

I. INTRODUCCIÓN

1

| | |
|---|-----------|
| 1.1. LOS ASCOMICETOS..... | 2 |
| 1.1.1. Los hongos como organismos eucariotas..... | 2 |
| 1.1.2. Morfología de los ascomicetos..... | 4 |
| 1.1 1.1.3. Taxonomía..... | 14 |
| 1.1.4. Filogenia molecular..... | 17 |
| <i>1.1.4.1. Genes estudiados en la construcción de árboles filogenéticos</i> | 18 |
| <i>1.1.4.2. Métodos filogenéticos.....</i> | 20 |
| 1.2. LOS SORDARIOMYCETES..... | 23 |
| 1.2.1. Caracteres generales..... | 23 |
| 1.2.2. Taxonomía..... | 24 |
| 1.2.3. Los géneros <i>Neurospora</i> y <i>Gelasinospora</i>..... | 29 |
| 1.2.4. La familia Coniochaetaceae..... | 33 |
| 1.3. LOS ASCOMICETOS DEL SUELO..... | 36 |
| 1.3.1. Introducción..... | 36 |
| 1.3.2. Fenómenos de micostasis y latencia..... | 37 |
| 1.3.3. Metodología de estudio..... | 39 |
| <i>1.3.3.1. Métodos de aislamiento directos.....</i> | 40 |
| <i>1.3.3.2. Métodos de aislamiento indirectos.....</i> | 41 |
| 1.3.4. Importancia del estudio y de la conservación de los hongos del suelo..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1. TÉCNICAS DE CAMPO..... | 52 |
| 3.1.1. Origen de las muestras..... | 52 |
| 3.1.2. Muestreo y conservación de las muestras..... | 52 |
| 3.2. TÉCNICAS DE LABORATORIO..... | 53 |
| 3.2.1. Método de aislamiento mediante la activación de las ascosporas presentes en el suelo..... | 53 |
| 3.2.1.1. Activación mediante la acción del fenol..... | 53 |
| 3.2.1.2. Activación mediante la acción del etano..... | 53 |
| 3.2.1.3. Modificación del método de Furuya y Naito..... | 54 |
| 3.2.2. Método de aislamiento mediante la técnica de “cebo o anzuelo”..... | 54 |
| 3.2.3. Examen de las muestras. Aislamiento y obtención de cultivos puros | 54 |
| 3.2.4. Identificación de los ascomicetos aislados en cultivo puro..... | 56 |
| 3.2.5. Medios de cultivo y medios de montaje utilizados..... | 57 |
| 3.2.5.1. Medios de cultivo..... | 57 |
| 3.2.5.2. Medios de montaje..... | 59 |
| 3.2.6. Conservación de las cepas..... | 60 |
| 3.2.6.1. Conservación en tubos con medio de cultivo inclinado | 60 |
| 3.2.6.2. Conservación en agua..... | 60 |
| 3.2.6.3. Conservación de cultivos secos | 61 |
| 3.2.6.4. Preservación de cultivos vivos | 61 |
| 3.2.7. Estudios microscópicos..... | 61 |
| 1.1.1.13.2.7.1. Microscopia óptica..... | 61 |
| 3.2.7.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)..... | 62 |
| 3.2.8. Técnicas de biología molecular..... | 65 |
| 3.2.8.1. Extracción del ADN..... | 65 |
| 3.2.8.2. Amplificación de los genes y de las regiones de los espaciadores intergénicos (ITS) del ARNr..... | 67 |
| 3.2.8.3. Secuenciación, alineamiento y análisis filogenético..... | 69 |

3.2.8.4. *Depósito y obtención de secuencias*.....70

IV. RESULTADOS

71

4.1. *Syspastospora tropicalis*, una nueva especie aislada de suelos tropicales

D. García, A. M. Stchigel and J. Guarro. 2002. A new species of *Syspastospora* from tropical soils. *Mycologia* 94: 862-865.

.....72

4.2. Dos especies nuevas del género *Apiosordaria* aisladas de suelo de España

D. García, A.M. Stchigel and J. Guarro. 2003. Soil ascomycetes from Spain. XIII. Two new species of *Apiosordaria*. *Mycologia* 95: 134-140.

.....77

4.3. Una nueva especie de *Poroconiochaeta* aislada de suelo de Rusia

D. García, A.M. Stchigel and J. Guarro. 2003. A new species of *Poroconiochaeta* from Russian soil. *Mycologia* 95: 525-529.

.....85

4.4. Dos nuevas especies del género *Sphaerodes*

D. García, A. M. Stchigel and J. Guarro. 2004. Two new species of *Sphaerodes* from Spanish soils. *Studies in Mycology* 50: 63-68.

.....91

4.5. *Coronatomyces cubensis* gen. et. sp. nov., un nuevo ascomiceto de Cuba

D. García, A.M. Stchigel, J. Cano, and J. Guarro. 2004. *Coronatomyces cubensis* gen. et. sp. nov., a new ascomycete from Cuban soil. *Studies in Mycology* 50: 143-148.

.....98

4.6. Estudio morfológico y molecular de los géneros *Neurospora* y *Gelasinospora*

D. García, A. M. Stchigel, J. Cano, J. Guarro and D. L. Hawksworth. 2004. A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data. *Mycological Research* 108: 1119-1142.

.....104

4.7. Estudio molecular de la familia Coniochaetaceae

D. García, A. M. Stchigel, J. Cano, M. Caldach, D. L. Hawksworth and J. Guarro. A molecular approach to the taxonomy of Coniochaetaceae. (sometido a publicación. *Mycological Research*)

.....130

1.1.1.1.1.1.1.V. DISCUSIÓN

176

5.1. Ascosporas latentes: activación química o métodos indirectos.....177

5.2. Filogenia molecular179

5.2.1. Los géneros Gelasinospora y Neurospora.....179

5.2.2. El género Coronatomyces.....181

5.2.3. La familia Coniochaetaceae.....181

2 VI. CONCLUSIONES

183

VII. BIBLIOGRAFÍA

188

I INTRODUCCIÓN

1.1. LOS ASCOMICETOS

1.1.1. Los hongos como organismos eucariotas

Los hongos han sido tradicionalmente definidos como organismos eucarióticos que presentan pared celular y carecen de clorofila (Jahn, 1949; Whittaker, 1969). Estos organismos pueden ser unicelulares (talo levaduriforme) o pluricelulares y filamentosos (talo miceliar). Los filamentos o hifas constituyen la parte somática de los hongos que se desarrolla a través del crecimiento apical. Los hongos son organismos heterótrofos que se nutren por absorción, utilizando compuestos orgánicos como fuente primaria de energía, los que deben atravesar la pared celular y la membrana plasmática. Los hongos producen enzimas capaces de degradar moléculas grandes y poco solubles en agua (carbohidratos, proteínas o lípidos) en moléculas más pequeñas y más solubles. Muchos hongos son saprofitos pudiendo utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, aunque un considerable número de especies son parásitos de plantas, animales o de otros hongos (Tehler, 1988; Alexopoulos y col., 1996; Carlile y col., 2001). Los hongos se reproducen por esporas, de origen asexual o sexual. En algunos grupos las esporas se forman sobre estructuras bien diferenciadas de las partes somáticas exhibiendo una gran variedad de formas y de mecanismos de ontogenia. La clasificación de los hongos se basa en los caracteres derivados de las estructuras reproductivas (Alexopoulos y col., 1996).

En la reproducción asexual las esporas se originan a través de la mitosis (mitosporas = conidios), diferenciándose por su ontogenia y su morfología. A los estados asexuales se les conoce como anamorfos, y a los estados sexuales se les denomina teleomorfos. Algunos teleomorfos pueden desarrollar dos o más anamorfos, los que son llamados sinanamorfos. El término holomorfo se emplea para denotar a todas las manifestaciones de un mismo genotipo, o sea, para designar al organismo como un todo, incluyendo todas sus morfologías y fases (anamorfo o sinanamorfos y teleomorfo) (Kendrick, 1992; Kirk y col., 2001). El teleomorfo y sus

anamorfos pueden o no coincidir en el tiempo, o pueden desarrollarse sobre sustratos diferentes. Por estas razones son generalmente recolectados por separado, y en algunos casos han sido tratados como organismos diferentes.

Un complejo sistema de genes controla el desarrollo sexual de los hongos. En los ascomicetos y en algunos basidiomicetos interviene un único locus denominado *mat* el cual presenta dos alternativas o “idiomorfos”. Por ejemplo, en los pirenomicetos estos idiomorfos han sido designados como *mat A* y *mat a*. Los hongos en su fase sexual pueden seguir tres estrategias reproductoras diferentes: heterotalismo, homotalismo o pseudohomotalismo. Los individuos de las especies heterotálicas (Ej. *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler) Drechsler, *Neurospora crassa* Shear & B. O. Dodge, *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw.) poseen únicamente uno de estos idiomorfos (*mat-A* ó *mat-a*) y solo la interacción con un individuo de talo opuesto hace posible la conjugación y la formación de esporas sexuales. Las especies homotálicas poseen ambos idiomorfos en un mismo individuo, o esta diferenciación no existe. En estos organismos la reproducción sexual no requiere la interacción de dos individuos. Las especies pseudohomotálicas (Ej. *Neurospora tetrasperma* Shear & B. O. Dodge, *Podospora anserina* (Rabenh.) Niessl) desarrollan algunas esporas con dos núcleos, uno con cada idiomorfo, y por tanto estas son capaces de completar el ciclo sexual por sí mismas. Sin embargo, otras esporas solo contienen un núcleo (*mat-A* ó *mat-a*) necesitando de un individuo de talo complementario para poder completar el ciclo sexual (Alexopoulos y col., 1996; Pöggeler, 1999).

Los hongos fueron considerados como un reino independiente en base al estudio de las secuencias del gen 18S del ARN ribosómico (Bruns y col., 1991; Tehler y col., 2000; Berbee y Taylor, 2001; Tehler y col., 2003). Recientemente el quinto reino ha sido confirmado a través de análisis multigénicos (Lutzoni y col., 2004) y reúne a un grupo monofilético de organismos más relacionado con el reino *Animalia* que con el reino *Plantae*. Por otra parte, estos estudios han demostrado que algunos organismos tradicionalmente considerados especies fúngicas, como los Myxomycetes y los Oomycetes, están circunscritos al reino *Protista*. Los hongos verdaderos

– Eumycota – se ubican en cuatro *Phyla* (divisiones): Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota.

1.1.2. Morfología de los ascomicetos

Los miembros del *Phylum* Ascomycota (ascomicetos o ascomicetes) se distinguen del resto de los hongos por la formación de esporas endógenas (ascosporas), las cuales se desarrollan en el interior de estructuras en forma de saco denominadas ascos (Gr. *askos* = saco). Los ascos pueden contener una o varias ascosporas, las cuales son el resultado de la cariogamia y la meiosis de un núcleo diploide (Tsuneda, 1983; Ingold y Hudson, 1993; Carlile y col., 2001).

Los ascos se desarrollan en “cuerpos fructíferos” denominados ascocarpos o ascomas (Gr. *askos* + *karpos*= fruto). Los ascomas pueden ser globosos y completamente cerrados (cleistotecios); o piriformes y provistos de una apertura apical, el ostiolo (peritecios). Pueden ser abiertos con formas de discos o copas donde los ascos se encuentran expuestos (apotecios), o los ascos se pueden desarrollar directamente en la cavidad de un estroma, formado por el agrupamiento de hifas somáticas (ascostromas o pseudotecios) (Fig. 1). Existen además varias modificaciones estructurales que determinan numerosas formas intermedias características de ciertos grupos.

Asociados con los ascos, en la cavidad del ascoma (*centrum*) se pueden desarrollar diferentes tejidos interascales o células estériles e hifas (hamatecium, Gr. *hama*= junto + *theke*= caja, lugar en el que se guarda algo) (Kirk y col., 2001). Los tipos de tejidos interascales más frecuentes en los grupos estudiados son las paráfisis (hifas que se desarrollan desde la base de la cavidad) y las perífisis (hifas que se desarrollan en el canal ostiolar) (Fig. 2).

Los ascos pueden ser esféricos, cilíndricos, ovoides, etc. Pueden ser sésiles o estipitados. Pueden formarse en varios niveles en el interior del ascocarpo u originarse en un único nivel en la base del ascoma. Se diferencian tres tipos básicos: prototunicados, unitunicados y bitunicados. Los ascos prototunicados presentan una pared fina y delicada, produciéndose la

liberación de las ascosporas por la lisis de la misma. Los ascos unitunicados y los bitunicados presentan dos paredes o capas, la externa o exotúnica y la interna o endotúnica. En los ascos unitunicados estas paredes están adheridas y son inseparables, y pueden ser evanescentes o persistentes. Los ascos unitunicados pueden presentar opérculos o poros apicales, a través de los cuales son liberadas las ascosporas. En algunos grupos, el poro puede estar rodeado por un anillo apical. Los anillos apicales pueden ser amiloides y teñirse de azul en presencia de colorantes yodados (I+) o no colorearse en presencia del yodo (I-), no amiloides. En los ascos bitunicados las capas de la pared son perfectamente distinguibles. La exotúnica es fina y rígida, y la endotúnica gruesa y elástica. En este tipo de ascos la endotúnica se expande y rompe la exotúnica, las esporas son liberadas a través de un poro en el extremo de la endotúnica (Alexopoulos y col., 1996) (Fig. 3).

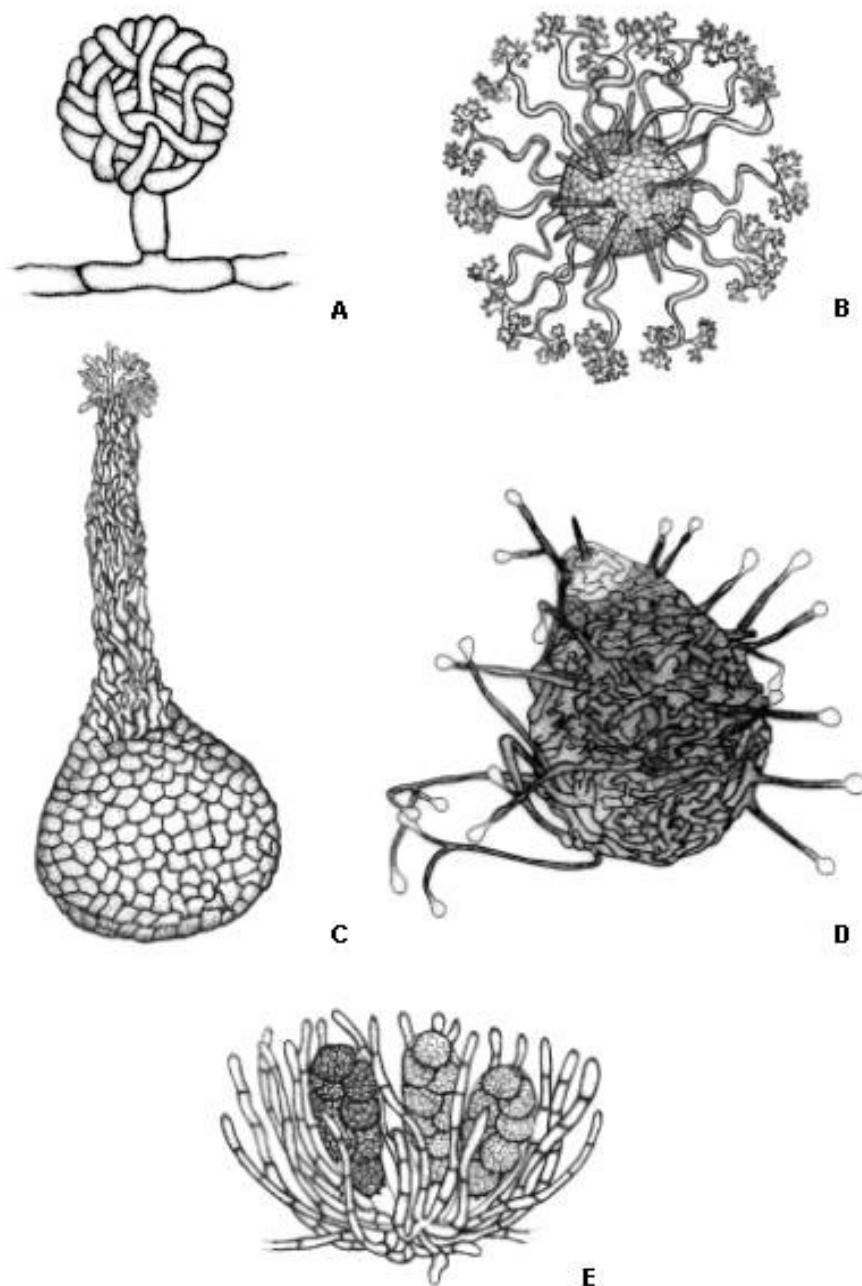


Fig. 1. Tipos de ascomas. A y B cleistotecios. A, *Monascus purpureus*. B, cleistotecio ornamentado (*Medusosphaera* sp.). C y D peritecios. C, *Arxiomyces* sp. D, peritecio ornamentado (*Ascotricha hispanica*). D, apotecio (*Ascodesmis sphaerospora*).

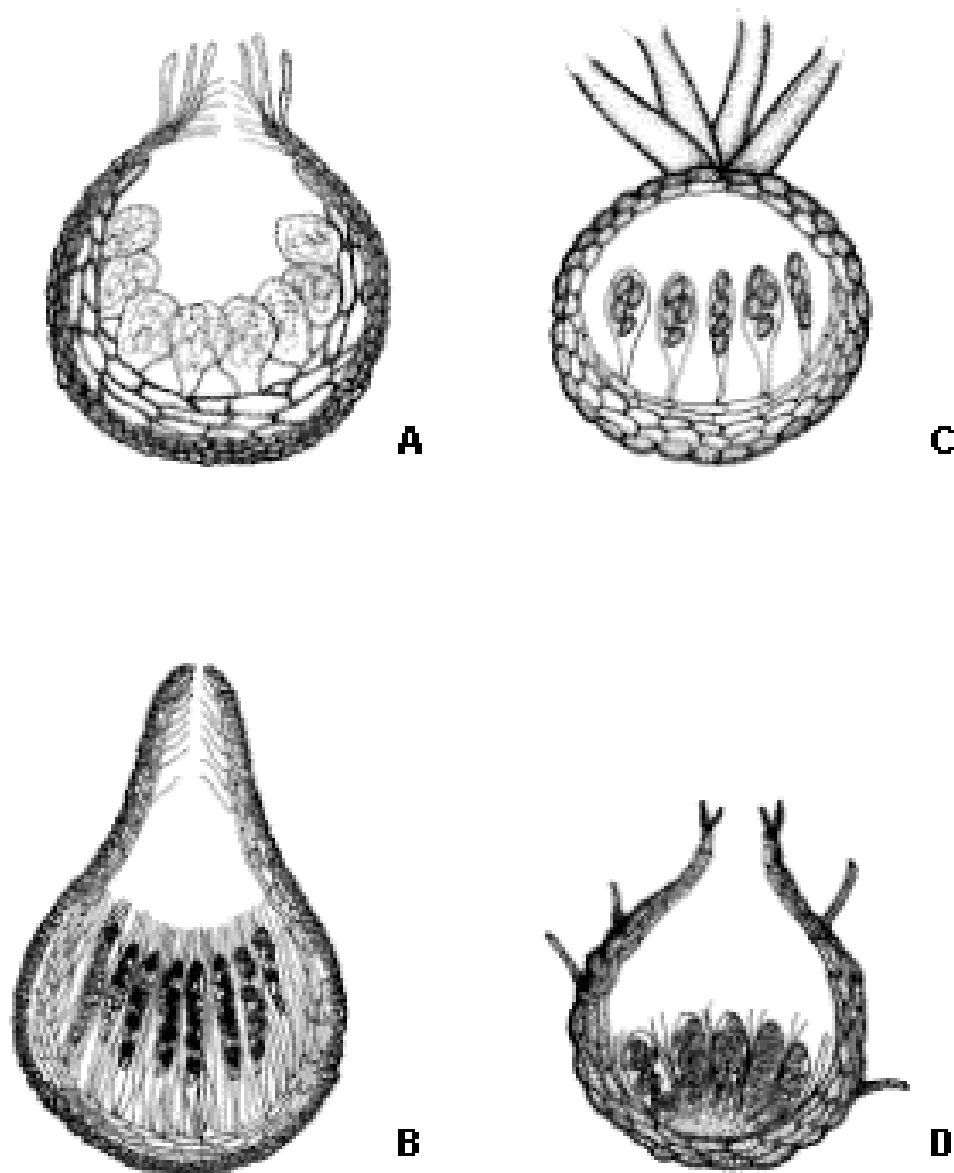


Fig. 2. Tipos de hamatecia más frecuentes en los ascomicetes estudiados en la presente tesis. A, hamatecium con perífisis (*Petriella guttulata*). B, hamatecium con paráfisis y perífisis (*Apiosordaria backusii*). C, hamatecium sin tejidos interascales (*Chaetomidium heterotrichum*). D, Hamatecium con paráfisis (*Poroconiochaeta discoidea*).

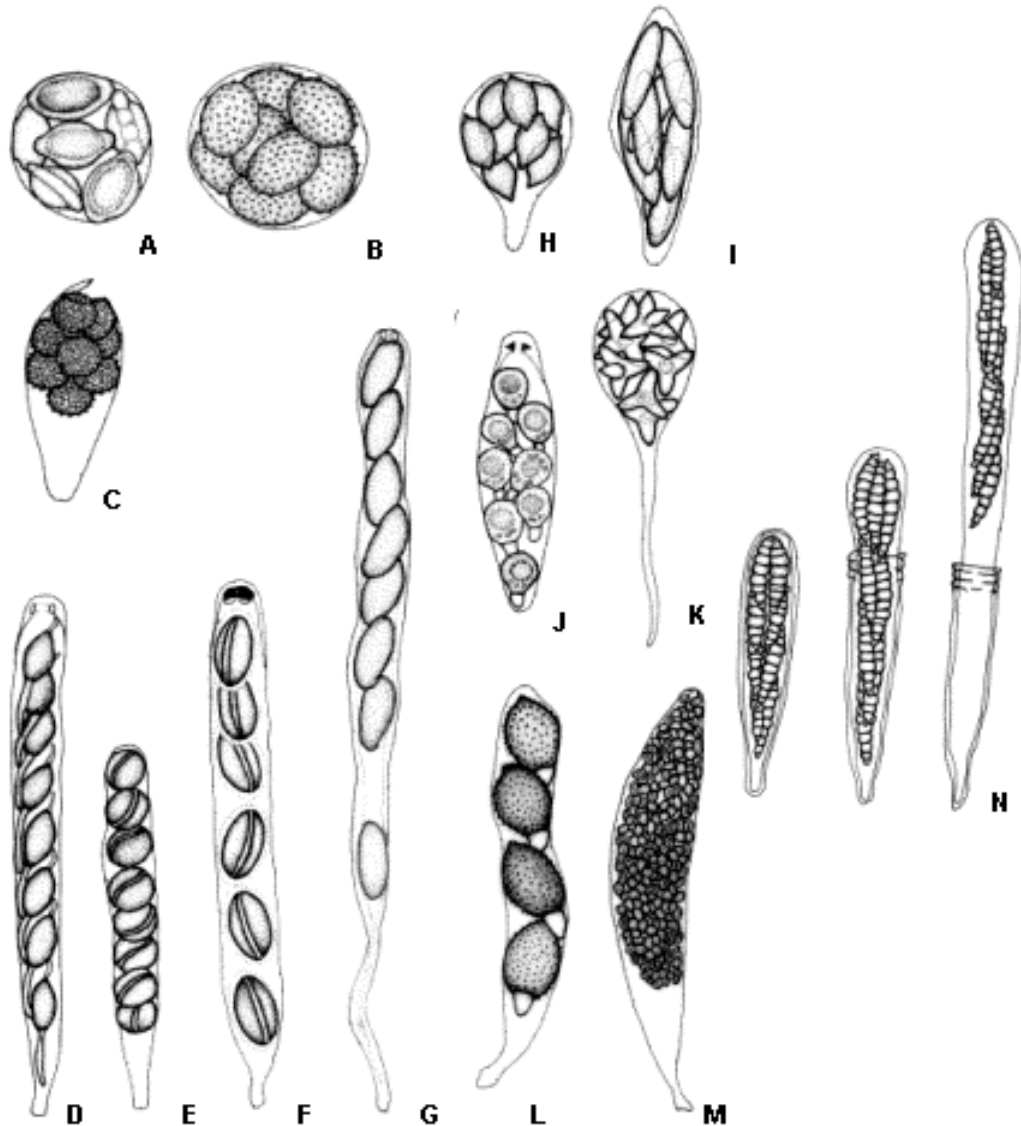


Fig. 3. Ascospores. A and B, spherical protunicated asci (*Testudomyces verrucosus* and *Talaromyces flavus*). C-M, unitunicated asci. C, operculated ascus (*Ascodesmis sphaerospora*). D-G, cylindrical asci. D, ascus with non-amyloid apical ring (*Bombardia bombardia*). E, ascus without apical structure (*Ascotricha xyliina*). F, ascus with amyloid apical ring (*Podosordaria leporina*). G, septate ascus (*Cryptadelphia polyseptata*). H-K, claviform asci. H and I, evanescent asci (*Lophotrichum ampullus* and *Thielavia terricola*). J, ascus with amyloid apical ring (*Apiosphaeria guaranítica*). K, septate ascus (*Tripospora tripos*). L, ascus with 4 ascospores (*Apiosordaria effusa*). M, multispored ascus (*Coniochaeta polysperma*). N, bitunicated ascus (*Leptosphaeria acuta*).

Las ascosporas presentan una gran diversidad de formas, pueden ser unicelulares o pluricelulares, pigmentadas o hialinas. Las ascosporas pueden presentar capas o apéndices mucilaginosos, pueden tener poros germinativos o líneas germinativas o carecer de ambos (Fig. 4).

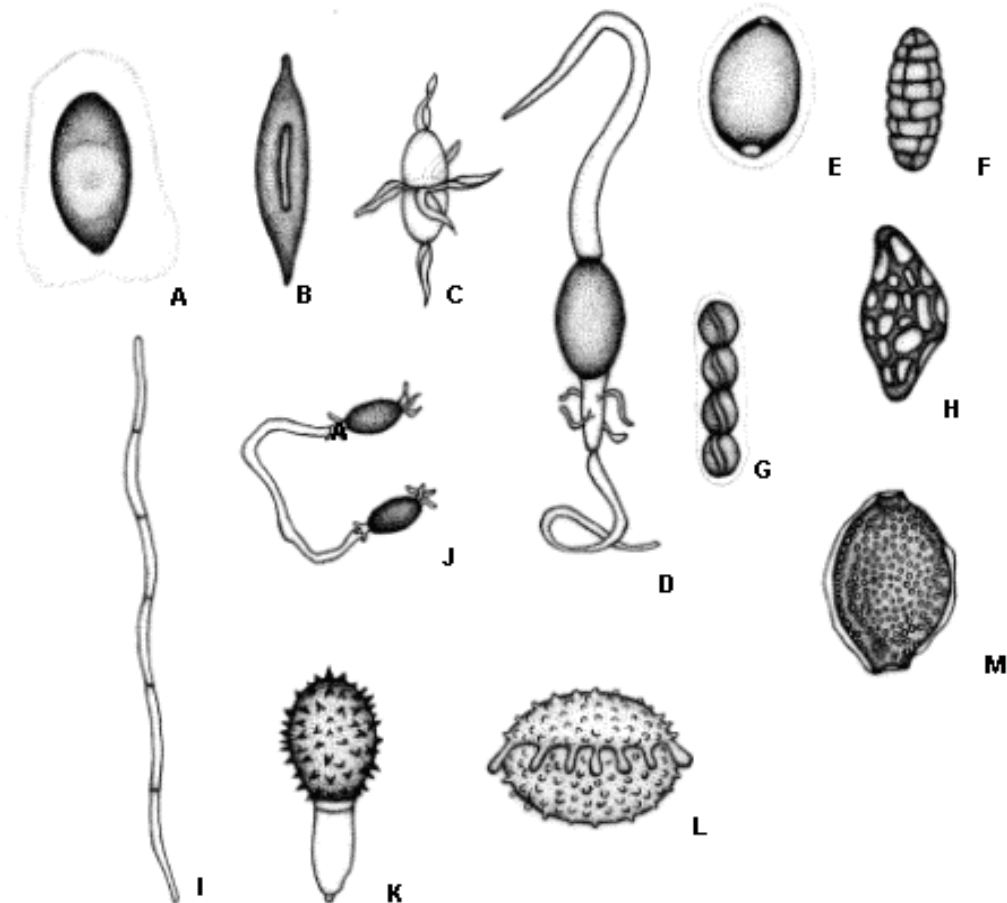


Fig. 4. Ascosporas. A, *Sordaria fimicola*. B, *Rosellinia necatrix*. C, *Halosphaeria appendiculata*. D, *Podospora anserina*. E, *Fimetariella macromisela*. F, *Pleospora herbarum*. G, *Sporomiella minima*. H, *Sphaerodes retispora* var. *inferior*. I, *Cochliobolus carbonum*. J, *Zygopleurage zygospora*. K, *Apiosordaria vermicularis*. L, *Testudomyces verrucosus*. M, *Pteridosperma lenticularis*.

Estudios ultraestructurales han demostrado que las ascosporas poseen una pared formada por varias capas. Sin embargo, la terminología utilizada por diferentes autores para designarlas es confusa (Kirk y col., 2001). En nuestro trabajo seguiremos la nomenclatura propuesta por Cailleux (1971) y los resultados obtenidos por Hackett y Chen (1976) en su estudio sobre la ontogenia de *Sordaria brevicollis* Olive & Fantini. Estos autores reconocen 4 capas bien definidas (Fig. 5):

endosporio: es la capa más interna que recubre el citoplasma celular, es fina, electro-traslúcida, y la última en formarse (Figs 5 A y 5 B)

episporio: es una capa de elevada electro-densidad, determina la forma de la ascospora, la pigmentación y puede estar ornamentada.

perisporio: rodea al episporio, puede ser pigmentada o hialina y ornamentada o lisa.

exosporio: es la capa más externa y la menos densa, aparentemente deriva de la membrana y otros componentes del citoplasma del asco. Aparece en los primeros estadios de delimitación de las ascosporas conjuntamente con el episporio.

Las variaciones en el grosor, la pigmentación y la ornamentación de las capas intermedias (episporio y perisporio) dan lugar a considerables diferencias morfológicas en las ascosporas de algunos géneros dentro de una misma familia (Ej. Lasiosphaeriaceae y Sordariaceae).

Las ascosporas, una vez liberadas, pueden ser dispersadas por las corrientes de aire, el agua, los insectos o por los herbívoros. Existen varios factores que influyen en la germinación de las ascosporas: la humedad, la presencia de oxígeno y la temperatura, entre otros. Sin embargo, ciertas especies necesitan estímulos físicos o químicos más específicos. Por ejemplo, los compuestos furfúricos liberados durante la combustión parcial de la hemicelulosa son capaces de activar la germinación de las ascosporas en *Neurospora* (Carlile y col., 2001). Si las condiciones son óptimas, las ascosporas germinan dando lugar al tubo germinativo, el cual irá alargándose y ramificándose para formar el micelio.

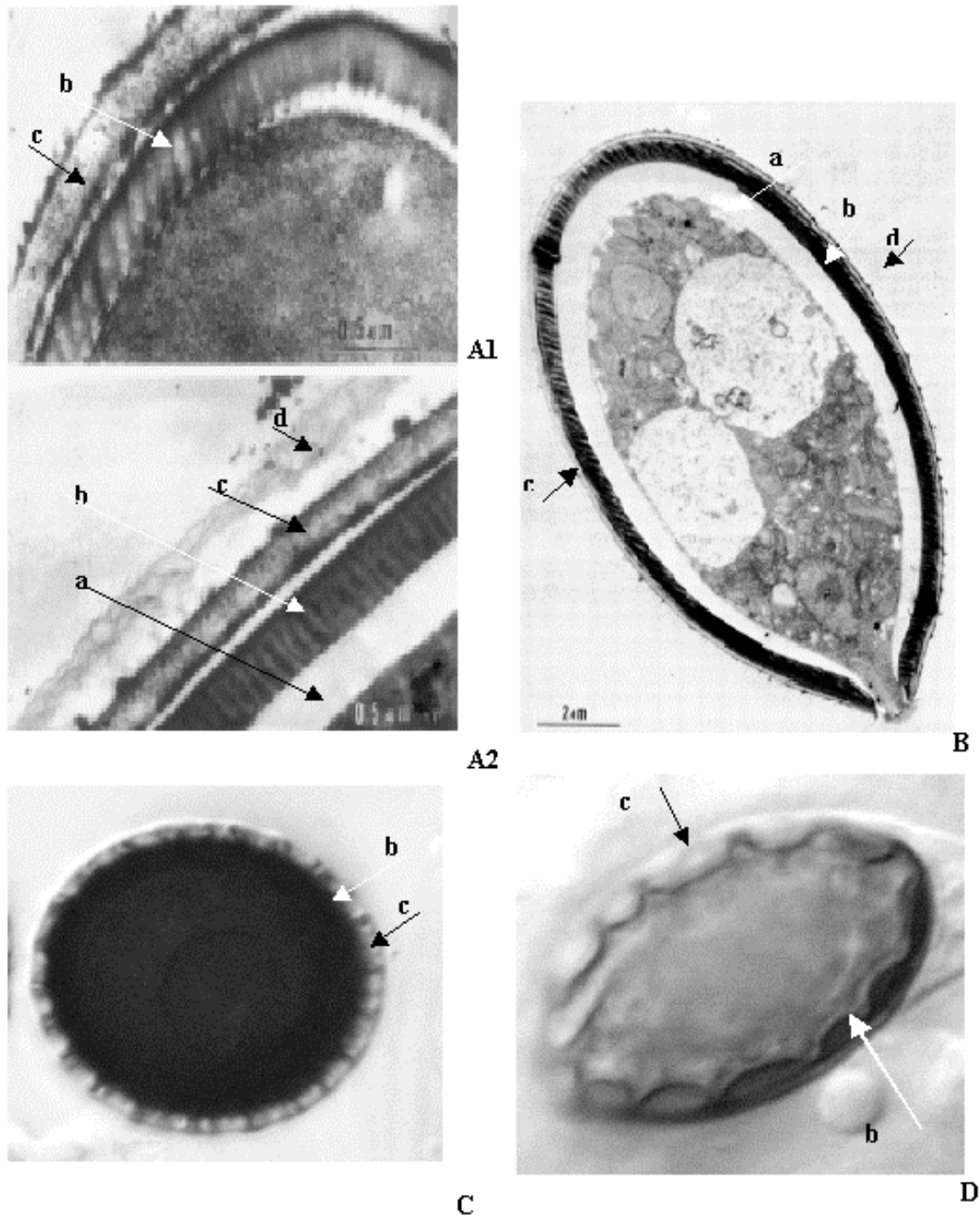


Fig. 5. Capas de la pared de las ascosporas. A y B, *Sordaria brevicollis* (Hackett y Chen, 1976). A, Detalles de la formación de las capas de la pared. A1, se observa que el episporio comienza a separarse del citoplasma, pero el endosporio aún no se ha formado. En este estadio el perisporio está definido pero poco pigmentado. A2, ascospora madura. Nótese que se ha formado el endosporio y que la electrodensidad del episporio ha aumentado, así como la definición y la pigmentación del perisporio. B, Ascospora madura. C, *Gelasinospora stellata* (García y col., 2004). Nótese el episporio liso y el perisporio ornamentado. D, *Gelasinospora retispora* (García y col., 2004). Nótese el episporio y el perisporio ornamentados. a, endosporio; b, episporio; c, perisporio; d, exosporio.

La reproducción asexual en los ascomicetos se lleva a cabo por gemación, fisión, o formación de clamidosporas, esclerocios, o conidios. La fisión y la gemación son mecanismos de propagación desarrollados por las levaduras. Las clamidosporas y los esclerocios son considerados estructuras de resistencia, pero no de diseminación, su formación garantiza la supervivencia del hongo bajo condiciones extremas (Alexopoulos y col., 1996; Kirk y col., 2001). Los conidios, como se ha comentado previamente, son esporas asexuales, carecen de motilidad y se forman a partir de células especializadas denominadas células conidiógenas. El conidio se puede desarrollar a partir de la conversión de una porción de hifa preexistente (desarrollo tálico) o por la formación *de novo* de la pared del conidio a partir de un punto de la célula conidiógena (desarrollo blástico) (Fig. 6). En los pirenomicetos del suelo, la conidiogénesis blástica es la más frecuente, y los conidios se desarrollan siguiendo fundamentalmente dos tipos de proliferación, enteroblástica u holoblástica. En la conidiogénesis enteroblástica, la pared del conidio crece y se extiende a través de un orificio de la capa externa de la pared de la célula conidiógena. En la conidiogénesis enteroblástica pueden diferenciarse dos tipos de desarrollo, fialídico y anelídico. En estos tipos de desarrollo los conidios pueden ser mucosos o secos, los primeros tienden a formar agregados en el ápice de la célula conidiógena y los segundos cadenas basípetas (Fig. 6). En la ontogenia holoblástica todas las capas de la pared de la célula conidiógena están implicadas en la formación del conidio. (Alexopoulos y col., 1996; Kirk y col., 2001). La abundante producción de conidios garantiza la dispersión de la especie. En condiciones favorables los conidios germinan a través de un tubo germinativo que se ramifica dando lugar al micelio.

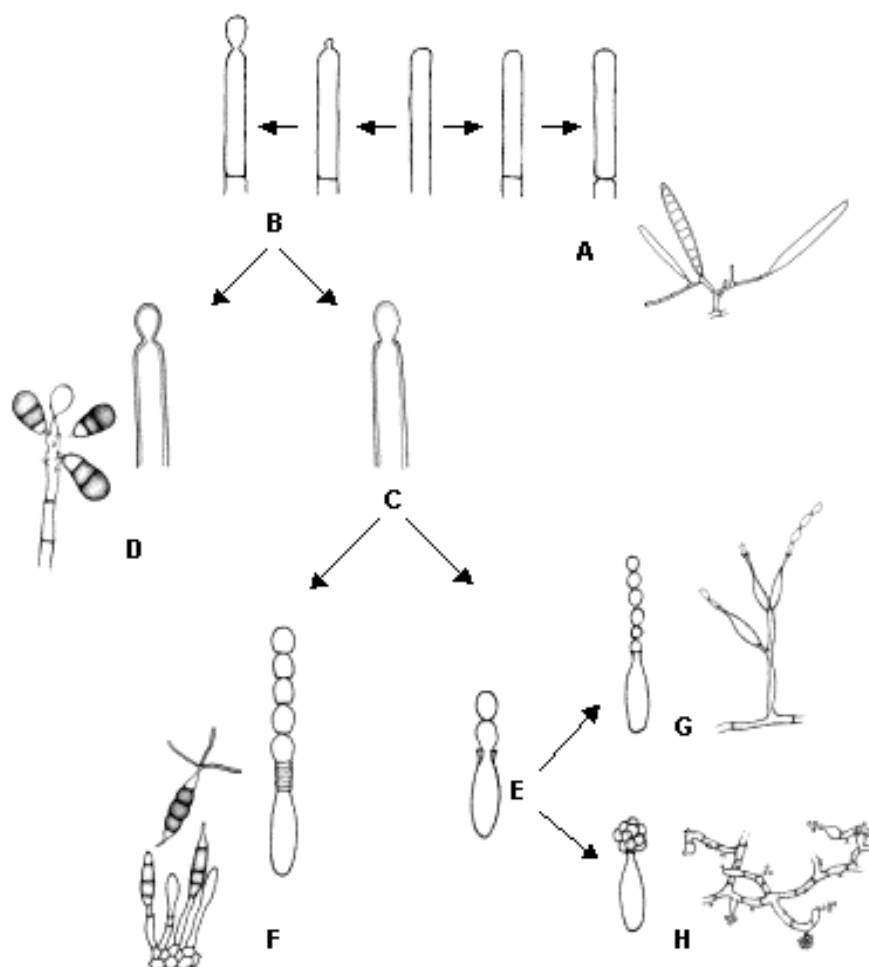


Fig. 6. Tipos de conidiogénesis. A, conidiogénesis tálica (*Microsporium gallinae* anamorfo de *Arthroderma grubyi*) enteroblástica (fialídica). B-H, conidiogénesis blástica. C, E-H, conidiogénesis enteroblástica. D, conidiogénesis holoblástica (*Brachysporium* sp. anamorfo de *Cryptadelfia* sp.). E, conidiogénesis enteroblástica fialídica. F, conidiogénesis enteroblástica anelídica (*Pestalotiopsis versicolor*). G, fialoconidios catenulados (tipo *Paecylomyces*, anamorfo de *Coniochaeta cypraespora*). H, fialoconidios mucosos (*Cladorhinum foecundissimum* anamorfo de *Apiosordaria* sp.).

1.1.3. Taxonomía

La taxonomía es la ciencia que estudia las relaciones y la clasificación de los organismos, así como los procesos a través de los cuales estos organismos han evolucionado (Hawksworth y col., 1995). Los sistemas tradicionales de clasificación se han basado en la descripción de las características morfológicas de los organismos. Estos sistemas se fundamentan en la presencia o ausencia de determinados caracteres, y en consecuencia agrupan a diferentes organismos en una misma categoría taxonómica (Alexopoulos y col., 1996). Sin embargo, estos caracteres o atributos no siempre son filogenéticamente informativos.

Algunos de los caracteres morfológicos más utilizados en la clasificación de los ascomicetes han sido el tipo de ascoma y su ontogenia, el tipo de *centrum*, la morfología del asco y su dehiscencia, la ontogenia del anamorfo y las características de las ascosporas (presencia y tipo de estructuras germinativas o de capas o apéndices mucilaginosos, color, ornamentación, etc.) (Barr, 1990). Estas características tienen como ventaja fundamental que son fácilmente observables, sin embargo, en algunos grupos de organismos la morfología es poco variable o los caracteres utilizados han estado sujetos a una evolución convergente. Muchos autores han considerado a los caracteres morfológicos de escaso valor taxonómico y los sistemas taxonómicos basados en ellos poco objetivos y artificiales.

Según Rogers (1994) la taxonomía de los ascomicetes presenta tres problemas claves:

- 1º. Pocas especies han sido estudiadas detalladamente,
- 2º. La antigüedad de los ascomicetes, y el hecho de que muchos de ellos se hayan extinguido, ha propiciado la interpretación de relaciones evolutivas a partir de caracteres que en muchas ocasiones apuntan en varias direcciones y no tienen valor filogenético y
- 3º. La creación y formalización de sistemas taxonómicos basados en muy pocos caracteres.

En la pasada década técnicas basadas en la secuenciación del ADN y el avance de la informática permitieron elaborar nuevos sistemas de clasificación basados en las relaciones evolutivas. En estos sistemas los taxones son definidos como grupos monofiléticos de

organismos, es decir, con un ancestro común (Alexopoulos y col., 1996). Estas relaciones pueden representarse gráficamente mediante árboles filogenéticos o cladogramas.

Estudios moleculares recientes han demostrado que tanto el tipo de ascoma (peritecial, cleistotecial), como la presencia de ornamentación en las ascosporas son caracteres que han aparecido de forma independiente en diferentes grupos no relacionados entre sí y que por tanto, tienen escaso valor taxonómico (Suh y Blackwell, 1999; Dettman y col., 2001). Sin embargo, caracteres que no resultan filogenéticamente informativos para un conjunto de organismos permiten relacionar grupos monofiléticos en otros (Réblova y Winka, 2001; Zhang y Blackwell, 2002). El problema radica en definir qué caracteres morfológicos son los idóneos para diseñar un sistema de clasificación. Estos caracteres deben ser homólogos para el grupo de organismos que se compara y que no sean homoplásticos, es decir, caracteres que no sean el resultado de una evolución convergente, en paralelo, o reversible. Por ello, el procedimiento más generalizado para escoger los caracteres morfológicos que se esgrimirán al sustentar una hipótesis filogenética, consiste en incorporar en el árbol filogenético obtenido la mayor cantidad de caracteres homólogos y de este modo determinar el valor taxonómico de cada uno de ellos (Spatafora y Blackwell, 1993; Berbee, 1996; Silva-Hanlin y Hanlin, 1999; Réblová y Winka, 2000, 2001).

Actualmente la secuenciación del ADN ha revolucionado los puntos de vista sobre las relaciones entre los diferentes grupos de hongos y ha renovado algunas normas que imperaban en la taxonomía de los mismos. Por ejemplo, hace pocos años los micólogos eludían el empleo de categorías supraordinales dentro del *phylum* (Hawksworth y Eriksson, 1994; Hawksworth y col., 1983, 1995). Sin embargo, diferentes estudios moleculares respaldaron la creación de un esquema taxonómico que agrupara a los organismos en niveles superiores al orden (subclases, clases, subdivisiones) (Berbee y Taylor, 1992; Nishida y Sugiyama, 1994). Recientemente Eriksson y Winka (1997, 1998) y Winka (2000) sentaron las bases para la clasificación más actual en la que Eriksson y col. (2004) aceptan para el *phylum* Ascomycota tres *subphyla*: Taphrinomycotina (Archiascomycetes), Saccharomycotina (Hemiascomycetes) y Pezizomycotina (Euascomycetes) (Tabla 1).

Tabla 1. Sistema propuesto para el *phylum* Ascomycota (Eriksson y col., 2004)

| PHYLUM ASCOMYCOTA | | |
|---|-------------------------------|---|
| SUBPHYLUM TAPHRINOMYCOTINA | SUBPHYLUM SACCHAROMYCOTINA | SUBPHYLUM PEZIZOMYCOTINA |
| Clase Neolectomycetes Clase Pneumocystidomycetes Clase Schizosaccharomycetes Clase Taphrinomycetes | Clase Saccharomycetes | Clase Arthoniomycetes Clase Chaetothyriomycetes Clase Dothideomycetes Clase Eurotiomycetes Clase Laboulbeniomycetes Clase Lecanoromycetes Clase Leotiomycetes Clase Orbiliomycetes Clase Pezizomycetes Clase Sordariomycetes Clase Spathulosporomycetes |

1.1.4. Filogenia molecular

Como señalábamos anteriormente, la filogenia tiene como objetivo la reconstrucción de las relaciones evolutivas existentes entre los seres vivos utilizando para ello la comparación de caracteres moleculares, fundamentalmente las secuencias de ADN. La filogenia molecular se fundamenta en la teoría de que los cambios de nucleótidos se acumulan de forma constante en el tiempo. En consecuencia, las diferencias entre nucleótidos que aparecen al comparar secuencias homólogas de varios taxones aportan información sobre el tiempo transcurrido desde que estos evolucionaron a partir de un ancestro común. De este modo se infiere la distancia genética que relaciona a un organismo con su ancestro.

La ventaja de los caracteres moleculares sobre los caracteres morfológicos es que están exactamente definidos y que son menos sensibles a las fuerzas de la selección natural que los caracteres derivados de las estructuras que participan en la reproducción (Olsen y Woese, 1993). Por otra parte, los caracteres moleculares son cuantificables y la metodología utilizada para su obtención y comparación es altamente reproducible. No obstante, también existen algunos inconvenientes en la utilización de los caracteres moleculares. La mayoría de ellos son provocados por el restringido número de caracteres (cuatro: A, C, T, y G) que se comparan. En primer lugar, estos caracteres al ser tan escasos pueden determinar problemas de homoplasia molecular. Es decir, la presencia de una base en dos especies diferentes puede estar condicionada por el azar y no significa necesariamente que desciendan de un ancestro común. Otra de las problemáticas más frecuentes es la saturación de los datos. Por ejemplo, un gen puede haber variado tanto en el transcurso de su evolución que finalmente las señales de estos cambios desaparezcan o se solapen. Como consecuencia, al comparar con otras especies podríamos encontrar solamente un nucleótido de diferencia, cuando esta única divergencia podría haber sido el resultado de varios eventos anteriores que no pueden ser detectados con el análisis de las secuencias actuales. Otro inconveniente es que no todos los taxones presentan idénticas tasas de sustituciones y los que presentan una tasa de sustitución más elevada (*fast-clock-taxa*) pueden alterar los resultados pudiendo formar agrupamientos basales

en ramas mucho más largas (*long-branch attraction*) (Felsenstein, 1978; Huelsenbeck, 1997; Maley y Marshall, 1998).

1.1.4.1. Genes estudiados en la construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias más utilizadas en estudios filogenéticos de los hongos son las correspondientes al ADN ribosómico del núcleo (ADNr). Su principal ventaja radica en que se trata de una región repetida en tándem unas 200 veces en la cadena. Por otra parte, esta unidad génica se encuentra en todos los organismos eucariotas, pero su tasa de evolución varía para las diferentes regiones que lo conforman y lo convierten en una buena herramienta para realizar comparaciones filogenéticas a diversos niveles taxonómicos (Bruns y col., 1991; Winka, 2000; Iwen y col., 2002).

Dentro de esta región repetitiva del ADNr se localizan tres genes (18S, 5.8S y 28S) y dos espaciadores intergénicos (ITS1 e ITS2) que se transcriben como una sola unidad (Fig. 7). Los ARN ribosómicos (ARNr) codificados por estos tres genes dan lugar a fragmentos estructurales de los ribosomas que son esenciales para la síntesis de proteínas y están altamente conservados. Por ello se emplean para definir relaciones a diferentes niveles, desde reinos hasta especies (Berbee y Taylor, 2001). Los ITS, sin embargo, exhiben una mayor variabilidad y pueden ser útiles para comparar géneros o especies muy cercanos.

Uno de los principales problemas al que se enfrentan los micólogos al afrontar la sistemática molecular es el de seleccionar las secuencias del ADNr más adecuadas. El gen 18S (subunidad menor o SSU) (1800 pares de bases) tiene una función crucial en el proceso de síntesis de las proteínas y a pesar de su alto grado de conservación, sus dominios variables han sido válidos para establecer relaciones a niveles supraordinales dentro del reino de los hongos así como la relación de éste con otros reinos (Bruns y col., 1992; Spatafora y Blackwell, 1993, 1994ab; Nagahama, 1995; Eriksson y Winka, 1997, 1998; Sugiyama, 1998; Suh y Blackwell, 1999; Winka, 2000; Berbee y Taylor, 2001).

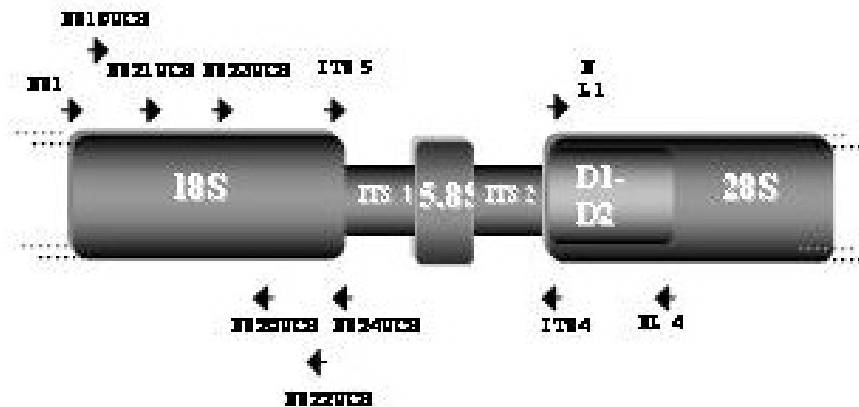


Fig. 7. Representación esquemática de los genes y de los espaciadores intergénicos que constituyen el ADN ribosómico. Las flechas indican los cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de estas regiones.

No obstante, el gen 18S del ARNr no ha permitido esclarecer numerosas incógnitas dentro de la taxonomía de los ascomicetes (Tehler y col., 2000; Winka, 2000). El gen 5.8S (560 pb) presenta por su parte dos inconvenientes: su pequeño tamaño que ofrece escasa robustez en las filogenias trazadas a partir de sus secuencias, y su alto grado de conservación (Muir y Schötterer, 1999; Berbee y Taylor, 2001; Iwen y col., 2002). Sin embargo al estar considerablemente conservado, ha sido de utilidad para diseñar cebadores universales (Iwen y col., 2002). Por último el gen 28S (sub-unidad mayor o LSU) (3400 pb) a pesar de estar muy conservado posee regiones que son más variables que otras. Estos dominios variables han sido empleados para inferir filogenia a diferentes niveles taxonómicos (Suh S-O y Blackwell, 1999; Réblova y Winka, 2001; Bills y col., 2002; Huzefa y col., 2003), aunque en el ámbito de especies morfológicamente muy relacionadas no son siempre resolutivos (Hennequin y col., 1999). Con este último objetivo, o sea, para intentar establecer relaciones entre especies muy similares, se han empleado las secuencias de los espaciadores intergénicos (ITS1 e ITS2). Los ITS han sido empleados como marcadores moleculares en la identificación de patógenos humanos y fitopatógenos, en la detección y tipificación de especies clínicas y ambientales, en estudios epidemiológicos (Bryan y col., 1995; Iwen y col., 2002; Abd-Elsalam y col., 2003) así como para dilucidar relaciones taxonómicas entre especies cercanas y establecer

correspondencias entre anamorfos y teleomorfos (Kuhls y col., 1996; Lieckfeldt y Seifert, 2000; Dettman y col., 2001; Solé y col., 2002 a, b). Sin embargo, varios autores consideran que los ITS son regiones polimórficas, que pueden crear confusiones filogenéticas (Berbee y Taylor, 2001; Kwan y Hack, 2002).

En la taxonomía fúngica también se ha utilizado la secuenciación de los genes (idiomorfos) implicados en la reproducción sexual de los ascomicetes, así como la secuenciación de genes que codifican para determinadas proteínas (Ej. β -tubulina, *gpd*, RPB2) (Beatty y col., 1994; Liu y col., 1999; Pöggeler, 1999, 2001; Pöggeler y Kück, 2000; Dettman y col., 2001; Zhang y Blackwell, 2002; Miller, 2003). No obstante, se sigue prefiriendo el uso de los genes ribosómicos ya que todas las copias que provienen de un mismo núcleo son prácticamente idénticas.

Los genes ribosómicos son de gran utilidad para ayudar a definir la filogenia dentro del reino de los hongos, pero por sí solo ninguno de ellos permite esclarecer todas las interrogantes. Por esta razón algunos autores han comenzado a trabajar con árboles filogenéticos contruidos a partir de la combinación de las secuencias de varios genes (Suh y Blackwell, 1999; Kohlmeyer y col., 2000; Dettman y col., 2001; Miller, 2003; Lutzoni y col., 2004).

La interpretación de los resultados que se derivan de los datos moleculares, así como el estudio exhaustivo de los caracteres morfológicos son metodologías complementarias, y su aplicación es la fórmula que nos permite resolver los problemas taxonómicos y filogenéticos (Taylor y col., 1994).

1.1.4.2. Métodos filogenéticos

Los métodos diseñados para inferir filogenia pretenden ser modelos de un proceso evolutivo que permitan reconstruir las relaciones existentes entre un grupo de organismos. Los métodos filogenéticos basados en secuencias de ADN se pueden englobar en dos grandes grupos: los métodos basados en distancias genéticas y los métodos basados en caracteres conservados.

Los métodos basados en distancias genéticas parten del supuesto de que la distancia entre dos taxones (definida como la medida de su disimilitud) se relaciona directamente con su relación filogenética. Estas distancias se reconstruyen mediante la comparación de pares de secuencias, para las cuales se calcula un índice que expresa las diferencias observadas entre sus nucleótidos. Con las distancias calculadas se elabora una matriz a partir de la cual se construye el árbol filogenético. Uno de los métodos más extendido basado en distancias genéticas es el de *neighbour-joining* (NJ) o vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987). Los árboles que se obtienen con este método forman agrupamientos con las secuencias que poseen menor distancia genética entre ellas, siguiendo el principio de mínima evolución propuesto por Saitou e Imanishi (1989). Así, el árbol obtenido a través de NJ es aquel en que la suma total de las longitudes de sus ramas es la menor. La ventaja más significativa del NJ es su rapidez en el procesamiento de los datos, lo que lo convierte en uno de los métodos más empleados para inferir filogenia. Además, resulta muy resolutivo cuando las distancias evolutivas son cortas y las secuencias de que se dispone son largas. Entre sus principales desventajas podemos citar que solamente muestra un único árbol, desestima las distancias genéticas largas y es especialmente susceptible a los fenómenos de homoplasia.

El método basado en caracteres conservados más utilizado es el de máxima parsimonia (MP) (Czelusniak y col., 1990; Swofford y Olsen, 1990). Este método considera la posición de cada nucleótido como un carácter independiente, por tanto, cuanto más largas sean las secuencias que se comparan más información se obtendrá. En MP se calcula el número de cambios evolutivos que requiere cada uno de los posibles árboles. A dicho número se le considera como la longitud del árbol. De todos los árboles posibles se selecciona el que requiere menor número de cambios (el árbol de menor longitud). La MP emplea criterios de optimización, pues utiliza los caracteres sin realizar ninguna transformación y esto permite reconstruir la evolución de caracteres individuales y de estados ancestrales. Otras ventajas de este método son que construye múltiples árboles (ofrece varias hipótesis), suele ser muy resolutivo cuando comparamos pocas secuencias que no son muy divergentes entre si, y minimiza los fenómenos de homoplasia, seleccionando los árboles con el menor número de

pasos evolutivos (Farris, 1983). Sus principales desventajas son que no utiliza todos los caracteres en el cálculo, es decir, solo estima los sitios variables (fracción informativa); es inexacto cuando existen múltiples sustituciones y es el método más susceptible a los fenómenos de *long-branch attraction* (Felsenstein, 1978). En la práctica uno de sus mayores inconvenientes es el tiempo de cómputo y la potencia de cálculo que necesita.

Una vez que se han obtenido los árboles filogenéticos por uno u otro método, es necesario determinar su grado de fiabilidad. Existen diferentes métodos que permiten obtener un valor estadístico que estima los niveles de confianza de los agrupamientos obtenidos, uno de los más utilizados es el análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985; Hillis y Bull, 1993). Este método se basa en generar un número elevado de pseudo-réplicas de la matriz original de datos. El algoritmo recorta los datos de la matriz por columnas, las cuales son seleccionadas posteriormente al azar para construir una réplica del mismo tamaño que la original. Este proceso se repite entre 100 y 1000 veces. Para cada matriz obtenida se genera un árbol nuevo y finalmente se reconstruye el árbol óptimo. El resultado final, el índice de *bootstrap*, representa la frecuencia de conservación de cada rama en el total de árboles réplicas. Se considera que un valor superior al 75% indica un buen soporte estadístico para la rama.

Indiscutiblemente, los métodos basados en distancia genética y en caracteres conservados han sido los más extendidos para inferir filogenia, pero ninguno de ellos resulta absolutamente ventajoso. Un método puede ser más o menos resolutivo en dependencia del tipo de datos, en consecuencia es esencial conocer los principios básicos de la inferencia filogenética para así escoger el procedimiento más adecuado e interpretar los resultados considerando sus limitantes. En resumen, la inferencia filogenética se basa en un conjunto de modelos matemáticos cimentados en ciertos postulados evolutivos, y se encuentra en continuo perfeccionamiento.

1.2. LOS SORDARIOMYCETES

1.2.1. Caracteres generales

Dentro de los tres *subphyla* en que se divide el *phylum* Ascomycota nuestros estudios se han centrado en el *subphylum* Pezizomycotina, o sea, los ascomicetes miceliares (Euascomycota), y específicamente los pertenecientes a la clase Sordariomycetes (Pyrenomycetes). Los Sordariomycetes son un grupo taxonómico bien definido, tanto a escala morfológica como molecular (Berbee y Taylor, 1992; Eriksson y Winka, 1997, 1998; Spatafora y Blackwell, 1994a; Suh y Blackwell, 1999; Winka, 2000; Tehler y col., 2003; Lutzoni y col., 2004) (Fig.8).

Los teleomorfos de los Sordariomycetes se caracterizan por desarrollar ascomas periteciales o cleistoteciales, con hamatecium que puede presentar paráfisis y perífisis o carecer de ambos. Los ascos tienen una ontogenia himenial, es decir, se forman a partir del himenio (capa fértil donde se producen los ascos a partir de las hifas ascógenas), son unitunicados o prototunicados, y generalmente exhiben un anillo apical (Eriksson y Winka, 1997; Kirk y col., 2001). Los miembros de esta clase pueden seguir diferentes estrategias de reproducción sexual: heterotálicos, homotálicos o pseudohomatálicos. Los anamorfos pueden ser holoblásticos o enteroblásticos.

Los hongos de la clase Sordariomycetes presentan una amplia distribución geográfica y de nichos ecológicos. Pueden ser saprofitos, creciendo sobre madera o restos vegetales, incluyendo material sumergido. Algunos tienen una elevada capacidad celulolítica o lignolítica, otros son coprófilos, fimícolas, necrótrofos o geófilos y otros causan importantes daños en la agricultura como parásitos.

1.2.2. Taxonomía

Los hongos sordariaceos o pirenomicetos agrupan a más de 900 géneros, distribuidos en 47 familias que a su vez están incluidas en 17 órdenes (Eriksson y col., 2004). Sin embargo, en la clasificación de la clase Sordariomycetes aún persisten numerosos problemas taxonómicos, tanto a nivel de orden como de familia, existiendo múltiples taxones cuyas relaciones filogenéticas son inciertas (Eriksson y col., 2004; Lutzoni y col., 2004). En la presente tesis hemos seguido el sistema de clasificación propuesto por Eriksson y col. (2004, 2005), quienes reconocen dentro de los Sordariomycetes tres subclases: Sordariomycetidae, Hypocreomycetidae, y Xylariomycetidae (Tabla 2).

En la taxonomía de este grupo, al igual que en la de otros ascomicetes, la ontogenia del *centrum* así como la estructura de los ascos son caracteres importantes para delimitar órdenes y familias (Spatafora y Blackwell, 1993, 1994b; Réblová y Winka, 2001; Zhang y Blackwell, 2002; Lutzoni y col., 2004).

Estudios moleculares han demostrado que la ontogenia del anamorfo tiene validez taxonómica a nivel supraordinal, especialmente para las subclases Hypocreomycetidae (enteroblásticos) y Xylariomycetidae (holoblásticos) (Spatafora y Blackwell, 1993). Asimismo, los caracteres derivados de la morfología del anamorfo tales como la pigmentación de los conidióforos y su patrón de ramificación pueden indicar relaciones filogenéticas en algunos órdenes (Seifert y Samuels, 2000). Por ejemplo, en los Hypocreales los conidios suelen ser hialinos o poco pigmentados, con una ontogenia fialídica y agrupándose en masas mucosas. En Xylariales por el contrario, los conidios y los conidióforos suelen estar pigmentados, los conidios tienen una ontogenia holoblástica y son solitarios, catenulados o botriosos (Spatafora y Blackwell, 1993; Seifert y Samuels, 2000). No obstante, la utilidad de estos caracteres en otros grupos requiere una cuidadosa interpretación, ya que en Sordariomycetidae (Ej. Sordariales o Diaporthales) los anamorfos suelen ser tanto holoblásticos como enteroblásticos, y a su vez hialinos o pigmentados (Spatafora y Blackwell, 1993).

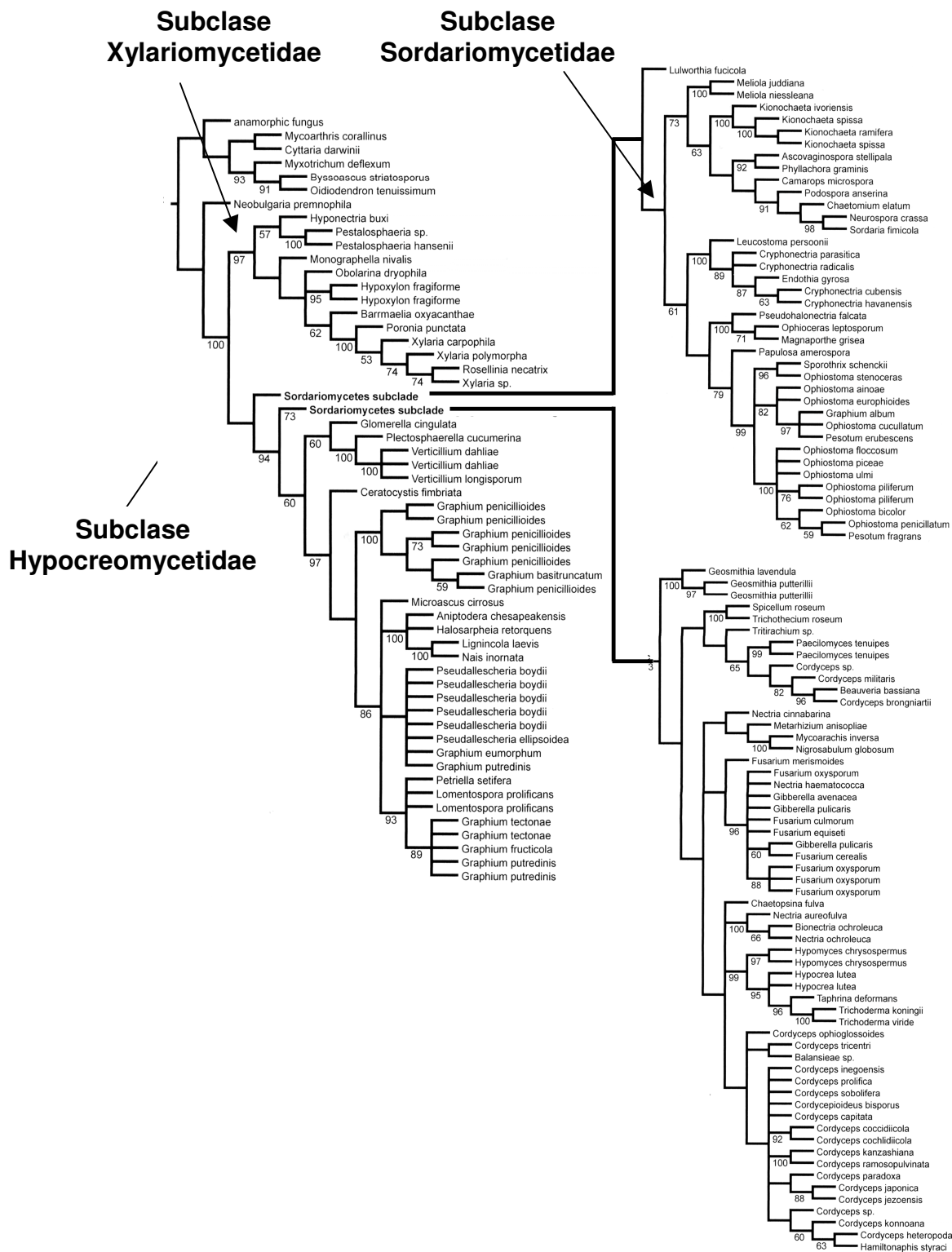


Fig. 8. Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 18S del ARNr, donde se encuentran incorporados los principales representantes de la clase Sordariomycetes (modificado de Tehler y col., 2003).

La morfología de las ascosporas tiene poco valor taxonómico ya que se encuentra especialmente sujeta a la selección natural y ambiental (Hawksworth y Mouchacca, 1994). En cambio, otros caracteres como el número de células, la ornamentación, la presencia de línea o poros germinativos, la ornamentación y presencia de vainas o apéndices mucilaginosos se han considerado útiles para delimitar familias, géneros y especies. Sin embargo, estudios moleculares recientes en Ceratostomataceae, Lasiosphaeriaceae y Sordariaceae han demostrado que la morfología y la ornamentación de las ascosporas no son caracteres filogenéticamente informativos a nivel genérico (Dettman y col., 2001; Zhang y Blackwell, 2002; Huhndorf y col., 2004). Zhang y Blackwell (2001) demostraron que en los géneros *Melanospora* Corda, *Sphaerodes* Clem. (Ceratostomataceae, Hypocreales) y *Syspastospora* P. F. Cannon & D. Hawksw. (Hypocreales) la forma y la estructura del poro germinativo tienen mayor valor filogenético que la ornamentación de las ascosporas. Dettman y col. (2001) demostraron que la ornamentación de las ascosporas en los géneros *Neurospora* y *Gelasinospora* Dowding tiene escaso valor taxonómico.

Recientemente con la introducción de las técnicas moleculares, la taxonomía de muchos grupos se ha clarificado, y con la incorporación de un mayor número de especies en los análisis filogenéticos se han solucionado algunas de las problemáticas que se plantearon en la década de los noventa. Algunos ejemplos son los estudios realizados en las familias Ceratostomataceae y Coniochaetaceae. Spatafora y Blackwell (1994 b) sugirieron la ubicación de *Melanospora* (Ceratostomataceae, Sordariales, Sordariomycetidae) en Hypocreales, pero no fue hasta que Zhang y Blackwell (2002) publicaran un nuevo estudio con un mayor número de especies de este género, que se aceptó su ubicación dentro de la subclase Hypocreomycetidae. La familia Coniochaetaceae fue aceptada dentro del orden Sordariales por numerosos autores (Alexopoulos y col., 1996; Barr, 1990; Checa y col., 1988), hipótesis que fue respaldada por los resultados obtenidos a partir del análisis del gen 18S del ARNr (Lee y Hanlin, 1999). En cambio, Rogers (1994) consideraba a esta familia con una clasificación taxonómica dudosa y aislada del resto de los ascomycetes del orden. Una aproximación más reciente a la problemática de este grupo fue realizada por Weber y col. (2002) y Huhndorf y col.

(2004). Finalmente fue propuesto el orden nuevo Coniochaetales para agrupar a los miembros de la familia Coniochetaceae (Huhndorf y col., 2004).

Sin embargo, algunos de estos grupos aún precisan nuevos estudios. Muestra de ello son las relaciones filogenéticas entre los géneros *Neurospora* y *Gelasinospora* y entre los miembros de la familia Coniochaetaceae.

Tabla 2. Clasificación de la clase Sordariomycetes (Eriksson y col., 2005)

| CLASE SORDARIOMYCETES | | |
|---|---|--|
| SUBCLASE HYPOCREOMYCETIDAE | SUBCLASE SORDARIOMYCETIDAE | SUBCLASE XYLARIOMYCETIDAE |
| <p>Orden Halosphaeriales Kohlm. 1986. Halosphaeriaceae E. Müll. & Arx ex Kohlm. 1972.</p> <p>Orden Coronophorales Nannf. 1932. Bertiaceae Smyk 1981 Chaetosphaerellaceae Huhndorf, A.N. Mill. & F. A. Fern. 2004. Nitschkiaceae (Fitzp.) Nannf. 1932. Scortechiniaceae Huhndorf, A.N. Mill. & F. A. Fern. 2004.</p> <p>Orden Hypocreales Lindau 1897. Bionectriaceae Samuels & Rossmann 1999. Ceratostomataceae G. Winter 1885. Clavicipitaceae (Lindau) Earle ex Rogerson 1971. Hypocreaceae De Not. 1844. Nectriaceae Tul. & C. Tul. 1844. Niessliaceae Kirschst. 1939.</p> <p>Orden Microascales Luttr. ex Benny & Kimbr. 1980. Chadefaudiellaceae Faurel & Schotter ex Benny & Kimbr. 1980. Microascaceae Luttr. ex Malloch 1970.</p> | <p>Orden Boliniales P.F. Cannon 2001. Boliniaceae Rick 1931.</p> <p>Orden Chaetosphaeriales Huhndorf, A.N. Mill. & F.A. Fernández 2003. Chaetosphaeriaceae Réblová, M. E. Barr & Samuels 1999.</p> <p>Orden Coniochaetales Huhndorf, A.N. Mill. & F.A. Fernández 2003. Coniochaetaceae Malloch & Cain 1971.</p> <p>Orden Diaporthales Nannf. 1932. Diaporthaceae Höhn. ex Wehm. 1926. Gnomoniaceae G. Winter 1886. Melanconidaceae G. Winter 1886. Togniniaceae Réblová, L. Mostert, W. Gams & Crous 2004. Valsaceae Tul. & C. Tul. 1861. Vialaeaceae P.F. Cannon 1995.</p> <p>Orden Ophiostomatales Benny & Kimbr. 1980. Kathistaceae Malloch & M. Blackw. 1990. Ophiostomataceae Nannf. 1932.</p> <p>Orden Sordariales Chad. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss. 1986. Chaetomiaceae G. Winter 1885. Lasiosphaeriaceae Nannf. 1932. Sordariaceae G. Winter 1885.</p> <p>Familias inc. sed. Cephalothecaceae Höhn. 1917. Annulatasceae S.W. Wong, K.D. Hyde & E.B.G. Jones 1998. Helminthosphaeriaceae Samuels, Candoussau & Magní 1997. Papulosaceae Winka & O.E. Erikss. 2000.</p> | <p>Orden Xylariales Nannf. 1932. Amphisphaeriaceae G. Winter 1885. Clypeosphaeriaceae G. Winter 1886. Diatrypaeae Nitschke 1869. Graphostromataceae M.E. Barr, J.D. Rogers & Y.M. Ju 1993. Hyponectriaceae Petr. 1923. Xylariaceae Tul. & C. Tul. 1861.</p> |
| <p>CLASE SORDARIOMYCETES, Ordenes inc. sed.</p> <p>Orden Calosphaeriales M.E. Barr 1983. Calosphaeriaceae Munk 1957. Pleurostomataceae Réblová, L. Mostert, W. Gams & Crous 2004.</p> <p>Orden Lulworthiales Kohlm., Spatafora & Volkm-Kohlm. 2000. Lulworthiaceae Kohlm., Spatafora & Volkm-Kohlm. 2000.</p> <p>Orden Meliolales Gäum. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss. 1986. Meliolaceae G.W. Martin ex Hansf. 1946.</p> <p>Orden Phyllachorales M.E. Barr 1983 Phaeochoaraceae K.D. Hyde, P.F. Cannon & M.E. Barr 1997. Phyllachoraceae Theiss. & H. Syd. 1915.</p> <p>Orden Spathulosporales Kohlm. 1973. Spathulosporaceae Kohlm. 1973.</p> <p>Orden Trichosphaeriales M.E. Barr 1983. Trichosphaeriaceae G. Winter 1885</p> | <p>CLASE SORDARIOMYCETES, Familias inc. sed.</p> <p>Apiosporaceae K.D. Hyde, J. Fröhlich, J.E. Taylor & M.E. Barr 1998. Catabotrydaceae Petrak ex M.E. Barr 1990. Magnaporthaceae P.F. Cannon 1994. Obryzaceae Körb. 1855. Thyridiaceae O.E. Erikss. & Yue 1987.</p> | |

1.2.3. Los géneros *Neurospora* y *Gelasinospora*

Los géneros más representativos dentro de la familia Sordariaceae son *Gelasinospora*, *Neurospora* y *Sordaria* Ces. & De Not. (Dettman y col., 2001).

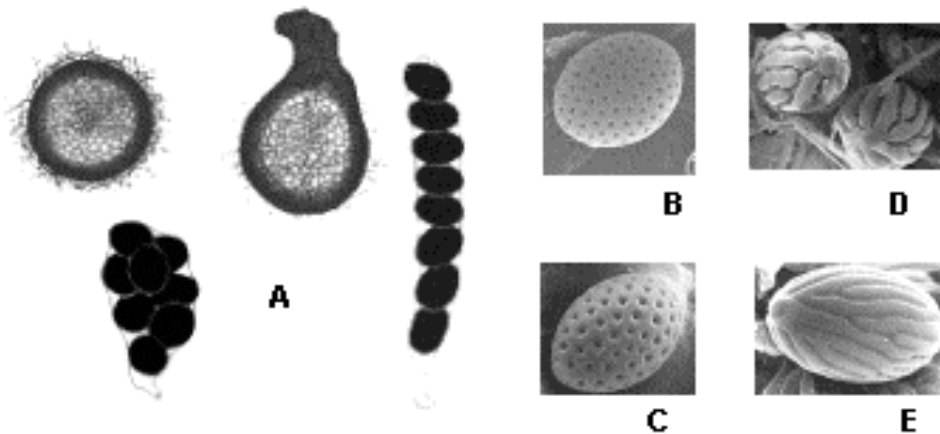


Fig. 9. Características morfológicas de los géneros *Gelasinospora* y *Neurospora*. A, tipos de ascos y ascos. B y C, ascosporas de *Gelasinospora*. B, *G. endodonta*. C, *G. calospora*. D y E, ascosporas de *Neurospora*. D, *N. dodgei*. E, *N. tetrasperma*.

La ornamentación de las ascosporas ha sido considerada de gran valor taxonómico para la familia y en general para el orden Sordariales (Dowding, 1933; von Arx y Gams, 1967; Jeng y Krug, 1976; Hawksworth y Manoharachary, 1978; von Arx, 1982). Los géneros *Gelasinospora* y *Neurospora* se diferencian de *Sordaria* porque esta última presenta esporas con paredes lisas. A su vez, *Gelasinospora* y *Neurospora* difieren entre sí por el tipo de ornamentación que presentan, alveolada y estriada, respectivamente (Fig. 9). Sin embargo, numerosos estudios relativos a la formación de la ornamentación en estos géneros, coincidieron en señalar que en ambos la ornamentación de las ascosporas involucra a las capas intermedias (episporio y perisporio) (Gochenaur y Backus, 1962; Sussman, 1966; Lundquist, 1967; Cailleux, 1971). Fue precisamente Cailleux (1971) el primero en otorgar valor taxonómico a las características del episporio, y definió cuatro tipos en el género *Gelasinospora* (Fig. 10):

Grupo I. El episporio se extiende hacia el interior de la ascospora presentando una apariencia de espinas cónicas.

Grupo II. El episporio es liso.

Grupo III. El episporio es ligeramente ondulado. Es un tipo intermedio entre los grupos II y IV.

Grupo IV. El episporio presenta ondulaciones pronunciadas.

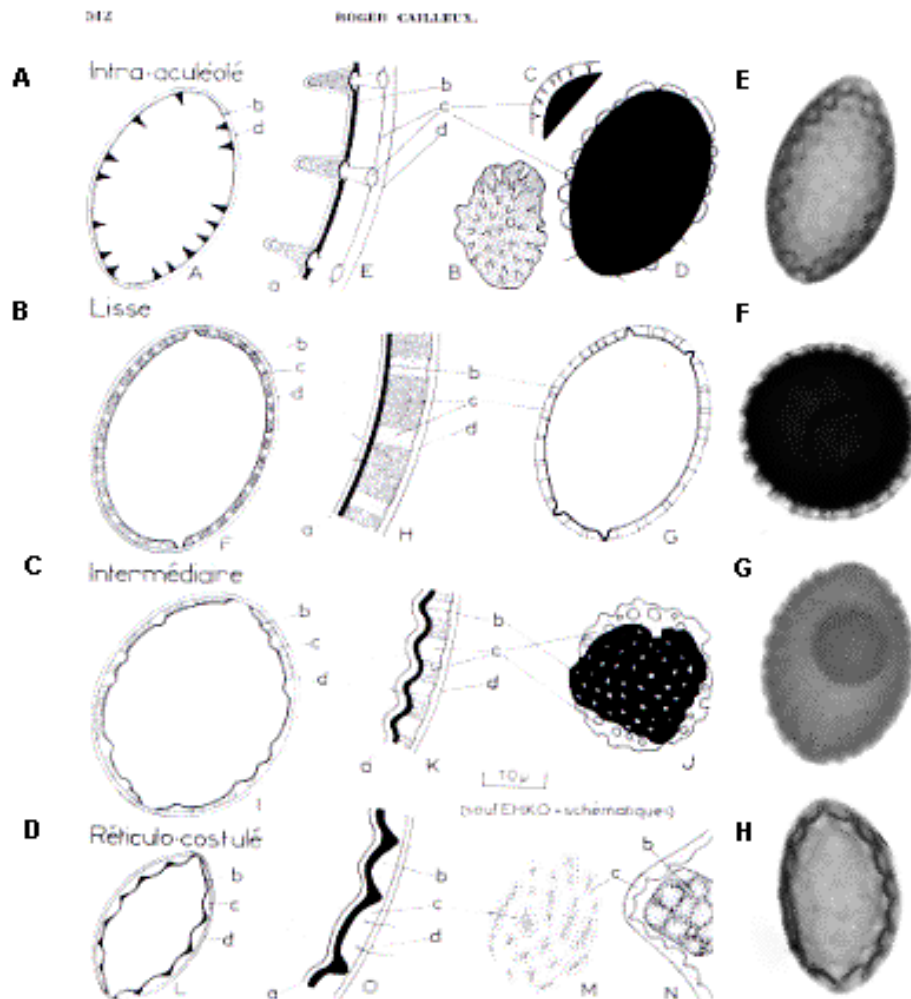


Fig. 10. Esquema propuesto por Cailleux (1971) para la clasificación del género *Gelasinospora* según el tipo de episporio. **A**, G I, episporio endodentado. **B**, G II, episporio liso. **C**, G III, episporio ligeramente ondulado. **D**, G IV, episporio con ondulaciones pronunciadas. (Tomado del original, Cailleux, 1971). **E**, *Gelasinospora endodonta*. **F**, *Gelasinospora stellata*. **G**, *Gelasinospora cerealis*. **H**, *Gelasinospora retispora* (García y col., 2004).

En el género *Neurospora* también se pueden diferenciar dos de los patrones básicos de Cailleux (1971), concretamente episporio liso y episporio ornamentado. Por ejemplo, *Neurospora terricola* Gockenaur & Backus presenta un episporio liso (Gockenaur y Backus, 1962) al igual que las especies descritas por Cailleux (1971) para el Grupo II (Ej. *G. kobi* Cailleux, *G. stellata* Cailleux), mientras que en *Neurospora tetrasperma* Shear & Dodge, esta capa es ornamentada y similar a la que se observa en *Gelasinospora retispora* (Greis & Greis-Dengler) Cain, Grupo IV (Cailleux, 1971) (Fig 11). Además existen especies que muestran un patrón de ornamentación intermedio entre *Neurospora* y *Gelasinospora*, lo que nos indica que la separación entre ambos géneros no es muy clara.



Fig. 11. Esporas de *Neurospora* con diferentes patrones de ornamentación del episporio. A, episporio liso (*Neurospora dodgei*). B, episporio ornamentado (*Neurospora tetrasperma*).

Dettman y col. (2001) estudiaron diferentes especies de *Gelasinospora* y *Neurospora* demostrando que la ornamentación de las ascosporas posee escaso valor filogenético. Sin embargo, las relaciones entre ambos géneros no fueron elucidadas debido al limitado número de especies de *Gelasinospora* que se incluyeron en el análisis (Fig. 12). En consecuencia, se justificaba la realización de un estudio más completo sobre la taxonomía de estos géneros incluyendo un mayor número de especies y evaluando tanto los caracteres morfológicos como las secuencias del ADN.

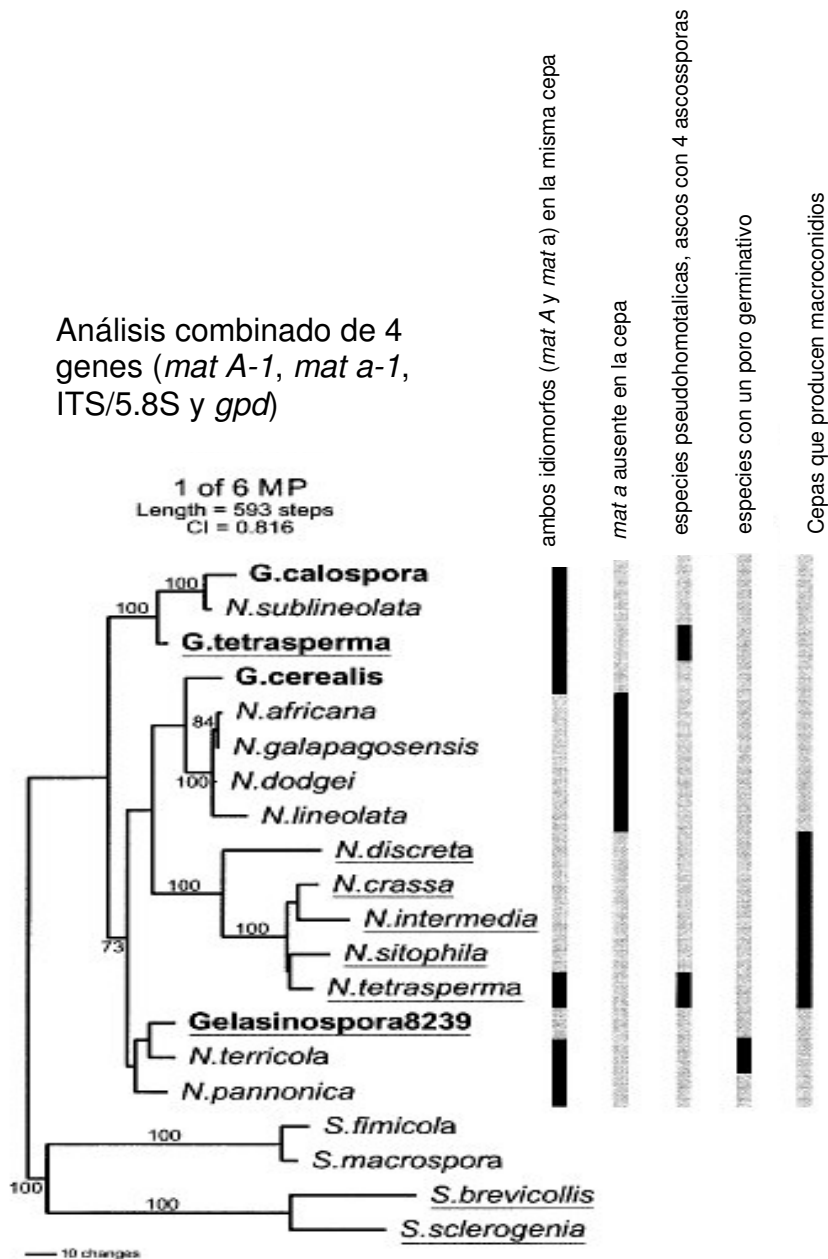


Fig. 12. Filograma producido a partir del análisis combinado de las secuencias de cuatro genes. Algunas características biológicas/morfológicas se representan junto al filograma. Las barras negras indican la presencia de los caracteres que se comparan. Las especies heterotálicas o pseudohomotálicas aparecen subrayadas, y las especies con ornamentación alveolada aparecen en letra negra y no cursiva. (Dettman y col., 2001). *N.*, *Neurospora*; *G.*, *Gelasinospora*; *S.*, *Sordaria*.

El género *Neurospora* es considerado la “*Drosophila*” del reino de los hongos (Kendrick, 1992), pues ha sido utilizado como organismo modelo para múltiples investigaciones. La experimentación con *Neurospora* ha contribuido al desarrollo de los conocimientos en biología celular, genética, sexualidad, en los fenómenos de regulación temporal, y de los movimientos citoplasmáticos de este grupo de organismos. Establecer su relación taxonómica con *Gelasinospora* es imprescindible para poder reevaluar el peso de los caracteres morfológicos en la taxonomía del orden y continuar los estudios sobre la evolución y la sexualidad de los hongos filamentosos en general y de los sordariaceos en particular.

1.2.4. La familia Coniochaetaceae

La familia Coniochaetaceae fue establecida para acomodar los géneros *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke y *Coniochaetidium* Malloch & Cain (Malloch y Cain, 1971). Se caracteriza por presentar ascomas periteciales o cleistoteciales, ascos cilíndricos o claviformes con un anillo apical no amiloide, ascosporas con línea germinativa y anamorfos mayoritariamente fialídicos (Barr, 1990) (Fig.13). Inicialmente la familia Coniochaetaceae fue diferenciada de Xylariaceae Tul & C. Tul (Xylariales, Xylariomycetidae) por la ausencia de tejidos estromáticos (Malloch y Cain, 1971), característica típica de los miembros de la familia Xylariaceae. Asimismo, la ontogenia de los anamorfos ha resultado otra diferencia importante entre ambos taxones, enteroblástica en Coniochaetaceae y hoblástica en Xylariaceae.

Actualmente, además de *Coniochaeta* y *Coniochaetidium*, la familia Coniochaetaceae incluye a los géneros *Barrina* A. W. Ramaley, *Coniolaria* Seigle-Mur., Guiraud, Seteiman & Sage (según Eriksson y Hawksworth, 1998; su publicación no es válida ya que carece de descripción latina), *Ephemeroascus* Emden, *Poroconiochaeta* Udawaga & Furuya y *Synaptospora* Cain.

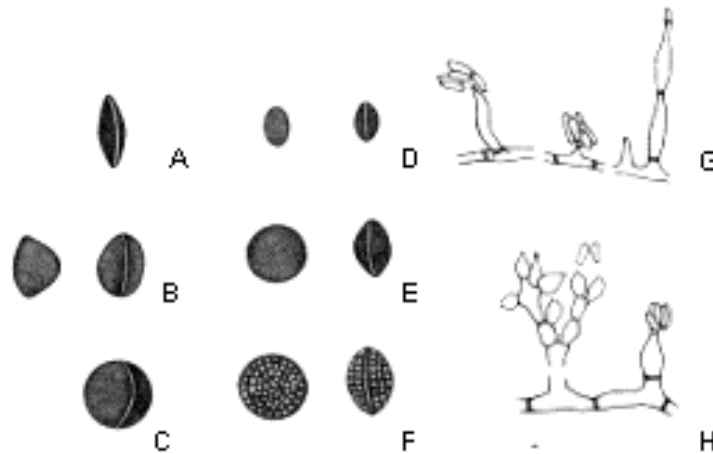


Fig. 13. Ascosporas y anamorfos en *Coniochaetaceae*. A-F, Ascosporas representativas de los géneros *Coniochaeta*, *Coniochaetidium* y *Poroconiochaeta*. A, *Coniochaeta angustispora*. B, *Coniochaeta arxii*. C, *Coniochaeta malacotricha*. D, *Coniochaetidium boothii*. E, *Coniochaetidium ostreum*. F, *Poroconiochaeta discoidea*. G-H, *Lecythophora* spp., anamorfos de *Coniochaeta*. G, *Lecythophora* anamorfo de *Coniochaeta ligniaria*. H, *Lecythophora* anamorfo de *Coniochaeta vetulina*.

El género *Ascotrichella* Valldos. & Guarro es morfológicamente similar a los miembros de esta familia. Carece de estructuras estromáticas, los ascos no son amiloides y las ascosporas presentan línea germinativa. Sin embargo, desarrolla un anamorfo con conidiogénesis holoblástica, similar al género *Humicola* Traaen, por lo que se considera perteneciente a la familia Xylariaceae (Valldosera y Guarro, 1988; Whalley, 1996).

Los géneros incluidos en *Coniochaetaceae* fueron inicialmente delimitados por el tipo de ascoma (ostiolado en *Coniochaeta*, y no ostiolado en *Coniochaetidium* y *Ephemeroascus*) (Malloch y Cain, 1971; van Emden, 1973). La disposición verticilada de las fiálides en el anamorfo de *Ephemeroascus* fue el carácter utilizado para segregar este género de *Coniochaetidium* (van Emden, 1973). Mientras que la ornamentación de las ascosporas se consideró un criterio válido para diferenciar el género *Poroconiochaeta* de *Coniochaeta* (Udagawa y Furuya, 1979). Como hemos expuesto anteriormente, estudios recientes han demostrado que las clasificaciones taxonómicas basadas únicamente en criterios morfológicos no guardan en general, correlación con las relaciones filogenéticas inferidas a partir de las secuencias del ADN (Réblová y Winka, 2000; Réblová y Seifert, 2004). En consecuencia consideramos que la delimitación genérica actual en *Coniochaetaceae* es artificial.

Como hemos referido anteriormente, Coniochaetaceae fue incluida en un orden nuevo, Coniochaetales, (Huhndorf y col., 2004). Sin embargo, aún persisten algunos de los problemas históricamente más discutidos. Estas situaciones confusas están esencialmente relacionadas con la presencia de anamorfos holoblásticos en algunos de los taxones aceptados en Coniochaetaceae (*Coniochaeta nodulisporioides* D. Hawksw., *Coniochaeta emodensis* Udagawa & Y. Horie y *Coniolaria murandii* Seigle-Mur., Guiraud, Seteiman & Sage) (Hawksworth, 1978; Udagawa y Horie, 1982; Seigle-Murandi y col., 1995) (Fig.14).

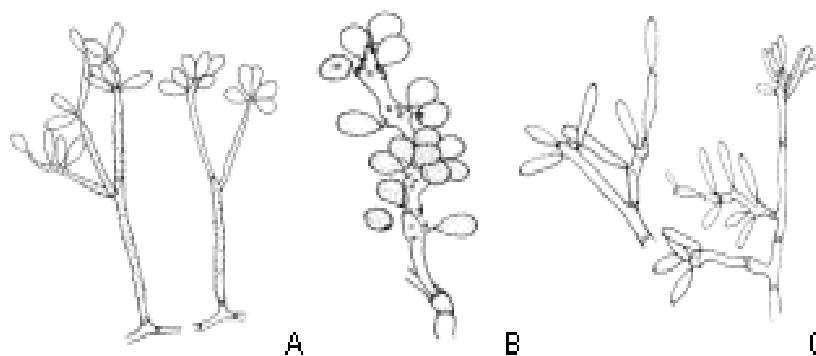


Fig. 14. Anamorfos holoblásticos en Coniochaetaceae. A, tipo *Geniculosporium*, anamorfo de *Coniochaeta emodensis*. B, tipo *Nodulisporium*, anamorfo de *Coniochaeta nodulisporioides*. C, tipo *Dactylaria*, anamorfo de *Coniolaria murandii*.

En este sentido, numerosos autores han sugerido que las especies de *Coniochaeta* con anamorfos tipo *Geniculosporium* o *Nodulisporium* deberían ser excluidas del género [Barr, 1990; Laessøe, 1994; Hawksworth, y Rogers (en: Barr y Cannon, 1994)]. *Coniolaria murandii* fue descrita sobre la base de un aislamiento morfológicamente similar a *Coniochaeta* pero que presentaba un anamorfo tipo *Dactylaria*. Algunos autores teniendo en cuenta las características del anamorfo relacionaron este *taxon* con *C. emodensis* y *C. nodulisporioides* (Eriksson y Hawksworth, 1998; Kirk y col., 2001) sugiriendo que debería crearse un nuevo género que las englobara, y que estaría más relacionado con Xylariaceae que con Coniochaetaceae.

En consecuencia, queda demostrada la necesidad de emprender nuevos estudios en la familia Coniochaetaceae, tanto a niveles morfológicos como moleculares, que nos permitirían delimitar las relaciones filogenéticas entre sus integrantes y definir la posición taxonómica de los taxones con anamorfos holoblásticos.

1.3. LOS ASCOMICETOS DEL SUELO

1.3.1. Introducción

El suelo es uno de los principales reservorios fúngicos y abarca una gran variedad de micro hábitats, lo que propicia que las comunidades de hongos del suelo sean muy diversas. El suelo es un ecosistema dinámico donde las fuentes de materias orgánicas e inorgánicas son transformadas y renovadas continuamente como consecuencia de la actividad biológica de los microorganismos (Ingold y Hudson, 1993; Kendrick, 1992). El suelo está compuesto por minerales, en última instancia, derivados de las rocas y por compuestos químicos orgánicos complejos provenientes de los organismos vivos. Los hongos se desarrollan en los espacios existentes entre las partículas que lo conforman, donde los restos de materia orgánica o las raíces de las plantas son utilizados como sustratos. Las especies fúngicas que se aíslan de este ecosistema se denominan hongos del suelo (Watanabe, 2002). Las especies fúngicas del suelo desempeñan un papel clave en la degradación de restos ligno-celulósicos o quitinosos (exoesqueletos o escamas de animales) que se acumulan en el lecho de los bosques. La actividad metabólica de los hongos propicia la redistribución de los nutrientes, contribuye a la formación del humus, a inmovilizar grandes cantidades de nitrógeno y de este modo a mantener la fertilidad y la propia estructura del suelo (Hawksworth, 1993; Kirk y col., 2001; Watanabe, 2002).

La variabilidad observada entre las poblaciones fúngicas que se desarrollan en diferentes tipos de suelos está condicionada por diferentes factores, entre los que podemos, citar el pH, las propiedades físico-químicas, el contenido de materia orgánica y las plantas que componen el ecosistema (Dix y Webster, 1995; Kirk y col., 2001; Watanabe, 2002). Aunque las características poblacionales están condicionadas por el tipo de suelo, algunos géneros son cosmopolitas y están presentes en muchos de ellos (Ej. *Aspergillus* Link, *Chaetomium* Kunze, *Fusarium* Link, *Gliomastix* Guég., *Gymnoascus* Baran, *Memnoniella* Höhn., *Penicillium* Link, *Stachybotrys* Corda y *Trichoderma* Pers.). Los hongos siguen la distribución de la materia orgánica, por tanto son más numerosos en el lecho y en los horizontes A₀₀ y A₀ (Dix y Webster, 1995). En los suelos agrícolas la diversidad fúngica está reducida, justamente porque la capa vegetal que conforma el lecho, los hongos y los animales que en ella se desarrollan están ausentes. Sin embargo, los suelos cultivados han sido tradicionalmente más estudiados que los suelos de los ecosistemas naturales (Carlile y col., 2001).

En el suelo, los hongos establecen relaciones complejas entre ellos y con el resto de los microorganismos que habitan este ecosistema (bacterias, algas, protozoos, helmintos, artrópodos). Muchos ascomicetes del suelo y sus anamorfos producen compuestos con actividad inhibitoria sobre otros organismos, como los antibióticos, dióxido de carbono, etileno o amonio. Los antibióticos son sustancias derivadas de su metabolismo secundario, y se producen cuando las fuentes de carbono son abundantes pero el crecimiento está limitado por la carencia de otros nutrientes esenciales (Carlile y col., 2001). Muchos de los metabolitos producidos por los hongos son muy tóxicos para el hombre, pero otros han resultado de gran valor terapéutico.

1.3.2. Fenómenos de micostasis y latencia

Las esporas generalmente se forman cuando los nutrientes se agotan, en estas condiciones medio ambientales desfavorables las esporas pueden permanecer en el suelo en estado de latencia (Kendrick, 1992; Carlile y col., 2001). Para los hongos geófilos, el suelo constituye un reservorio de sus esporas latentes (Carlile y col., 2001). La latencia es la fase que usualmente precede a la germinación de las esporas y durante este período no ocurren cambios morfológicos y se mantienen con un metabolismo basal. En *Neurospora*, por ejemplo, las ascosporas latentes tienen tasas de producción de dióxido de carbono y de consumo de oxígeno que representa entre el 1 y 4% del de las células somáticas. El período de latencia depende de varios factores y puede limitarse a unas pocas horas o mantenerse por varios años.

En algunos organismos el período de latencia está controlado principalmente por el ambiente y sus esporas germinan en cuanto las condiciones se hacen favorables. Pueden estar influenciados por cambios en la temperatura, la disponibilidad de nutrientes o la humedad. A este tipo de latencia se le conoce como exógena.

En condiciones naturales, el suelo también puede provocar la inhibición de la germinación de las esporas fúngicas. Este fenómeno se conoce como micostasis, y se produce principalmente por la actividad de algunos microorganismos del suelo (Carlile y col., 2001). En el suelo los azúcares y otras fuentes de carbono son consumidos rápidamente por los microorganismos, lo que provoca el agotamiento de los nutrientes necesarios para la germinación las esporas. Pero además, estos microorganismos pueden producir metabolitos que inhiben la germinación. La micostasis puede ser interpretada como una adaptación ventajosa, ya que retrasa la germinación de las ascosporas hasta que la actividad de los microorganismos del ecosistema sea reducida, o bien hasta que las condiciones nutricionales se restablezcan (Carlile y col., 2001).

La latencia endógena o constitutiva, es consecuencia de la estructura y del metabolismo de la espora. En la latencia constitutiva están involucrados mecanismos de naturaleza diversa,

como la permeabilidad de la pared celular, la producción de inhibidores metabólicos o de auto-inhibidores de la germinación (Kendrick, 1992), y requiere condiciones concretas e inusuales para su interrupción (Carlile y col., 2001). La diferenciación entre latencia exógena y endógena no es clara, y probablemente en muchas esporas ambos mecanismos estén presentes.

La germinación de las esporas implica el inicio de la actividad bioquímica (ausente o reducida al mínimo en los estadios de latencia), el aumento gradual de la tasa metabólica y cambios morfológicos como el aumento de tamaño y la emisión del tubo germinativo. Las circunstancias que condicionan la suspensión de los estados de latencia de las esporas fúngicas varían entre especies, y entre los tipos de esporas que puede producir una misma especie (ascosporas, macro o microconidios y clamidosporas) (Carlile y col., 2001). No obstante existen algunos requerimientos generales que influyen en la germinación de las esporas, como son la presencia de agua o de elevados niveles de humedad, la existencia de oxígeno o dióxido de carbono, y las variaciones de temperatura. Para algunos hongos saprofitos la aparición de nutrientes de bajo peso molecular, y solubles en agua (azúcares, aminoácidos) es indispensable para su germinación. Hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehídos y terpenos producidos por las plantas son capaces de activar la germinación de un gran número de especies fúngicas. Por otra parte, las esporas de las especies coprófilas se activan mediante el paso por el tracto digestivo de los animales herbívoros, donde son expuestas a diferentes sustancias químicas (enzimas y ácidos) y a elevadas temperaturas.

1.3.3. Metodología de estudio

En las últimas décadas, la importancia de los hongos del suelo se ha extendido más allá de su protagonismo en el equilibrio de este ecosistema. Actualmente, el aislamiento y estudio de las especies fúngicas del suelo, es la finalidad de muchos de los programas de investigación a escala industrial para la obtención de metabolitos secundarios biológicamente activos. Los hongos del suelo tienen como ventaja añadida que requieren esfuerzos y gastos mínimos para

su aislamiento, cultivo y conservación. Son precisamente los métodos utilizados para el aislamiento y la obtención de cultivos de especies fúngicas los que condicionan nuestros conocimientos sobre la diversidad de la microbiota del suelo.

En general, las metodologías para obtener especies fúngicas del suelo se dividen en dos grandes grupos, los aislamientos directos y los indirectos. En las técnicas de aislamiento directo, muestras de suelo son transferidas a medios de cultivos más o menos selectivos. Este método produce numerosas colonias fúngicas, y permite recuperar sobre todo, organismos saprofitos. Las técnicas indirectas de aislamiento se basan en “atrapar” a los hongos del suelo con la ayuda de sustratos vivos o inertes. La recuperación de las especies fúngicas se realiza desde este sustrato a partir de sus estructuras reproductivas o del micelio. Al igual que en el método anterior se obtienen en cultivo organismos saprofitos. No obstante, si las especies que se pretenden recuperar solo se desarrollan como parásitos obligados, este procedimiento también puede ser aplicable, pero el tipo de sustrato que se utiliza como “cebo” es especie-específico.

Por último, aunque son técnicas más complejas y difíciles de aplicar, no dejaremos de mencionar los procedimientos de extracción directa. Como su nombre indica, los aislamientos se realizan directamente del suelo, sin que medien cultivos previos o sustratos incorporados en él. Su aplicación se limita a los hongos que poseen hifas, clamidosporas, esporas, o esclerocios fácilmente separables de las partículas del suelo. Este procedimiento se basa en las diferencias de tamaño y de densidad de los propágulos fúngicos para separarlos de las partículas del suelo y de otros microorganismos a través de la centrifugación, la decantación o la flotación en gradientes de densidad (Davet y Rouxel, 2000).

1.3.3.1. Métodos de aislamiento directos.

Dilución seriada y siembra en placa (Rapilly, 1968; Garrett, 1981; Johnson y Curl, 1972). Se realiza una suspensión de la muestra de suelo en agua estéril, posteriormente se efectúan

diluciones seriadas y subsiguientemente un volumen de la dilución final (0.5-1 mL) es depositado sobre medios de cultivo agarizados.

Siembra directa de suelo (Warcup, 1950; Johnson y Curl, 1972; Davet y Rouxel, 2000). Este método consiste en mezclar una pequeña cantidad de la muestra de suelo (5-15 mg), seca y homogenizada, con una alícuota de medio agarizado en estado líquido (37-40 °C). Posteriormente se homogeniza por agitación y se vierte en placas de Petri.

Estos procedimientos tienen el inconveniente de que los hongos asociados a las partículas del suelo de mayor tamaño no pueden ser recuperados, pues precipitan junto con ellas cuando se preparan las suspensiones. Para superar este inconveniente Parkinson y Williams (1961) introdujeron una variación que se basa en el cribado del suelo con el objetivo de separar las partículas y los propágulos según su tamaño. Con todo, estas metodologías desestiman a los hongos de crecimiento lento o que tienen una esporulación pobre. También están competitivamente desfavorecidas aquellas especies que se encuentran en forma miceliar, que no esporulan en el suelo, o que sus ascosporas se encuentran en estado de latencia y por tanto raramente son recuperadas en cultivo.

El estudio de los ascomicetes del suelo recibió un mayor interés cuando Warcup y Baker (1963) describieron dos nuevos métodos de aislamiento basados en la activación de las ascosporas por la acción del calor y del etanol que permitieron recuperar especies hasta entonces inéditas. Otros métodos de aislamiento, que tienen como principio la activación de las ascosporas por la acción de compuestos químicos, fueron propuestos por Furuya y Naito (1979, 1980), fundamentados en los efectos del ácido acético y de los compuestos fenólicos sobre la interrupción de la latencia.

1.3.3.2. Métodos de aislamiento indirecto.

El método indirecto más difundido es el de “cebo o anzuelo” (Payen, 1965; Barnett y col., 1974; Davet y Rouxel, 2000). La técnica está basada en la utilización de un sustrato que estimula el crecimiento de una o varias especies y limita o suprime el crecimiento de sus

competidores. Por tanto, el éxito de la técnica radica en la elección del sustrato adecuado (vivo o inerte, y su grado de selectividad). Los sustratos utilizados como cebos son muy variados así como las técnicas empleadas, las cuales están en función de las características biológicas de los hongos.

Payen (1965) y Davet y Rouxel (2000) reconocen tres categorías generales para agrupar los cebos que se aplican en esta técnica:

- 1.- inertes (papel, madera, pelos, uñas, escamas o exoesqueletos de insectos, etc.)
- 2.- partes de plantas, vivas o muertas (hojas, porciones de tallos o de raíces, semillas, pétalos de flores, frutos, etc.)
- 3.- plantas o plántulas enteras

Para hacer que los cebos sean más específicos y sensibles suelen sumergirse en agentes antimicrobianos o en sustancias químicas. Además, para los cebos orgánicos, pueden realizarse esterilizaciones (de semillas o de partes de plantas, etc.) y posteriormente someterlos a tratamientos enriquecedores en soluciones nutritivas combinadas con antibióticos que elevan su selectividad (Davet y Rouxel, 2000).

1.3.4. Importancia del estudio y de la conservación de los hongos del suelo

Los hongos causan inmensas pérdidas económicas debido a su elevada capacidad saprofitica, provocando biodeterioro y enfermedades de postcosecha. Como parásitos son aún más devastadores, ya que provocan numerosas enfermedades en plantas, animales y en el hombre. Sin embargo, los hongos comestibles han sido explotados por el hombre durante milenios, y otros han sido continuamente empleados en la elaboración de alimentos y de diferentes tipos de bebidas. Los productos que se obtienen a partir de la actividad fúngica se han incrementado notablemente como consecuencia del desarrollo de la industria fermentativa. Los antibióticos representan la aplicación más extendida de los metabolitos secundarios producidos por los hongos, y su comercialización por las grandes compañías farmacéuticas

genera cuantiosas ganancias que exceden los 13 billones de dólares anuales (Tabla 3). Los hongos o sus metabolitos se emplean hoy en día en la industria alimenticia y cosmética (coloración y aromatización de numerosos productos) y en la obtención de enzimas con un amplio espectro de aplicaciones (celulasas, glucoamilasas, pectinasas, lactasas, proteasas, etc.). En la agricultura son aplicados como bioinsecticidas y agentes para el control biológico (Tabla 4). La síntesis de vitaminas, de antibióticos de nueva generación y de numerosos fármacos de origen fúngico son de extendido uso en medicina (Tabla 5).

Tabla 3. Ganancias económicas resultantes de las ventas de fármacos derivados de metabolitos fúngicos (EE.UU., año 1998) (Carlile y col., 2001)

| Productos | Valor [billones (10 ⁹) de dólares] |
|--|--|
| Penicilinas, cefalosporinas, amoxicilina-ácido clavulanico | 13.6 |
| Estatinas | 7.5 |
| Ciclosporinas | 1.2 |

Una retrospectiva realizada por Wildman (1997), basada en los resultados publicados por la revista *Journal of Antibiotics*, constituye un ejemplo claro del creciente interés en el estudio y en la aplicación de los metabolitos producidos por los hongos. Su estudio demuestra que en los últimos 20 años los compuestos obtenidos a partir de los hongos se incrementaron en un 77%, y añade que la mayor parte de las especies fúngicas productoras de nuevos metabolitos fueron aisladas del suelo.

Según Fox (1993), el 25% de los fármacos que se prescriben provienen de especies vegetales, pero para entender el alcance que pueden tener los hongos en este campo, tomemos como punto de partida dos de las hipótesis más difundidas sobre la diversidad de las especies fúngicas (Hawksworth, 1991; Hyde y Hawksworth, 1997):

- 1º. Los hongos se encuentran en una proporción 6:1 con respecto a las plantas vasculares
- 2º. Solamente se han descrito el 5% de las especies que se estima que existen para el reino de los hongos

Podemos entonces especular sobre las múltiples posibilidades que nos quedan por descubrir en el campo de la aplicación de los hongos y de sus metabolitos secundarios, y he aquí uno de los principales incentivos para acometer el estudio de los hongos del suelo. El primer paso en la investigación de sustancias biológicamente activas o de organismos útiles para el control biológico es la recolecta amplia de organismos su identificación y su conservación. La identificación de los hongos tiene además gran importancia práctica en fitopatología, micología médica y veterinaria y en la biotecnología. La conservación a través de cultivos puros, es necesaria para el estudio y la aplicación de sus metabolitos secundarios, para conocer los rasgos de variabilidad dentro de las especies de importancia clínica y fitopatológica, para entender los fenómenos de resistencia, y para diseñar nuevos métodos para su control.

Tabla 4. Algunos ejemplos de hongos ascomicetos (anamorfos o teleomorfos) utilizados en la agricultura para el biocontrol de plagas y enfermedades (Kendrick, 1992).

| Especies aplicadas en el biocontrol | Organismo diana |
|---|--|
| <i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire | <i>Alternaria zinniae</i> H. Pape (manchas foliares) |
| <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. | <i>Leptinotarsa</i> sp. (escarabajo de la patata, coleóptero) |
| | <i>Carpocapsa</i> sp. (polillas, lepidoptero) |
| | <i>Blissus leucopterus</i> (chinche de la raíz del arroz, chinche de los pastos, hemíptero) |
| <i>Chaetomium globosum</i> Kunze | <i>Fusarium roseum</i> Link (podredumbre en semilleros de maíz) |
| <i>Cladobotryum amazonense</i> C.N. Bastos, H.C. Evans & Samson | <i>Crinipellis pernicioso</i> (Stahel) Singer (enfermedad "escoba de bruja" del cacao) |
| <i>Fusarium roseum</i> Link | <i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul. (ergot: enfermedad "cornezuelo del centeno", gramíneas) |
| <i>Gliocladium roseum</i> Bainier | <i>Botrytis cinerea</i> Pers. (moho o podredumbre gris de las fresas) |
| <i>Hirsutella thompsonii</i> F.E. Fisher | <i>Phyllocoptruta</i> sp. (ácaro del cítrico) |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokĭn | <i>Cercopidae</i> sp (larvas chupadoras en caña de azúcar y pastos) |
| | <i>Anopheles</i> sp., <i>Aedes</i> sp., <i>Culex</i> sp. (mosquitos) |
| <i>Nomuraea rileyi</i> (Farl.) Samson | (varias especies de lepidópteros) |
| <i>Phialophora radicola</i> Cain | <i>Gaeumannomyces graminis</i> (Sacc.) Arx & D.L. Olivier (podredumbre de la raíz del trigo) |
| <i>Talaromyces flavus</i> (Klöcker) Stolk & Samson | <i>Verticillium dahliae</i> Kleb. (marchitez de la berenjena) |
| <i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier | <i>Pythium</i> spp. (<i>damping-off</i> en semilleros) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai | <i>Sclerotium rolfsii</i> (Welch) Boerema & Hamers (podredumbre del tallo en cacahuetes) |
| <i>Trichoderma viride</i> Pers. | <i>Rhizoctonia solani</i> (Welch) Boerema & Hamers |
| | <i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm. |
| | <i>Stereum purpureum</i> Pers. |
| | <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref. |
| | (<i>damping-off</i> , podredumbre de raíces, etc. en numerosos cultivos) |

Tabla 5. Algunos ejemplos de la aplicación en medicina de los metabolitos secundarios producidos por los hongos (Kendrick, 1992; Wildman, 1997; Carlile y col, 2001).

| Compuestos | Hongos que se utilizan en su producción | Aplicación |
|--|---|--|
| Ácido fusídico | <i>Fusidium coccineum</i> Fuckel | Antibiótico (bacterias Gram-positivas) |
| Alcaloides de la ergotamina: ergometrina metil-ergometrina dihydroergotamina bromocriptina | <i>Claviceps fusiformis</i> Loveless <i>Claviceps paspali</i> F. Stevens & J.G. Hall <i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul. | Vasoconstrictores: estimulantes de la musculatura lisa del útero tratamiento de la migraña Supresor de la prolactina |
| Cefalosporinas | <i>Cephalosporium acremonium</i> Corda | Antibiótico (bacterias grampositivas y gramnegativas) |
| Ciclosporinas (A-Z) | <i>Tolypocladium</i> spp. <i>Beauveria</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Neocosmospora</i> sp. <i>Stachybotrys</i> sp. | Inmunosupresores |
| Fumagilina | <i>Aspergillus</i> spp. | Antibiótico (protozoos) |
| Griseofulvina | <i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx | Antibiótico (dermatofitos) |
| Lovastatina | <i>Monascus ruber</i> Tiegh. <i>Aspergillus terreus</i> Thom | Hipolipemiente |
| Antidiabéticos orales | <i>Pseudomassaria</i> sp. | Tratamiento de la diabetes |
| Mevastatina | <i>Penicillium citrinum</i> Sopp | Hipolipemiente |
| Penicilina G | <i>Penicillium notatum</i> Westling | Antibiótico |
| Penicilina V | <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom | Antibiótico |
| Sordarina | <i>Sordaria araneosa</i> Cain | Antibiótico (antifúngico) |

Debido a la rápida destrucción de los ecosistemas, muchas especies se encuentran amenazadas de extinción, lo que implica la pérdida de todos sus potenciales beneficios. Un paso importante para concienciar sobre la necesidad de preservar los ecosistemas terrestres consiste en promover el descubrimiento, la caracterización, y el empleo de los hongos del suelo (Rossman y col., 1998).

II OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO

La amplia gama de potencialidades biológicas de los hongos ha incrementado el interés de estos organismos para la medicina, la veterinaria, la fitopatología, la industria química y la farmacéutica. Su aplicación por las grandes compañías se ha traducido en notables rendimientos económicos. Tan solo por citar un ejemplo, en los EE.UU., las ganancias anuales obtenidas a partir de la aplicación industrial de los hongos exceden los 32 billones de dólares. En consecuencia, las últimas décadas han estado marcadas por un creciente interés en el estudio de estos organismos.

Además de sus aplicaciones, los ascomicetos filamentosos constituyen el grupo de mayor importancia en investigación básica. Al ser organismos eucariotas poseen una estructura génica y una organización metabólica similar a la de las plantas y los animales. Estas características, unidas al hecho de que son fácilmente manipulables, han convertido a los hongos filamentosos en modelos para estudiar los aspectos básicos de la regulación celular. Los estudios basados en el género *Neurospora* merecieron un Premio Nobel en Fisiología y Medicina (año 1958), los cuales abrieron un nuevo campo de investigación, la bioquímica génica.

Hasta el presente, los hongos anamórficos han sido los más estudiados, la mayoría de ellos están ubicados en la *phylum* Ascomycota (Hanlin, 1993). Sin embargo, los teleomorfos han sido escasamente investigados y esto es debido a que solamente un 10 % de los géneros han podido ser aislados en cultivo (von Arx, 1981). La principal dificultad para su aislamiento radica en que es necesario interrumpir el estadio de latencia constitutiva de sus ascosporas. El número de hongos descritos hasta el momento se cifra en aproximadamente 250000 especies, el 75% de las cuales son ascomicetos (Nelson y col., 2001). Las estimaciones señalan, sin embargo, que el número de especies de este grupo que quedan por descubrir excede las 669000 (Hawksworth y Mouchacca, 1994).

La taxonomía de los ascomicetos, hasta hace unos pocos años, estaba basada exclusivamente en criterios morfológicos. En la actualidad disponemos de métodos más objetivos, entre ellos la inferencia de las relaciones filogenéticas a partir de secuencias del ADN ribosómico. Estos métodos han permitido rediseñar la taxonomía, y proponer sistemas de

clasificación más naturales. Sin embargo, aún quedan numerosas interrogantes por responder. Dentro de la subclase Sordariomycetidae, dos familias, Sordariaceae y Coniochaetaceae, presentan problemas taxonómicos pendientes de resolución.

En Sordariaceae encontramos uno de los géneros más significativos, *Neurospora*. Este género está siendo estudiado desde hace más de 60 años y sobre *Neurospora* se han publicado más de 5000 artículos en los últimos 30 años. Sin embargo, su circunscripción genérica aún no ha sido elucidada. Esto es debido a que los criterios morfológicos utilizados para su delimitación con *Gelasinospora* han resultado de poco valor filogenético.

Las relaciones filogenéticas de la familia Coniochaetaceae con los miembros de la subclase Sordariomycetidae fueron resueltas recientemente. Sin embargo, varias problemáticas taxonómicas dentro la familia y dentro del género *Coniochaeta* continúan sin ser dilucidadas.

En nuestro trabajo nos propusimos tres objetivos principales:

- ✓ Contribuir al conocimiento taxonómico de los miembros de la clase Sordariomycetes, utilizando técnicas morfológicas y moleculares.
 - Utilizar diferentes técnicas de aislamiento de hongos del suelo y de activación de ascosporas latentes.
 - Estudiar cepas de referencias procedentes de diferentes colecciones de cultivos puros representativas de los diferentes grupos taxonómicos de la clase.

- ✓ Determinar las relaciones filogenéticas entre los géneros *Gelasinospora* y *Neurospora*.

- ✓ Determinar la filogenia molecular de la familia Coniochaetaceae.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICAS DE CAMPO

3.1.1. Origen de las muestras

Las muestras de suelo se recolectaron durante diferentes campañas llevadas a cabo por el personal de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universidad Rovira i Virgili). Las recolectas se realizaron, por lo general, en países de clima tropical o subtropical (Argentina, Australia, Cuba, India, México, Nepal, Nigeria, Perú, Venezuela, y Tailandia), y se seleccionaron como zonas fitogeográficas de interés los bosques lluviosos, reportados como las áreas geográficas de mayor biodiversidad del planeta (Hawksworth, 1993). También se incluyeron en el estudio regiones de clima templado (Chile y España), semiárido continental (India y Nepal) y continental frío (Noruega y Rusia). El período de recolección abarcó desde 1995 hasta 2002.

3.1.2. Muestreo y conservación de las muestras

La recolección de las muestras se realizó tomando, aproximadamente, 50-100 g de suelo proveniente de la capa más superficial del suelo, libre de materia orgánica firme (estratos u horizontes A-A₀, 1cm de profundidad). Las muestras eran colocadas en bolsas de polietileno estériles. Una vez en el laboratorio, las muestras se conservaban en cámara fría a 4-7 °C hasta su estudio.

3.2. TÉCNICAS DE LABORATORIO

3.2.1. Método de aislamiento mediante la activación de las ascosporas presentes en el suelo.

3.2.1.1. Activación mediante la acción del fenol.

Aproximadamente, 1-2 g de suelo eran introducidos asépticamente en un tubo de ensayo de 10 mL, al cual se le agregó fenol al 2% (p/v) (Phenol crystal, Panreac, Barcelona, España). La muestra era homogenizada manualmente por agitación. Pasados 10 min de incubación, el sobrenadante era eliminado por decantación y el residuo sólido era resuspendido en 10 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se procedía a una nueva homogeneización y su contenido se dispensaba en 6 placas de Petri (1.6 mL/placa, aproximadamente). A cada placa se le adicionaban entre 10-15 mL de agar-patata-zanahoria (PCA, ver acápite 3.2.5.1.) fundido (40-45 °C) con cloranfenicol y dieldrín (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinhe, Alemania) para prevenir el desarrollo de bacterias y ácaros, respectivamente. Para homogenizar el contenido de las placas éstas eran agitadas con movimientos circulares y se dejaban solidificar a temperatura ambiente. Las muestras así procesadas eran incubadas a 15 °C, temperatura ambiente (22-25 °C) y 30 °C. Fueron utilizadas dos placas para cada temperatura.

3.2.1.2. Activación mediante la acción del etanol

Aproximadamente 1-2 g de suelo eran introducidos asépticamente dentro de un tubo de ensayo de 15-20 mL al que se le adicionaban 5 mL de solución de etanol al 60 ó 70% v/v. Pasados 10 min de incubación, el sobrenadante era eliminado por decantación y el residuo sólido era resuspendido en 10 mL de agua destilada estéril. A partir de este paso se procedía de igual forma que en la técnica de activación por fenol.

3.2.1.3. Modificación del método de Furuya y Naito (1979).

Alrededor de 1-2 g de suelo eran colocados en un tubo de ensayo de 10 mL, se les adicionaban 5 mL de solución de ácido acético al 5% v/v, se agitaban vigorosamente durante 1 min, y se incubaban durante otros 9 minutos. El sobrenadante era eliminado por decantación y el residuo sólido era resuspendido en 10 mL de agua destilada estéril. Luego se procedía de igual forma que en la técnica de activación por fenol.

3.2.2. Método de aislamiento mediante la técnica de “cebo o anzuelo”

(Payen, 1965; Barnett y col., 1974; Davet y Rouxel, 2000).

Las muestras de suelo eran colocadas en placas de Petri estériles, de manera que el suelo ocupara la mitad del volumen de la misma (aproximadamente 100 g de suelo). Como cebo se utilizaban pequeñas piezas de madera estéril (3-4 x 2 x 0.5 cm) obtenidas a partir de depresores linguales de uso médico (Depresores esterilizados, Betik S.A. Gipuzkoa, España), que se colocaban sobre la superficie de la muestra o parcialmente hundidas en ella. El suelo era humedecido con agua destilada estéril, repitiendo esta operación semanalmente para evitar el desecamiento de las muestras. Las placas eran incubadas a temperatura ambiente (22-25 °C), en condiciones de alternancia de luz-oscuridad.

3.2.3. Examen de las muestras. Aislamiento y obtención de cultivos puros.

Las colonias de hongos que se desarrollaban eran examinadas mediante un microscopio estereoscópico Carl Zeiss. Los ascomas eran extraídos mediante agujas hipodérmicas estériles, y eran depositados sobre una gota de agua destilada estéril, lactofenol o lactofenol

azul de algodón previamente colocada sobre un portaobjetos. Si la observación de las estructuras fúngicas (ascomas, ascos, ascosporas) confirmaba la presencia de un espécimen interesante procedíamos a su aislamiento.

Con una aguja hipodérmica estéril se recogían las ascosporas liberadas del ascoma y se inoculaban en placas de Petri de 5 cm de diámetro las que contenían diferentes medios de cultivo (ver acápite 3.2.5.1.): agua-agar (AA), agar-avena (OA), o agar-patata-zanahoria (PCA). Las placas eran rotuladas e incubadas a la misma temperatura que la placa a partir de la cual fue recuperado el espécimen. Si la especie en cuestión no presentaba ascosporas libres se procedía a la siembra directa de los ascomas previa descontaminación. La descontaminación era realizada por inmersión en una solución 1% de hipoclorito de sodio (NaClO) durante diferentes períodos de tiempo (1, 2 ó 5 min), posteriormente se sembraban en los medios de cultivos ya citados y en las mismas condiciones de incubación que la placa original.

Para estudiar las características morfológicas y culturales, los cultivos puros de las especies interesantes eran transferidos a placas de Petri de 10 cm de diámetro con diferentes medios de cultivo (agar extracto de malta-MEA-, OA, y PCA). La incubación se realizaba a diferentes temperaturas (generalmente a 15, 22-25, 35-37 °C, excepcionalmente a 40-42 ó 45-47 °C) con períodos de 12 h de alternancia luz-oscuridad.

3.2.4. Identificación de los ascomicetos aislados en cultivo puro.

Los taxones obtenidos en cultivos puros eran identificados de acuerdo con los criterios establecidos para cada género mediante el estudio de las características de la colonia y la morfología microscópica de sus estructuras somáticas y reproductivas.

1. Características de la colonia (por lo general, a los 14 días de incubación)

Las colonias eran examinadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se consideraban las siguientes características:

- ④ Diámetro de la colonia
- ④ Color de la superficie y del reverso (Kornerup y Wanscher, 1984)
- ④ Textura
- ④ Topografía
- ④ Bordes
- ④ Zonas de crecimiento
- ④ Presencia de pigmentos hidrosolubles
- ④ Presencia de exudados
- ④ Presencia de ascomas fértiles
- ④ Localización de los ascomas en la colonia

Las colonias eran descritas según los caracteres culturales observados a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Para el resto de las temperaturas ensayadas se anotaba su tasa de crecimiento y de maduración (formación de ascomas fértiles).

2. Morfología microscópica.

Las descripciones microscópicas incluían las siguientes estructuras y sus características:

- ④ Hifas: color, forma, diámetro y presencia de septos.
- ④ Ascomas: tipo, color, forma y tamaño; presencia de pelos (setas) peridiales, su color, forma, ornamentación y tamaño; grosor, número de capas y textura del

peridio; color, forma, tamaño y ornamentación de las células peridiales; presencia de paráfisis y perífisis, su forma, color, presencia o no de ramificaciones y disposición de los septos.

④ Ascos: número de ascosporas, forma y tamaño, tipo de pared (evanescente o persistente), presencia de estructuras apicales y su afinidad por determinados colorantes (amiloides, no amiloides o dextrinoides), presencia y tamaño del estípite.

④ Ascosporas: disposición dentro de los ascos, presencia y número de septos, forma, tamaño y color, tipo de ornamentación de la pared, número y posición de los poros o surcos germinales; presencia de capa o vaina mucilaginosa; presencia, disposición, forma y tamaño de apéndices mucilaginosos.

④ Anamorfo: presencia, tipo, color, forma, ornamentación y tamaño de los conidióforos; tipo, color, forma, ornamentación y tamaño de las células conidiógenas; tipo de conidiogénesis; color, forma, ornamentación, disposición, número de células y tamaño de los conidios.

④ Clamidosporas: presencia, color, forma, ornamentación, disposición y tamaño.

3.2.5. Medios de cultivo y medios de montaje utilizados

3.2.5.1. Medios de cultivo

④ Agar harina de avena (OA) (Kirk y col., 2001)

Harina de avena..... 30 g

Agar Difco..... 20 g

Agua destilada..... 1000 mL

Se colocaba en un recipiente apropiado la harina de avena y 500 mL de agua destilada y se calentaba hasta ebullición durante una hora. Posteriormente se filtraba el caldo a través de una gasa estéril desechando el residuo sólido, se adicionaban 20 g de agar previamente disuelto en 500 mL de agua y se agregaba más agua hasta completar 1000 mL. Se dispensaba en frascos de vidrio que se esterilizaban durante 20 min a 121 °C.

☉ Agar patata-zanahoria (PCA) (Kirk y col., 2001)

| | |
|---------------------|---------|
| Patatas..... | 20 g |
| Zanahoria..... | 20 g |
| Agar Difco..... | 20 g |
| Agua destilada..... | 1000 mL |

Las patatas y las zanahorias se cortaban en porciones, se colocaban en un recipiente apropiado con 500 mL de agua, se llevaban a ebullición manteniéndola durante una hora. Posteriormente se filtraba el caldo a través de una gasa desechando el residuo sólido, se le adicionaban 20 g de agar previamente disuelto en 500 mL de agua y se agregaba más agua hasta completar 1000 mL. Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaban durante 20 min a 121 °C.

☉ Agar extracto de malta (MEA) (Kirk y col., 2001)

| | |
|------------------------|---------|
| Extracto de malta..... | 20.0 g |
| Agar Difco..... | 20.0 g |
| Agua destilada..... | 1000 mL |

Los componentes eran mezclados y dispensados en frascos apropiados, se esterilizaban durante 20 min a 121 °C.

☉ Agar, agua y celulosa (AA+C)

| | |
|---------------|--------|
| Celulosa..... | 15.0 g |
|---------------|--------|

Agar Difco..... 20.0 g

Agua destilada..... 1000 mL

Los componentes eran mezclados y dispensados en frascos apropiados, se esterilizaban durante 20 min a 121 °C.

3.2.5.2. Medios de montaje

☉ Lactofenol (Barnett y col., 1974)

Ácido láctico..... 20 g

Fenol..... 20 g

Glicerol..... 40 g

Agua destilada..... 20 mL

☉ Lactofenol-azul de algodón (Barnett y col., 1974)

Ácido láctico..... 20 g

Fenol..... 20 g

Glicerol..... 40 g

Agua destilada..... 20 mL

Azul de algodón..... 0.05-0.10 g

☉ Reactivo de Melzer (Barnett y col., 1974)

Hidrato de cloral..... 100 g

KI..... 5 g

I₂..... 1.5 g

Agua destilada..... 100 mL

Para observar la ornamentación del episporio, las ascosporas se colocaban con ayuda de una aguja hipodérmica en una gota de hipoclorito de sodio concentrado depositada sobre un

portaobjetos. Pasados 5 min se colocaba el cubreobjetos y se observaban las características de esta capa de las esporas (Cailleux, 1971).

3.2.6. Conservación de las cepas

3.2.6.1. Conservación en tubos con medio de cultivo inclinado (“agar en pico de flauta”)

El medio de cultivo estéril y licuado (por lo general OA ó PCA) era introducido asépticamente en tubos de polietileno estériles con tapa del mismo material. Antes de dejar solidificar el medio a temperatura ambiente, los tubos eran inclinados para obtener un “pico de flauta”. Una vez solidificado, y pasado el control de esterilidad, se inoculaban las cepas. Se incubaban a temperatura óptima durante el período de tiempo necesario para la formación de ascomas maduros. Posteriormente, se almacenaban en cámara frigorífica a 4 °C. Se realizaban siembras periódicas (usualmente cada 3 meses). Para garantizar la conservación durante períodos más prolongados, se cubría totalmente el cultivo con aceite de vaselina o parafina líquida estéril.

3.2.6.2. Conservación en agua

Las cepas de interés se sembraban en un medio de cultivo adecuado para la producción de ascomas. Se incubaban en condiciones óptimas. Las colonias obtenidas sobre el medio agarizado se cortaban con hojas de bisturí estériles formando cubos de agar de unos 10 mm de lado. Éstos se introducían de forma aséptica en viales de cristal con agua destilada estéril, se cerraban herméticamente (con tapa de rosca o tapón de caucho sintético) y se almacenaban a temperatura ambiente.

3.2.6.3. Conservación de cultivos secos

Los cultivos destinados a la micoteca se desecaban en una estufa de secado a 45-55 °C, y se almacenaban en sobres de papel encerado, con todos los datos de referencia convenientemente anotados. Los holotipos eran remitidos para su depósito al *International Mycological Institute* (IMI, CABI), Egham, Gran Bretaña. Los isotipos eran depositados en la colección de cultivos puros de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (FMR), Reus, España.

3.2.6.4. Preservación de los cultivos vivos

Los cultivos vivos de los taxones nuevos o interesantes fueron depositados en las siguientes colecciones:

- Biological Resource Center (**NBRC**), Chiba, Japón
- Centraalbureau voor Schimmelcultures (**CBS**), Utrecht, Holanda
- Colección de cultivos de la Facultad de Medicina de Reus (**FMR**), Tarragona, España
- International Mycological Institute (**IMI**, CABI), Egham, Gran Bretaña
- University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (**UAMH**), Alberta, Canadá

3.2.7. Estudios microscópicos

3.2.7.1. Microscopía óptica

Para el estudio morfológico se utilizaron los siguientes microscopios:

- Leitz Dialux 20 EB con contraste de fases
- Olympus CH 2
- Olympus BH2 con contrastes de fases e interferencia de Nomarski

Para realizar las ilustraciones se utilizó una cámara clara Olympus acoplada a un microscopio Olympus BH2, empleando los oculares Olympus NFK 6.7 X LD y Leitz Wetzlar Periplan GF 25 X M. Para los dibujos en tinta se empleó papel vegetal DIN A4, rotuladores Staedtler Marsmatic con punto de 0.1 y 0.2 mm de diámetro, tinta china negra Rotring GMBH, plantillas de dibujo Faber-Castell 972 A, B, y C, y compás Forcel. Para realizar las microfotografías se utilizó una cámara digital Olympus DP10 acoplada a un microscopio Leitz Dialux 20, el sistema de captación de imágenes y procesamiento de las mismas es el del programa Soft Imaging System GMBH (Alemania)

3.2.7.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM) fueron procesadas según el método de Figueras y Guarro (1988 a, b), el cual incluye las siguientes fases:

④ Fijación

Mediante el empleo de la lupa estereoscópica se seleccionaban las áreas de las colonias con desarrollo óptimo y se cortaban dichas zonas utilizando una hoja de bisturí estéril. Las muestras eran sumergidas en una solución fijadora de 2-glutaraldehído 2% v/v en tampón fosfato de concentración 0.1 M y pH 7.3-7.4 (Sabatini y col., 1963), dispensada en viales de cristal. Para evitar que las muestras flotaran libremente y para aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el fijador, se agregaban unas gotas de Tween 80 (Carrol y Carrol, 1973). Los viales se colocaban dentro de un desecador y eran sometidos a la acción del vacío generado por una bomba acoplada durante 1 hora (Campbell, 1972; Hanlin, 1982; Rosing, 1982). Transcurrido este tiempo

las muestras eran separadas del fijador por decantación cuidadosa y lavadas durante 15 minutos con solución de tampón fosfato 0.1 M. La fijación secundaria se realizaba mediante una solución de tetraóxido de osmio (O_4O_s) 1% p/v en solución de tampón fosfato 0.1 M (Palade, 1952).

☉ Deshidratación

Las muestras eran deshidratadas progresivamente mediante concentraciones crecientes de etanol. A continuación se indican dichas concentraciones y el tiempo de exposición:

1. Solución 30 % v/v.....15 minutos
2. Solución 50 % v/v.....15 minutos
3. Solución 70 % v/v.....15 minutos
4. Solución 80 % v/v.....15 minutos
5. Solución 90 % v/v.....15 minutos
6. Solución 96 % v/v.....15 minutos
7. 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, por lo que se empleaban soluciones de concentración creciente de este, en etanol absoluto.

A continuación se describen las concentraciones y el tiempo que se empleaba para lograr dicha sustitución de solventes:

1. Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:3 v/v..... 15 minutos
2. Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:3 v/v..... 15 minutos
3. Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:1 v/v..... 15 minutos
4. Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 2:1 v/v..... 15 minutos
5. Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 3:1 v/v..... 15 minutos
6. Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 4:1 v/v..... 15 minutos

7. Acetato de amilo puro..... 60 minutos

Ⓢ Secado

Para secar las muestras se utilizaba la técnica de punto crítico, sustituyendo previamente el acetato de amilo por CO₂ (Anderson, 1953; Bartlet y Burstyn, 1975).

Ⓢ Montaje y metalización.

Las muestras secas, eran pegadas a un porta-muestras de aluminio (u otro metal conductor de la electricidad) mediante plata coloidal o pegamento de secado rápido. Las muestras así acondicionadas se introducían en un metalizador Polaron Sputter Coater (Bal-Tec, Liechtenstein), se sometían a una atmósfera de gas argón y siguiendo la técnica de *sputtering* (Echlin y Kaye, 1979), se cubrían con una capa de oro de 100-200 µm de espesor.

Algunas especies interesantes que no formaron ascomas en cultivo puro fueron sometidas simplemente a este procedimiento. Los ascomas y las ascosporas fueron directamente extraídos de los cebos o anzuelos, y colocados sobre los portamuestras. Las estructuras fúngicas fueron secadas al aire a temperatura ambiente.

Ⓢ Observación y fotografía de las muestras

Las muestras ya procesadas se examinaban en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400 del Servicio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universidad Rovira y Virgili, Reus, España). La distancia de trabajo empleada variaba entre los 8 y 39 mm. El voltaje aplicado estaba comprendido entre 10 y 20 kV. Las primeras microfotografías se obtenían empleando la película de 35 milímetros Kodak Tri-X Pan 400 ASA, posteriormente se acopló un ordenador al microscopio electrónico y a partir de este momento las imágenes se obtuvieron en formato digital (jpg, tiff, etc) y eran impresas en el laboratorio.

3.2.8. Técnicas de biología molecular

3.2.8.1. Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN fúngico fueron utilizados dos métodos:

Ⓢ *Pipette tips*

El ADN total fue obtenido según la técnica descrita por Estruch y col. (1989), con algunas modificaciones realizadas por Cano y col. (2002). Las cepas eran sembradas en 0.8 mL de caldo Sabouraud dispensado en tubos de microcentrífuga (*eppendorfs*) de 1.5 mL de capacidad. Eran incubadas a 28 °C en un agitador orbital a 250 rpm durante el tiempo suficiente como para obtener una biomasa apreciable (7-12 días). La pureza de los cultivos era verificada antes de la extracción del DNA y era realizada a partir de una pequeña suspensión de micelio que era inoculado sobre placas de OA o PCA. El micelio obtenido a partir de los cultivos líquidos era recogido por filtración, y lavado dos veces con agua destilada estéril para eliminar restos del medio de cultivo. Posteriormente la masa miceliar se sometía a liofilización (Advantage Freeze Dryer, The VirTis Company, NY). El producto resultante era triturado con la ayuda de puntas estériles, las cuales se adaptaban perfectamente a la forma de la base del *eppendorf* (*Pipette tips*). Con este paso se garantizaba la obtención de un polvo muy fino, el que se resuspendía en 500 µL de tampón de extracción (50 mM Tris HCl pH 7.2, 50 mM EDTA, 3% SDS) y era incubado durante 1 h a 65 °C. A continuación, el producto de la lisis era extraído con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y el ADN era recuperado por precipitación con isopropanol. El precipitado resultante era lavado con solución de etanol 70% v/v, secado al vacío y resuspendido en solución tampón TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, EDTA 0.1 mM).

Ⓢ *Fast DNA[®] Kit* (Bio 101[®] Systems, Q BIOgene)

Las cepas eran sembradas en placas de Petri sobre medios de cultivos convencionales (PCA, OA, o MEA). El DNA fúngico era extraído y purificado utilizando el Fast DNA kit (Bio101[®] Systems, Q BIOgene). Cuyo protocolo general era el siguiente:

La muestra fúngica era obtenida mediante el raspado de la colonia, y era introducida en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Estos tubos contenían diminutas cuentecillas, una esfera de cerámica y una solución que funciona como tampón de lisis y componentes estabilizadores del ADN (CLS-Y). Los tubos eran centrifugados durante 5 min en el FastPrep[®] Instrument (centrifugación y oscilación), para provocar la lisis celular. Posteriormente, se realizaba una centrifugación a 13 000 rpm durante 7 min para separar los restos celulares y las proteínas. 600 µL del sobrenadante eran transferidos a otro tubo de microcentrífuga, se le agregaban 600 µL de una solución que funciona como matriz de fijación para el ADN (Binding Matrix) y se incubaba durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaba durante 1 min y el precipitado resultante (matriz + ADN) era resuspendido cuidadosamente en 500 µL de una solución de lavado (SEWS-M). A continuación eran realizados dos pasos consecutivos de centrifugación (1 min y 10 seg.), en cada caso el sobrenadante era eliminado cuidadosamente con una pipeta y el procedimiento se continuaba con el precipitado (matriz + ADN). Para recuperar el ADN fijado en la matriz, eran añadidos 100 µL de una solución de aclarado (DES) que se dejaba actuar entre 2-3 min, transcurrido este tiempo se procedía a una nueva centrifugación de 1 min a 13 000 rpm. El sobrenadante era transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 µL y a continuación, para eliminar los restos de partículas procedentes de la matriz, era nuevamente centrifugado.

3.2.8.2. Amplificación de los genes y de las regiones de los espaciadores intergénicos (ITS) del

ARNr

☉ Amplificación del gen 18S del ARNr

Para la amplificación del fragmento correspondiente al gen 18S del ARNr se emplearon los cebadores NS1 y NS24UCB descritos por White y col. (1990) y Gargas y Taylor (1992) respectivamente (Tabla 6).

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 desoxirribonucleótido (gene Amp dNTP Mix con 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 en lugar del ADN fúngico.

El protocolo utilizado para la amplificación fue el descrito por Henrion y col. (1994) con algunas modificaciones descritas por Gené y col. (1996).

La reacción de PCR estaba constituida por los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C
2. 30 ciclos, cada uno de ellos constituido por tres fases:
 - Desnaturalización, 1 min a 94 °C
 - Anillamiento, 1 min a 42 °C
 - Elongación, 3 min a 72 °C
3. Extensión final, 7 min a 72 °C

Las reacciones de amplificación se realizaban en un termociclador Perkin Elmer 2400 (Perkin-Elmer Cetus Co., Emeryville, CA). Con el objetivo de visualizar y analizar el resultado de la amplificación, se tomaban 2 μ L de la reacción y eran sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% (Boehringer Mannheim). Para comprobar el

tamaño de los amplificadores se añadía en el primer y último pocillo el marcador de peso molecular 100 bp Ladder (Invitrogen, Groningen, The Netherlands).

Los productos finales eran purificados mediante el *kit* GFX™ PCR DNA *and gel band Purification* (Amersham Biosciences, NJ. U. S. A.), y subsiguientemente almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su secuenciación.

☉ Amplificación de las regiones ITS y del gen 5.8S del ARNr

Para la amplificación de las regiones de los ITS (ITS1 e ITS2) y del gen 5.8S del ARNr se usaron los cebadores ITS 5 e ITS 4 (Tabla 6), descritos por White y col. (1990). El protocolo usado para la amplificación fue el descrito por Gené y col. (1996). El programa de amplificación fue el siguiente:

1. desnaturalización inicial de 5 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. 30 ciclos de 30 seg. a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. 1 min a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. 1 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$
5. extensión final, 7 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$

Los productos finales se analizaban por electroforesis en geles de agarosa al 2% (agarose MP; Boehringer Mannheim). En la comprobación del peso molecular de los amplificadores y la limpieza de los mismos se siguió el protocolo descrito anteriormente.

☉ Amplificación del gen 28S del ARNr

Los cebadores utilizados para la amplificación de los dominios D1, D2 del gen 28S del ARNr fueron los descritos por O'Donnell (1993), NL1 y NL4.

La reacción de PCR constaba de los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial de 5 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$,
2. 30 ciclos, cada uno de ellos constituido por tres pasos:
 - Desnaturalización, 45 seg. a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - Anillamiento, 1 min a $51\text{ }^{\circ}\text{C}$

- Elongación, 3 min a 72 °C
3. Extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos finales se analizaban por electroforesis en geles de agarosa al 2% (agarose MP; Boehringer Mannheim). En la comprobación del peso molecular de los amplificados y la limpieza de los mismos se siguió el protocolo descrito anteriormente.

3.2.8.3. Secuenciación, alineamiento y análisis filogenético

Secuenciación de los productos de PCR

Para la secuenciación se utilizó el protocolo recomendado en el *kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems. Gouda, Holanda). En la Tabla 6 se muestran los cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación de los genes 18S y 5.8S, de las regiones de los espaciadores intergénicos (ITS1 e ITS2), y de los dominios D1 y D2 del gen 28S. La secuenciación se realizó empleando un secuenciador capilar ABIPrism310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Las secuencias consenso se obtenían utilizando el programa Autoassembler (Applied Biosystems).

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación y la secuenciación de las diferentes regiones del ADN ribosómico.

| Regiones | Cebadores | Secuencias 5' → 3' | Referencias |
|------------|-----------|--------------------------------|-----------------------|
| 18S | 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 |
| ITS y 5.8S | 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 |
| 28S | NL1 | GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA | O'Donnell, 1993 |
| | NL4 | GGT CCG TGT TTC AAG ACG G | O'Donnell, 1993 |

Ⓢ Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

Las secuencias se alineaban utilizando el programa Clustal W (versión 1.5) (Thompson y col., 1994) y Clustal X (Thompson y col., 1997). Los alineamientos eran corregidos visualmente mediante un procesador de texto (Microsoft Word 2000).

Las relaciones evolutivas fueron reconstruidas utilizando el método de las distancias genéticas o *Neighbor-joining*. Los alineamientos fueron analizados mediante el programa MEGA 2.1 (Kumar y col., 2001), utilizando el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980), incluyendo las transiciones y transversiones. Los valores de confianza para cada agrupamiento se determinaron mediante el análisis de *bootstrap*, (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985).

3.2.8.3. Depósito y obtención de secuencias

Las secuencias derivadas de nuestro trabajo fueron depositadas en la base de datos del *European Molecular Biology Laboratory* (**EMBL**). Otras secuencias incluidas en nuestros análisis fueron adquiridas de dicha base de datos y del **GenBank** a través de la página de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

IV RESULTADOS

4.1. *Syspastospora tropicalis*, una especie nueva aislada de suelos tropicales

D. García, A. M. Stchigel and J. Guarro. 2002. A new species of *Syspastospora* from tropical soils. *Mycologia* 94: 862-865.

Mycologia, 94(5), 2002, pp. 862–865.
© 2002 by The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897

A new species of *Syspastospora* from tropical soils

Dania García

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en
Agricultura Tropical "Alejandro de Humbolt", calle 1
esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La
Habana, Cuba*

A. M. Stchigel

J. Guarro¹

*Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21,
43201, Reus, Tarragona, Spain*

Abstract: *Syspastospora tropicalis* sp. nov. isolated from soil samples from different tropical regions is described and illustrated. The fungus can be easily separated from the other species of the genus by its setose perithecial ascomata with a short papillate neck.

Key Words: Ascomycota, Ceratostomataceae, soil borne fungi

INTRODUCTION

The genus *Syspastospora* was erected by Cannon and Hawksworth (1982) to accommodate *S. parasitica* (Tul.) P. F. Cannon & D. Hawksw. (1982), which was removed from *Melanospora* Corda mainly on the basis of the neck structure. In *Syspastospora* the neck is long and formed by more or less parallel hyphae with remote septa, and in *Melanospora* it is short and composed of pseudoparenchymatous cells. The ring of hyaline setae around the ostiole, which is universally present in *Melanospora*, is lacking in *Syspastospora*. Another distinctive feature is the shape of the ascospores, which in *Syspastospora* are cylindrical to doliform, with truncate ends and with large terminal crateriform germ pores, while in *Melanospora* they are usually ellipsoidal to citriform, and with small, slightly sunken germ pores (Cannon and Hawksworth 1982). The second species of the genus, *S. boninensis* Horie, Udagawa & P. F. Cannon (1986), is characterized by non-ostiolate ascomata and wider ascospores.

During a survey of soil-borne ascomycetes in tropical forests of different countries numerous strains of an interesting species of *Syspastospora* were isolated. This species proved to be sufficiently different from those previously described to warrant the proposal of a new taxon.

Accepted for publication February 08, 2002.

¹ Corresponding author, Email: umb@fmcs.urv.es

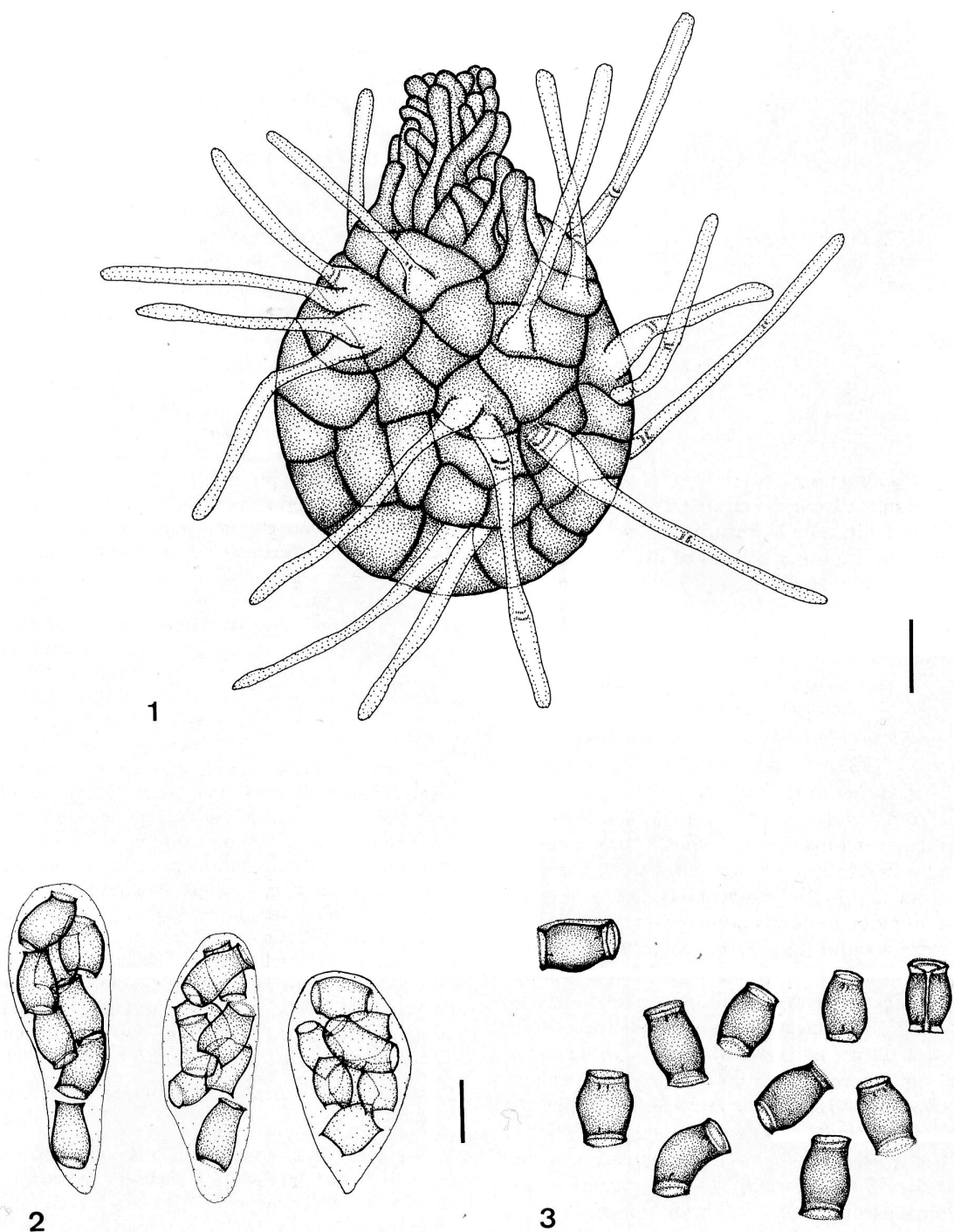
MATERIALS AND METHODS

The soil samples were collected in Argentina, Cuba, Nepal, and Nigeria in different forays (1995–2000). In Argentina, soil samples were collected in areas of the Las Yungas rain-forest with average monthly temperatures between 11 and 30 C and an annual precipitation of 2500 mm. Samples from Cuba were collected from four localities with average monthly temperatures ranging from 24 to 26 C and an annual precipitation of approximately 1400 mm. Soil samples from Nepal were collected at a site 1440 m above sea level and with a subtropical climate (average monthly temperature 2–32 C, annual precipitation 1570 mm). Soils from Nigeria were collected at a site 300 m below sea level with a tropical hinterland climate (temperatures usually higher than 27 C, annual precipitation 2000–3000 mm).

Soil samples were collected from the A₀ horizon using sterile polyethylene bags. These were then sealed with a rubber band and labeled. Material was stored in a refrigerator at 4–7 C. A soil bait technique was used for recovering the fungi. Petri dishes were half-filled with the soil samples and moistened with sterile distilled water. Several pieces of sterile wood (approx 1 × 2 cm) were placed on the soil surface or partially buried in it. Petri dishes were incubated at room temperature, in darkness, and checked weekly. Axenic cultures of the growing fungi were obtained from masses of mature ascospores ejected from the ascomata. Isolates were grown on oatmeal agar (OA; Difco, Detroit, Michigan, USA), potato carrot agar (potatoes 20 g, carrot 20 g, agar 20 g, tap water 1000 mL) and malt extract agar (MEA, Difco, Detroit, Michigan, USA) and incubated at 15, 25, and 35 C. Color notations in parentheses are from Kornerup and Wanscher (1984). Measurements were made from slide preparations mounted in water and lactophenol. Photomicrographs were obtained with a Leitz Dialux 20EB microscope. Scanning electron microscopy techniques were described previously by Figueras and Guarro (1988).

Syspastospora tropicalis D. García, Stchigel & Guarro, sp. nov. FIGS. 1–10

Coloniae in agar cum decocto tuberorum et carotarum expansae, 70–86 mm ad 14 d, effusae, floccose, reversum albidum vel pallidum flavae. Mycelium ex hyphis hyalinis vel dilute flavo-brunneis, ramosis, septatis, levibus, 2–5 µm diam compositum. Chlamydosporae 7–10 µm diam., globosae vel ovoideae, primo hyalinis deinde atro-brunneae. *Ascomata* superficialia vel immersa, dispersa vel in catervis parvis aggregata, pyriformia vel globosa, (71–) 90–109 (–220) × 45–85 (–156) µm, nigra in ascosporis acervulantis, setosa; setae rectae vel parum curvae, 30–80 µm longae, 1.5–4 µm latae ad basim, pallide brunneae, septatae, crassitunicatae. Collis nullis vel brevibus, 0–30 µm longis, 20–30 µm latis ad basim. *Peridium* membranaceum, pilosum,



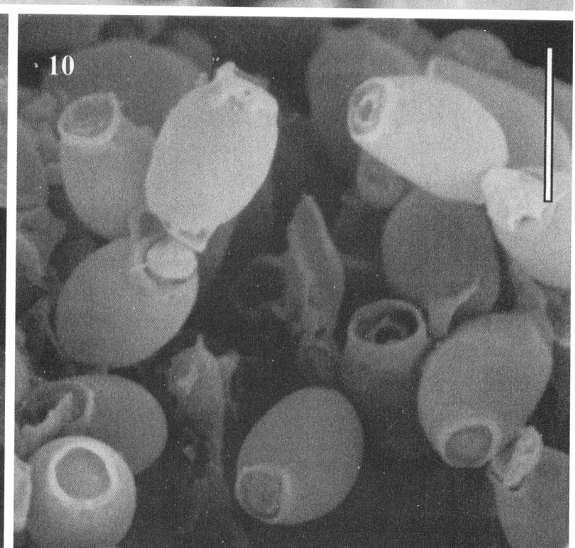
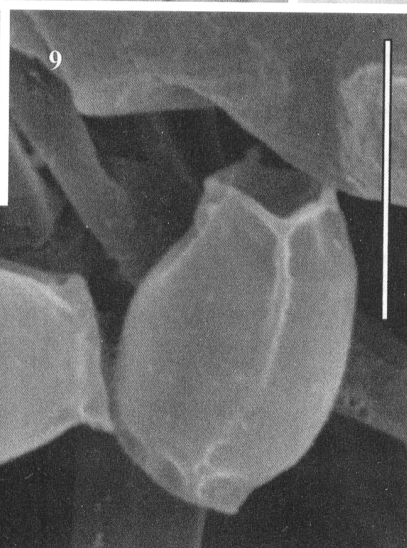
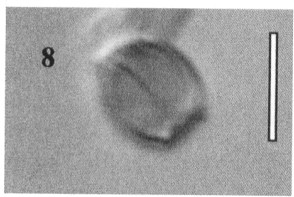
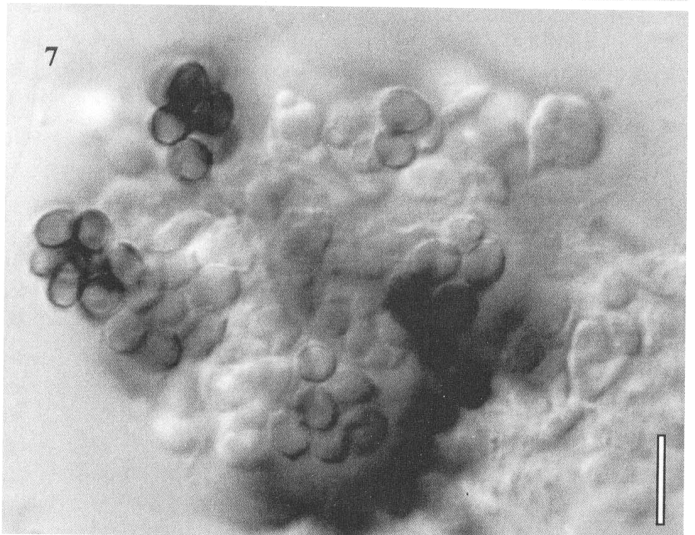
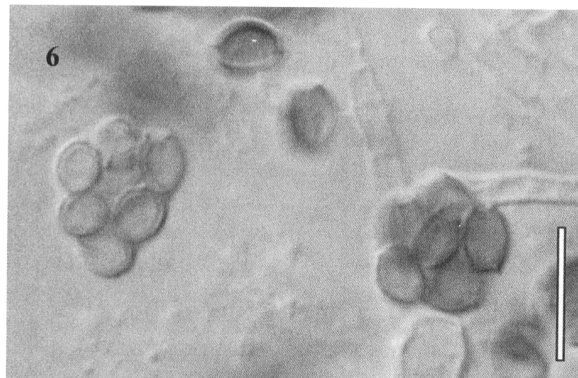
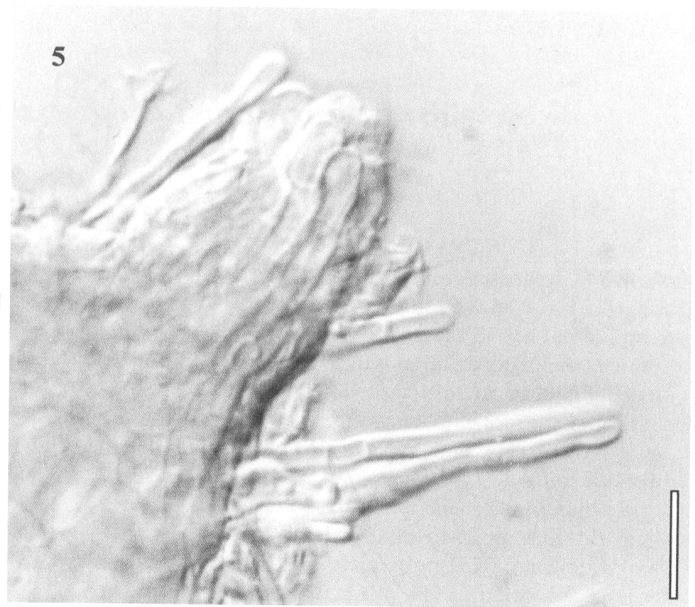
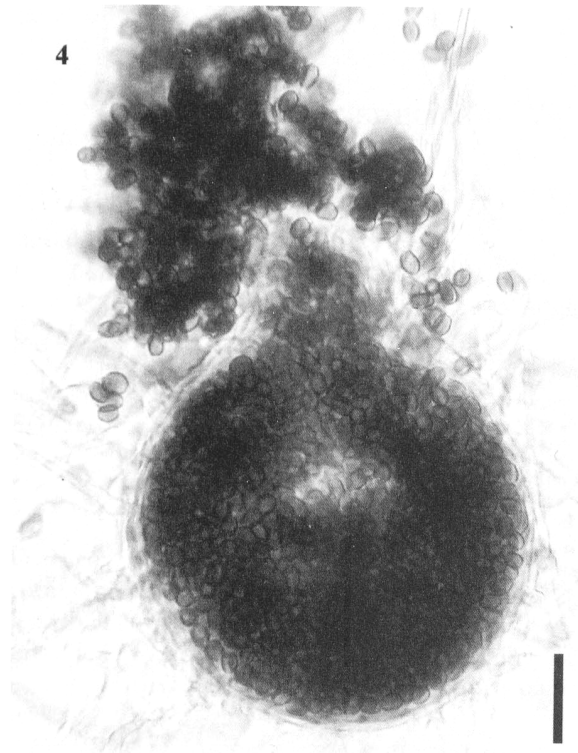
FIGS. 1–3. *Syspastospora tropicalis* FMR-7301. 1. Ascocoma. 2. Ascus with ascospores. 3. Ascospores. Scale bars: 1 = 20 μm , 2, 3 = 5 μm .

2–3 stratiarum compositum, translucidum, textura angularis compositum. *Paraphysis* nullis. *Asci* in fasciculati ad centrum dispositi, 8-spori, obovati vel late clavati, 12–19 \times 6–12 μm , superne rotundati, brevistipitati, celeriter evanescenti. *Ascospores* cum irregulariter dispositionis, primo hy-

alinae et gutulatae, deinde brunneae vel atro-brunneae, doliiformes vel cylindratae, 4–5 (–6) \times (3–) 3.5–4 (–4.5) μm , unicellulares, cum parietibus laevis, utrinque truncatae; poris germinationibus terminalibus duabus, 1–1.5 (–2.5) μm diam, in utroque apice instructo.

864

MYCOLOGIA



Mycelium composed of hyaline to pale yellowish-brown, branched, septate, smooth hyphae, 2–5 µm diam. Colonies on MEA attaining 80 mm diam in 14 d at 25 °C, cottony, grayish-yellow (4B4); reverse similarly colored. Colonies on OA spreading, attaining 70–80 mm diam in 14 d at 25 °C, consisting of abundant aerial mycelium, floccose, white to pale yellow (4A3); reverse brownish orange (5C5). Colonies on PCA spreading broadly, attaining a diam of 70–86 mm in 14 d at 25 °C, consisting of a thin basal felt with abundant aerial growth, white to yellowish-white (4A2), granulose due to the production of abundant ascospores; reverse pale yellow (4A3) to yellowish-brown (5D5). Ascospores produced only on PCA.

Ascomata superficial or immersed, sparse or aggregated in small groups, pyriform to globose, ostiolate, (71–) 90–109 (–220) × 45–85 (–156) µm, pale yellow to yellowish-brown, usually appearing darker when full of mature ascospores, setose; *setae* stiff to slightly curved or sinuous, 30–80 µm long, 1.5–4 µm wide at the base, pale yellow to yellowish-brown, non-septate, thick-walled; *beak* short or absent, conical, up to 30 µm long, 20–30 µm wide at the base, made up of relatively short cells, similar to those of the body wall, but longer and with a rounded tip. *Peridium* membranaceous, 2–3 layered, translucent, composed of thin-walled cells measuring 4–15 µm in diam that form a *texture angularis* in surface view. *Paraphyses* absent. *Asci* 8-spored, obovate to broadly clavate, fasciculate, 12–19 × 6–12 µm, with a rounded apex and without apical structures, short stipitate, evanescent. *Ascospores* irregularly arranged, at first hyaline and guttulate, becoming light brown to olive-brown, doliform to cylindrical, 4–5.5(–6) × (3–) 3.5–4.5 µm, one-celled, smooth and thick-walled, with truncate ends and a large, slightly sunken germ pore at each end, behind which the ascospore wall is slightly constricted; *germ pores* 1–1.5 (–2.5) µm in diam, surrounded by a flange formed from the ascospore wall that sometimes extends as a conspicuous crest along one side of the ascospore. Chlamydospores globose to ovoid, 7–10 µm in diam, brown, thick-walled, terminal or intercalate. *Conidial anamorph* absent.

Material examined. ARGENTINA, SALTA PROVINCE: Rosario de la Frontera, from soil, 18.V.2000, col. A.M. Stehlig, J. Guarro and J. Cano, isol. D. García (HOLOTYPE: IMI 385315, ISOTYPE: FMR 7301).

Other specimens examined. ARGENTINA, TUCUMAN PROVINCE: Cerro San Javier, 15.V.2000, col. A.M. Stehlig, J. Guarro and J. Cano (FMR-7403); SALTA PROVINCE: Ro-

sario de la Frontera, 8.V.2000, col. A.M. Stehlig, J. Guarro and J. Cano (FMR-7444); CUBA, HOLGUIN PROVINCE: Loma La Gloria, 6.XII.1995, col. J. Guarro and E. Mayayo (FMR-7260, FMR-7261, FMR-7438); CAMAGÜEY PROVINCE: Camagüey City, col. J. Guarro and E. Mayayo, 7.XII.1995 (FMR-7440); MATANZAS PROVINCE: Zapata, 8.XII.1995, col. J. Guarro and E. Mayayo (FMR-7404, FMR-7441); LA HABANA PROVINCE: San Antonio de Los Baños, "Las Yaguamas", 9.XII.1995, col. J. Guarro and E. Mayayo (FMR-7439); NEPAL, Dhulikhel, 3.VI.1996, col. J. Guarro (FMR-7399, FMR-7402); NIGERIA, ANAMBRA STATE: Campus Nsukka University, 2.VI.1997, col. A.M. Stehlig, M. Calduch and J. Guarro (FMR-7442, FMR-7443).

Sypastospora tropicalis can be easily differentiated from *S. parasitica*, a species that possesses a long neck (400–3000 µm in length) composed of parallel adhering hyphae, and narrower ascospores (2–2.5 µm) (Dognet 1955, Cannon and Hawksworth 1982). *Sypastospora boninensis* is distinguished from *S. tropicalis* by its non-ostiolate ascospores and longer ascospores (6–9 µm) (Horie et al 1986). Some strains of the new species exhibit a peculiar characteristic never seen before in this genus in that a conspicuous crest extends along one side of the ascospore (FMR-7301, FMR-7399, FMR-7402, FMR-7404, and FMR-7441). However, because the other important morphological characteristics of these strains are identical to those of the other isolate studied, we do not think that this feature alone justifies the erection of a different species.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundació Ciència i Salut (Reus). The first author is grateful for the fellowship grant from Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Spain).

LITERATURE CITED

- Cannon PF, Hawksworth DL. 1982. A re-evaluation of *Melanospora* Corda and similar Pyrenomyces, with a revision of the British species. *Bot J Linn Soc* 84:115–160.
Dognet G. 1955. Le genre *Melanospora*. *Le Botaniste* 39:1–313.
Figueras MJ, Guarro J. 1988. A scanning electron microscopic study of ascospore development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* 80:298–306.
Horie Y, Udagawa SH, Cannon PF. 1986. Four new Japanese species of the Cerastostomataceae (Ascomycetes). *Mycotaxon* 25:229–245.
Kornerup A, Wanscher JH. 1981. *Methuen handbook of color*. 3rd ed. Euse Methuen, London, 252 p.

FIGS. 4–10. *Sypastospora tropicalis*. 4–10. *Sypastospora tropicalis* FMR-7301. Ascoma, 5. Detail of the neck, 6, 7. Asci, 8. Ascospore, 9. Ascospores (SEM), 10. *S. tropicalis* FMR-7399. Ascospores (SEM). Scale bars = 5 µm. Scale bars: 4 = 20 µm, 5–7 = 10 µm, 8–10 = 5 µm.

4.2. Dos especies nuevas del género *Apiosordaria* aisladas de suelo de España

D. García, A.M. Stchigel and J. Guarro. 2003. Soil ascomycetes from Spain. XIII. Two new species of *Apiosordaria*. *Mycologia* 95: 134-140.

Mycologia, 95(1), 2003, pp. 134–140.
© 2003 by The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897

Soil ascomycetes from Spain. XIII. Two new species of *Apiosordaria*

Dania García

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en
Agricultura Tropical "Alejandro de Humbolt", calle 1
esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La
Habana, Cuba*

A. M. Stchigel

J. Guarro¹

*Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21,
43201, Reus, Tarragona, Spain*

Abstract: *Apiosordaria hispanica* sp. nov. and *Apiosordaria globosa* sp. nov. isolated from soil samples collected in Tarragona, Catalonia, Spain, are described and illustrated. Both species are morphologically close to *A. otanii*. The ascospores of *A. hispanica* have tuberculate walls, while those of *A. otanii* have small warts. *Apiosordaria globosa* differs from those species by the globose upper cell of the ascospores, which has a small apical protrusion with sub-apical germ pore when young. In *A. hispanica* and *A. globosa* the lower cells of the ascospores are slightly warty, while in *A. otanii* the lower cell of the ascospores is smooth-walled.

Key Words: Ascomycota, Lasiosphaeriaceae, Mediterranean region, soil borne fungi

INTRODUCTION

The genus *Apiosordaria* Arx & Gams (Lasio-sphaeriaceae, Ascomycota) is characterized by dark ascomata, non-amyloid asci and two-celled ascospores (Arx and Gams 1967). These are composed of a dark and ornamented upper cell and a hyaline lower cell (Krug et al 1983). The presence of spines, warts or pits in the upper cell of the ascospores is the principal character that differentiates this genus from other related genera of the Lasiosphaeriaceae. *Triangularia* Boedijn and *Zopfiella* Winter both have a smooth upper cell, although they also have unequal two-celled ascospores (Guarro and Cano 1988). The genus *Apiosordaria* comprises 21 species, including mainly soil-borne and coprophilous species (Krug et al 1983, Stchigel et al 2000).

Accepted for publication June 17, 2002.

¹ Corresponding author, Email: umb@fmcs.urv.es

During a continuous survey of soil ascomycetes from Spain, two interesting species of *Apiosordaria* were isolated. Their morphological characteristics differentiate them from all previously described species of the genus (Krug et al 1983, Guarro and Cano 1988, Stchigel et al 2000). In the present report these species are fully described, illustrated, and proposed as new.

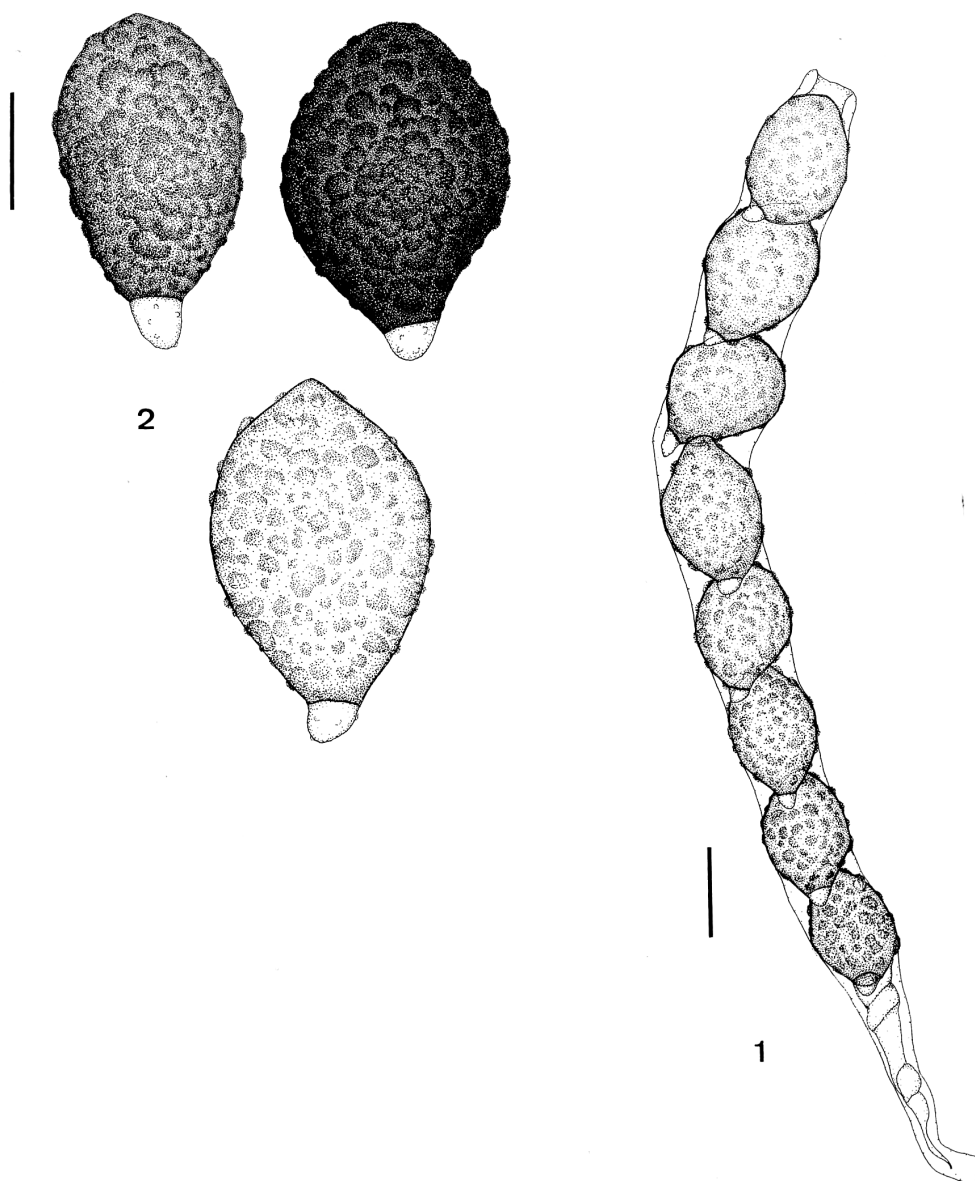
MATERIALS AND METHODS

The soil samples were collected from several places in Els Gorgs de la Febró, Tarragona, Spain. The vegetation is mostly composed of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. The area has a Mediterranean climate with an annual average temperature of 15–36 °C and an annual precipitation up to 600 mm. Soil was mainly collected from the A₀ horizon with sterile polyethylene bags. These were sealed with a rubber band, and labeled. On returning to the laboratory samples were stored at 4–7 °C until used. Approx 1 g of the sample was treated with 2% (p/v) phenol (Phenol crystal, Panreac, Barcelona, Spain) for 10 min. The supernatant was discarded and the solid phase resuspended in 10 mL of sterilized water. The suspensions were cultured on potato carrot agar (PCA, potato 20 g, carrot 20 g, agar 20 g) at 15 °C in the dark. Strains were grown on oatmeal agar (OA; Difco, Detroit, Michigan, USA), PCA and malt extract agar (MEA, Difco, Detroit, Michigan, USA). Cultures were made and structures were measured as described previously by Stchigel et al (1998). Color notations in parentheses are from Kornerup and Wansher (1984). Photomicrographs were obtained with a Leitz Dialux 20 EB microscope. Scanning electron microscopy techniques were described previously by Figueras and Guarro (1988).

TAXONOMY

Apiosordaria hispanica D. García, Stchigel et Guarro, sp. nov. FIGS. 1–9

Mycelium ex hyphis dilute brunneis vel dilute olivaceo-brunneis, septatis, ramosis, anastomosantibus, laevibus, 1–6 µm diam composito. *Coloniae* in agar cum decocto tuberorum et carotarum (PCA) expansae, planae, ex mycelio vegetativo submerso et aereo, brunneae; reversum brunneum. *Ascomata* superficialia vel immersa, dispersa vel in catervis parvis aggregata, ostiolata, brunnea vel atrobrunnea, pyriformia vel subglobosa, 350–420 × 265–330 µm, pilosa; pilis laxis, longis, flexuosis, dilute flavo-brunneis, septatis, 2–3 µm diam composito. *Collum* conicum, nigrum, 78–88 (–113) µm longum, 127–137 µm latum ad basim. *Peridium* membranaceum, pilosum, 6–9 str.

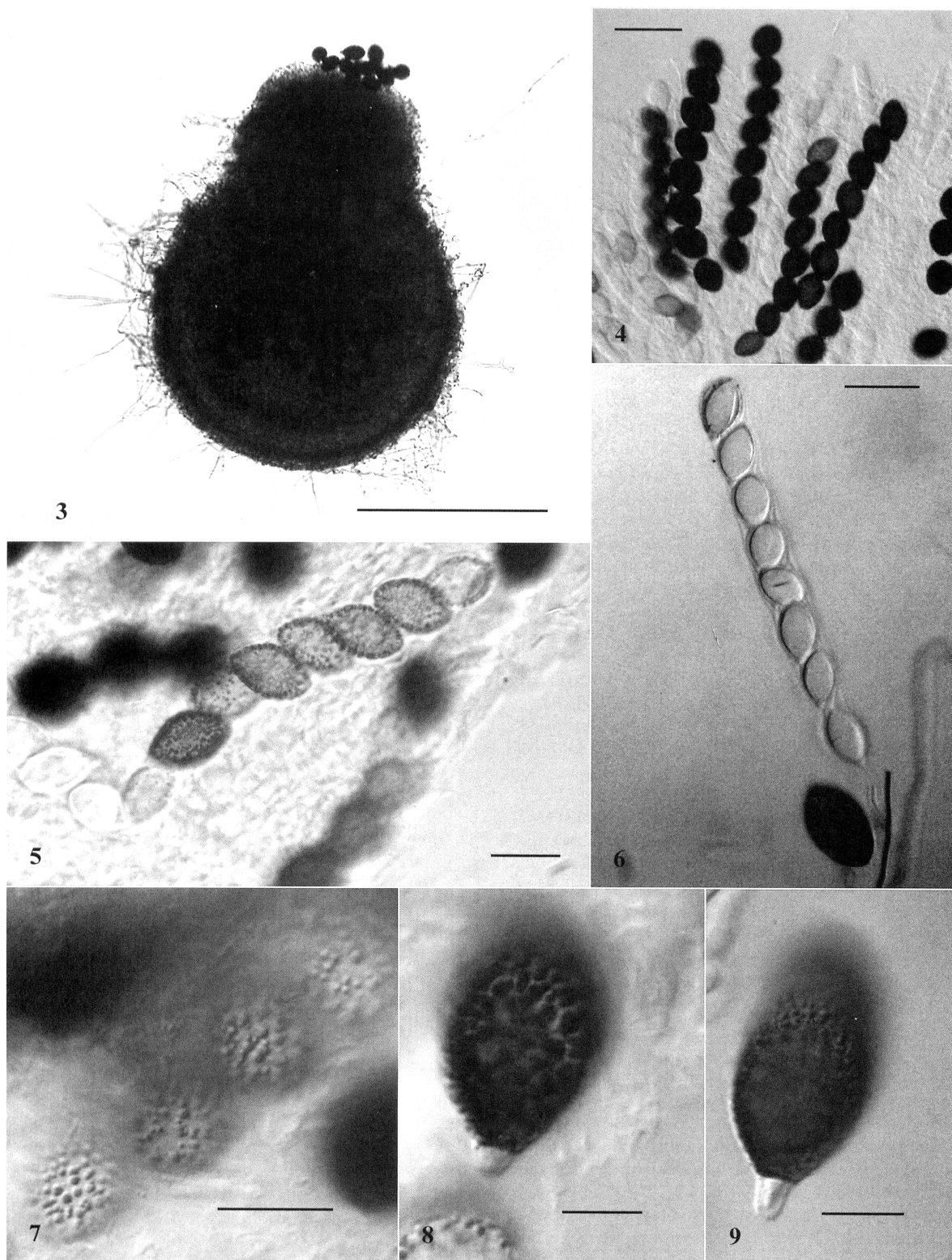


FIGS. 1–2. *Apiosordaria hispanica* FMR 7398. 1. Ascus with ascospores. 2. Ascospores. Scale bars: 1 = 20 μm , 2 = 10. μm .

tiorum compositum, 17–20 μm crassitunicatum, ex textura intricata vel textura angularis. *Asci* in fasciculo ad centrum dispositi, 8-sporei, cylindrici, stipitati, 146–232 \times 15–22 μm , cum muris tenuibus. *Paraphyses* numerosae, hyalinae, filiformes, septatae, 0.5–2 μm diam. *Periphyses* hyalinae, filiformes, septatae, 0.5–1 μm diam. *Ascospores* uniseriatae, primum unicellulares, clavatae, hyalinae, deinde transverse septatae ad bicellulares; cellula superior obovoidea cum apice acuminato, brunnea, crassitunicata, 23–28 (–30) \times 18–22 (–23) μm , tuberculata, cum foramine germinali singulari, apicali vel sub-apicali, 0.5–2 μm diam praedita; cellula

inferior hyalina vel sub-hyalina, conica, 1–5 (–6) μm longa. *Status conidialis* nullus.

Mycelium composed of pale brown to pale olive-brown, septate, branched, smooth-walled hyphae, 1–6 μm diam. *Colonies* on PCA growing rapidly, attaining 84–86 mm diam in 14 d at room temperature (22–25 C), flat, thin, consisting of submerged mycelium and sparse aerial hyphae, zonate and slightly radiate, brown (M. 5E6); ascomata produced after one mo; reverse brown (M. 5F5). *Ascomata* immersed



FIGS. 3–9. *Apiosordaria hispanica* FMR 7398. 3. Ascoma. 4–6. Asci. 7. Detail of ascospore wall. 8, 9. Ascospores. Scale bars. 3 = 200 μm , 4 = 40 μm , 5–7 = 20 μm , 8, 9 = 10 μm .

to superficial, ostiolate, subglobose to pyriform, dark brown to black, $350\text{--}420 \times 265\text{--}330 \mu\text{m}$, tomentose, covered with long, slender, pale yellowish-brown, smooth, septate, unbranched or inconspicuously branched hypha-like hairs, $2\text{--}3 \mu\text{m}$ diam, with a conspicuous neck; neck $78\text{--}88$ (~ 113) μm long, $127\text{--}137 \mu\text{m}$ wide at the base, with brown, papillate cells disposed around the ostiole. *Peridium* membranaceous, pilose, 6–9-layered, $17\text{--}20 \mu\text{m}$ thick, brownish-orange to brown; outer layer with *textura intricata*, composed by brown cells, $2\text{--}5 \mu\text{m}$ diam; inner layer composed by thin-walled polygonal cells, $9\text{--}15 \mu\text{m}$ diam. *Asci* 8-spored, fasciculate, cylindrical, thick-walled when young, becoming thin-walled at maturity, $146\text{--}232 \times 15\text{--}22 \mu\text{m}$, rounded at the apex, with a thin apical ring, stipitate, evanescent. *Paraphyses* hyaline, filiform, septate, $0.5\text{--}2 \mu\text{m}$ wide. *Periphyses* hyaline, filiform, septate, unbranched, $0.5\text{--}1 \mu\text{m}$ wide. *Ascospores* uniseriate, clavate, hyaline, and 1-celled when young, becoming two-celled by the formation of a transverse septum; upper cell obovoid, truncate at the base and with a slightly acuminate apex, brown, thick-walled, $23\text{--}28$ (~ 30) $\times 18\text{--}22$ (~ 23) μm , uniformly ornamented with numerous rounded warts of $0.5\text{--}2 \mu\text{m}$ diam, with an apical to sub-apical germ pore, $0.5\text{--}2 \mu\text{m}$ diam; lower cell sub-hyaline, conical and slightly warted, $1\text{--}5$ (~ 6) μm long. *Anamorph* unknown.

Colonies on OA and MEA growing rapidly, attaining $55\text{--}70$ mm diam in 14 d at room temperature ($22\text{--}25$ C), zonate and slightly radiate, cottony, brown to olive-brown (M. 5E6 to M. 4E8); reverse dark olive brown. Ascospores produced after one mo on OA; on MEA, ascospores not produced. At 15 and 35 C growing rapidly on PCA and OA; on MEA colonies restricted, ascospores not produced.

Specimen examined SPAIN, TARRAGONA: Vilaplana, Els Gorgs de la Febró, soil, 25-IX-1996, col. AM Stchigel and M Caldich (HOLOTYPE: FMR 7398).

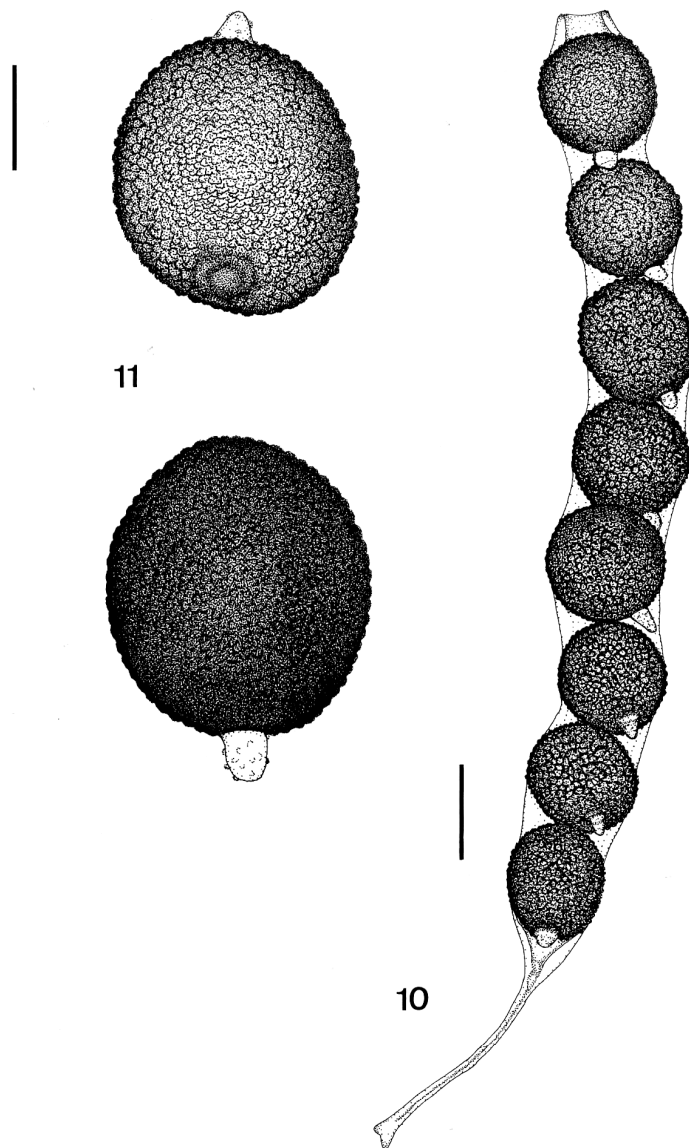
Apiosordaria hispanica is morphologically similar to *Apiosordaria vermicularis* (Morinaga et al) Krug, Udagawa & Jeng (Morinaga et al 1978), *Apiosordaria yae-yamensis* Morinaga, Utatsu & Minoura (Morinaga et al 1979), *Apiosordaria otanii* Udagawa (Udagawa 1990) and *Apiosordaria microcarpa* Udagawa & Muroi (Udagawa and Muroi 1981). All have 8-spored asci and the upper cell of the ascospores more or less spinulose. *Apiosordaria vermicularis* can be easily differentiated from *A. hispanica* by its non-ostiolate ascospores and longer lower cell of the ascospores ($12\text{--}20 \mu\text{m}$), which is frequently 1-septate (Morinaga et al 1978). *Apiosordaria microcarpa* and *A. yae-yamensis* have ostiolate ascospores, but the upper cell of the ascospores is smaller ($15\text{--}19 \times 10\text{--}12.5 \mu\text{m}$ and $10\text{--}12.5 \times 6\text{--}8 \mu\text{m}$, respectively) (Udagawa and Muroi 1981, Morinaga et al 1979). In *Apiosordaria otanii*,

the upper cell of the ascospores has very small warts and the lower cell is smooth-walled (Udagawa 1990), while *A. hispanica* has ascospores with the upper cell ornamented with large tubercles and the lower cell slightly warted.

Apiosordaria globosa D. García, Stchigel et Guarro, sp. nov. FIGS. 10–20

Mycelium ex hyphis dilute brunneis vel dilute olivaceo-brunneis, septatis, ramosis, anastomosantibus, laevibus, $1\text{--}6 \mu\text{m}$ diam composito. *Coloniae* in PCA expansae, planae, ex mycelio vegetativo submerso et aereo, brunneae; reversum brunneum. *Ascospores* superficialia vel immersa, dispersa vel in catervis parvis aggregata, ostiolata, brunnea vel atrobrunnea, pyriformia vel subglobose, $600\text{--}770 \times 320\text{--}540 \mu\text{m}$, dense pilosae, pilis laxis, longis, flexuosis, dilute flavo-brunneis, septatis, $1\text{--}3 \mu\text{m}$ diametro composito. *Collum* conicum, nigrum, $220\text{--}280 \mu\text{m}$ longum, $210\text{--}250 \mu\text{m}$ latum ad basim, papilliformes. *Peridium* membranaceum, pilosum, 6–9 stratorum compositum, $15\text{--}19 \mu\text{m}$ crassitunicatum, ex textura intricata vel textura angularis. *Asci* 8-sporei in fasciculo ad centrum dispositi, cylindrici, stipitati, $195\text{--}250 \times 24\text{--}28 \mu\text{m}$, cum muris tenuibus. *Paraphyses* numerosae, hyalinae, filiformes, septatae, $0.5\text{--}2 \mu\text{m}$ diam. *Periphyses* hyalinae, filiformes, septatae, $0.5\text{--}1 \mu\text{m}$ diam. *Ascospores* uniseriatae, primum unicellulares, clavatae, hyalinae, deinde transverse septatae ad bicellulares; cellula superior globosa, atrobrunnea vel nigra, crassitunicata, $25\text{--}27$ (~ 29) \times (22--) $23\text{--}27 \mu\text{m}$, verruculosa, cum foramine germinali singulari et sub-apicali, $1\text{--}2 \mu\text{m}$ diam praedita; cellula inferior hyalina vel subhyalina, conica, (1–) $4\text{--}6 \mu\text{m}$ longa. *Status conidialis* nullus.

Mycelium composed of pale brown to pale olive-brown, septate, branched, smooth-walled hyphae, $1\text{--}6 \mu\text{m}$ diam. *Colonies* on PCA growing rapidly, attaining $80\text{--}86$ mm diam in 14 d at room temperature, flat, thin, consisting of submerged mycelium and sparse aerial hyphae, zonate and slightly radiate, brown (M. 5E6); ascospores produced after one mo; reverse brown (M. 5F5). *Ascospores* immersed to superficial, ostiolate, subglobose to pyriform, dark brown to black, $600\text{--}770 \times 320\text{--}540 \mu\text{m}$, tomentose, covered with long, slender, pale brownish-yellow, smooth, septate, hypha-like hairs, $1\text{--}3 \mu\text{m}$ diam, unbranched or inconspicuously branched, with a conspicuous neck; neck $220\text{--}280 \mu\text{m}$ long, $210\text{--}250 \mu\text{m}$ wide at the base, with brown, papillate cells around the ostiole. *Peridium* membranaceous, pilose, 6–9-layered, $15\text{--}19 \mu\text{m}$ thick, brownish orange to brown; outer layer with *textura intricata*, composed of brown irregular cells, $2\text{--}5 \mu\text{m}$ diam; inner layer composed of thin-walled polygonal cells, $9\text{--}17 \mu\text{m}$ diam. *Asci* 8-

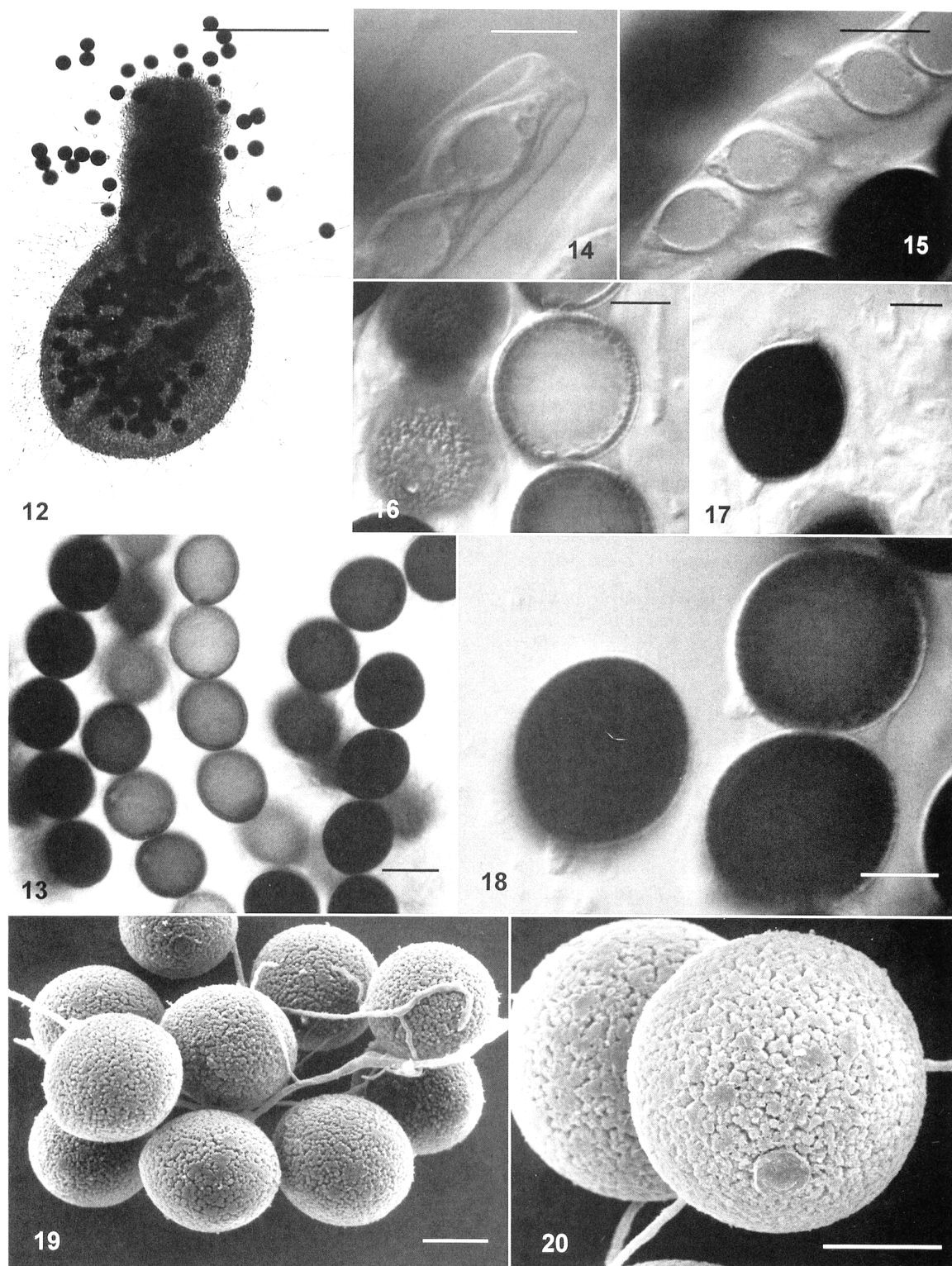


FIGS. 10–11. *Apiosordaria globosa* FMR 7400. 10. Ascus with ascospores. 11. Ascospores. Scale bars: 10= 20 μm , 11 = 10 μm .

spored, fasciculate, cylindrical, thick-walled when young becoming thin-walled when mature, 195–250 \times 24–28 μm , rounded at the apex, with a thin apical ring, stipitate, evanescent. *Paraphyses* hyaline, filiform, septate, unbranched, 0.5–2 μm wide. *Periphyses* hyaline, filiform, septate, 0.5–1 μm wide. *Ascospores* uniseriate, broadly fusiform, hyaline and 1-celled when young, becoming two-celled by the formation of a transverse septum; upper cell globose, dark brown to black and opaque, with a small subapical protuberance, which disappears when ascospores mature, thick-walled, 25–27 (–29) \times (22–) 23–27 μm , uniformly ornamented with small warts; lower cell

sub-hyaline, conical, (1–) 4–6 μm long, slightly warted; germ pore sub-apical, 1–2 μm diam. *Anamorph* unknown.

Colonies on OA growing rapidly, attaining 80–86 mm diam in 14 d at room temperature, zonate and slightly radiate, cottony, with immersed and sparse aerial mycelium, olive-brown (M. 4E5); reverse dark brown; ascomata produced after one mo. Colonies on MEA restricted, elevated, cottony and radiately wrinkled, olive-brown (M. 4E5); reverse olive-brown (M. 4E8), ascomata not produced. At 15 and 35 C, the growth rate is similar to that at room temperature on all media used; ascomata not produced.



FIGS. 12–20. *Apiosordaria globosa* FMR 7400 12. Ascoma. 13. Asci. 14, 15. Detail of ascus. 16. Detail and optical section of ascospore wall. 17, 18. Ascospores. 19, 20. Ascospores (SEM). Scale bars: 12 = 200 μm , 13 and 15 = 20 μm , 14 and 16–20 = 10 μm .

Specimen examined. SPAIN, TARRAGONA: Vilaplana, Els Gorgs de la Febró, from soil, 25-IX-1996, col. AM Stchigel, M Caldach (HOLOTYPE: FMR 7400).

Apiosordaria globosa is very similar to *A. otanii* (Udagawa 1990). Both have cylindrical, 8-spored asci and small warts on the upper cell of the ascospores. However, they can be differentiated by the shape and size of the upper cell of the ascospores, which are broadly ellipsoidal with a truncate base, 20–24 × 15–18 µm in *A. otanii*, and globose, measuring 25–27 (–29) × 23–27 µm in the new taxon. In addition, *A. otanii* produces a *Chrysosporium*-like anamorph, which is lacking in the new species, and the lower cell of the ascospores is smooth, while in *A. globosa* it is slightly warted.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundació Ciència i Salut (Reus). The senior author is grateful for the fellowship grant from Universitat Rovira i Virgili (Tarragona), Spain.

LITERATURE CITED

- Arx JA von, Gams W. 1967. Über *Pleurage verruculosa* und die zugehörige *Cladorrhinum*-Konidienform. *Nova Hedwigia* 13:199–208.
- Figueras MJ, Guarro J. 1988. A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* 80:298–306.
- Guarro J, Cano J. 1988. The genus *Triangularia*. *Trans Br Mycol Soc* 91:587–591.
- Kornerup A, Wanscher JH. 1984. *Methuen handbook of colour*. 3rd ed. London: Eyre Methuen. 252 p.
- Krug JC, Udagawa S-I, Jeng RS. 1983. The genus *Apiosordaria*. *Mycotaxon* 17:533–549.
- Morinaga T, Minoura K, Udagawa S-I. 1978. New species of microfungi from Southeast Asian soil. *Trans Mycol Soc Japan* 19:135–148.
- , Utatsu I, Minoura K. 1979. Notes on filamentous fungi found in Japan. II. *Trans Mycol Soc Japan* 20: 493–498.
- Stchigel AM, Cano J, Guarro J. 1998. A new species of *Gelasinospora* from Argentinian soil. *Mycol Res* 102:1405–1408.
- , ——, Gugnani HC. 2000. A new *Apiosordaria* from Nigeria, with a key to the soil-borne species. *Mycologia* 92:1206–1209.
- Udagawa S-I. 1990. A new species of *Apiosordaria* and some interesting ascomycetes from Nepal. In: *Cryptogams of the Himalayas*. Vol. 2. Tsukuba, Japan: National Science Museum. p 73–84.
- , Muroi T. 1981. Notes on some Japanese Ascomycetes. XVI. *Trans Mycol Soc Japan* 22:11–26.

4.3. Una nueva especie de *Poroconiochaeta* aislada de suelo de Rusia

D. García, A.M. Stchigel and J. Guarro. 2003. A new species of *Poroconiochaeta* from Russian soil. *Mycologia* 95: 525-529.

Mycologia, 95(3), 2003, pp. 525–529.
© 2003 by The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897

A new species of *Poroconiochaeta* from Russian soils

Dania García

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en
Agricultura Tropical, Alejandro de Humboldt, calle 1
esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La
Habana, Cuba*

A. M. Stchigel

J. Guarro¹

*Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21,
43201, Reus, Tàrragona, Spain*

Abstract: *Poroconiochaeta tetraspora* sp. nov., isolated from soil of Russia, is described and illustrated. The new taxon differs from *P. discoidea* in its four-spored asci (eight-spored in *P. discoidea*) and from *P. punctulata* in the pattern of ascospore ornamentation, which is conspicuously pitted in *P. tetraspora* (punctulate in the other species). The new combination *Poroconiochaeta savoryi* is proposed and discussed.

Key words: Ascomycota, Coniochaetaceae, soil-borne fungi

INTRODUCTION

The genus *Poroconiochaeta* Udagawa & Furuya was introduced to include two new species, *P. discoidea* Udagawa & Furuya and *P. punctulata* Udagawa & Furuya, characterized by ostiolate ascomata and one-celled, dark, ornamented ascospores, with an equatorial to lateral germ slit (Udagawa and Furuya 1979).

During a study of ascomycetes from Russia, an interesting fungus was isolated. It is characterized by its globose to pyriform, nonostiolate or ostiolate ascomata, and ellipsoidal, conspicuously pitted ascospore with a longitudinal germ slit. Based on these features, this fungus was identified as *Poroconiochaeta*. However, it shows a combination of characters not seen in the previously described species and is described here as a new species.

Accepted for publication November 25, 2002.

¹ Corresponding author. E-mail: umb@fmc.s.uv.es

MATERIALS AND METHODS

Soil samples were collected in Chujonskoye, near Bubenize, Toropetskiy district, Tverskaya region, Russia. The area is characterized by a continental climate, with a temperature range of –31 to +25 C and annual precipitation of 550–750 mm. The region belongs to the taiga, with cultivated areas and boreal southerly woods, composed mainly of *Alnus* spp., *Betula pendula* Roth, *B. pubescens* Ehrh., *Picea abies* (L.) H. Karst., *Pinus* spp., *Populus tremula* L., *Salix* spp., and *Sorbus aucuparia* L.

The methods used for sampling have been described by Stchigel et al (1998). Approximately 1 g of soil was treated with 2% (p/v) phenol (Phenol crystal, Panreac, Barcelona, Spain) for 10 min. The supernatant was discarded and the solid phase was resuspended in 10 mL of sterilized water. The suspensions were cultured on potato-carrot agar (PCA, potatoes, 20 g; carrot, 20 g; tap water, 1000 mL) at 15 C in the dark. Isolates were grown on oatmeal agar (OA; Difco, Detroit, USA), PCA, and malt-extract agar (MEA, Difco, Detroit, USA) at room temperature (22–25 C), or incubated at 15, 25 and 35 C. Measurement of the fungal structures and photomicrographs were made as described by Stchigel et al (1998). Color notations in parentheses are from Kornerup and Wansher (1984).

TAXONOMY

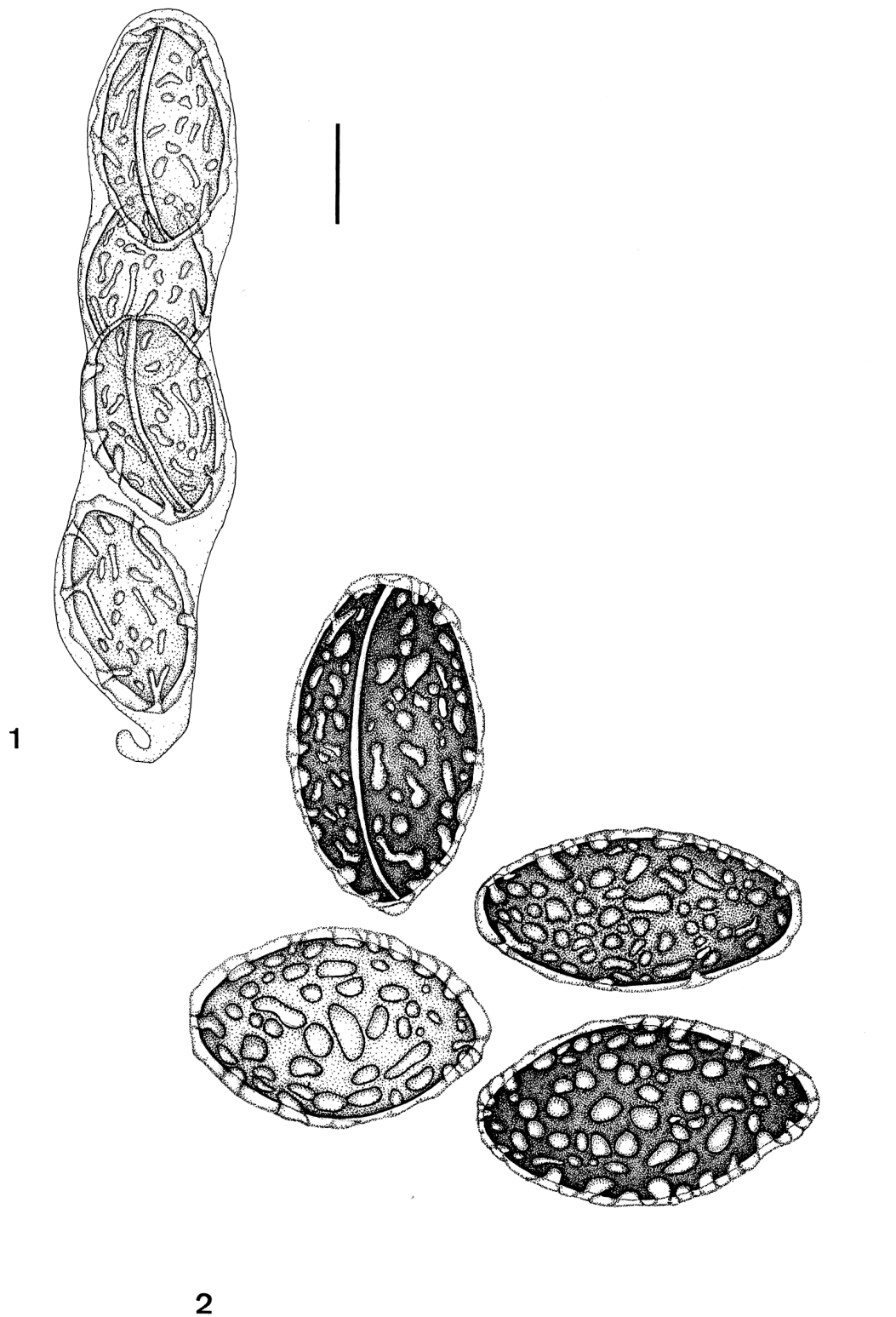
Poroconiochaeta tetraspora D. García, Stchigel et Guarro, sp. nov. FIGS. 1–8

Mycelium ex hyphis hyalinis vel flavo-brunneis, septatis, ramosis, anastomosantibus, laevibus, 1–6 µm diam composito. *Coloniae* in agarum cum decocto tuberorum et carotarum (PCA) expansae, planae, tenues, granulosa, ex mycelio vegetativo submerso, olivaceo-brunneae; reversum olivaceo-brunneum. *Ascomata* superficialia vel immersa, dispersa vel in catervis parvis aggregata, ostiolata vel non ostiolata, translucida, brunnea, pyriformia vel globosa, 146–200 × 80–120 µm, glabra. *Peridium* brunneum, 3–5 stratorum compositum, ex textura angularis. *Asci* in fasciculo ad centrum dispositi, 4-sporei, cylindrici, brevistipitati 55–70(–77) × 10–14 µm, superne rotundati. *Paraphyses* numerosae, hyalinae, filiformes, septatae, ramosae, 1–2 µm diam. *Ascospores* uniseriatae, primum hyalinae, deinde olivaceo-brunneae, late fusiforme (18–)20–24 × 9–13 µm, cum fissura germinali aequatoria vel lateri praeditae. *Status conidialis* ignotus.

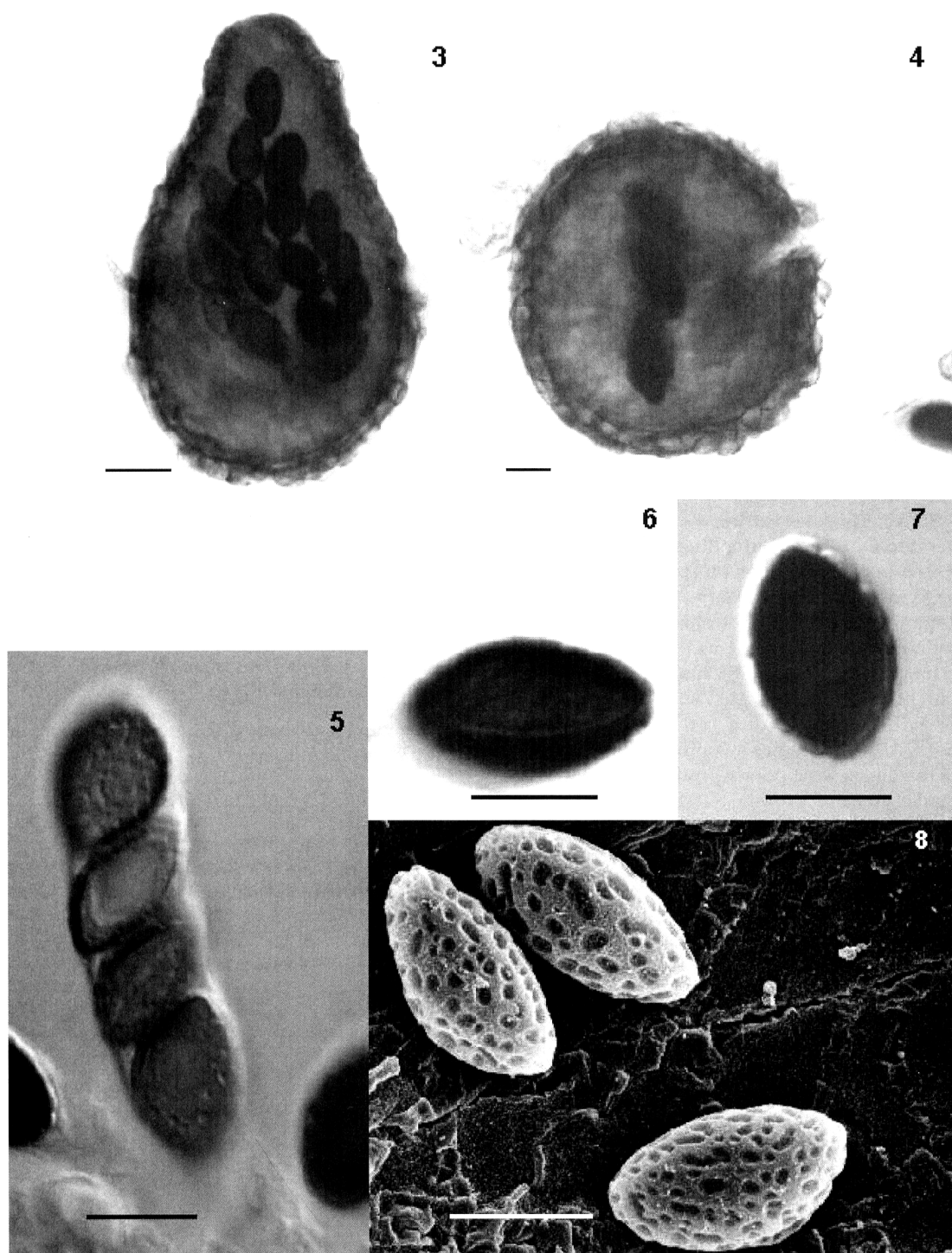
Mycelium composed of hyaline to pale yellowish-brown hyphae, becoming dark in the immediate vicinity of the ascomata, septate, branched, frequently anastomosing, smooth-walled, 1–6 µm diam. *Colonies* on PCA growing rapidly, attaining 71–86 mm diam

526

MYCOLOGIA



FIGS. 1, 2. *Poroconiochaeta tetraspora* FMR-7401. 1. Ascus with ascospores. 2. Ascospores. Scale bars: 1, 2 = 10 μ m.



FIGS. 3–8. *Poroconiochaeta tetraspora* FMR-7401. 3. Perithecial ascoma. 4. Cleistothecial ascoma. 5. Ascus. 6, 7. Ascospores. 8. Ascospores (SEM). Scale bars: 3, 4 = 20 μm , 5–8 = 10 μm .

in 14 d at room temperature, flat, thin, consisting of submerged mycelium and sparse aerial hyphae, dark olive-brown (M. 4F4) due to production of abundant, radially disposed ascomata; reverse olive-brown (M. 4F4). *Ascomata*, 146–200 × 80–120 µm, superficial to immersed, scattered or aggregated in small clusters, ostiolate or nonostiolate, pyriform to subglobose, or globose, translucent, appearing dark brown to black due to mass of ascospores glabrous. *Peridium* 3–5-layered, translucent, membranaceous, yellowish-brown to brown, with *textura angularis*, composed of thin-walled polygonal cells 6–14 µm diam. *Asci* four-spored (sometimes two- or three-spored), fasciculate, cylindrical, 55–70(–77) × 10–14 µm, rounded at the tip, without apical structures, short-stipitate, thin-walled, evanescent. *Paraphyses* 1–2 µm diam, numerous, hyaline, filiform, septate, simple or branched, swollen at the base. *Ascospores* (18–)20–24 × 9–13 µm, uniseriate, broadly fusiform, hyaline when young, becoming dark olivaceous-brown when mature, conspicuously ornamented by numerous circular to elongate pits, measuring 4–5 × 0.5 µm; germ slit lateral to equatorial, extending the entire length of the ascospores. *Anamorph* unknown.

On OA at room temperature, colonies attaining 55–62 mm diam in 14 d, dark olive-brown (M. 4F4), with radial production of the ascomata. On MEA at room temperature, colonies attaining 63–70 mm diam in 14 d, pastel-red (M. 7A4), slightly zonate, radially wrinkled, and slightly cottony; ascomata not produced. At 15 C colonies attaining 50–65 mm diam in 14 d, ascomata were poorly produced on both culture media. At 35 C growing slowly, attaining 15–25 mm diam in 14 d, ascomata not produced.

Specimens examined: RUSSIA, CHUJONSKOYE: Toropetskiy district. From soil, 22-III-2000, col. Natalia Sastre, isol. *D. Garcia*. (HOLOTYPE: IMI 386072; ISOTYPE: FMR 7401); *Paraconiochaeta tetraspora* (FMR 7415).

Other specimen examined: *Paraconiochaeta punctulata*, ARGENTINA, TUCUMÁN PROVINCE: Cerro San Javier. From soil, 15-V-2000, col. A.M. Stehigel, J. Guarro and J. Cano, isol. *D. Garcia* (FMR 7408).

The genus *Paraconiochaeta* is closely related to *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke. Both genera are distinguished by the ornamentation of the ascospores, which are pitted or punctulate in the former and smooth in the latter (Arx 1981). Those morphologically related species with nonostiolate ascomata and smooth ascospores are included in *Coniochaetidium* Malloch & Cain (Malloch and Cain 1971). *Paraconiochaeta tetraspora* had ostiolate and nonostiolate ascomata in the same culture, which at first created some confusion concerning to the adequate placement of this taxon. However, we agree with Arx (1973), who considered the presence of an ostiole a

variable character, not always useful for the delimitation of genera. Thus, in spite of the presence of cleistothecial ascomata, we included the fungus in *Paraconiochaeta*, on the basis of its pitted ascospores. *Paraconiochaeta tetraspora* easily can be differentiated from the other species of the genus by its four-spored asci. The ornamentation of the ascospores resembles that of *Paraconiochaeta discoidea*, but this species has eight-spored asci, and discoid and smaller ascospores ((8–)9–12 × 8–11 µm). *Paraconiochaeta punctulata* also has similar ascospores, but they are finely pitted.

Thielavia savoryi Booth (Booth 1961) is characterized by nonostiolate ascomata, four-spored asci and fusoid ascospores, which are slightly flattened on one side. The species was included in *Coniochaetidium* Malloch & Cain (Malloch and Cain 1971) based on the presence of a germ slit in the ascospores (Malloch and Cain 1971). Later, due to the fasciculate arrangement of asci with a parallel disposition and plane convex ascospores, it was considered the type species of the new genus *Germisditospora* Lodha (Lodha 1978). Udagawa and Furuya (1979), based primarily on ascospore ornamentation, considered the new genus to be justified. This genus, however, has not been generally accepted (Arx 1981, Hawksworth et al 1995, Guarro et al 1997). Considering the ornamentation of the ascospores, we think this species should be included in *Paraconiochaeta*. Therefore, this new combination is proposed:

***Paraconiochaeta savoryi* (Booth) D. García, Stehigel & Guarro, comb. nov.**

= *Thielavia savoryi* Booth, *Commonw. Mycol. Inst. Mycol. Pap.* 85:3.1961. (Basionym).

= *Coniochaetidium savoryi* (Booth) Malloch & Cain, *Can. J. Bot.* 49: 880. 1971. = *Germisditospora* Lodha, in: *Taxonomy of Fungi* (CV Subramanian, ed) 250, 1978. type: *Germisditospora savoryi* (Booth) Lodha (IMI 076253b)

Key to *Paraconiochaeta* species.

1. Asci 8-spored 2
- 1' Asci 4-spored 3
2. Ascospores discoid; phallic anamorph present *P. discoidea*
- 2' Ascospores ellipsoidal; anamorph absent *P. punctulata*
3. Ascospores smooth under light microscopy, finely pitted under scanning electron microscopy *P. savoryi*
- 3' Ascospores conspicuously ornamented with circular to elongate pits, up to 5 µm long *P. tetraspora*

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Natalia Sastre and Marta Remeu for the collection of the soil samples. The first author is grateful for the fellowship grants from Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Spain).

LITERATURE CITED

- Arx JA von. 1973. Ostiolate and nonostiolate Pyrenomycetes. Proc K Ned Akad Wet Amsterd C 76:289-296.
- . 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd ed. Vaduz: J Cramer 424 p.
- Booth C. 1961. Studies of Pyrenomycetes: VI. *Thielavia*, with notes on some allied genera. Mycol Pap 83:1-15.
- Guarro J, Gené J, Al-Bader SM, Abdullah SK. 1997. A new species of *Coniochaetidium* from soil. Mycoscience 38: 123-125.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8th ed. Wallingford, UK: International Mycological Institute, CAB International. 616 p.
- Kornerup A, Wanscher JH. 1984. Methuen handbook of colour. 3rd ed. London: Eyre Methuen. 252 p.
- Lodha BC. 1978. Generic concepts in some Ascomycetes occurring on dung. In: Subramanian CV, ed. Taxonomy of fungi (Proc. Inter. Semp. Taxonomy of Fungi. Univ. Madras. 1970). Madras: Univ. Madras. Part 1, p 241-257.
- Malloch D, Cain RF. 1971. New cleistothecial Sordariaceae and a new family, Coniochaetaceae. Can J Bot 49:869-880.
- Stehlig AM, Cano J, Guarro J. 1998. A new *Gelasinospora* from Argentinian soil. Mycol Res 102:1405-1408.
- Udagawa S-I, Furuya K. 1979. *Poroconiochaeta*, a new genus of the Coniochaetaceae. Trans Mycol Soc Japan 20:5-12.

4.4. Dos nuevas especies del género *Sphaerodes*

D. García, A. M. Stchigel and J. Guarro. 2004. Two new species of *Sphaerodes* from Spanish soils. *Studies in Mycology* 50: 63-68.

Two new species of *Sphaerodes* from Spanish soils

Dania García¹, Alberto M. Stchigel² and Josep Guarro^{2*}

¹Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", calle 1 esq.2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La Habana, Cuba; ²Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Tarragona, Spain.

*Correspondence: J. Guarro, josep.guarro@urv.net

Abstract: The two new species, *Sphaerodes quadrangularis* and *Sphaerodes tenuissima*, isolated from soil in Spain, are described and illustrated. The former can be easily distinguished from the other species of the genus by the peculiar polygonal section of their ascospores. The most noteworthy feature of *Sphaerodes tenuissima* is the smooth-walled appearance of its ascospores, which is unusual in the genus. The new combinations *Sphaerodes ellipsozona*, *Sphaerodes levita*, and *Sphaerodes singaporensis* are proposed and a key to the accepted species of the genus is provided.

Taxonomic novelties: *Sphaerodes quadrangularis* D. García, Stchigel & Guarro sp. nov., *Sphaerodes tenuissima* D. García, Stchigel & Guarro sp. nov., *Sphaerodes ellipsozona* (Takada) D. García, Stchigel & Guarro comb. nov., *Sphaerodes levita* (Udagawa & Cain) D. García, Stchigel & Guarro comb. nov., *Sphaerodes singaporensis* (Morinaga, Minoura & Udagawa) D. García, Stchigel & Guarro comb. nov.

Key words: *Ceratostomataceae*, *Microthecium*, soil-borne fungi, *Sphaerodes*.

INTRODUCTION

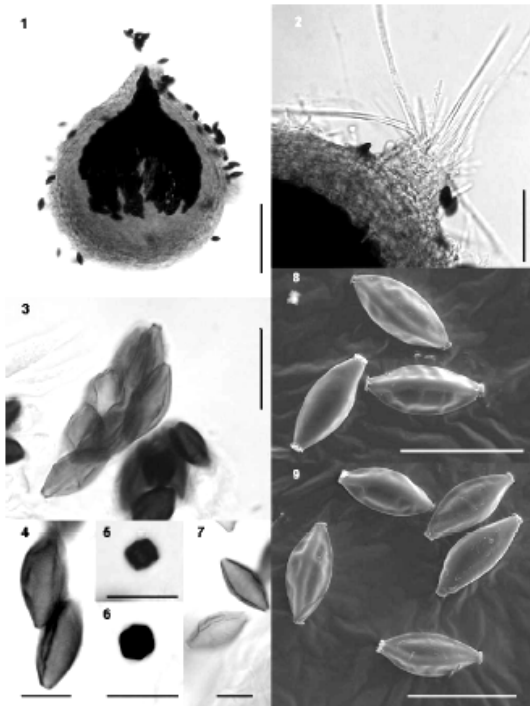
The genera *Melanospora* Corda, *Microthecium* Corda, and *Sphaerodes* Clem. of the family *Ceratostomataceae* (*Hypocreales*) are morphologically very close to each other. They have been differentiated by the presence or not of ascomatal ostioles, the ornamentation of the ascospores, and the structure of the germ pores. Cannon & Hawksworth (1982) reviewed these genera and considered the smooth-walled ascospores with depressed germ pores as exclusive features of *Melanospora*. Consequently, *Microthecium* was considered as synonym. However, the species of *Microthecium* with reticulate ascospores were transferred to *Sphaerodes*. According to this point of view, the genus *Sphaerodes* would currently comprise eight species, characterized by non-ostiolate ascomata (if they are ostiolate they have a short neck surrounded by a crown of hyaline setae) and reticulate ascospores, umbonate at both ends, and with tuberculate germ pores, whose walls support a net-like growth (Cannon & Hawksworth 1982). Recently, Zang & Blackwell (2002) studied the molecular phylogeny of *Melanospora* and related genera; their results showed that *Melanospora* and *Sphaerodes* have a common phylogenetic origin, forming a basal clade within the *Hypocreales*. However, we agree with Eriksson *et al.* (2003) in that further studies are required to decide if both genera should be accepted as different or not. The reduced number of strains included in the analyses by Zang & Blackwell (2002) does not allow us to make a more general conclusion.

During a continuous survey of soil ascomycetes from Spain, two interesting species of *Sphaerodes* were found. Their morphological characteristics differentiated them from all known species of the genus, and therefore they are described here as new. In addition, three new combinations are proposed and discussed.

MATERIAL AND METHODS

The soil samples were collected in different forays (1998–2001) in two Spanish nature reserves. One was in the Valle Tejerua, in the Muniellos Biosphere Reserve, in Asturias Province. It is at 680 m above sea level and surrounded by mountains of more than 1400 m. The annual temperature range is 6–10 °C and the annual precipitation 1400–1700 mm. Oakwoods, composed mainly by *Quercus petraea* (Matthuschka) Liebl., *Quercus robur* L., and *Quercus × rosacea* Bechst., are the predominant vegetation; the arboreal levels are represented also by *Corylus avellana* L., *Fagus sylvatica* L., *Ilex aquifolium* L., and *Populus* spp. The second area studied was the Umbria de Peña Apartada in Sierra de Espuña, Murcia Province, located at 700–1400 m above sea level. This region is a humidity island in the middle of the half-desert climate, the annual temperature ranges from 13–18 °C and the annual precipitation ranges from 310–500 mm.

GARCIA ET AL.



Figs 1–9. *Sphaerodes quadrangularis* (FMR 8049). 1. Ascoma. 2. Detail of the neck. 3. Mature asci. 4–9. Ascospores. 5, 6. Ascospores observed in transversal section. 8, 9. Ascospores (SEM). Scale bars: 1 = 100 μm , 2 = 50 μm , 3, 5, 6, 8, 9 = 20 μm , 4, 7 = 10 μm .

The vegetation is dominated by pinewoods composed mainly of *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinaster* Aiton, and *Pinus nigra* Link. In addition, *Quercus rotundifolia* Lam., *Quercus faginea* Tenore, and *Sorbus aria* Crantz are frequently interspersed with the pinewoods. The methods used for sampling, isolation and morphological study of the fungal isolates were described previously (García *et al.* 2002). Colour notations in parenthesis are from Komerup & Wanscher (1984) (M. = Methuen). Reference strains included in the study were provided by NBRC (Biological Resource Centre, National Institute of Technology and Evaluation; Chiba, Japan).

TAXONOMY

Sphaerodes quadrangularis D. García, Stchigel & Guarro, sp. nov. MycoBank MB500012. Figs 1–11, 29.

Etymology: *quadrangularis* (L) quadrangular; referring to the most frequent shape of ascospores in transverse section.

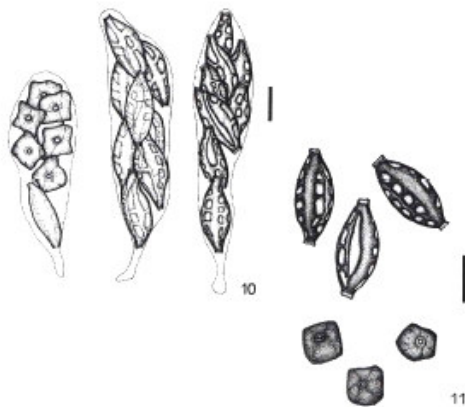
Mycelium ex hyphis hyalinis vel dilute flavo-brunneis, septatis, ramosis, anastomosantibus, laevibus, 2–6 μm diam compositum. Ascomata superficialia vel immersa, dispersa vel in catervis parvis aggregata, pyriformia vel subglobosa, ostiolata, flavo-brunnea, 190–220 μm longa, 135–180 μm diam. Collum conicum, (40–)50–60 μm longum, 65–90 μm latum ad basim, setosum. Peridium membranaceum, 5–10 stratis compositum, 40–55 μm crassum, textura angulari, setosum, setae rectae vel parum curvae, hyalinae vel dilute flavae, crassitunicatae, 82–150 μm longae, 6–10 μm latae ad basim, septatae. Asci 8-sporei, ovoidei vel clavati, 70–90 \times 20–22 μm , superne late rotundati, brevistipitati, tenuitunicati, evanescentes. Paraphyses nullis. Ascospores unicellulares, irregulariter biseriatae, primum hyalinae, deinde brunneae vel atrobunneae, crassitunicatae, fusiformes, 23–28(–30) \times 10–12 μm , reticulatae, costis protrudentibus, e polo visae polygonales, utrinque umbonatae, foramine germinali praeditae. Status conidialis nullus.

Mycelium composed of hyaline to pale yellowish brown, septate, branched, smooth-walled hyphae, 2–6 μm diam. *Ascomata* superficial to immersed, scattered or aggregated in small groups, pyriform to subglobose, ostiolate, with a conical neck, yellowish brown to black due to mass of mature ascospores, 190–220 high μm , 135–180 μm diam. *Neck* short, conical (40–)50–60 μm long, 65–90 μm wide at the base, surrounded by an upright crown of setae, 45–200(–300) \times 5–7 μm . *Peridium* membranaceous, 5–10-layered, 40–55 μm thick, translucent, pale yellow to yellowish brown, with *textura angularis*, composed by polygonal cells of 15–25 μm diam, setose; setae straight, hyaline to pale yellow, thick-walled, 82–150 \times 6–10 μm . *Asci* 8-spored, ovoid to clavate, 70–90 \times 20–22 μm , rounded at the apex, without apical structures, short stipitate, thin-walled and evanescent. *Paraphyses* absent. *Ascospores* 1-celled, irregularly biseriate, at first hyaline becoming brown to dark brown, thick-walled, fusiform, 23–28(–30) \times 10–12 μm , reticulate, with 4–6 prominent longitudinal ribs, polygonal in transversal section, with a strongly umbonate germ pore at each end. *Anamorph* unknown.

Cultural characteristics: Colonies on PCA growing rapidly, attaining 50 mm diam after 14 d at room temperature (22–25 °C), flat, consisting of submerged mycelium and sparse aerial hyphae, granulose and dark brown (M. 6F7) due to production of abundant ascomata; reverse brown (M. 6E5). Colonies on OA and MEA growing rapidly, attaining 85–90 mm diam after 14 d at room temperature, granulose and dark brown due the production of abundant ascomata (M. 6F7). At 15 °C restricted growth on PCA, but growing rapidly on OA and MEA attaining 76–90 mm diam after 14 d in both media, ascomata abundantly produced. At 35 °C no growth.

Specimen examined: Spain, Asturias, Muniellos Biosphere Reserve, Valle Tejerua, soil, 25 Jun. 1998, A.M. Stchigel & M. Caldach, holotype FMR 8049, culture ex-type CBS 112763.

Notes: *Sphaerodes quadrangularis* is morphologically similar to *S. fimicola* (E.C. Hansen) P.F. Cannon & D. Hawksw. and *S. micropertusa* Y. Horie, Udagawa & P.F. Cannon. The two latter species also have ostiolate ascomata and coarsely reticulate ascospores with strongly umbonate germ pores (Cannon & Hawksworth 1982, Horie *et al.* 1986). However, *S. quadrangularis* is easily distinguished by its polygonal section, which is circular in the other two species.



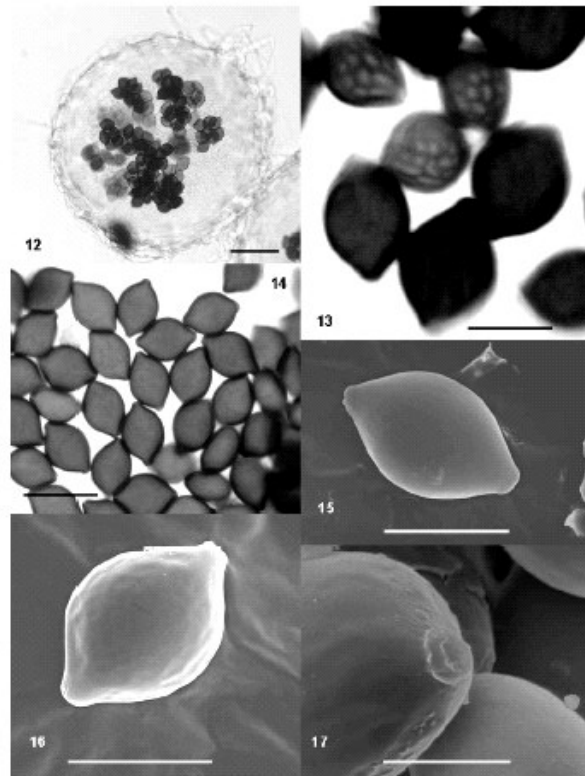
Figs 10–11. *Sphaerodes quadrangularis* (FMR 8049). 10. Asci. 11. Ascospores. Scale bars = 10 μ m

Sphaerodes tenuissima D. García, Stchigel & Guarro, sp. nov. MycoBank MB500013. Figs 12–20, 32.

Etymology: *tenuis* (L) fine; referring to the inconspicuous ornamentation of the ascospores wall.

Mycelium ex hyphis hyalinis vel dilute flavo-brunneis, septatis, ramosis, anastomosantibus, laevibus, 2–8 μ m diam compositum. Ascomata superficialia vel immersa, dispersa vel in catervis parvis aggregata, globosa vel subglobosa, non-ostiolata, pallide flavo-brunnea, 52–120 μ m alta, 50–95 μ m diam. Peridium membranaceum, e 3–5 stratis compositum, 10–20 μ m crassum, textura angulari, glabrum vel leniter setosum; setae rectae vel parum curvae, 60–125 μ m longae, 3–7 μ m latae ad basim, hyalinae vel dilute flavo-brunneae, distanter septatae, crassitunicatae. Asci 8-sporei, clavati, 40–55 \times 20–25 μ m, superne late rotundati, brevistipitati, tenuitunicati, evanescentes. Paraphyses nullis. Ascosporeae unicellulares, irregulariter biseriatae, primum hyalinae, deinde brunneae vel atrobrunneae, crassitunicatae, leniter compressae, 19–23 \times (12–)14–15 (–17) \times 10–13 μ m, citrifformes, e latere visae ellipsoideae, tenuiter reticulatae, utrinque umbonate, foramine germinali utrinque praeditae. Status conidialis nullus.

TWO NEW SPECIES OF SPHAERODES FROM SPANISH SOILS



Figs 12–17. *Sphaerodes tenuissima* (FMR 8048). 12. Ascoma with asci. 13, 14. Ascospores. 15–17. Ascospores (SEM). 17. Detail of a pore of an ascospore. Scale bars: 12 = 50 μ m, 13, 15, 16 = 10 μ m, 14 = 20 μ m, 17 = 5 μ m.

Mycelium composed of hyaline to pale yellowish brown, septate, branched, smooth-walled hyphae, 2–8 μ m diam. Ascomata superficial to immersed, scattered or aggregated in small groups, globose to black due to ascospores mass, 52–120 μ m high, 50–95 μ m diam. Peridium membranaceous, 3–5-layered, 10–20 μ m thick, translucent, pale yellow to yellowish brown, with *textura angularis*, composed by polygonal cells of 16–30 μ m diam, glabrous to slightly setose, setae upright to slightly curved, 60–125 μ m long, 3–7 μ m diam at base, hyaline to pale yellowish brown, remote septate or non-septate, thick-walled. Asci 8-spored, clavate, 40–55 \times 20–25 μ m, rounded at the apex, without apical structures, short stipitate, thin-walled and evanescent. Paraphyses absent. Ascospores 1-celled, irregularly biseriata, at first hyaline becoming brown to dark brown, thick-walled, slightly bilaterally flattened, 19–23 \times (12–)14–15 (–17) \times 10–13 μ m, citriform, ellipsoidal in lateral view, apparently smooth under light microscopy, apparently finely reticulated under scanning electron microscopy; with terminal, strongly apiculate germ pores at each end. Anamorph unknown.

GARCIA ET AL.

Cultural characteristics: Colonies on PCA growing rapidly, attaining 90 mm diam in 14 d at room temperature (22–25 °C), consisting of submerged mycelium and aerial hyphae, granulose and brown (M. 6E6) due to production of abundant ascomata; reverse greyish brown (M. 6D4). Colonies on OA and MEA growing rapidly, attaining 90 mm diam in 14 d at room temperature, dark brown due to the production of abundant ascomata (M. 6E7). At 15 °C growing rapidly on all media, attaining 65–90 mm diam in 14 d, with abundant aerial mycelia, ascomata abundantly produced. At 35 °C no growth.

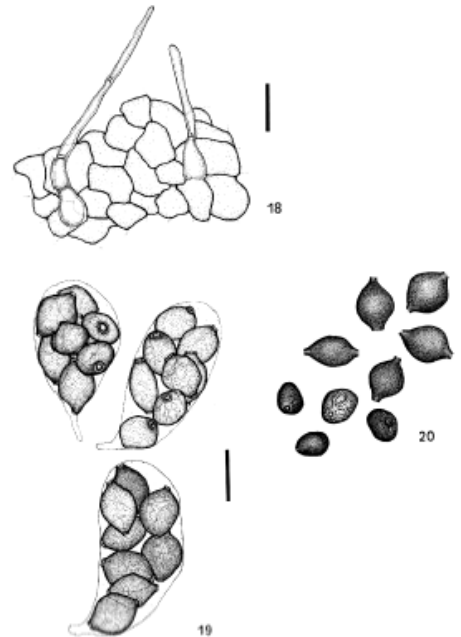
Specimen examined: Spain, Murcia, Sierra de Espuña Natural Reserve, Umbria de Peña Apartada, soil, 10 Oct. 2001, G. Sisó, holotype FMR 8048, culture ex-type CBS 112764.

Additional cultures examined: *Sphaerodes compressa* NBRC 8627, NBRC 8659, and NBRC 30249.

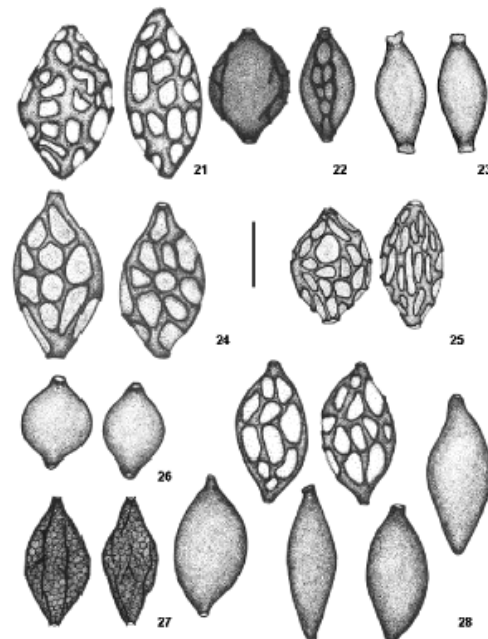
Notes: *Sphaerodes tenuissima* is morphologically similar to *Microthecium ellipsosporum* Takada, *M. levitum* Udagawa & Cain, and *Melanospora singaporensis* Morinaga, Minoura & Udagawa. They all have smooth ascospores with strongly umbonate ends. *Microthecium ellipsosporum* can be easily differentiated from *S. tenuissima*, because *M. ellipsosporum* has fusiform ascospores (Takada 1973). *Microthecium levitum* and *M. singaporensis* have citriform ascospores, but they are smaller (10–17 × 8–12 µm and 16–18 × 6–7 µm, respectively) (Udagawa & Cain 1969, Morinaga et al. 1978) than those of *S. tenuissima*. The inconspicuous ornamentation of the ascospores of *S. tenuissima* is similar to *S. compressa* (Udagawa & Cain) P.F. Cannon & D. Hawksw. However, the ascospores of the latter are bilaterally flattened and their narrower sides are coarsely reticulate (Udagawa & Cain 1969, Cannon & Hawksworth 1982). In addition, *S. compressa* has a phialidic anamorph while in *S. tenuissima* the anamorph is absent.

Several species of *Ceratostomataceae*, such as *M. levitum*, *M. ellipsosporum*, and *M. singaporensis*, have smooth ascospores with tuberculate germ pores, which can be considered as intermediate between *Melanospora* and *Sphaerodes*. In spite of this, Cannon & Hawksworth (1982) have maintained them in their original genera. We agree with Zhang & Blackwell (2002) who on the basis of molecular studies concluded that in *Ceratostomataceae* ascospore shape and the structure of the germ pores are more informative characters than wall ornamentation. Therefore, the presence of reticulate walls is not considered a distinctive character of *Sphaerodes*. This is corroborated by the fact that within a given species, e.g. *S. perplexa*, both types of ascospores, smooth and reticulate, are present (Fig. 28). Accordingly, and emphasising the presence of tuberculate

germ pores as a key feature in *Sphaerodes*, the following new combinations are proposed:



Figs 18–20. *Sphaerodes tenuissima* (FMR 8048). 18. Detail of peridium. 19. Asci with ascospores. 20. Ascospores. Scale bars 18, 19 = 20 µm, 20 = 10 µm.



Figs 21–28. Ascospores of *Sphaerodes*. 21. *S. beatonii*. 22. *S. compressa*. 23. *S. ellipsospora*. 24. *S. episphaeria*. 25. *S. fimicola*. 26. *S. levita*. 27. *S. micropertusa*. 28. *S. perplexa*. Scale bar = 10 µm.

TWO NEW SPECIES OF *SPHAERODES* FROM SPANISH SOILS

Sphaerodes ellipsospora (Takada) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** MycoBank MB500014. Fig. 23.

Basionym: *Microthecium ellipsosporum* Takada, Bull. N. S. Museum. 16: 527. 1973.

Culture examined: NBRC 31376 (culture ex-holotype).

Sphaerodes levita (Udagawa & Cain) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** MycoBank MB500015. Fig. 26.

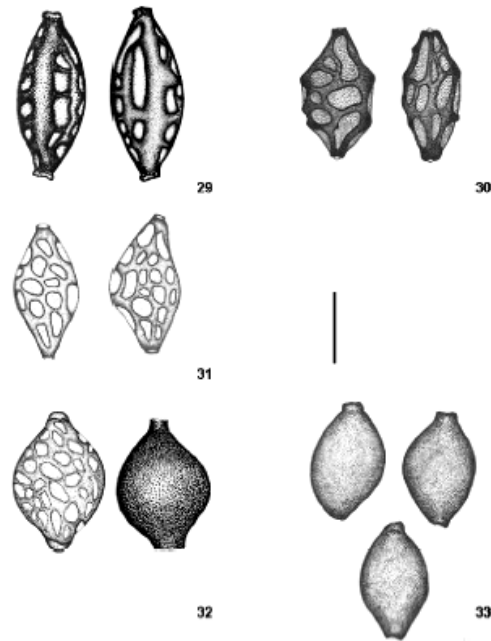
Basionym: *Microthecium levitum* Udagawa & Cain, Can. J. Bot. 47: 1917. 1969.

Culture examined: NBRC 8204 and NBRC 33029.

Sphaerodes singaporensis (Morinaga, Minoura & Udagawa) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** MycoBank MB500016. Fig. 32.

Basionym: *Melanospora singaporensis* Morinaga, Minoura & Udagawa Trans. Mycol. Soc. Japan 19: 142. 1978.

Culture examined: NBRC 30865 (culture ex-holotype).



Figs 29–33. Ascospores of *Sphaerodes*. 29. *S. quadrangularis*. 30. *S. retispora* var. *retispora*. 31. *S. retispora* var. *inferior*. 32. *S. tenuissima*. 33. *S. singaporensis*. Scale bar = 10 μ m.

Key the species of *Sphaerodes*

- 1. Ascomata ostiolate.....2
- 1. Ascomata non-ostiolate.....5
- 2. Ascospores coarsely reticulate3
- 2. Ascospores smooth-walled, strongly umbonate at both ends, 15–18 \times 9–11 μ m..... *S. singaporensis* (Fig. 33)
- 3. Ascospores fusiform4
- 3. Ascospores citriform, 14–26 \times 10–17 μ m..... *S. finicola* (Fig. 25)
- 4. Ascospores delicately pitted, circular in 2 \times transverse section, 18–22(–28) \times 9–11(–13) \times 8–9 μ m.....
..... *S. micropertusa* (Fig. 27)
- 4. Ascospores reticulate, polygonal in 2 \times transverse section, 23–28 \times 10–12 \times 8–10 μ m.....
..... *S. quadrangularis* (Fig. 29)
- 5. Ascospores longer than 20 μ m.....6
- 5. Ascospores shorter than 20 μ m9
- 6. Asci 8-spored.....7
- 6. Asci 4-spored.....8
- 7. Ascospores coarsely reticulate, 25–34 \times 12–18 μ m *S. episphaeria* (Fig. 24)
- 7. Ascospores with indistinct reticulation, 19–23 \times 12–17 μ m..... *S. tenuissima* (Fig. 32)
- 8. Ascospores (25–)28–34 \times 14–16(–18) μ m; coarsely reticulate *S. beatonii* (Fig. 21)
- 8. Ascospores 22–28 \times 12–15 \times 9–11 μ m; both types of ascospores, smooth
and reticulate, present in a single strain *S. perplexa* (Fig. 28)

GARCIA ET AL.

9. Ascospores smooth, umbonate, and with a tuberculate germ pore at each end.....10
9. Ascospores reticulate11
10. Ascospores citriform, 10–17 × 8–12 × 9–10 μm; phialidic anamorph present *S. levita* (Fig. 26)
10. Ascospores fusiform, 16–18 × 6–8 μm; anamorph absent *S. ellipsozona* (Fig. 23)
11. Ascospores reticulate 12
11. Ascospores smooth and with a narrower sides reticulate *S. compressa* (Fig. 22)
12. Ascospores prominently reticulated..... *S. retispora* var. *retispora* (Fig. 30)
12. Ascospores inconspicuously reticulated *S. retispora* var. *inferior* (Fig. 31)

ACKNOWLEDGEMENTS

The senior author is grateful for the fellowship grant from Universitat Rovira i Virgili (Tarragona), Spain. The authors are indebted to the curators of the NBRC for providing strains and to the Consejería de Agricultura of Principado de Asturias, Spain, for permission to collect soil samples. This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grant CGL 2004-00425/BOS.

REFERENCES

Cannon PF, Hawksworth DL (1982). A re-evaluation of *Melanospora* Corda and similar *Pyrenomyces*, with a revision of the British species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 84: 115–160.
Eriksson OE, Baral HO, Curah RS, Hansen K, Kurtzman CP, Rambold G, Læssøe T (2003). Notes on ascomycetes systematics. *Mycotax* 9: 91–103.

García D, Stchigel AM, Guarro J (2002). A new species of *Syspastospora* from tropical soils. *Mycologia* 94: 862–865.
Horie Y, Udawaga S, Cannon PF (1986). Four new Japanese species of the *Ceratostomataceae* (*Ascomycetes*). *Mycotax* 25: 229–245.
Kornerup A, Wanscher JH (1984). *Methuen handbook of colour*. 3rd ed. Eyre Methuen, London.
Morinaga T, Minoura K, Udagawa S (1978). New species of microfungi from southeast Asian soil. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 19: 135–148.
Takada M (1973). Mycological reports from New Guinea and the Salomon Islands 20. Notes on soil-borne ascomycetes. *Bulletin of the National Science Museum Tokyo, Japan* 16: 529–531.
Udagawa S, Cain RF (1969). Notes on the genus *Microthecium*. *Canadian Journal of Botany* 47: 1915–1933.
Zhang N, Blackwell M (2002). Molecular phylogeny of *Melanospora* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycological Research* 106: 148–115.

4.5. *Coronatomyces cubensis* gen. et. sp. nov., un nuevo ascomiceto de Cuba

D. García, A.M. Stchigel, J. Cano, and J. Guarro. 2004. *Coronatomyces cubensis* gen. et. sp. nov., a new ascomycete from Cuban soil. *Studies in Mycology* 50: 143-148.

Coronatomyces cubensis gen. et sp. nov., a new ascomycete from Cuban soil

Dania García^{1,2}, Alberto M. Stchigel¹, José Cano¹ and Josep Guarro^{1*}

¹Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Tarragona, Spain; ²Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La Habana, Cuba

*Correspondence: Josep Guarro, umb@fnics.urv.es

Abstract: The new ascomycete *Coronatomyces cubensis* gen. et sp. nov., isolated from Cuban soil and characterized by ostiolate or non-ostiolate, setose ascomata and one-celled, thick-walled, dark brown, and ellipsoidal ascospores, with a single germ pore at the umbonate base, is described and illustrated. Molecular studies were performed on the internal transcribed spacer (ITS1, ITS2) and the 5.8S gene to investigate the relationships of this new taxon with other members of *Sordariales*.

Taxonomic novelties: *Coronatomyces* D. García, Stchigel & Guarro gen. nov., *Coronatomyces cubensis* D. García, Stchigel & Guarro sp. nov.

Key words: *Ascomycota*, soil-borne fungi, *Sordariales*.

INTRODUCTION

During the course of a survey of soil ascomycetes in Cuba, an undescribed ascomycete was isolated from a soil sample from Ciénaga de Zapata (Matanzas province). This fungus is characterised by ostiolate or non-ostiolate ascomata and thick- and smooth-walled, dark brown, opaque, ellipsoidal ascospores, which have a wide germ pore at the umbonate base. This taxon was easily recognized as belonging to the *Sordariales*, although its inclusion in any particular family was difficult. This fungus is described here as a new genus and compared with morphologically similar taxa.

MATERIAL AND METHODS

Sample origin and fungal isolation

Soil samples were collected in Cuba, Ciénaga de Zapata region, UNESCO Biosphere Reserve. This is a peculiar region due to its high percentage of endemic, rare and endangered organisms. The reserve is located South of Matanzas, at –2 to 10 m above sea level. The annual average temperature is 24–26 °C. The major ecosystem types are mangrove and swamp forest. Representative species in the mangrove forest are *Avicennia germinans* L., *Conocarpus erectus* L., *Laguncularia racemosa* Gaertn. and *Rhizophora mangle* L. The swamp forest is dominated by *Bucida buceras* L., *Calophyllum antillanum* Britton, *Rauwolfia cubana* A. DC. and *Tabebuia angustata* Britton.

The methods used for sampling, isolation, and for morphological study were previously described (Gar-

ría *et al.* 2002). Colour notations in parentheses are from Kornerup & Wanscher (1984).

Molecular methods

Techniques to isolate genomic DNA were as described by Solé *et al.* (2003). Briefly, DNA was extracted and purified directly from fungal colonies using the Fast DNA kitTM (Bio 101, Joshua Way, Vista California, U.S.A.). Fungal suspensions were vortexed with a FastPrep FP120 Instrument (Thermo Savant) to disrupt the fungal cells. The ITS-regions and 5.8S rDNA gene were amplified as described by Gené *et al.* (1996). The protocol used for sequencing was performed according to Solé *et al.* (2002). The sequence obtained was compared with those in the GenBank DNA database by using the BLAST programme (Altschul *et al.* 1997). A total of 17 strains representing *Chaetomiaceae*, *Chaetosphaeriaceae*, *Lasiochaetiaceae*, and *Sordariaceae* were used in the molecular study. These strains and their EMBL accession numbers are shown in Table 1. *Melanospora pascuensis* Stchigel & Guarro (*Ceratostomataceae*, *Hypocreales*) was used as out-group. Phylogenetic analyses using the Neighbour-joining (NJ) method (Saitou & Nei 1987) were performed with the MEGA 2.1 computer programme (Kumar *et al.* 2001) with the Kimura two-parameter distance model (Kimura 1980), including transitions and transversions and with pair wise deletion for the treatment of the handling gaps/missing data. Confidence values for individual branches were determined by bootstrap analyses (1000 pseudoreplicates).

GARCIA ET AL.

Table 1. Strains used in the molecular study.

| Strains ¹ | EMBL No. |
|--|-----------------------|
| <i>Apiosordaria nigeriensis</i> FMR 6363 | AJ458184 ³ |
| <i>Asordaria tenerifae</i> IMI 305078 | AJ630460 |
| <i>Cercophora appalachianensis</i> | AF177155 ² |
| <i>Chaetomium nigricolor</i> FMR 5737 | AJ458185 ³ |
| <i>Coronatomyces cubensis</i> FMR 7132 | AJ458184 |
| <i>Corynascus sepedonium</i> FMR 5593 | AJ458186 ³ |
| <i>Gelasinospora bonaerensis</i> IMI 37 5099 | AJ002029 ³ |
| <i>Gelasinospora nigeriensis</i> FMR 5963 | AJ002400 ³ |
| <i>Melanocarpus thermophilus</i> FMR 6190 | AJ271586 ³ |
| <i>Melanopsammella chloroconia</i> | AF178542 ² |
| <i>Melanospora pascuensis</i> FMR 6367 | AJ011312 ³ |
| <i>Neurospora africana</i> FGSC 1740 | AF388913 ² |
| <i>Neurospora crassa</i> | M13906 ² |
| <i>Sordaria alcina</i> IMI 267236 | AJ630459 |
| <i>Sordaria macrospora</i> | AF246293 ² |
| <i>Striatosphaeria codinaeophora</i> | AF178546 ² |
| <i>Thielavia hircaniae</i> CBS 773.85 | AJ271581 ³ |

¹CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht; GSC, Fungal Genetic Stock Center, Kansas; FMR, Culture Collection Facultat de Medicina, Reus; IMI, CABI Bioscience Genetic Resource Collection, Egham. ²Obtained from GenBank. ³Previously sequenced by us.

TAXONOMY

Coronatomyces D. García, Stchigel & Guarro, **gen. nov.** MycoBank MB500037.

Etymology: *coronatus* (Latin) crowned; *mykes* (Greek) fungi, referring to the crown of straight and short setae, which surrounding the neck.

Ascomata pyriformia vel globosa, ostiolata vel non ostiolata, setosa. Asci unitunicati, clavati vel cylindrici, brevistipitati, fasciculati, structura apicalis absens, evanescentes. Paraphyses evanescentes. Ascospores unicellulares, uniseriatae vel biseriatae, atrobunneae vel nigrae, glabrotunicatae, obovatae vel late ellipsoideae, cum foramine germinali basilari. Status conidialis ignotus.

Typus: *Coronatomyces cubensis* D. García, Stchigel & Guarro sp. nov.

Ascomata pyriform to globose, ostiolate or non-ostiolate, scattered to aggregate, superficial to immersed, non-stromatic, setose. *Peridium* membranaceous, composed of several layers of cells. *Asci* unitunicate, clavate to cylindrical, short-stipitate, fasciculate, without distinct apical structures, evanescent. *Paraphyses* filiform, thin, unbranched, evanescent. *Ascospores* 1-celled, uniseriate to biseriatae, dark brown to black, opaque at maturity, smooth-walled, obovate to broadly ellipsoidal, slightly pointed at the

apex and with a wide germ pore at the umbonate base. *Anamorph* unknown.

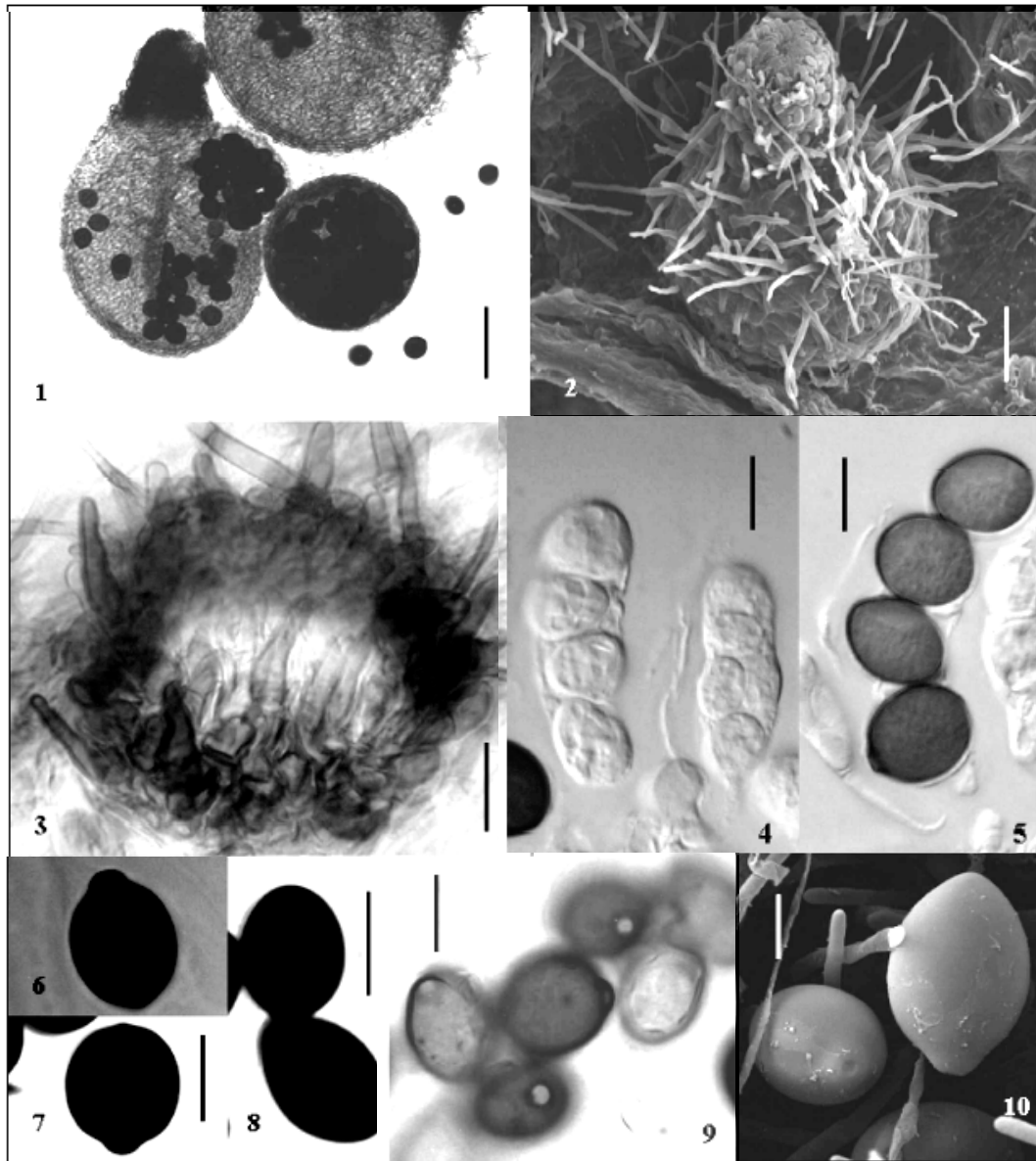
Coronatomyces cubensis D. García, Stchigel & Guarro, **sp. nov.** MycoBank MB500038. Figs 1–15.

Etymology: *cubensis* = from Cuba; referring to the origin of the isolate.

Mycelium ex hyphis hyalinis, simplicibus vel ramosis, septatis, anastomosantibus, 0.5–3 µm diam. Coloniae in agaro cum decocto tuberum et carotum (PCA) planae, granulosa, radiatae, brunneae. Ascomata dispersa vel aggregata, superficialia vel immersa, pyriformia vel globosa, ostiolata vel non ostiolata, 180–240 × 125–210 µm (non ostiolata 70–80 µm diam), translucida, atrobunneae vel nigra propter ascospores acervatas, setosa. Setae atrobunneae, rectae vel late curvae, septatae, crassitunicatae. Collum atrobunneum, papillatum, subconicum, 20–45 µm longum, 40–54 µm latum ad basim setis coronatum. *Peridium* membranaceum, e 3–5 stratis compositum, griseo-brunneum vel brunneum, translucidum, textura intricata. *Asci* 2- vel 8-sporei, unitunicati, clavati vel cylindrici, brevistipitati, 39–69(–75) × 11–25 µm, fasciculati, superne rotundati, structura apicalis absens, evanescentes. *Paraphyses* evanescentes. *Ascospores* unicellulares, uniseriatae vel biseriatae, primum hyalinae, deinde brunneae vel nigrae, crassitunicatae, glabrotunicatae, obovatae vel late ellipsoideae, 13–17(–19) × (10–)11–13(–15) × (7–)8–11(–13) µm, foramine germinali basilari, 1.5–3 µm diam. Status conidialis ignotus.

Mycelium mainly submerged, composed of hyaline, branched and unbranched, septate, anastomosing, 0.5–3 µm broad hyphae. *Ascomata* scattered or aggregated, superficial to immersed, pyriform to globose, ostiolate with a short conical neck or non-ostiolate, 180–240 × 125–210 µm (70–80 µm diam if non-ostiolate), translucent, appearing dark brown to black due to the mass of ascospores, setose. *Setae* dark brown, straight to slightly curved, septate, thick-walled, 30–83(–104) µm long, 2–4 µm wide at the base. *Neck* dark brown, papillate, sub-conic, 20–45 µm long, 40–54 µm wide at the base, surrounded by a crown of upright setae; setae septate, dark brown, 11–23 µm long, 2–4 µm wide at the base. *Peridium* membranaceous, 3–5-layered, greyish brown to brown, translucent, outer layer of *textura intricata*; inner layer of *textura angularis*, composed by polygonal cells of 5–10 µm diam. *Asci* 2- to 8-spored, unitunicate, clavate to cylindrical, short-stipitate, thin-walled, 39–69(–75) × 11–25 µm, fasciculate, rounded at the tip and without apical structures, evanescent. *Paraphyses* filiform, thin, 35–40 × 0.5–1.5 µm unbranched, evanescent.

CORONATOMYCES CUBENSIS GEN. ET SP. NOV.



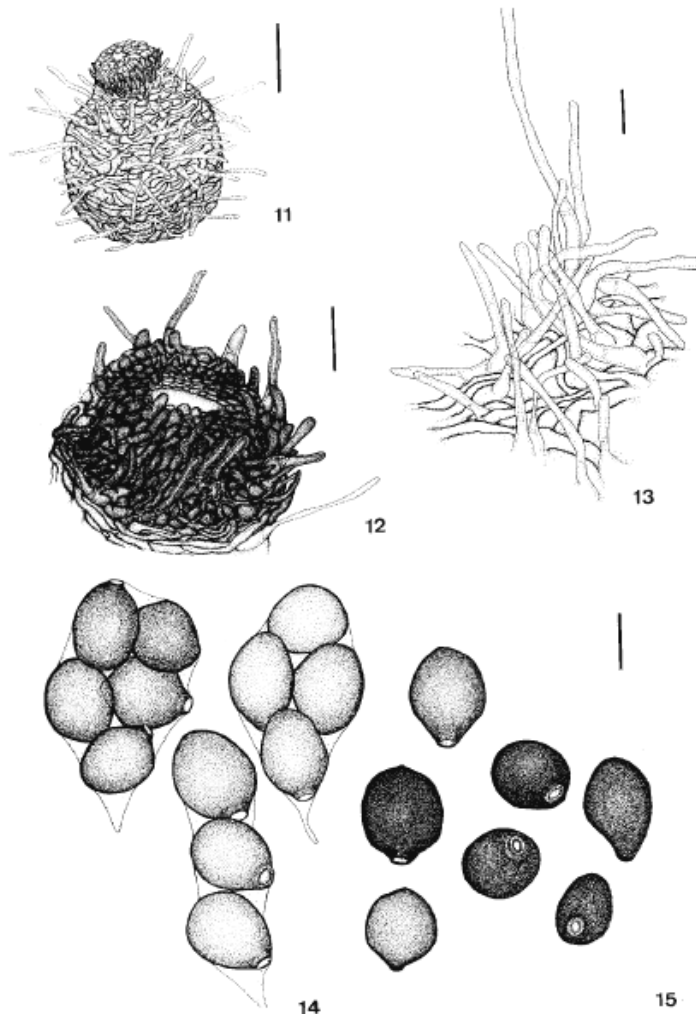
Figs 1–10. *Coronatomyces cubensis* (FMR 7132). 1. Ascomata. 2. Ascoma (SEM). 3. Detail of the neck. 4, 5. Asci and ascospores. 6–9. Ascospores. 10. Ascospores (SEM). Scale bars: 1 = 50 μm , 2 = 20 μm , 3–9 = 10 μm , 10 = 5 μm .

Ascospores 1-celled, uniseriate to biseriate, at first hyaline, becoming brown to black and opaque at maturity, thick-walled, smooth, obovate to broadly ellipsoidal, 13–17(–19) \times (10–)11–13(–15) \times (7–)8–11(–13) μm , slightly apiculate at the apex and umbonate at the base, with a protruding, basal germ pore; 1.5–3 μm diam.

Anamorph absent.

Cultural characteristics: Colonies at room temperature (22–25 $^{\circ}\text{C}$) were incubated under 12 h of darkness alternating with 12 h of cool white fluorescent light. Colonies on PCA attaining a diam of 45–46 mm in 14 d at room temperature, flat, granulose due to production of abundant ascomata, appearing slightly radiate due to the disposition of the ascomata, dark brown (5F5); reverse brown (5E5).

GARCIA ET AL.



Figs 11–15. *Coronatomyces cubensis* (FMR 7132). 11. Ascoma. 12. Detail of the neck. 13. Detail of the peridium. 14. Asci. 15. Ascospores. Scale bars: 11, 12 = 20 μm , 13–15 = 10 μm .

Colonies on oatmeal agar (OA) attaining a diam of 40–41 mm in 14 d at room temperature, flat, mycelium mainly submerged, brown (5F5), granulose, zonate and slightly radiate because of the uneven production of abundant ascomata; reverse brown (5F4). Colonies on OA attaining a diam of 13 mm in 14 d at 15 °C, flat, colourless; reverse colourless; ascomata not produced. Colonies on malt-extract agar (MEA) attaining a diam of 20–24 mm in 14 d at room temperature, composed of aerial and submerged mycelium, cottony, yellowish-brown (5D5); ascomata not produced. Colonies on MEA attaining a diam of 5–6 mm in 14 d at 15 °C; ascomata not produced. Colonies growing slowly at 35 °C on all media tested; ascomata not produced.

Specimen examined: Cuba, Matanzas Province, Ciénaga de Zapata, soil, 7 Dec. 1995, coll. R.F. Castañeda, **holotype** IMI 385316, **isotype** FMR 7132, culture ex-type CBS 109268.

Coronatomyces possesses several outstanding morphological features that make this taxon easy to identify. These are the setose, ostiolate ascomata (although non-ostiolate ascomata are also observed in culture) with a papillate neck, surrounded by a crown of short setae; a membranous peridium with an outer layer formed by closely interwoven hyphae; and opaque ascospores, with a wide, basal, protruding germ pore. These features are typical of members of *Sordariales*, although this combination of features in a single taxon has not previously been described in this order.

CORONATOMYCES CUBENSIS GEN. ET SP. NOV.

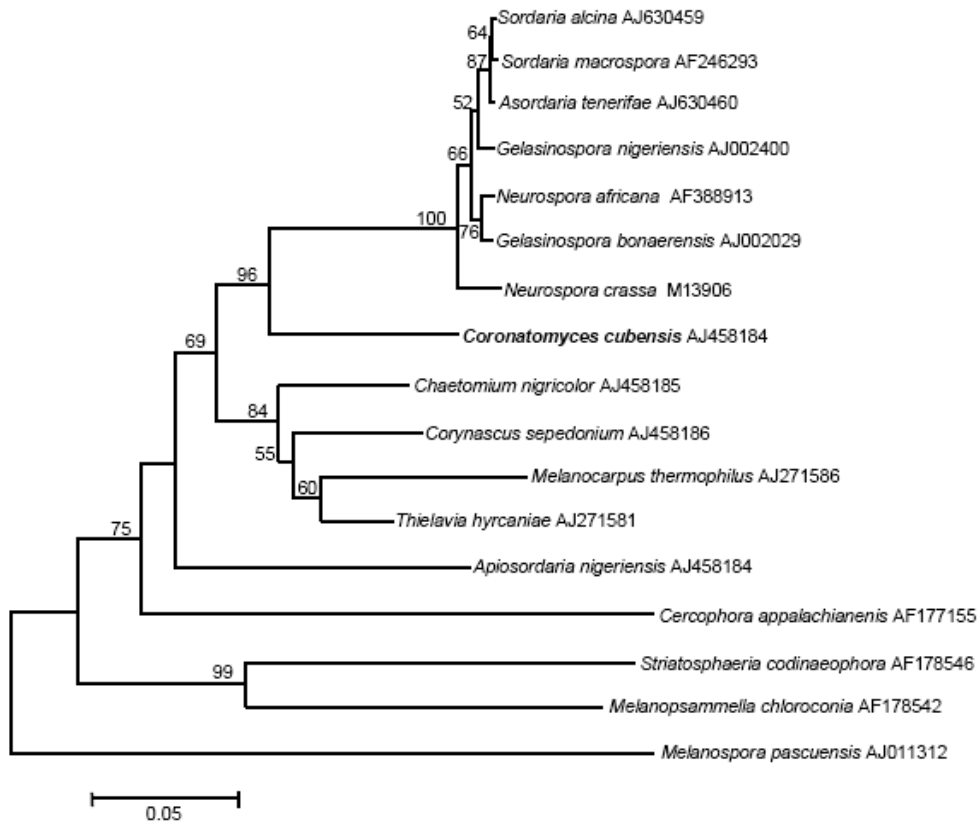


Fig. 16. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences from the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region and 5.8S rDNA gene of the 17 strains listed in Table 1. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap replication frequencies are indicated in the internodes.

A BLAST search comparison of the ITS sequences of the new taxon with the GenBank sequences showed that the closest species was *Strattonia insignis* (E.C. Hansen) Lundq. (*Lasiosphaeriaceae*) (97 % homology), although *Strattonia* Cif. emend. Lundq. is undoubtedly a very different genus characterized by 2-celled ascospores, with a hyaline lower cell. By contrast, *Coronatomyces cubensis* showed more morphological similarities with other members of the *Sordariaceae* and the *Lasiosphaeriaceae*.

The genera of *Sordariaceae* morphologically most similar to *Coronatomyces* are *Apodus* Malloch & Cain, *Asordaria* Arx, Guarro & Aa, and *Sordaria* Ces. & De Not. All three have dark, smooth ascospores with a basal germ pore. However, in the latter three genera the ascogonia have an outer layer of *textura angularis*, the asci are cylindrical with an apical ring and the ascospores are violently discharged (Udagawa & Ueda 1981, Guarro & von Arx 1987, von Arx *et al.* 1987, Barr 1990). Moreover, in *Sordaria*, the ascospores are surrounded by a gelatinous sheath.

Some members of the *Lasiosphaeriaceae* also have some morphological features similar to *Coronatomyces*. These are *Apodospora* Cain & Mirza, *Amiella* Jeng & J.C. Krug, *Bombardioidea* C. Moreau ex N. Lundq., *Arnim* Nits., *Emblemospora* Jeng & J.C. Krug, *Fimetariella* Lundq., and *Periamphispora* J.C. Krug. Similar to the new genus, all of them have 1-celled, darkly pigmented and opaque ascospores with one or more germ pores. However, they are differentiated from *Coronatomyces* by the presence of a bombardoid peridial wall or an outer layer formed by angular cells, and ornamented, sheathed or appendaged ascospores (Lundqvist 1972, Jeng & Krug 1976, 1977, Krug 1989, 1995). *Periamphispora* is the most similar to *Coronatomyces*, but the former has a centrum formed by abundant and septate paraphyses, which are longer than the asci and ascospores surrounded by a hyaline gelatinous sheath that can occasionally show irregular striations and rarely 1–2 apical pores (Krug 1989).

GARCIA ET AL.

To confirm our proposal and in order to clarify the taxonomic position of the new taxon, we performed a phylogenetic study based on sequences of the ITS regions. Fig. 16 shows the tree inferred from the analysis of the sequences of the 16 strains of *Sordariales*. Two main clades were observed. The first, which received a bootstrap support of 99 %, grouped the two members of *Chaetosphaeriaceae* [*Striatosphaeria codineophora* Samuels & E. Müll. and *Melanopsammella chloroconia* (W. Gams & Hol.-Jech.) Réblová, M.E. Barr & Samuels]. This clade was very distant from the other one that comprised members of the three families of *Sordariales* included in the study and the new genus, which received a bootstrap value of 75 %. The four genera representing the *Chaetomiaceae* [*Chaetomium nigricolor* L. M. Ames, *Corynascus sepedonium* (C.W. Emmons) Arx, *Melanocarpus thermophilus* (Abdullah & Al-Bader) Guarro, Abdullah & Al-Bader, and *Thielavia hircaniae* Nicot] formed a well-supported subclade (84 % bootstrap support), while the two members of the *Lasiochaetaceae* [*Apiosordaria nigeriensis* Stchigel & Guarro and *Cercophora appalachianensis* O. Hilber & R. Hilber] did not cluster together. *Coronatomyces* was closer to the members of the *Sordariaceae* (*Asordaria*, *Gelasinospora* Dowding, *Neurospora* Shear & B.O. Dodge, and *Sordaria*) (96 % bootstrap support) than to the *Chaetomiaceae* or to the two members of the *Lasiochaetaceae* included in the study. However, the new genus was placed in a separate branch very distant from members of the *Sordariaceae*. Although these data confirmed our proposed new genus its placement in a given family of the *Sordariales* was not resolved. It is probably due to the fact that the delineation of these families based either on morphological or on molecular criteria remains confused.

ACKNOWLEDGEMENTS

The senior author is grateful for fellowship grants from Universitat Rovira i Virgili of Spain. This study was also supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grant CGL 2004-00425/BOS.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang Z, Miller W, Lippman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3402.
- Arx JA von, Guarro J, Aa HA van der (1987). *Asordaria*, a new genus of the *Sordariaceae*, and a new species of *Melanocarpus*. *Persoonia* **13**: 263–272.
- Barr M (1990). Prodomus to nonlichenized, pyrenomycetous members of class *Hymenoascmycetes*. *Mycotaxon* **39**: 43–184.
- García D, Stchigel AM, Guarro J (2002). A new species of *Syspastospora* from tropical soils. *Mycologia* **94**: 862–865.
- Gené J, Guillamón JM, Guarro J, Pujol I, Ulfing 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.
- Guarro J, Arx JA von (1987). The ascomycete genus *Sordaria*. *Persoonia* **13**: 301–313.
- Jeng RS, Krug JC (1976). *Emblemospora*, a new genus of the *Sordariaceae*. *Canadian Journal of Botany* **54**: 1971–1976.
- Jeng RS, Krug JC (1977). *Arniella*, a new genus of the *Sordariaceae* with pitted ascospores. *Mycologia* **69**: 73–80.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Kornerup A, Wanscher, JH (1984). *Methuen handbook of colour*: 3rd ed. Eyre Methuen, London.
- Krug JC (1989). *Periamphispora*, a new genus of the *Sordariaceae*. *Mycologia* **81**: 475–479.
- Krug JC (1995). The genus *Fimetariella*. *Canadian Journal of Botany* **73**: 1905–1916.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001). *MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1*. Analysis software, Bioinformatics. Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium.
- Lundqvist, N. (1972). Nordic *Sordariaceae* s. lat. *Symbolae Botanicae Upsalienses* **20**: 1–374.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Solé M, Cano J, Rodríguez-Tudela JL, Pontón J, Sutton DA, Perrie R, Gené J, Rodríguez V, Guarro J (2003). Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Scedosporium prolificans* by inter-single-sequence-repeat-polymerase chain reaction. *Medical Mycology* **41**: 293–300.
- Solé M, Cano J, Stchigel AM, Guarro J (2002). Two new species of *Auxarthron* morphologically and genetically close to *A. kuehni*. *Studies in Mycology* **47**: 103–110.
- Udawaga S, Ueda S (1981). *Eremodothis angulata* and *Apodus oryzae*, two rare Plectomycetes from marine sludges. *Journal of Japanese Botany* **56**: 289–294.

4.6. Estudio morfológico y molecular de los géneros *Neurospora* y *Gelasinospora*.

D. García, A. M. Stchigel, J. Cano, J. Guarro and D. L. Hawksworth. 2004. A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data. *Mycological Research* 108: 1119-1142.

A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data

Dania GARCÍA^{1,2}, Alberto M. STCHIGEL², José CANO², Josep GUARRO^{2*} and David L. HAWKSWORTH³

¹Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt, calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La Habana, Cuba.

²Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Calle Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Tarragona, Spain.

³Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 20840 Madrid, Spain.

E-mail: umb@fmc.s.urv.es

Received 16 August 2003; accepted 26 March 2004.

Neurospora and *Gelasinospora* are traditionally distinguished by the ornamentation pattern of the surface of their ascospores, which are ribbed in the former and pitted in the latter. However, a detailed examination of the morphology of numerous strains of most of the species of both genera confirm the hypothesis that there are not enough criteria to distinguish them from each other. The names *Neurospora* and *Gelasinospora* are synonymized and the circumscription of the genus *Neurospora* amended. Partial sequences of the 28S rDNA gene from 27 species of both genera were analysed to infer their phylogenetic relationships. Species of the two genera were interspersed in the different clades and confirmed that they are genetically very similar. The grouping obtained demonstrates that the morphology of the episporial-layer of the ascospores is an informative phylogenetic character. Two recent isolates from soils of Nigeria and Spain, which could not be classified as any known species of *Neurospora* are described, illustrated, and recognized as new: *N. nigeriensis* and *N. uniporata* spp. nov. A synopsis and key to the 49 species of *Neurospora* now recognized in the genus is presented, and the new genus *Pseudogelasinospora* described to accommodate *P. amorphoporcata* (syn. *Gelasinospora amorphoporcata* comb. nov.).

INTRODUCTION

The *Sordariaceae* (*Ascomycota*) encompasses approximately 10 genera (Eriksson *et al.* 2003) which are coprophilous, soil borne or grow on plant debris. They are characterized by ampulliform or conical and usually ostiolate ascomata; asci are commonly cylindrical with an apical ring; and the ascospores are generally aseptate, with the surface smooth, pitted, reticulate or striate, sheathed or unsheathed, darkly pigmented, and with one or several germ pores. The largest genera are *Gelasinospora* Dowding 1933, *Neurospora* Shear & B. O. Dodge 1927 and *Sordaria* Ces. & De Not. 1863. The main difference between them lies in the ornamentation of the ascospore wall.

The generic name *Neurospora* was introduced by Shear & Dodge (1927) for four species characterized by dark ascospores, with a grooved surface with longitudinal ribs. Later, numerous species were added (Tai 1935, Gochenaur & Backus 1962, Nelson, Novak & Backus 1964, Frederick, Uecker & Benjamin 1969, Mahoney,

Huang & Backus 1969, von Arx 1981, Perkins & Raju 1986, Krug & Khan 1991) and so far 12 species have been accepted. These fungi show three different mating strategies: homo-, pseudohomo-, or heterothallic. The latter have developed a distinctive anamorph, *Chrysonilia* Arx 1981, which predominates in culture and in nature. *Gelasinospora* was proposed by Dowding (1933) to accommodate two species with ascospores similar to those of *Neurospora*, but with a pitted wall. Further species were added by Moreau & Moreau (1949), Cain (1950), Udagawa & Takada (1967), Cailleux (1971), Udagawa, Furuya & Horie (1973), Horie & Udagawa (1974), Furuya & Udagawa (1976), Khan & Krug (1989a,b), Krug, Khan & Jeng (1994), and Stchigel, Cano & Guarro (1998). Some of these species were initially included in *Anixiella* Saito & Minoura ex Cain 1961, the non-ostiolate counterpart of *Gelasinospora* (Cain 1961). However, *Anixiella* was not accepted by von Arx (1982) in the most recent revision of the genus.

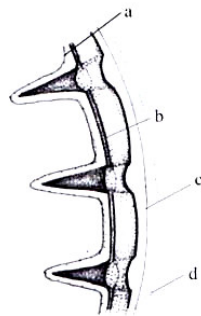
Ornamentation of the ascospore wall has been traditionally considered an important taxonomic character in *Sordariales* (Dowding 1933, von Arx & Gams

* Corresponding author.

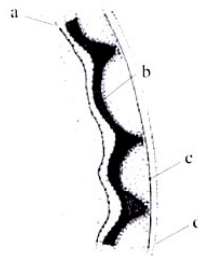
Synopsis of *Neurospora*

1120

Epispore endodontate



Epispore folded



Epispore smooth

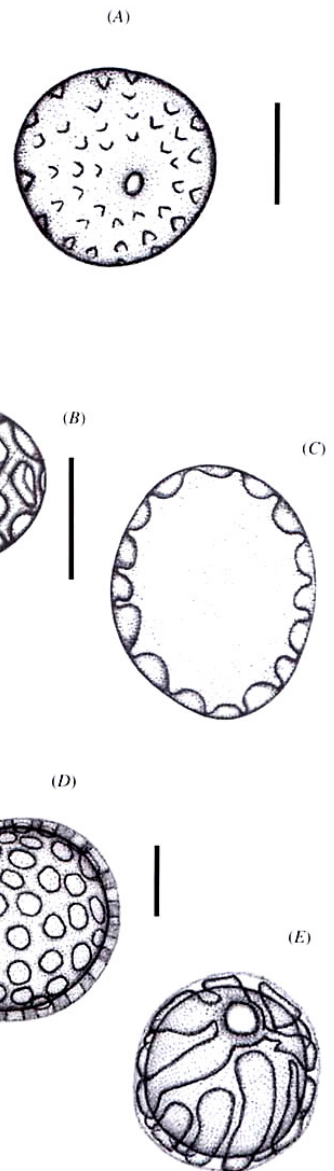
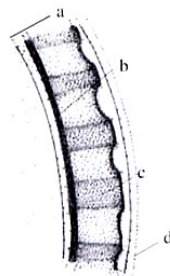


Fig. 1. Types of ascospore wall. (A) *Gelasinospora endodontata*; (B) *G. retispora*; (C) *Neurospora nigeriensis*; (D) *G. indica*; (E) *N. dodgei*. a, endospore; b, epispore; c, perispore; d, exospore. Bars = 10 μ m.

1967, Jeng & Krug 1976, Hawksworth & Manoharachary 1978, von Arx 1982), and several genera such as the two mentioned above are distinguished only on this basis. It has been demonstrated that the ornamentation in both genera involves the two intermediate layers of the ascospore, the epispore, which is darkly pigmented and may be ornate or not, and the perispore, which is lightly pigmented and always ornate (Gochenaour &

Backus 1962, Sussman 1966, Lundquist 1967, Cailleux 1971) (Fig. 1). On the basis of the type of epispore, Cailleux (1971) recognized four groups in *Gelasinospora*: Group I, endodontate; Group II, slightly verruculose; Group III, smooth; and Group IV, folded. Preliminary studies with the SEM in 1978–79 (D.L.H., unpubl.) showed the value of this approach in studying ascospore ornamentation in the complex, as it revealed

D. García and others

1121

furrows with pits along their lengths, but this was not pursued further at that time. The existence of species with an ornamentation pattern intermediate between *Neurospora* and *Gelasinospora* seemed to indicate that the separation of the genera was not clear-cut. Recent molecular studies in *Lasiochaeriales*, *Melanospora* (*Hypocreales*) and *Onygenales* also suggested that generic distinction only on the basis of this character does not correlate with phylogenetic relationships inferred from DNA sequences (Cano *et al.* 2002a, Miller & Huhndorf 2002, Solé *et al.* 2002, Sugiyama, Summerbell & Mikawa 2002, Zhang & Blackwell 2002).

The phylogenetic relationships between members of *Gelasinospora* and *Neurospora* were recently investigated by Dettman *et al.* (2001) analysing the four genes: ITS/5.8S rRNA, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gpd*), mating-type *A-1*, and mating-type *a-1*. Although only five species of *Gelasinospora* were included in that study, they concluded that pitted vs ribbed ascospores is not a useful criterion for the separation of these genera.

In order to evaluate the morphological and genetic relationships between *Neurospora* and *Gelasinospora*, we studied the morphological features of numerous fresh isolates and some reference strains (including numerous types). We have also analysed the nucleotide sequences of D1 and D2 domains of the 28S rDNA gene of a representative number of species of both genera.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and fungal isolation

Soil samples from various geographical regions including areas with different climates and vegetation were studied. Techniques used for sampling and isolation were described previously (Stchigel *et al.* 1998, García, Stchigel & Guarro 2002).

Strains studied

105 strains, mostly from soil, including 18 reference and type strains from different culture collections (CBS, FGSC, IMI and NBRC), were included in this study.

Morphological study

The macro- and microscopic morphological characteristics of the fungi were studied on oatmeal agar (OA; oat flakes 30 g, agar 20 g), malt extract agar (MEA; Difco) and potato-carrot-agar (PCA; potato 20 g, carrot 20 g, agar 20 g) at 15, 25, 35, 40, and 45 °C. Colour notation in parenthesis follow Kornerup & Wanscher (1984). The measurements of the fungal structures were taken in cold lactophenol. Scanning electron microscopy was used to examine the ornamentation of the ascospore wall.

Molecular study

Strains used

The strains sequenced in this study and their EMBL accession nos. are listed in Table 1.

DNA extraction

The DNA was isolated as described by Cano *et al.* (2002b).

PCR amplification

The D1–D2 regions of the large-subunit rDNA from the strains tested was amplified using the NL1 and NL4 primers (O'Donnell 1993). PCR conditions consisted of pre-denaturalisation at 94 °, 5 min; 30 cycles at 94 °, 45 s; 51 °, 1 min and 72 °, 3 min; and a final incubation at 72 ° for 10 min. The final products were electrophoresed in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. A 100-bp DNA ladder marker (Gibco, Barcelona) was used as the size standard. The products were purified using the GFX™ PCR DNA purification kit (Pharmacia Biotech, Barcelona) and stored at –20 ° until used in sequencing.

Sequencing and phylogenetic analysis

The protocol used for sequencing was the Taq Dye-Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Gouda). The reactions were performed using the NL1, NL4 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 CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997) followed by manual adjustments with a text editor.

Phylogenetic analyses of the D1–D2 domains were performed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei 1987) with the MEGA 2.1 computer program (Kumar *et al.* 2001). The trees were constructed using the Kimura-2-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 molecular analysis of the 28S rDNA sequences of the 35 strains included in the study confirmed that *Gelasinospora* and *Neurospora* can no longer be separated from each other. The length of these sequence regions ranged from 493 bp (*G. nigeriensis* FMR 5963) to 520 bp (*G. cerealis* FMR 7271). The number of variable sites was 54, 30 of them being parsimony-informative.

In the neighbour-joining tree (Fig. 2), using *Xylaria curta* and *Chaetomium globosum* as out-groups, two main branches were shown. One included the only

Synopsis of *Neurospora*

1122

Table 1. Strains sequenced in the molecular study.

| Species | Strains | Source | EMBL no. |
|---|--|---|--|
| <i>G. anomophoporcata</i> | CBS 626.80 ¹⁹⁷¹ | Soil, Philippines | AJ 579682 |
| <i>G. bangorensis</i> | FMR 5962 ¹⁹⁷⁶ | Soil, Argentina | AJ 579547 |
| <i>G. calospora</i> | FMR 5508 | Soil, Australia | AJ 579545 |
| <i>G. rousalis</i> | CBS 177.33 | Root of cereal, Canada | AJ 579560 |
| <i>G. dictyospora</i> | CBS 329.95 FMR 7511 | Dung, Tanzania Soil, Spain | AJ 579680 AJ 579678 |
| <i>G. endodontae</i> | IMI 148369 ¹⁹⁷⁹ | Soil, Australia | AJ 579553 |
| <i>G. haplospora</i> | CBS 408.82 ¹⁹⁷⁹ | Dung, Venezuela | AJ 579681 |
| <i>G. indica</i> | IMI 120719 ¹⁹⁷⁹ | Soil, India | AJ 579556 |
| <i>G. kabi</i> | CBS 300.72 ¹⁹⁷⁹ | Dung, Central African Rep | AJ 579561 |
| <i>G. macrospora</i> | IMI 212194 | Soil, Japan | AJ 579552 |
| <i>G. mesopneustes</i> | FMR 7269 | Soil, Gran Canaria | AJ 579558 |
| <i>G. rousalis</i> | IMI 080039 ¹⁹⁷⁹ FMR 9979 | Stem, UK Soil, Argentina | AJ 579555 AJ 579549 |
| <i>G. retispora</i> | CBS 275.90 ¹⁹⁷⁹ FMR 5513 FMR 7276 FMR 7510 | Seeds, Netherlands Soil, Singapore Soil, Chile Soil, Spain | AJ 579679 AJ 579544 AJ 579677 AJ 579687 |
| <i>G. sanctiflori</i> | FMR 5556 | Soil, Singapore | AJ 579546 |
| <i>G. stellata</i> | IFO 30242 ¹⁹⁷⁹ CBS 561.72 ¹⁹⁷⁹ | Dung, Central African Rep Dung, Central African Rep | AJ 579683 AJ 579560 |
| <i>G. pseudostellata</i> (syn. <i>G. ovalis</i>) | CBS 556.72 ¹⁹⁷⁹ | Dung, Central African Rep | AJ 579684 |
| <i>N. africana</i> | FMR 7370 | Soil, Cuba | AJ 579686 |
| <i>N. dudzei</i> | FGSC 1692 | Soil, Puerto Rico | AJ 579551 |
| <i>N. lineolata</i> | CBS 502.70 ¹⁹⁷⁹ | Soil, Pakistan | AJ 579557 |
| <i>N. nigricans</i> | FMR 5963 | Soil, Nigeria | AJ 579548 |
| <i>N. sublineolata</i> | IMI 224881 ¹⁹⁷⁹ | Soil, Japan | AJ 579554 |
| <i>N. trossata</i> | CBS 298.63 ¹⁹⁷⁹ | Soil, USA | AJ 580043 |
| <i>N. tetrasperma</i> | FMR 5545 | Soil, Australia | AJ 579545 |
| <i>N. uniporata</i> | FMR 7273 ¹⁹⁷⁹ FMR 7283 | Soil, Spain Soil, Spain | AJ 579562 AJ 579683 |

CBS, Centraalbureau voor Schimmcultures, Utrecht; FMR, Culture Collection Facultad de Medicina, Reus; FGSC, Fungal Genetics Stock Center; IFO, Institute for Fermentation, Osaka (Actually NBRC = Biological Resource Center); IMI = CABI Bioscience, Egham; ¹⁹⁷¹⁻⁷⁹ = ex-type culture

species *G. anomophoporcata*, and the other the species of *Neurospora* and *Gelasinospora* included in the study, which were interspersed in several clades. The fact that *G. anomophoporcata* was genetically separated from all the species of *Neurospora* and *Gelasinospora* supported the morphological differences observed and confirmed the exclusion of this species from the genus. It was remarkable that the species of *Gelasinospora* and *Neurospora* were grouped in four major clades on the basis of the ornamentation of the epispore. Only the clade formed by *N. terreicola* and *N. nigricans* included species with smooth and ornate epispore. The other three clades encompassed exclusively species with smooth or with ornate surface. Two of them included species with an ornate epispore. The first, which received 71% bootstrap support, branched twice: one branch (78% bootstrap support) grouped *G. endodontae*, *G. calospora*, and *N. sublineolata*. The ascospores of these three species are characterized by inwardly projecting small pits (Group-I, Cailleux 1971). The other branch (58% bootstrap value) included species of *Gelasinospora* with folded epispore (*G. retispora*, *G. dictyospora*, and *G. novoguineensis*; Group-IV, Cailleux 1971), but also *G. sanctiflori* (ascospores with inwardly projecting small pits) although fairly distant from the rest. The third clade included two species with an ornate epispore, the

heterothallic *N. crassa* and the pseudohomothallic species *N. tetrasperma*. The species with smooth epispores were grouped in the fourth clade with a 98% bootstrap value. This clade included homothallic species of *Neurospora* and the *Gelasinospora* species belonging to Groups II and III (Cailleux 1971). The two strains of the new species *G. uniporata* tested (FMR 7273 and FMR 7283) formed a well-supported sister branch.

Our results agree with the phylogram produced from combined analysis of the four nuclear genes: ITS 5.8S rRNA, *gpd*, *mat A-1* and *mat a-2* by Dettman *et al.* (2001), which confirm that *Gelasinospora* did not form a distinct group from *Neurospora*. In that study, as in ours, the species with ascospores with inwardly projecting pits (*G. calospora*, *G. tetrasperma*, and *N. sublineolata*) were also nested together, receiving a 100% bootstrap support. Our results concerning a single origin for heterothallic and pseudohomothallic species of *Neurospora* confirmed previous studies (Pöggeler 1999, 2001, Dettman *et al.* 2001). Pöggeler (1999) performed a molecular study based on mating-type gene sequences to determine the phylogenetic relationships between homothallic and heterothallic species of *Neurospora*. That study included the 12 accepted species of *Neurospora*, and demonstrated that

D. García and others

1123

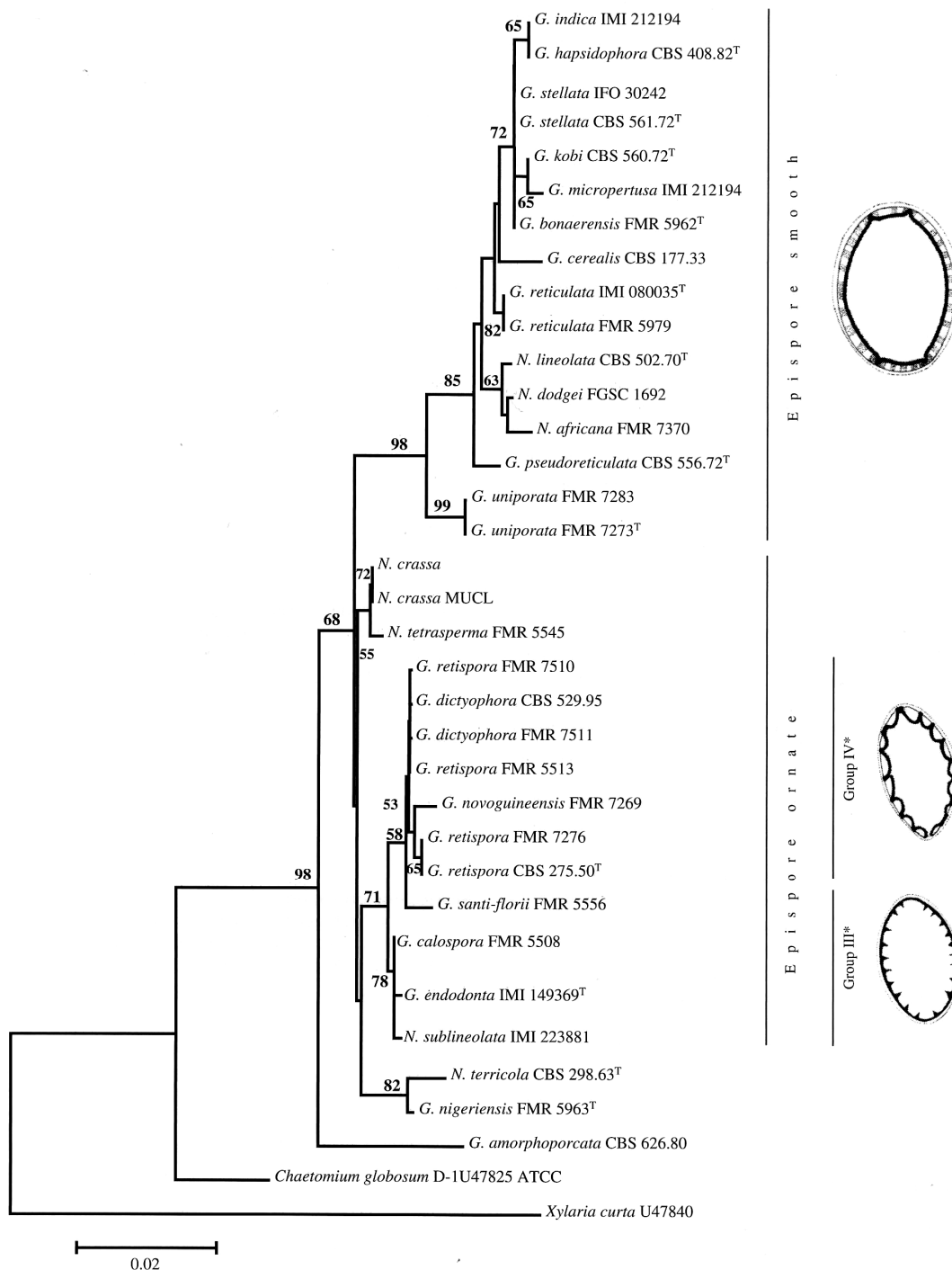


Fig. 2. Unrooted neighbour-joining tree of 35 sequences of the D1-D2 regions of the LSU rDNA from *Gelasinospora* and *Neurospora* species. Branch lengths are proportional to genetic distance, indicated by a bar. Bootstrap values of 50% or greater (1000 replicates) are indicated above the internodes *Group III and IV according to Cailleux (1971).

Synopsis of *Neurospora*

1124

A-type and *A*-type homothallic species of *Neurospora* were strictly separated into two clades. In our tree, homothallic species which contain both the *mat A* and the *mat a* idiomorphs, such as *G. calospora*, *G. reisporea*, *N. sublineolata*, and *N. terricola* (Glass, Metzberg & Raju 1990, Beatty, Smith & Glass 1994) also formed a divergent group from the homothallic species *N. africana*, *N. dodgei*, and *N. lineolata*, which contain only the *mat A* idiomorph (Glass *et al.* 1990). Although Pöggeler (1999) suggested that in *Neurospora* a change of one reproductive strategy to another might be a consequence of a single ancient event, the topology of the present tree suggests a polyphyletic origin of homothallism in *Neurospora*. Results provided by Dettman *et al.* (2001) seem to support this hypothesis.

In conclusion, our studies demonstrated that the ornamentation pattern of the epispore is a very informative character for establishing phylogenetic relationships at the infrageneric level in this fungal group, and confirmed the results of other authors, which indicated that the mating strategy may also be a good indicator of phylogenetic relatedness.

TAXONOMY

A detailed examination of the most important characteristics of all the strains of *Gelasinospora* and *Neurospora* included in this study revealed that there are not enough morphological or another features to discriminate between the genera. The most representative features of the colonies, ascomata, asci, and ascospores are similar in species referred to both genera. The ornamentation pattern of the ascospores, which has been considered a key character to separate the genera is also inconsistent: some species such as *N. discreta* and *N. sublineolata*, have an intermediate ornamentation pattern between the genera. The wall of the ascospores of *N. sublineolata* (IMI 223881) has pits which indent the intercostal veins (Figs 3–4). Cailleux (1971) described a similar pattern in the species belonging to Group I of *Gelasinospora*. *N. discreta* shows also a similar ascospore surface, characterized by thick ribs indented by numerous pits (Perkins & Raju 1986).

Because *Neurospora* has priority under the Code, *Gelasinospora* is formally treated here as a synonym of *Neurospora*, whose generic diagnosis is amended as follows.

Neurospora Shear & B. O. Dodge, *J. Agric. Res.* **34**: 1019 (1927)

Gelasinospora Dowding, *Can. J. Res.* **9**: 294 (1933).

Ausiello Saito & Minoura ex Cain, *Can. J. Bot.* **39**: 1667 (1961).

Colonies spreading broadly, with abundant production of ascomata. *Ascomata* superficial or immersed, perithecial and ostiolate or cleistothecial and non-ostiolate, hairy or glabrous, dark. *Peridium* membranaceous, usually *textura angularis* or *intrincata*. *Asci* cylindrical, clavate or subspherical, with a persistent or evanescent

wall, usually with a thickened and non-amyloid annular structure at the apex, usually 8-spored. *Hanuthecium* with paraphyses filiform, hyaline and early evanescent. *Ascospores* broadly fusiform, ellipsoidal, or nearly spherical, 1-celled, hyaline to yellowish brown or olive-brown, becoming dark and opaque at maturity, ascospore wall with longitudinal ribs or pitted, occasionally nearly smooth, 1–2 germ pores disposed at the ends of the ascospores, or less frequently more (up to 12), gelatinous sheaths or appendages absent. *Anamorphs* known in only a relatively small number of species, belonging to *Cheysomita* Arx.

Type species: Neurospora sitophila Shear & B. O. Dodge.

The morphology of the ascospores, mainly the ornamentation pattern, number and placement of germ pores, and the presence or not of ostiole in the ascomata are the most important features for species distinction. However, some heterothallic species are difficult to separate morphologically and can only be differentiated by mating tests (Perkins, Turner & Barry 1976, Perkins & Turner 1988, Turner, Perkins & Fairfield 2001).

Accepted species

Neurospora bonaerensis (Stehlig & Guarro) D. García, Stehlig & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 46)

Gelasinospora bonaerensis Stehlig & Guarro, *Mycol. Res.* **102**: 1405 (1998).

Ascomata ostiolate, 520–650 × 310–420 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to subglobose, 35–46 × 29–35 µm, walls with numerous interconnected pits, variable in size; 4–7 germ pores, arranged near the ends.

Strain examined: FMR 5962

Distribution: Argentina. Soil.

References: Stehlig *et al.* (1998).

Neurospora brevispora (R. S. Khan & J. C. Krug) D. García, Stehlig & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 47)

Gelasinospora brevispora R. S. Khan & J. C. Krug, *Mycologia* **81**: 226 (1989).

Ascomata ostiolate, 300–500 × 250–400 µm. *Ascospores* subglobose to ellipsoidal, occasionally globose, 20–24 (–27) × 15–20 µm; walls with numerous, small, round or ovate, inwardly projecting pits, measuring 0.5–1.5 µm diam, one germ pore at each end.

Notes: This species is close to *N. calospora* and *N. endodontia*. However, *N. brevispora* can be differentiated from the former by its wider and more globose spores with smaller pits, while *N. endodontia* has non-ostiolate ascomata.

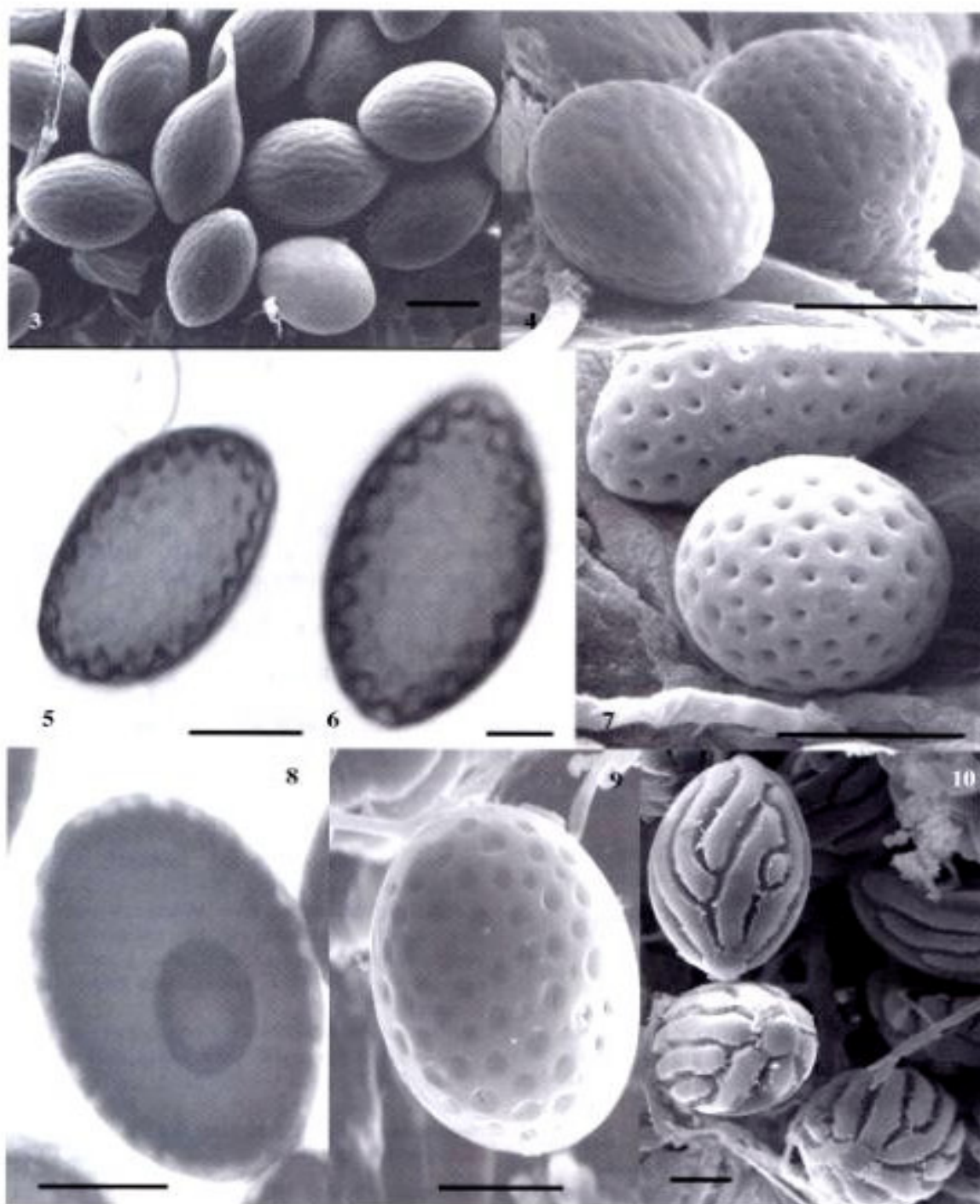
Distribution: Kenya and Tanzania. Dung

References: Khan & Krug (1989a).

Neurospora caffer (Matsush.) D. García, Stehlig & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 48)

Gelasinospora caffer Matsush., *Matsush. Mycol. Mem.* **9**: 11 (1996).

Ascomata ostiolate, 240–375 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal, 22–28 × 18–21 µm; walls reticulate with



Figs 3–10. Ascospores of *Neurospora* species. **Figs 3–4.** *N. sublineolata*. **Figs 5–7.** *N. calospora*. **Figs 8–9.** *N. cerealis*. **Fig. 10.** *N. dodgei*. Bars: Figs 3–5, 7–10—10 μm , Fig. 6—5 μm .

circular to ellipsoidal pits 1–2.5 μm , one germ pore at each end.

Notes: This species is related to *N. cerealis*. Both have ascospores with a similar shape and ornamentation characterized by an undulate episporium and a thick, light outer layer. However, *N. cerealis* has larger ascospores.

Distribution: South Africa. Soil.

References: Matsushima (1996).

***Neurospora calospora* (Mouton) D. García, Stehlig & Guarro, comb. nov.** (Figs 1A, 5–7, and 49)

Synopsis of *Neurospora*

1126

Rosellinia calospora Mouton, *Bull. Soc. R. bot. Belg.* **36**: 12 (1879).

Gelasinospora calospora (Mouton) C. Moreau & M. Moreau, *Rev. Mycol.* **14**: 50 (1949).

Gelasinospora adjuncta Cain, *Can. J. Res.* **28**: 568 (1950).

Gelasinospora autosteiira Alexop. & S. H. Sun, *Mycologia* **42**: 273 (1950).

Ascomata ostiolate, 550–800 × 400–600 µm. *Ascospores* ellipsoidal, slightly apiculate, (15–)20–28(–31) × 12–17 (–19) µm; wall with circular and inwardly pits 1–1.5 µm diam, one germ pore at each end.

Strains examined: FMR 15, FMR 146, FMR 5508, FMR 7518, FMR 7519, FMR 7522, FMR 7528, FMR 7818, FMR 7819, FMR 7825, and FMR 7827.

Distribution: Worldwide. From artificial manure, dung, litter, *Piper nigrum*, soil, and wood.

References: Alexopoulos & Sun (1950), von Arx (1982), Cailleux (1971), Guarro & Calvo (1982), Manihotis (1965), Matsushima (1975), and Moreau & Moreau (1949).

Neurospora cerealis (Dowding) D. García, Stehigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 8–9, and 50)

Gelasinospora cerealis Dowding, *Can. J. Res.* **9**: 295 (1933).

Ascomata ostiolate, 350–600 × 225–300 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal, slightly apiculate at one end, 27–35 × 22–27 µm; walls with small circular pits up to 2 µm diam, showing an undulate epispore and a slightly thick perispore, one germ pore at each end.

Strain examined: CBS 177.33, FMR 118, FMR 154, FMR 158, FMR 394, FMR 2200, FMR 7816, FMR 7817, and FMR 7971.

Distribution: Australia, Central African Republic, Canada, Netherlands, Spain, Switzerland, and the UK. From dung, root, stem, and soil.

References: von Arx (1982), Dowding (1933), Cain (1950), Cailleux (1971), Guarro & Calvo (1982), Matsushima (1975), and Valldosera & Guarro (1990).

Neurospora crassa Shear & B. O. Dodge, *J. Agric. Res.* **34**: 1026 (1927). (Fig. 51)

Anamorph: *Chrysonilia crassa* (Shear & B. O. Dodge) Arx, *Sydowia* **34**: 17 (1981).

Colonies pale salmon to light orange. *Ascomata* ostiolate, 400–600 µm diam. *Ascospores* ellipsoidal, (23–)29–36 × (11–)14–16 µm; wall with about 20 longitudinal, sometimes branched ridges, one germ pore at each end. *Conidia* (5–)6–7(–8) × 4–6 µm, globose to subglobose, smooth, yellow to pale orange in mass.

Distribution: Worldwide. Soil and rest of vegetation, more common at burnt sites in Africa, India, Caribbean, northern Brazil, and southeast corner of the United States.

References: Shear & Dodge (1927), Perkins *et al.* (1976), Perkins & Turner (1988), and Turner *et al.* (2001).

Neurospora cratophora (R. S. Khan & J. C. Krug) D. García, Stehigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 52)

Gelasinospora cratophora Khan & J. C. Krug, *Mycologia* **81**: 228 (1989).

Ascomata ostiolate, 850–1050 × 650–780 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to sub-globose, rarely globose, 31–43 × 26–32 µm; walls with numerous, small, round and inwardly projecting pits, one or two apical germ pores.

Distribution: France and Tanzania. Dung and soil.

References: Khan & Krug (1989a).

Neurospora dictyophora (R. S. Khan & J. C. Krug) D. García, Stehigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 53)

Gelasinospora dictyophora Khan & J. C. Krug, *Mycologia* **81**: 230 (1989).

Ascomata ostiolate, 650–800 × 300–530 µm. *Ascospores* ellipsoidal, 26–34(–40) × 16–20 µm; walls reticulate, with large, angular to somewhat rounded pits (0.5–3.5 µm diam), one germ pore at each end.

Notes: This species is close to *N. retispora*; ascospores of both possess a similar reticulate pattern. However, in *N. retispora* the pits are broader (up to 5 µm diam).

Strains examined: CBS 529.95, FMR 7511, and FMR 7970.

Distribution: Kenya, Spain, and Tanzania. Dung and soil.

References: Khan & Krug (1989a).

Neurospora discreta Perkins & Raju, *Exp. Mycol.* **10**: 323 (1986). (Fig. 54)

Anamorph: *Chrysonilia* sp.

Colonies yellow. *Ascomata* ostiolate, 300–600 µm. *Ascospores* ellipsoidal, (28–)31–33 × (19–)21–24 µm; wall with a variable number of longitudinal, branched ribs, which are indented by numerous, spherical pits, one germ pore at each end. *Conidia* yellowish orange, variable in size (macro and microconidia are present).

Distribution: Worldwide. From burnt substrata.

References: Perkins & Raju (1986), Perkins & Turner (1988), and Turner *et al.* (2001).

Neurospora dodgei A. Nelson & E. K. Novák, *Mycologia* **56**: 384 (1964). (Figs 1E, 10 and 55)

Ascomata ostiolate, 400–600 µm diam. *Ascospores* ellipsoidal, 29–37(–40) × 18–21 µm; wall with about 14–16 longitudinal, broad ribs, branched and anastomosed, one germ pore at each end.

Strains examined: FGSC 1692, FMR 5507, and FMR 7968.

Distribution: Australia, Dominican Republic, Martinique, Mexico, Nepal, Puerto Rico, and USA. Soil.

References: Frederick *et al.* (1969), Glass *et al.* (1988, 1990), Mahoney *et al.* (1969), Nelson *et al.* (1964), and Perkins & Turner (1988).

D. García and others

1127

Neurospora endodonta (Malloch & Cain) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 11 and 56)
Gelasinospora endodonta (Malloch & Cain) Arx, *Proc. K. ned. Akad. Wet., Ser. C* **76**: 290 (1973).

Anixiella endodonta Malloch & Cain, *Can. J. Bot.* **49**: 870 (1971).

Ascomata non-ostiolate, 95–250 µm diam. *Ascospores* ellipsoidal, 23–31 × 15–22 µm; wall with inwardly projecting pits, one germ pore at each end.

Notes: *N. endodonta* is close to *N. calospora*. But *N. endodonta* can be differentiated by its non-ostiolate ascomata.

Strains examined: IMI 148369 (ex-type), FMR 166, FMR 393, FMR 7815, FMR 7820, and FMR 7824.

Distribution: Australia and Spain. Soil.

References: von Arx (1973, 1982), Guarro & Fort (1984), and Malloch & Cain (1970).

Neurospora fallaciosa (Cailleux) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 57)

Gelasinospora fallaciosa Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 623 (1971).

Ascomata ostiolate or non-ostiolate, 200–400 µm. *Ascospores* subglobose to broadly ellipsoidal, 30–38 × 25–34 µm; wall with large, circular to angular, some time irregular pits, one germ pore at each end.

Distribution: Central African Republic and South Africa. Dung.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora foveaconica (Cailleux) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 58)

Gelasinospora foveaconica Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata ostiolate, 450–950 × 325–600 µm. *Ascospores* narrowly ellipsoidal with slightly attenuated ends, 38–52 × 25–32 µm; wall with small pits not well delimited, 2–6 germ pores arranged in apical rings at each end.

Distribution: Central African Republic and Colombia. Dung.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora galapagosensis Mahoney & Backus, *Mycologia* **61**: 265 (1969). (Fig. 59)

Neurospora africana L. H. Huang & Backus, *Mycologia* **61**: 268 (1969).

Ascomata ostiolate, 300–700 µm in diam. *Ascospores* ellipsoidal, 21–32(–35) × 14–18 µm; wall with 18–22 longitudinal, frequently branched ribs, epispore smooth, one germ pore at each end.

Notes: *N. galapagosensis* and *N. africana* have been traditionally differentiated only by the length of the ascospores. However, according to our observations they are indistinguishable. Recent studies based on *mat A-1*, *ITS5.8S*, and *gpd* sequences demonstrated that the species are genetically identical (Pöggeler 1999, Dettman, Harbinski & Taylor 2001). *N. dodgei*

and *N. lineolata* are also close to other species, but can be differentiated from *N. galapagosensis* by their ornamentation pattern, which has wider ribs in the former and indistinct intercostals veins in the latter.

Strains examined: FMR 5547, FMR 7370, FMR 7963, FMR 7964, FMR 7965, and FMR 7967.

Distribution: Australia, Cuba, India, Isla Santa Cruz (Galapagos Islands), Nigeria, Papua-New Guinea, Peru, and Venezuela. Soil.

References: Frederick *et al.* (1969), Glass *et al.* (1988, 1990), Mahoney *et al.* (1969), Matsushima (1971, 1989), Perkins & Turner (1988), Pöggeler (1999), Takada (1973), and Turner *et al.* (2001).

Neurospora goundaensis (Cailleux) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 60)

Gelasinospora goundaensis Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata ostiolate, 330–650 × 200–550 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal with rounded ends, 34–38 × 24–28 µm; wall with small pits, 2–6 germ pores disposed at each end.

Strain examined: FMR 7525.

Distribution: Central African Republic and Nigeria. Dung and soil.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora hapsidophora (R. S. Khan & J. C. Krug) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 61)

Gelasinospora hapsidophora Khan & J. C. Krug, *Mycologia* **81**: 232 (1989).

Ascomata ostiolate, 500–700 × 350–550 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to subglobose, rarely globose, 19–26 × 14–16 µm; wall reticulate with angular to nearly circular pits, 0.5–2.5 µm in diam, one germ pore at each end.

Notes: This species resembles *N. dictyophora* and *N. retispora* in its ornamentation pattern. However, *N. hapsidophora* can be differentiated from both by its smaller ascospores.

Strains examined: CBS 408.82 (ex-type) and FMR 7529.

Distribution: Cuba, India, Tanzania, Venezuela, and Zimbabwe. Dung and soil.

References: Khan & Krug (1989a).

Neurospora heterospora (Cailleux) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 62)

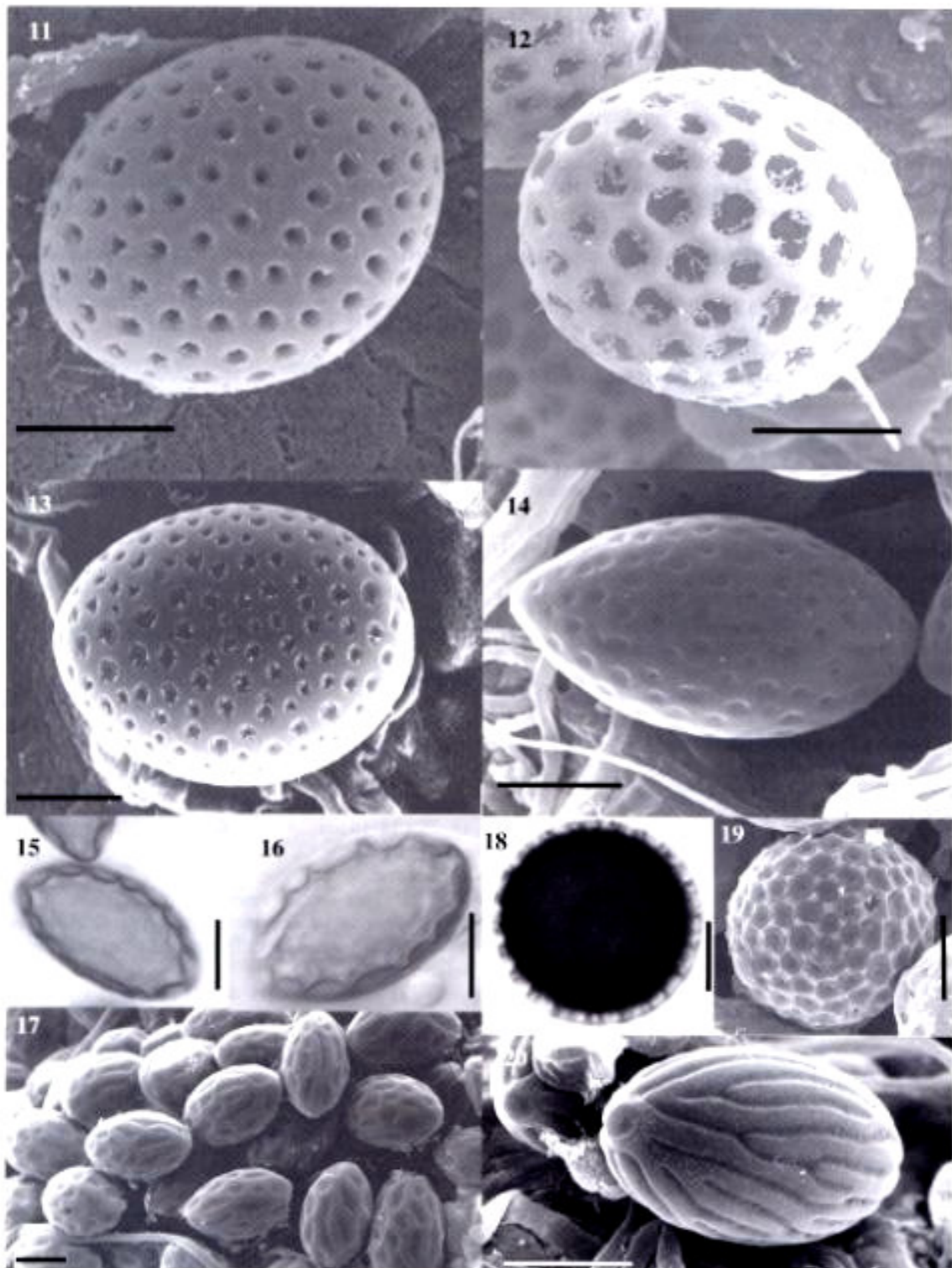
Gelasinospora heterospora Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata ostiolate, 650–1100 × 350–700 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to subcylindrical with rounded ends, 35–45(–48) × 25–33 µm; wall with small indistinct pits, 4–6 germ pores arranged at each end.

Strain examined: FMR 7521.

Distribution: Argentina, Central African Republic, and Venezuela. Dung and soil.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).



Figs 11–20. Ascospores of *Neurospora* species. Fig. 11, *N. eudolosa*. Fig. 12, *N. indica*. Fig. 13, *N. lobi*. Fig. 14, *N. reticulata*. Figs 15–17, *N. retrospora*. Figs 18–19, *N. stellata*. Fig. 20, *N. tetrasperma*. Bars = 10 μ m.

D. García and others

1129

Neurospora himalayensis (Y. Horie & Udagawa) D. García, Stehligel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 63)
Gelasinospora himalayensis Y. Horie & Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **15**: 201 (1974).

Ascomata ostiolate, 600–700 × 360–450 µm. *Ascospores* ellipsoidal, 37–56 × 28–36 µm wall with angular to irregularly angular-ovate pits to 3 µm diam, 4–8 germ pores located at each end.

Distribution: Nepal. Soil.

References: von Arx (1982) and Horie & Udagawa (1974).

Neurospora hippopotama (J. C. Krug, R. S. Khan & Jeng) D. García, Stehligel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 64)

Gelasinospora hippopotama J. C. Krug, R. S. Khan & Jeng, *Mycologia* **86**: 250 (1994).

Ascomata ostiolate, 500–750 × 375–450 µm. *Ascospores* ellipsoidal or subglobose to almost globose, 35–45 × 25–32 µm; walls with circular, inwardly projecting wide shallow pits 1–2.5 µm diam, 6–8 germ pores which may be scattered or concentrated near the end.

Notes: This species is close to *N. saitoi*, *N. seminuda* and *N. santi-florii*, but can easily be differentiated by the presence of multiple germ pores in *N. hippopotama*, while the others have one germ pore at each end.

Distribution: Egypt, Malawi, Sudan, and Venezuela. Dung and soil.

References: Krug, Khan & Jeng (1994).

Neurospora indica (J. N. Rai, Wadhvani & J. P. Tewari) D. García, Stehligel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 10, 12, and 65)

Gelasinospora indica (J. N. Rai, Wadhvani & J. P. Tewari) Arx, *Proc. K. ned. Akad. Wet., ser. C* **76**: 291 (1973).

Anixiella indica J. N. Rai, Wadhvani & J. P. Tewari, *Can. J. Bot.* **45**: 479 (1967).

Ascomata non-ostiolate, 175–230 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to sub-globose, 24–31 × 20–28 µm; wall reticulate with angular pits 3.5–4.5 µm, one germ pore at each end.

Notes: The size and the ornamentation of the ascospores of *N. stellata* are similar to *N. indica*, however, *N. stellata* has bigger ascumata and slightly broader ascospores.

Strains examined: IMI 120719 (ex-type) and FMR 5491.

Distribution: Australia, India, Philippines, Thailand and Venezuela. Dung and soil.

References: von Arx (1973, 1982), Malloch & Cain (1970), and Udagawa (1980).

Neurospora intermedia F. L. Tai, *Mycologia* **27**: 329 (1935). (Fig. 66)

Anamorph: *Chrysomilia* sp.

Colonies golden-yellow or orange. *Ascomata* ostiolate, 300–600 µm. *Ascospores* ellipsoidal, 19–27 × 12–17 µm;

wall with 12–17 longitudinal, often branched ribs, one germ pore at each end. Conidia golden yellow, 11–21 × 10–11 µm.

Distribution: Worldwide. Common in burnt vegetation, soil, and non-burned substrates.

References: Perkins *et al.* (1976), Perkins & Raju (1986), Perkins & Turner (1988), Tai (1935), and Turner *et al.* (2001).

Neurospora inversa (Cailleux) D. García, Stehligel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 67)

Gelasinospora inversa Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata ostiolate, 200–500 × 180–350 µm. *Ascospores* ellipsoidal with broadly rounded ends, (36–)39–47 (–49) × (27–)29–34 µm; wall with small circular pits, 0.5–1.5 µm diam, 2–6 germ pores arranged at each end.

Distribution: Central African Republic and Nigeria. Dung and soil.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora kobi (Cailleux) D. García, Stehligel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 13 and 68)

Gelasinospora kobi Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 621 (1971).

Ascomata ostiolate, 450–800 × 300–600 µm. *Ascospores* ellipsoidal with attenuated ends, 34–42(–44) × 25–31 (–33) µm; wall with small, circular pits, 1–1.5 µm diam, 4–6 germ pores distributed at each end.

Strains examined: CBS 560.72 (ex-type) and FMR 504.

Distribution: Central African Republic and Spain. Dung and soil.

References: von Arx (1982), Cailleux (1971), and Guarro & Fort (1984).

Neurospora lineolata Frederick & Uecker, *Mycologia* **61**: 1079 (1969). (Fig. 69)

Ascomata ostiolate, 500–800 × 350–500 µm. *Ascospores* ellipsoidal, 22–30 × 10–15(–18) µm; wall with 18–22 longitudinal ribs and inconspicuous intercostal veins, smooth epispore, one germ pore occasionally protruding at each end.

Notes: This species is close to *N. galapagosensis* in the shape and size of the ascospores, and the ornamentation are similar in both species. However, they can be differentiated by the presence of conspicuous intercostals veins in *N. galapagosensis*.

Strain examined: CBS 502.70 (ex-type).

Distribution: Pakistan. Soil.

References: Frederick *et al.* (1969), Glass *et al.* (1988, 1990), and Perkins & Turner (1988).

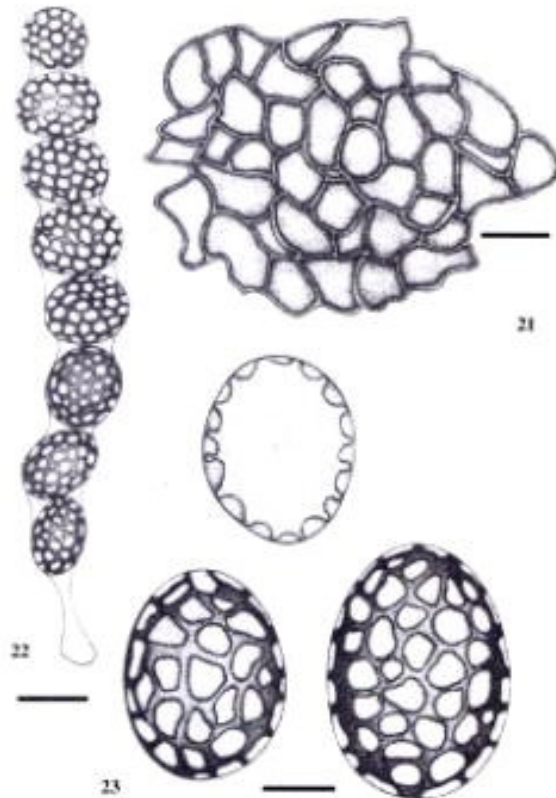
Neurospora longispora (Udagawa) D. García, Stehligel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 70)

Gelasinospora longispora Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **8**: 50 (1967).

Ascomata ostiolate, 800–1000 × 500–700 µm. *Ascospores* ellipsoidal, 32–43(–47) × 27–33 µm, sometimes

Synopsis of *Neurospora*

1130



Figs 21–23. *Neurospora nigeriensis*. **Fig. 21.** Detail of peridium. **Fig. 22.** Ascus with ascospores. **Fig. 23.** Ascospores. Bars: Figs 21 and 22 = 20 μm , Fig. 23 = 10 μm .

slightly pointed at one end; wall with small, rounded pits, 1–1.5 μm diam; one apical germ pore.

Notes: This species resembles *N. kobei*, but the latter has 4 to 6 germ pores located around the ascospore ends.

Distribution: Australia and Japan. From *Larix leptolepis* and soil.

References: von Arx (1982), Matsushima (1989), and Udagawa & Takada (1967).

Neurospora macrospora (Cailleux) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 71)

Gelasinospora macrospora Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata non-ostiolate or rarely with a sessile, papillate ostiole, 300–600 μm . **Ascospores** broadly ellipsoidal to subspherical 43–56 \times (32–)38–47(–50) μm ; walls with numerous small pits, 0.5–1 μm diam, 6–8 germ pores arranged at each end.

Distribution: Central African Republic. Dung.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora micropertusa (Y. Horie & Udagawa) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 72)

Anixiella micropertusa Y. Horie & Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **15**: 197 (1974).

Gelasinospora micropertusa (Y. Horie & Udagawa) Arx, *Persoonia* **11**: 446 (1982).

Ascomata non-ostiolate, 150–560 μm . **Ascospores** broadly ellipsoidal, 40–52 \times 30–42 μm ; walls with small circular pits, 0.5–1 μm diam, up to 8 germ pores located at the ends.

Notes: *N. micropertusa* is close to *N. macrospora*. However, *N. macrospora* has both ostiolate and non-ostiolate ascomata, larger asci and slightly broader ascospores.

Strain examined: IMI 212194.

Distribution: Japan and Nepal. Soil.

References: von Arx (1982) and Horie & Udagawa (1974).

Neurospora mirabilis (Furuya & Udagawa) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 73)

Gelasinospora mirabilis Furuya & Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **17**: 313 (1976).

Ascomata ostiolate, 530–880 \times 250–400 μm . **Ascospores** broadly ellipsoidal, 32–38 \times 22–28 μm ; wall reticulate, with sub-angular pits measuring 2–4 μm diam, (2–)4(–6) germ pores eccentrically located near each end.

Notes: *N. mirabilis* has some resemblance to *N. himalayensis*, but can be easily distinguished because *N. mirabilis* has smaller ascospores with a broader reticulate ornamentation pattern.

Distribution: Thailand. Soil.

References: von Arx (1982) and Furuya & Udagawa (1976).

Neurospora multiforis (Cailleux) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 74)

Gelasinospora multiforis Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata ostiolate, 550–1100 \times 365–750 μm . **Ascospores** broadly ellipsoid to broadly ovate, 40–52 \times 34–40(–42) μm ; wall with small circular pits, 0.5–1 μm diam, 6–12 germ pores located at each end.

Distribution: Central African Republic, Japan, and Nepal. Dung and soil.

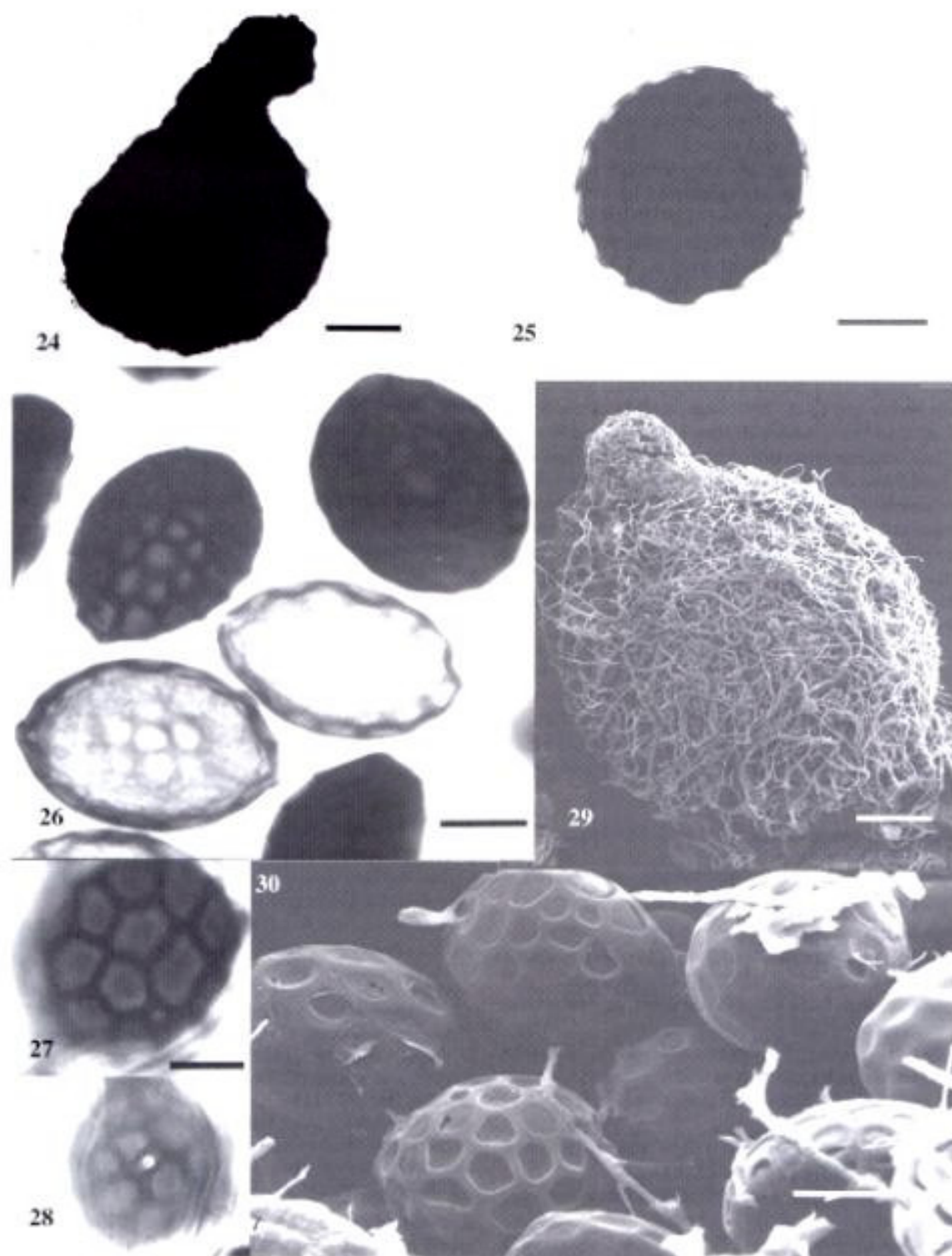
References: von Arx (1982), Cailleux (1971), and Horie & Udagawa (1974).

Neurospora nigeriensis Stchigel & Guarro, **sp. nov.** (Figs 21–30)

Ascomata ostiolata vel non-ostiolata. **Peridium** ex textura angularis vel globulosa compositum. **Asci** 8-spori, cylindrici vel sub-cylindrici, 280–350 \times 30–40 μm . **Ascospores** unicellulares, late ellipsoideae, atro-brunneae vel nigrae, 30–45 \times 22–31 μm , reticulatis, cum foveolas angulariter, 2.5–7 μm magnae, 2 foramine germinalis. Status conidialis nullus.

Types: **Nigeria.** *Etage:* Iheakpu-Awka, isol. ex solo, 2 Nov. 1996, *H. C. Gugnani* (IMI 375100 – holotypus; FMR 5963 – isotypus).

Mycelium composed of hyaline to pale brown hyphae, septate, branched and anastomosing, smooth, 2–20 μm wide. **Colonies** on PCA attaining more than 80 mm



Figs 24–30. *Neurospora nigeriensis*. Fig. 24. Ascoma. Figs 25–28. Ascospores. Fig. 29. Ascoma (SEM). Fig. 30. Ascospores (SEM). Bars: Figs 24 and 29 = 100 μ m, Figs 25–28 and 30 = 10 μ m.

Synopsis of *Neurospora*

1132

diam after 1 wk at room temperature (22–25 °C), flat, thin, consisting of submerged mycelium and sparse aerial hyphae, greyish brown (M. 5D3 to 5E3); reverse greyish brown; ascromatal initials arising as side branches from the mycelium, involving neighbouring hyphae, coiled and contorted. *Ascromata* superficial, scattered to grouped, pyriform and ostiolate or globose and not ostiolate, dark brown, 250–850 × 250–650 µm, with a short, papillate, conical to cylindrical neck when present; neck 110–250 µm tall and 130–350 µm wide at the base, with scarce setae-like appendages; setae smooth, septate, subhyaline to light brown, 8–150 µm long, 3–5 µm diam at the base, thick-walled. Peridium *textura angularis* to *textura globulosa*, 7–9 layered, 50–80 µm thick, brown; outer layers 1–2, consisting of brown, thin-walled cells 7–25 × 10–22 µm, 5–15 µm thick; several inner layers composed of subhyaline, thick-walled cells measuring 12–27 × 6–16 µm. *Asci* fasciculate, cylindrical to sub-cylindrical, thin-walled, 280–350 × 30–40 µm, stipitate, rounded to truncate at the apex with a broad and distinct apical ring, 8-spored. *Paraphyses* not observed. *Ascospores* uniseriate, one-celled, broadly ellipsoidal, 30–45 × 22–31 µm, hyaline when young, becoming dark brown to black; walls ornamented with angular pits, 2.5–7 µm, which forming a network pattern, with two terminal, circular, 1.5–2.5 µm diam germ pores. Anamorph unknown.

Notes: The species grows rapidly at 37 °C, but ascromata are not produced; at 42 °C growth is nil. *N. nigeriensis* is related to *N. dictyophora*, *N. novoguineensis* and *N. retispora*. All have spore walls with pits forming a network and a germ pore at each end. However, the ascospores and the diameter of the pits are clearly bigger in *N. nigeriensis*.

Neurospora novoguineensis (Takada) D. García, Stichigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 75)
Gelasinospora novoguineensis Takada, *Bull. nat. Sci. Mus. Tokyo* **16**: 529 (1973).

Ascromata ostiolate or non-ostiolate, 640–700 × 250–400 µm (when non-ostiolate, 210–300 µm diam). *Ascospores* ellipsoidal, (28–)31–42 × 20–26 µm; wall reticulate, with large pits 2–5 µm diam, one germ pore at each end.

Notes: *N. novoguineensis* resembles to *N. reticulata*, however the latter has non-ostiolate ascromata, smaller ascospores and a finer reticulate, which is formed by pits 1–2 µm diam.

Strains examined: FMR 132, FMR 5822, FMR 7269, FMR 7517, and FMR 7523.

Distribution: Papua-New Guinea, Singapore, and Spain. Soil.

References: von Arx (1982), Guarro & Calvo (1982), and Takada (1973).

Neurospora pannonica J. C. Krug & R. S. Khan, *Mycologia* **83**: 829 (1991). (Fig. 76)

Ascromata ostiolate, 450–700 × 360–500 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to subglobose, occasionally globose,

30–40 × 24–30 µm; wall with 20–24 longitudinal ribs, one germ pore at each end.

Notes: This species has a similar ornamentation pattern to *N. dodgii*, but *N. pannonica* has broader ascospores.

Distribution: Grenada and Hungary. Soil.

References: Krug & Khan (1991).

Neurospora pseudocalospora (Udagawa) D. García, Stichigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 77)
Gelasinospora pseudocalospora Udagawa, *Bull. nat. Sci. Mus. Tokyo* **16**: 517 (1973).

Ascromata ostiolate, 250–450 × 180–300 µm. *Ascospores* elliptical with attenuated ends, 27–32 × 16–18 µm; wall with numerous rounded pits (1 µm diam.), one germ pore at each end.

Notes: The closer species is *N. cerealis*, which can be distinguished by its broader ascospores with a thicker epispore.

Strains examined: FMR 5917, FMR 6180, and FMR 6181.

Distribution: Nigeria, Papua-New Guinea, and Venezuela. Dung and soil.

References: von Arx (1982) and Udagawa *et al.* (1973).

Neurospora pseudoreticulata (Matsushima) D. García, Stichigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 78)
Gelasinospora pseudoreticulata Matsushima, *Microf. Solom. Isl. Papua New Guinea*: 73 (1971).
Gelasinospora variabilis Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascromata ostiolate, 450–800 × 300–575 µm. *Ascospores* broadly ellipsoidal to subglobose, (35–)37–47 × 27–35 µm; wall reticulate, with irregular pits, 2–4 germ pores eccentrically distributed at each end.

Strain examined: CBS 556.72 (ex-type *G. variabilis*).

Distribution: Central African Republic and Papua-New Guinea. Dung and soil.

References: von Arx (1982), Cailleux (1971), Furuya & Udagawa (1976), and Matsushima (1971).

Neurospora reticulata (C. Booth & Ebben) D. García, Stichigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 14 and 79)
Thielavia reticulata C. Booth & Ebben, *Trans. Br. mycol. Soc.* **44**: 214 (1961).

Anixiella reticulata (C. Booth & Ebben) Cain, *Can. J. Bot.* **39**: 1667 (1961).

Anixiella reticulospora Saito & Minoura, *J. Ferment. Technol. Osaka* **26**: 4 (1948).

Gelasinospora reticulata (C. Booth & Ebben) Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 534 (1971).

Ascromata non-ostiolate, 150–350 µm in diam. *Ascospores* ellipsoidal to broadly ellipsoidal, (24–)26–32 × 16–23(–27) µm; wall with circular to ellipsoidal pits measuring 0.8–2 µm, one germ pore at each end.

Strains examined: IMI 080035 (ex-type), FMR 160, FMR 166, FMR 2955, FMR 5490, FMR 5927, FMR 5979, FMR 5980, FMR 5990, FMR 7515, FMR 7524, and FMR 7546.

D. García and others

1133

Distribution: Argentina, Australia, Cuba, Chile, Indonesia, Japan, Nigeria, Papua-New Guinea, Spain, the UK, and USA. From stems, roots, and soil.

References: von Arx (1982), Booth & Ebben (1961), Cailleux (1971), Cain (1961), Guarro & Calvo (1982), Malloch & Cain (1970), and Takada (1973).

Neurospora retispora (Cain) D. García, Stehigel & Guarro, *comb. nov.* (Figs 1B, 15–17 and 80)

Gelasinospora retispora Cain, *Can. J. Res., ser. C* **28**: 573 (1950).

Rosellinia reticulospora Greis & Greis-Dengler, *Jb. wiss. Bot.* **89**: 341 (1941).

Gelasinospora reticulospora (Greis & Greis-Dengler) C. Moreau & M. Moreau, *Mycothèque. Lab. Crypt. Mus. nat. Paris* **3**: 48 (1951).

Ascomata ostiolate, 700–100 × 400–600 µm. *Ascospores* ellipsoid, 24–35 × 14–20 µm; wall broad reticulate, with elongate to angular pits measuring 2–5 µm, one apical germ pore.

Strains examined: CBS 275, 50 (ex-type), FMR 509, FMR 510, FMR 5513, FMR 7276, FMR 7510, and FMR 7527.

Distribution: Australia, Canada, Chile, Cuba, Germany, Japan, Netherlands, and Spain. Dung, roots, seeds, and soil.

References: von Arx (1982), Cailleux (1971), Cain (1950), Guarro & Fort (1984), Matsushima (1989), and Moreau & Moreau (1951).

Neurospora saitoi (Udagawa) D. García, Stehigel & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 81)

Anaxiella saitoi Udagawa, *Bull. nat. Sci. Mus. Tokyo* **16**: 511 (1973).

Gelasinospora saitoi (Udagawa) Arx, *Persoonia* **11**: 447 (1982).

Ascomata non-ostiolate, 140–230 µm in diam. *Ascospores* broadly ellipsoidal, 30–42(–45) × 24–30(–33) µm; wall with inwardly projecting small pits (1 µm diam), one germ pore at each end.

Notes: This species is morphologically similar to *N. santi-florii*, but the latter has ostiolate ascomata.

Strain examined: FMR 7516.

Distribution: Argentina and New Guinea. Soil.

References: von Arx (1982) and Udagawa *et al.* (1973).

Neurospora santi-florii (Cailleux) D. García, Stehigel & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 82)

Gelasinospora santi-florii Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 621 (1971).

Ascomata ostiolate, 300–650 × 200–450 µm. *Ascospores* ellipsoidal, 32–38(–40) × 22–28 µm; wall with inwardly projecting, small pits (0.5–1 µm diam), one germ pore at each end.

Strains examined: FMR 5509, FMR 5556, FMR 7524, FMR 7526, FMR 7821, FMR 7822, FMR 7823, and FMR 7826.

Distribution: Argentina, Australia, Central African Republic, Cuba, Hungary, Malawi, Singapore, Spain and Zaire. Dung, wood, and soil.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora seminuda (Cailleux) D. García, Stehigel & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 83)

Gelasinospora seminuda Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata ostiolate, 300–600 × 270–450 µm. *Ascospores* ellipsoidal with slightly attenuate ends, (25–)27–33 × 18–22 µm; wall with inwardly projecting small pits, 0.5–1 µm diam, one germ pore at each end.

Notes: *N. seminuda* is very close to *N. santi-florii*. The species can be differentiated by the lighter coloured and broader ascospores with rounded ends in the latter.

Strains examined: FMR 5653, FMR 6184, and FMR 6185.

Distribution: Australia, Central African Republic, Nigeria, and Papua-New Guinea. Dung and soil.

References: von Arx (1982), Cailleux (1971), and Takada (1973).

Neurospora sitophila Shear & B. O. Dodge, *J. Agric. Res.* **34**: 1026 (1927). (Fig. 84)

Anamorph: *Chrysonilia sitophila* (Mont.) Arx, *Sydowia* **34**: 16 (1981).

Colonies orange. *Ascomata* ostiolate, 400–500 × 200–300 µm. *Ascospores* ellipsoidal, (20–)23–26 × (10–)13–14 µm; wall with 16–17 longitudinal, sometimes branched ribs, one germ pore at each end. *Conidia* globose to subglobose, (7–)10–15 × 5–10(–11) µm, smooth, orange in mass.

Distribution: Worldwide. From burnt vegetation and non-burnt substrata.

References: Perkins *et al.* (1976), Perkins & Turner (1988), Shear & Dodge (1927), and Turner *et al.* (2001).

Neurospora sphaerospora (Y. Horie & Udagawa) D. García, Stehigel & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 85)

Anaxiella sphaerospora Y. Horie & Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **15**: 197 (1974).

Gelasinospora sphaerospora (Y. Horie & Udagawa) Arx, *Persoonia* **11**: 447 (1982).

Ascomata non-ostiolate, 330–700 µm diam. *Ascospores* globose to subglobose, (32–)38–44(–46) µm; walls irregularly reticulate with ovate pits, 1.5–5 µm, 6–8 germ pores scattered at each end.

Distribution: Nepal. Soil.

References: von Arx (1982) and Horie & Udagawa (1974).

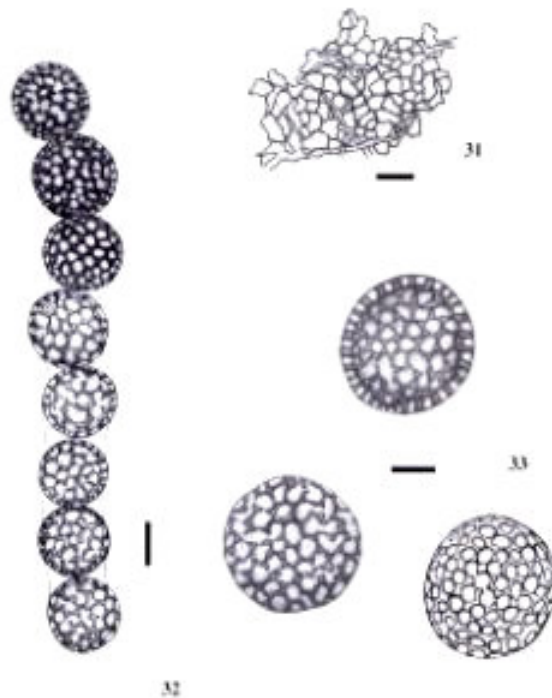
Neurospora stellata (Cailleux) D. García, Stehigel & Guarro, *comb. nov.* (Figs 18, 19, and 86)

Gelasinospora stellata Cailleux, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **87**: 622 (1971).

Ascomata non-ostiolate, 140–450 µm diam. *Ascospores* subspherical, (27–)30–36 × (23–)27–34 µm; walls

Synopsis of *Neurospora*

1134



Figs 31–33. *Neurospora uniporata*. Fig. 31. Detail of the peridium. Fig. 32. Ascus with ascospores. Fig. 33. Ascospores. Bars: Figs 31 and 32 = 20 μ m, Fig. 33 = 10 μ m.

reticulate with angular to subangular pits 4 μ m diam, one germ pore at each end.

Strains examined: IFO 30242 and CBS 56172 (ex-type).

Distribution: Central African Republic. Dung.

References: von Arx (1982) and Cailleux (1971).

Neurospora sublineolata (Furuya & Udagawa) Arx, *Persoonia* **11**: 447 (1982). (Figs 3, 4, and 87)
Anixiella sublineolata Furuya & Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **17**: 317 (1976).

Ascomata non-ostiolate, 180–240 μ m diam. *Ascospores* oval to ellipsoidal, (22–)24–30(–31) \times (14–)15–20(–22) μ m; wall with 18–20 longitudinal striations, which do not involve the episporial layer, and with inwardly projecting pits located on the intercostal veins, one germ pore at each end.

Strains examined: IMI 223881 (ex-type) and FGSC 5508.

Distribution: Japan. Soil.

References: von Arx (1982), Beatty *et al.* (1994), Furuya & Udagawa (1976), and Glass *et al.* (1988, 1990).

Neurospora terricola Goch. & Backus, *Mycologia* **54**: 557 (1962). (Fig. 88)

Ascomata ostiolate, 200–300 μ m diam. *Ascospores* oval, 20–27(–29) \times 16–22 μ m; wall with 19–21 longitudinal sometimes branch ribs, one apical germ pore.

Strain examined: CBS 298.63 (ex-type).

Distribution: USA. Soil.

References: Frederick *et al.* (1969), Glass *et al.* (1988, 1990), Gochenaur & Backus (1962), and Perkins & Turner (1988).

Neurospora tetraspora D. García, Stchigel & Guarro, *nom. nov.* (Fig. 89)

Gelasinospora tetrasperma Dowding, *Can. J. Res., ser. C* **9**: 294 (1933)

Gelasinospora calospora f. *tetrasperma* (Dowding) C. Moreau & M. Moreau, *Mycothèque. Lab. Crypt. Mus. nat. Paris* **3**: 41 (1951).

Ascomata ostiolate, 430–600 \times 270–450 μ m. *Asci* 4-spored. *Ascospores* ellipsoidal or elongate, 21–33 \times 12–20 μ m, often slightly flattened on one side; wall with inwardly projecting circular or slightly irregular pits, one germ pore at each end.

Strains examined: FMR 824 and FMR 7520.

Distribution: Canada, Finland, Russia, Spain, UK, and USA (Alaska). Dung and soil.

References: von Arx (1982), Dowding (1933), Fort *et al.* (1990), and Matsushima (1975).

Neurospora tetrasperma Shear & B. O. Dodge, *J. Agric. Res.* **34**: 1027 (1927). (Figs 20 and 90)

Neurospora erythraea Shear & B. O. Dodge, *J. Agric. Res.* **34**: 1027 (1927).

Neurospora torul F. L. Tai, *Mycologia* **27**: 330 (1935).

Anamorph: *Chrysomilia tetrasperma* (Shear & B. O. Dodge) Arx, *Sydowia* **34**: 17 (1981).

Colonies brown or orange. *Ascomata* ostiolate, 200–600 μ m in diam. *Asci* 4-spored. *Ascospores* ellipsoidal or elongate, (24–)31–36(–40) \times 15–19(–22) μ m; wall with 16–22 longitudinal sometimes branched ribs and ornate episporium, one germ pore at each end. *Conidia* subglobose to obovoid, smooth, 7–11(–16) \times 8–11 μ m, orange in mass.

Strains examined: FMR 473, FMR 5545, FMR 7369, and FMR 7969.

Distribution: Worldwide. From burnt vegetation and soil.

References: Frederick *et al.* (1969), Perkins *et al.* (1976), Perkins & Turner (1988), Shear & Dodge (1927), Tai (1935), and Turner *et al.* (2001).

Neurospora udagawae (R. S. Khan & J. C. Krug) D. García, Stchigel & Guarro, *comb. nov.* (Fig. 91)

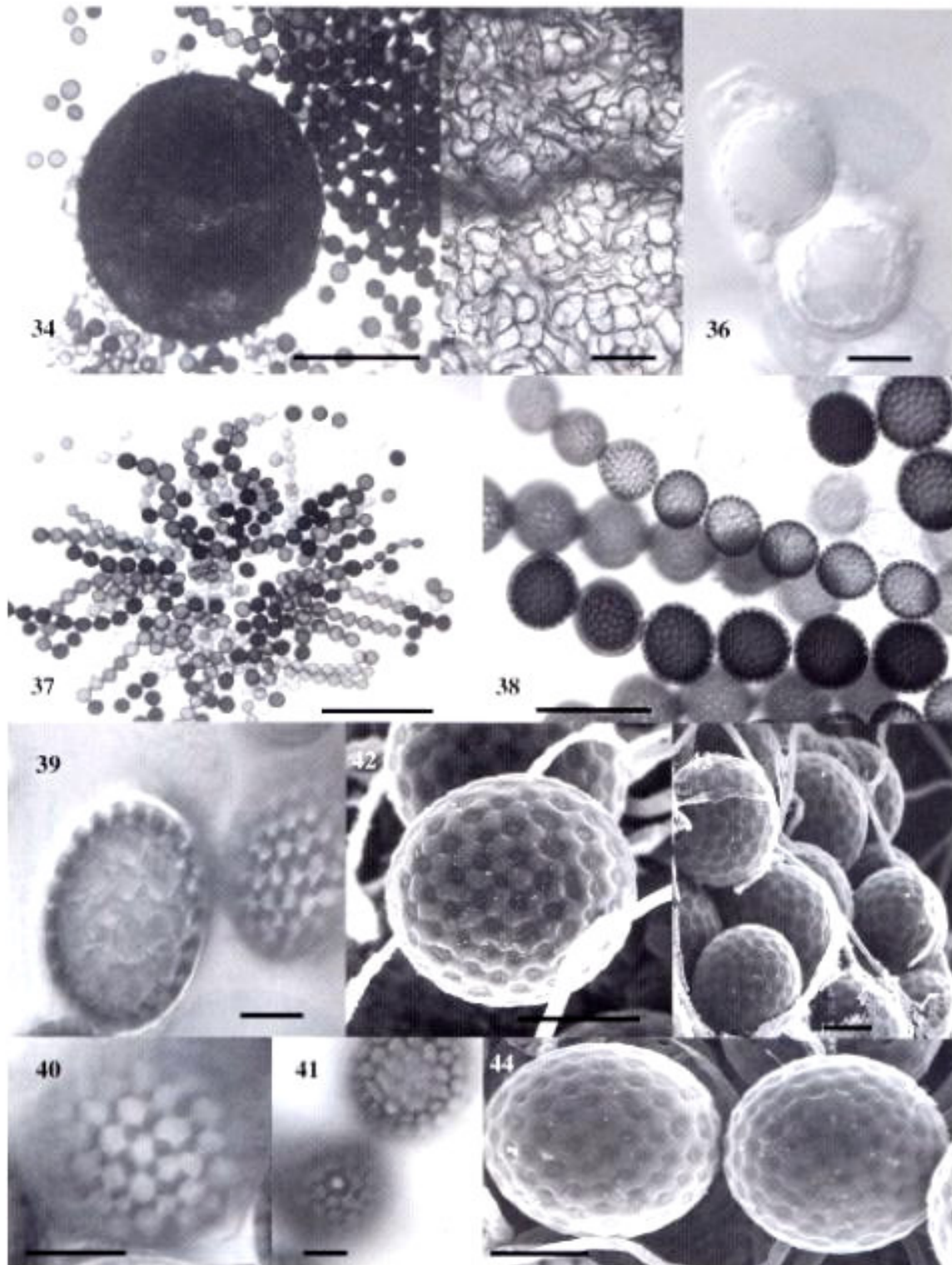
Gelasinospora udagawae R. S. Khan & J. C. Krug, *Sydowia* **41**: 180 (1989).

Ascomata ostiolate, 350–600 \times 250–450 μ m. *Ascospores* ellipsoidal to ovoid, occasionally ovoid-cymbiform, 20–22 \times 11–14 μ m; wall with numerous, small, round or ovate pits 0.5–1.5 μ m diam, one germ pore at each end.

Distribution: Pakistan. Soil.

References: Khan & Krug (1989b).

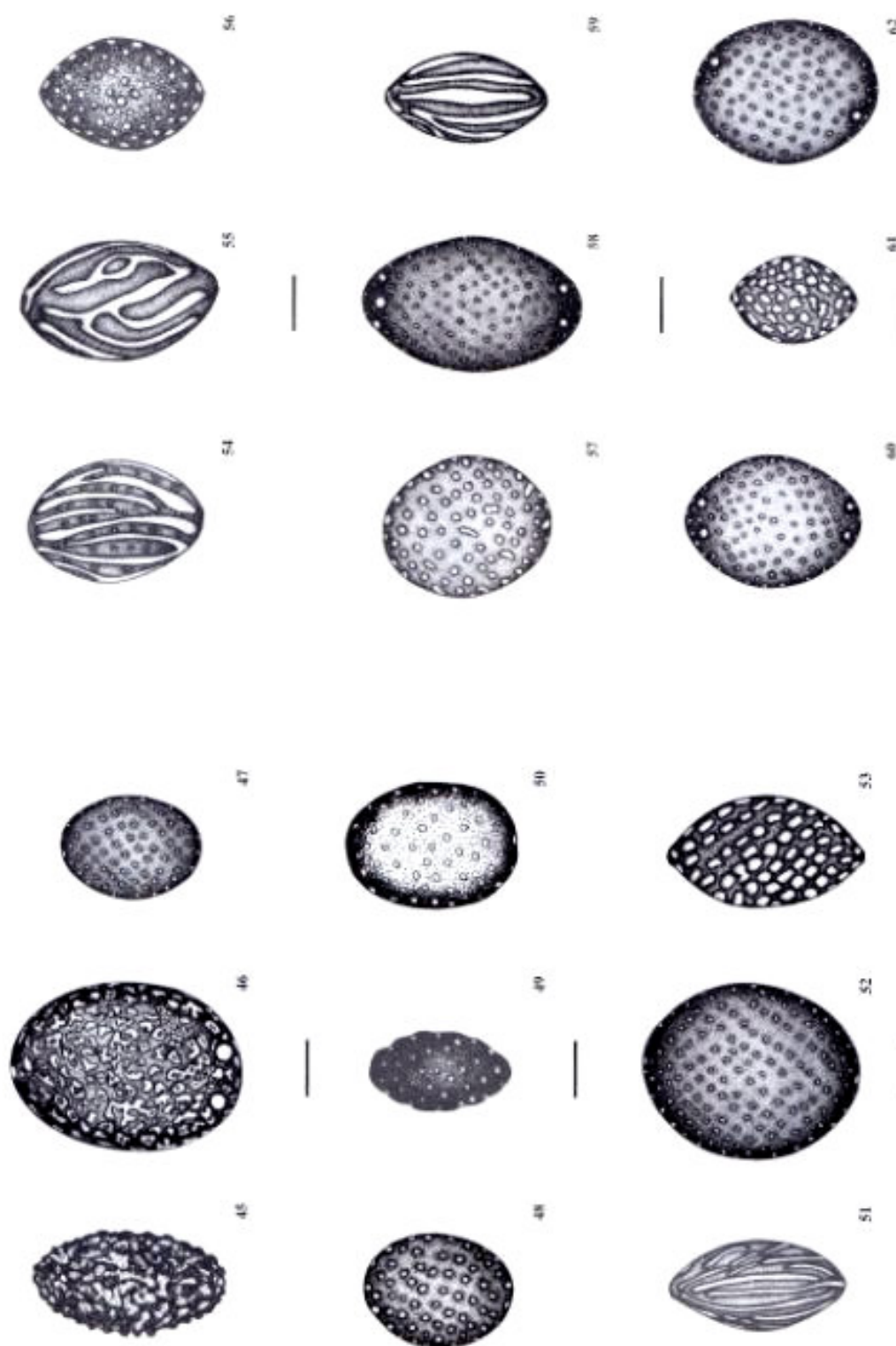
Neurospora uniporata Stchigel, D. García & Guarro, *sp. nov.* (Figs 31–44)



Figs 34–44, *Neurospora angorata*. Fig. 34, Ascocoma. Fig. 35, Detail of the peridium. Fig. 36, Detail of the ascus. Figs 37–38, Ascii with ascospores. Figs 39–41, Ascospores. Figs 42–44, Ascospores (SEM). Bars: Fig. 34 = 200 μ m, Figs 35–44 = 10 μ m

Synopsis of *Neurospora*

1136

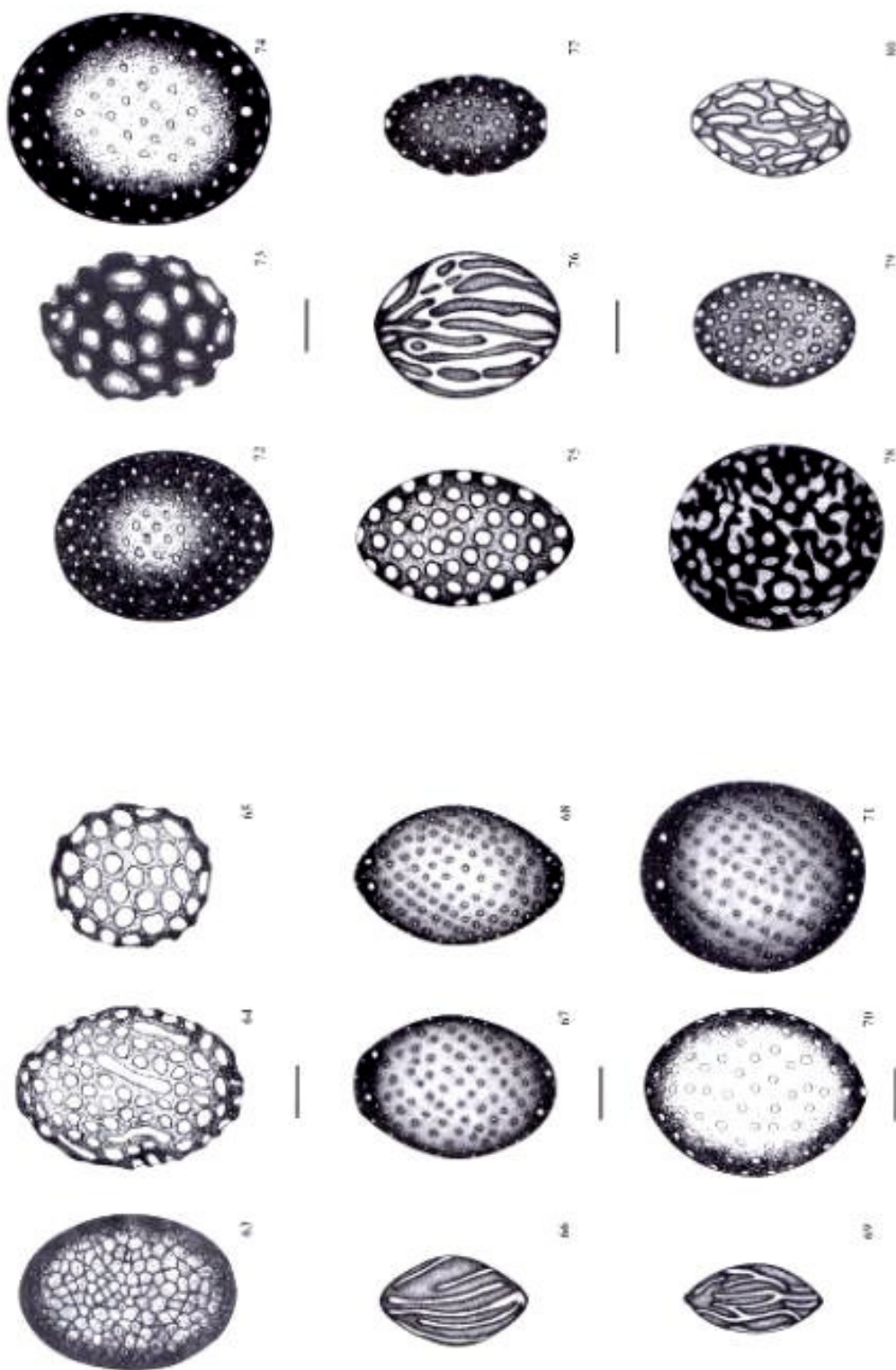


Figs 45-53. Ascospores of *Pseudoneurospora* and *Neurospora* species. Fig. 45. *Pseudoneurospora amorphosporata*. Fig. 46. *N. bonaventurae*. Fig. 47. *N. brevissima*. Fig. 48. *N. cifferta*. Fig. 49. *N. colospora*. Fig. 50. *N. crenata*. Fig. 51. *N. crassa*. Fig. 52. *N. cratichnora*. Fig. 53. *N. dicryophora*. Bars = 10 µm.

Figs 54-62. Ascospores of *Neurospora* species. Fig. 54. *N. albivertis*. Fig. 55. *N. dodgii*. Fig. 56. *N. enabulana*. Fig. 57. *N. fallaciosa*. Fig. 58. *N. fovearumica*. Fig. 59. *N. galopogonensis*. Fig. 60. *N. grandisensis*. Fig. 61. *N. lapidiphora*. Fig. 62. *N. heterospora*. Bars = 10 µm.

D. García and others:

1137

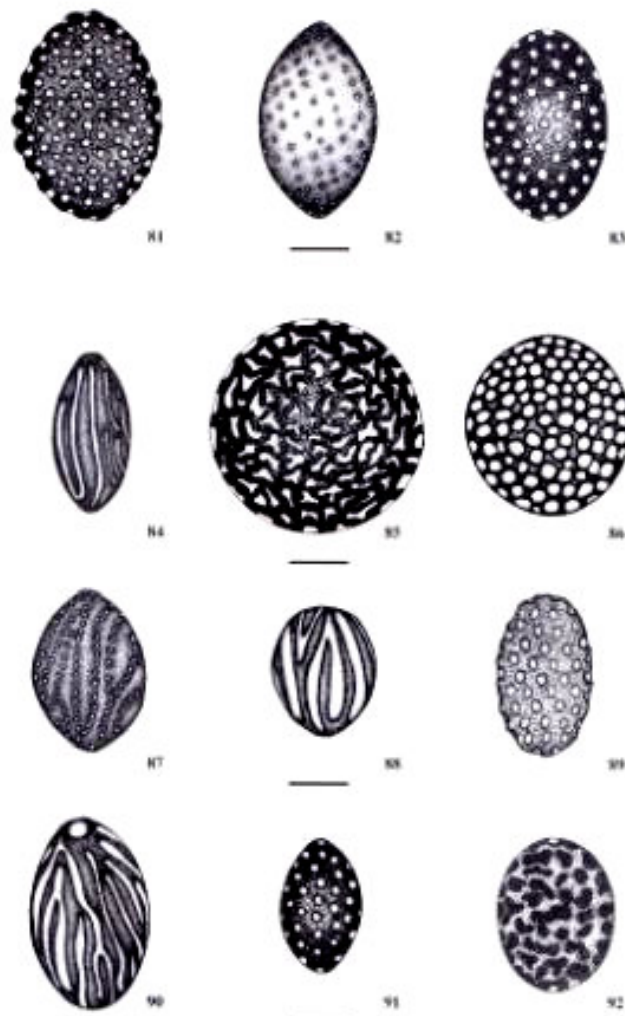


Figs 72-80. Ascomyces of *Ascomyces* species. Fig. 72, *A. microspora*; Fig. 73, *A. auribis*; Fig. 74, *A. auribis*; Fig. 75, *A. aurigiberosus*; Fig. 76, *A. penicillatus*; Fig. 77, *A. penicillatus*; Fig. 78, *A. penicillatus*; Fig. 79, *A. penicillatus*; Fig. 80, *A. penicillatus*. Bars = 10 µm

Figs 63-71. Ascomyces of *Ascomyces* species. Fig. 63, *A. bisulcatus*; Fig. 64, *A. bipunctatus*; Fig. 65, *A. sulcata*; Fig. 66, *A. medusa*; Fig. 67, *A. interced*; Fig. 68, *A. cubi*; Fig. 69, *A. bisulcatus*; Fig. 70, *A. amplexus*; Fig. 71, *A. microspora*. Bars = 10 µm.

Synopsis of *Neurospora*

1138



Figs 81–92. Ascospores of *Neurospora* species. Fig. 81, *N. saltoi*. Fig. 82, *N. santi-florii*. Fig. 83, *N. seminuda*. Fig. 84, *N. sitophila*. Fig. 85, *N. sphaerospora*. Fig. 86, *N. stellata*. Fig. 87, *N. sublineolata*. Fig. 88, *N. terricola*. Fig. 89, *N. tetraspora*. Fig. 90, *N. tetrasperma*. Fig. 91, *N. uliginosa*. Fig. 92, *N. varians*. Bars = 10 μ m.

Ascomata globosa, non ostiolata, 140–400 μ m diam. *Peridium* membranaceum, textura intricata vel epidermoidea compositum. *Asci* 8-spore, cylindrici. *Paraphyses* nullae. *Ascospores* uncellulares, globosae, atro olivacea-brunnea, 27–33(–35) μ m, reticulatis, cum foramine germinali singulari, 2–2.5 μ m diam. Status comitatus nullis.

Typus: Spain: Tarragona Province: Vandellós, isol. ex solo, April 1999. A. M. Sichel (CBS 112768 – holotypus; FMR 7273 – isotypus)

Mycelium composed of hyaline to pale brown hyphae, septate, branched and anastomosing, smooth, 4–17 μ m wide. *Colonies* on PCA attaining of 85 mm diam after 1 wk at room temperature (22–25 °C), flat, thin, consisting of submerged mycelium and sparse aerial hyphae, brown to dark brown (M. 6E2 to 6E6); reverse brown (M. 6E2). *Ascomata* superficial or immersed, scattered to grouped, globose, non-ostiolate, pale brown to dark brown at maturity, 140–400 μ m diam, with scarce

hypha-like hairs, hairs smooth, septate, light brown to brown, 3–7 μ m wide. *Peridium* 6–9 layered, brown, *textura intricata* to *epidermoidea*, consisting of brown, thin-walled hypha-like cells measuring 4–12 μ m diam, and irregular thick-walled cells measuring 7–18 μ m diam. *Asci* fasciculate, cylindrical, thin-walled, 238–335 \times 30–32 μ m, stipitate, rounded to truncate at the apex with an apical ring, which are distinguished only at early stages, 8-spored. *Paraphyses* filiform, not septate, 2–6 μ m thick. *Ascospores* uniseriate, one-celled, globose, 27–33(–35) μ m, hyaline when young, becoming olive-brown and opaque; walls ornamented with angular pits, forming a network pattern, with a circular and apical germ pore, 2–2.5 μ m diam. Anamorph unknown.

Notes: At 35 °C growing rapidly, but ascomata are not produced. *N. uniporata* resembles *N. indica*, *N. sphaerospora*, and *N. stellata*. All have globose

D. García and others

1139

ascospores of a similar size and similar ornamentation pattern. However, *N. uniporata* has a single germ pore and the others have two or multiple germ pores.

Neurospora varians (Furuya & Udagawa) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 92)
Gelasinospora varians Furuya & Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **17**: 314 (1976).

Ascomata ostiolate, 350–600 × 200–370 µm. *Ascospores* uniseriate, broadly ellipsoidal, 22–28 × 16–20 µm, rounded at both ends; walls with an irregular net-like pattern, with ovate to elongate ridges, 1.5–4 µm, one germ pore at each end.

Notes: *N. varians* is close to *N. pseudoreticulata*, but the two can be easily differentiated by the number of the germ pores, two in the former and up to four in the latter.

Strain examined: IMI 223880.

Distribution: Thailand, Soil.

References: von Arx (1982) and Furuya & Udagawa (1976).

Excluded species

Gelasinospora amorphoporcata was described by Udagawa (1980) on the basis of a single strain isolated from soil in Thailand. It is characterized by ascospores with several irregular and anastomosed crests that gives a reticulate appearance to their external surfaces. This peculiar ascospore ornamentation is not typical either of *Neurospora* or in any other fungal genus we seem. Therefore, the following new genus is proposed.

Pseudoneurospora D. García, Stchigel & Guarro, **gen. nov.**

Etym.: *pseudo* (Greek) = false, untrue; referred to the similarity with the redefined species of *Neurospora*.

Ascomata pyriformia, ostiolata, glabra vel leniter pilosa. *Peridium* membranaceum, textura angularis. *Asci* cylindrici, structura apicalis non-amyloideis, 8-spori. *Ascospores* uncellulares, ellipsoidea, reticulate cum cristis irregulariter

rotundatis ornatis, foramine germinalis apicalis. Status conidialis nullus.

Typus: *Pseudoneurospora amorphoporcata*.

Pseudoneurospora amorphoporcata (Udagawa) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 45)
Gelasinospora amorphoporcata Udagawa, *Trans. mycol. Soc. Japan* **21**: 19 (1980).

Ascomata superficial to immersed, scattered to grouped, pyriform and ostiolate, 400–600 × 160–200 µm. *Asci* cylindrical, 240–270 × 20–26 µm, rounded at the apex, with non-amyloid apical ring, 8-spored, *Paraphyses* numerous. *Ascospores* uniseriate, one-celled, ellipsoidal, (27–)28–34(–36) × 16–18(–22) µm; hyaline when young becoming dark brown to black, opaque, walls erratically reticulate, with irregular, rounded crest, crest 2 µm wide; one germ pore at each end.

Specimen examined: CBS 626.80.

Note: Unfortunately the strain examined only produced mycelium. However, the original description of this taxon is detailed and well-illustrated.

This species has some similarities with *Gelasinospora varians*, but in the latter the reticulate ornamentation pattern is formed by irregular pits. *Emblemospora* Jeng & J. C. Krug 1976 is also morphologically similar to *P. amorphoporcata*, although in *Emblemospora* the external wall is formed by fine, hyaline fissures, which confer the appearance of small plate-like markings (Jeng & Krug 1976). Similarly ornamented ascospores can be found in several genera of the *Sordariaceae*, e.g. *Copromyces* Lund, 1967, *Diplogelasinospora* Cain 1961, and *Isia* D. Hawksw. & Manohar 1978, but none of these combines the characters seen in *P. amorphoporcata*. *Pseudoneurospora* can be differentiated from *Copromyces* because the asci of the latter genus lack an apical ring (Lundqvist 1972). *Diplogelasinospora* has pitted and 2-celled ascospores (Cain 1961, Udagawa *et al.* 1973), and in *Isia* the reticulated ornamentation of the ascospores is produced by the compact disposition of convexly swollen warts (Hawksworth & Manohar-achary 1978, Udagawa & Sugiyama 1982).

Key to the species of *Neurospora*

| | | |
|------|--|-------------------|
| 1 | Ascospores pitted | 2 |
| | Ascospores with longitudinal striations | 39 |
| 2(1) | Ascospores with inwardly pits | 3 |
| | Ascospores without inwardly pits | 11 |
| 3(2) | Asci 8-spored | 4 |
| | Asci 4-spored | tetraspora |
| 4(3) | Ascospores to 31 µm long | 5 |
| | Ascospores more than 31 µm long | 7 |
| 5(4) | Ascomata ostiolate | 6 |
| | Ascomata non-ostiolate: ascospores 23–31 × 15–22 µm | endodonta |
| 6(5) | Ascospores globose to broadly ellipsoidal, 20–24(–27) × 15–20 µm | brevispora |
| | Ascospores ellipsoidal, 20–28 × 12–19 µm | calospora |
| 7(4) | Ascomata ostiolate | 8 |
| | Ascomata non-ostiolate: ascospores 30–42 × 24–33 µm | saitoi |

Synopsis of *Neurospora*

1140

Key to the species of *Neurospora* (Cont.)

| | | |
|--------|---|-------------------------|
| 8(7) | Ascospores with 1 or 2 germ pores | 9 |
| | Ascospores with 3 or more germ pores, 35–45 × 25–32 µm | hippopotama |
| 9(8) | Ascospores ellipsoidal | 10 |
| | Ascospores subglobose to globose, 31–43 × 26–32 µm | cratophora |
| 10(9) | Ascospores 27–33 × 18–22 µm, with slightly attenuated ends | seminuda |
| | Ascospores 32–38 × 22–28 µm, with rounded ends | santi-florii |
| 11(2) | Ascospores with an irregular ornamentation pattern | 12 |
| | Ascospores pitted, reticulate or nearly smooth | 14 |
| 12(11) | Ascospores with 3 or more germ pores | 13 |
| | Ascospores with 2 germ pores, 22–28 × 16–20 µm | varians |
| 13(12) | Ascospores with 2–4 germ pores, 37–47 × 27–35 µm | pseudoreticulata |
| | Ascospores up to 7 germ pores, 35–46 × 29–35 µm | bonaerensis |
| 14(11) | Ascospores with 2.5–7 µm wide pits | 15 |
| | Ascospores with 0.7–2.5 µm wide pits | 25 |
| 15(14) | Ascomata non-ostiolate | 16 |
| | Ascomata ostiolate | 19 |
| 16(15) | Ascospores with 2 germ pores | 17 |
| | Ascospores with 1 germ pore, globose, 27–35 µm in diam | uniporata |
| 17(16) | Ascospores less than 36 µm wide, subspherical | 18 |
| | Ascospores 38–46 µm diam, spherical | sphaerospora |
| 18(17) | Ascospores 24–31 × 20–28 µm | indica |
| | Ascospores 30–36 × 27–34 µm | stellata |
| 19(15) | Ascospores with 4 or more germ pores | 20 |
| | Ascospores with 1–2 germ pores | 21 |
| 20(19) | Ascospores with 4–8 germ pores and with angular pits to 3 µm diam, 37–56 × 28–36 µm | himalayensis |
| | Ascospores usually with 4 germ pores, with subangular pits 2–4 µm in diam, 32–38 × 22–28 µm | mirabilis |
| 21(19) | Ascospores broader than 16 µm | 22 |
| | Ascospores 19–26 × 14–16 µm | hapsidophora |
| 22(21) | Ascospores with angular to rounded pits | 23 |
| | Ascospores with elongate pits, 2–5 µm long, 24–35 × 14–20 µm | retispora |
| 23(22) | Ascospores with pits broader than 3.5 µm diam | 24 |
| | Ascospores 26–34(–40) × 16–20 µm, with pits to 3.5 µm diam | dictyophora |
| 24(23) | Ascospores 31–42 × 20–26 µm, pits to 5 µm diam | novoguineensis |
| | Ascospores 30–45 × 22–31, pits to 7 µm diam | nigeriensis |
| 25(14) | Ascospores with 1–2 germ pores | 26 |
| | Ascospores with more than 2 germ pores | 32 |
| 26(25) | Ascospores with 1 germ pore, 32–43(–47) × 27–33 µm | longispora |
| | Ascospores with 3 or more germ pores | 27 |
| 27(26) | Ascospores 20–22 × 11–14 µm | udagawae |
| | Ascospores 22–38 µm long | 28 |
| 28(27) | Asci fusoid to clavate | 29 |
| | Asci cylindrical | 31 |
| 29(28) | Ascospores with pits to 2 µm diam | 30 |
| | Ascospores with small pits, less than 1 µm diam, 27–32 × 16–18 µm | pseudocalospora |
| 30(29) | Ascospores 26–32 × 16–23 µm | reticulata |
| | Ascospores 30–38 × 25–34 µm | fallaciosa |
| 31(28) | Ascospores 22–28 × 18–21 µm, outer wall not markedly thick | caffera |
| | Ascospores 27–35 × 22–27 µm, outer wall rather thick | cerealis |
| 32(25) | Ascomata non-ostiolate or with a sessile ostiole | 33 |
| | Ascomata ostiolate | 34 |
| 33(32) | Ascospores broadly ellipsoidal, to 42 µm broad | micropertusa |
| | Ascospores subspherical, to 47(–50) µm broad | macrospora |
| 34(32) | Ascospores with 2–6 germ pores | 35 |
| | Ascospores with 6–12 germ pores, 40–52 × 34–40 µm | multiforis |
| 35(34) | Ascospores with circular pits | 36 |
| | Ascospores with pits often not sharply delimited, 38–52 × 25–32 µm | foveuconica |
| 36(35) | Ascospores with broadly rounded ends | 37 |
| | Ascospores with slightly attenuated ends, 34–42 × 25–31 µm | kobi |
| 37(36) | Ascospores 35–48 µm long | 38 |
| | Ascospores 34–38 × 24–28 µm | goundaensis |

D. García and others

1141

Key to the species of *Neurospora* (Cont.)

| | | |
|--------|--|-----------------------|
| 38(37) | Asci clavate to fusoid, ascospores in disposed 2-3 series 39-47(49) × 29-34 µm | inversa |
| | Asci cylindrical, ascospores uniseriate, 35-45(48) × 25-33 µm | heterospora |
| 39(1) | Asci 8-spored | 40 |
| | Asci 4-spored | tetrasperma |
| 40(39) | Anamorph absent; homothallic species | 41 |
| | Anamorph present; heterothallic species | 46 |
| 41(40) | Ascospores with 2 germ pores | 42 |
| | Ascospores with 1 germ pore | terricola |
| 42(41) | Ascوماتa ostiolate | 43 |
| | Ascوماتa non-ostiolate | sublineolata |
| 43(42) | Ascospores 10-21 µm broad | 44 |
| | Ascospores 24-30 µm broad, globose to subglobose, with 20-24 longitudinal ribs | pannonica |
| 44(43) | Ascospores with 18-22 ribs | 45 |
| | Ascospores with 14-16 ribs, 29-37 × 18-21 µm | dodgei |
| 45(44) | Ascospores 21-35 × 14-18 µm, intercostal veins distinct | galapagosensis |
| | Ascospores 22-30 × 10-15 µm, intercostal veins indistinct | lineolata |
| 46(40) | Ascospores 12-16 µm wide | 47 |
| | Ascospores 21-24 µm wide and with ribs indented by numerous pits | discreta |
| 47(46) | Colonies orange | 48 |
| | Colonies usually golden-yellow; ascospores 19-27 × 12-17 µm; conidia, 11-21 × 10-11 µm | intermedia |
| 48(47) | Ascospores 27-36 × 14-16 µm; conidia 6-8 µm diam | crassa |
| | Ascospores 23-26 × 10-14 µm; conidia 10-11 µm diam | sitophila |

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundació Ciència i Salut (Reus). We are indebted to the curators of CABI Bioscience, Egham (IMI); Centraalbureau voor Schimmcultures, Utrecht (CBS); Fungal Genetic Stock Center, Kansas (FGSC); and IFO (Biological Resource Centre, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba) for providing strains, and to Susana Maldonado for technical assistance. D.G. is grateful for fellowship grants from the Universitat Rovira i Virgili, and D.L.H. for support from the Ramón y Cajal programme of the Ministry of Science and Technology of Spain.

REFERENCES

Alexopoulos, C. J. & Sam, S. H. (1950) A new species of *Gelasinospora*. *Mycologia* **42**: 725-734.
 Arx, J. A. von (1973) Ostiolate and non ostiolate pyrenomyces. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, series C, Biological and Medical Science* **76**: 289-296.
 Arx, J. A. von (1981) *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. 3rd edn. J. Cramer, Vaduz.
 Arx, J. A. von (1982) A key to the species of *Gelasinospora*. *Persoonia* **11**: 443-449.
 Arx, J. A. von & Gams, W. (1967) Über *Pleurozia verruculosa* und die zugehörige *Chaetochytrium*-Konidienform. *Nova Hedwigia* **13**: 199-208.
 Beatty, N. P., Smith, M. I. & Glass, N. L. (1994) Molecular characterization of mating-type loci in selected homothallic species of *Neurospora*, *Gelasinospora* and *Aureocella*. *Mycological Research* **98**: 1309-1316.
 Booth, C. & Ebbert, M. H. (1961) *Thielavia reticulata* sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society* **44**: 214-216.
 Cailleux, R. (1971) Recherches sur la mycoflore coprophile continentale. Le genre *Sordaria*, *Gelasinospora*, *Banburyella*. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **87**: 461-626.
 Cain, R. F. (1950) Studies of coprophilous mycomycetes. I. *Gelasinospora*. *Canadian Journal of Research* **28**: 566-576.
 Cain, R. F. (1961) *Aureocella* and *Diploplectanomyces*, two genera with cleistothecial and potted ascospores. *Canadian Journal of Botany* **39**: 1667-1677.

Cano, J., Sagues, M., Barrio E., Vidal P., Castañeda, R. F., Gené, J. & Guarro, J. (2002a) Molecular taxonomy of *Aphanoascus* and description of two new species from soil. *Studies in Mycology* **47**: 155-164.
 Cano, J., Solé, M., Pitaarch, I. B. & Guarro, J. (2002b) *Ceratobasidium australiensis*, sp. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil. *Studies in Mycology* **47**: 165-172.
 Dettman, J. R., Harbinksi, F. M. & Taylor, J. W. (2001) Ascospore morphology is a poor predictor of the phylogenetic relationships of *Neurospora* and *Gelasinospora*. *Fungal Genetics and Biology* **34**: 49-61.
 Dowding, E. S. (1933) *Gelasinospora*, a new genus of pyrenomyces with pitted spores. *Canadian Journal Research* **9**: 294-305.
 Eriksson, C. E., Baral, H. C., Currah, R. S., Hansen, K., Kurtzman, C. P., Rambold, G. & Læssøe, T. (2003) Outline of *Ascomycota* - 2003. *Mycotaxa* **9**: 1-80.
 Font, F., Cano, J., Guarro, J. & Gené, J. (1990) Contribución al estudio de los ascomicetos del suelo de España. XI. *Boletín Sociedad Micológica de Madrid* **14**: 61-73.
 Frederick, L. F., Uecker, F. A. & Benjamin, C. P. (1969) A new species of *Neurospora* from soil of West Pakistan. *Mycologia* **61**: 1077-1084.
 Furuya, K. & Udagawa, S. (1976) New species of *Gelasinospora* and *Aureocella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **17**: 313-320.
 García, D., Schapel, A. M. & Guarro, J. (2002) A new species of *Sclerotium* from tropical soil. *Mycologia* **94**: 862-865.
 Glass, N. L., Metzberg, R. L. & Raja, N. B. (1990) Homothallic Sordariaceae from nature: the absence of strains containing only the α mating type sequence. *Experimental Mycology* **14**: 274-289.
 Glass, N. L., Vollmer, S. J., Stubbs, C., Großschäfer, J., Metzberg, R. L. & Yanofsky, C. (1988) DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* **241**: 570-573.
 Godenour, S. E. & Backus, M. P. (1962) A new species of *Neurospora* from Wisconsin lowland soil. *Mycologia* **54**: 555-562.
 Guarro, J. & Calvo, M. A. (1982) Ascomicetos del suelo de Cataluña IV. *Gelasinospora*. *Boletín de la Sociedad Micológica Castellana* **7**: 19-30.

Synopsis of *Neurospora*

1142

- Guarro, J. & Fort, F. (1984) Ascomycetes del suelo de Cataluña VIII *Gelasinospora*. *Collectanea Botanica* **15**: 259-265.
- Hawksworth, D. L. & Marthasachary, C. (1978) *Ista*, a new genus in the *Sordariaceae sensu lato* for *Thlasaria neocaledoniensis*. *Transactions of the British Mycological Society* **71**: 332-335.
- Horie, Y. & Udagawa, S. (1974) *Antoxella* and *Gelasinospora* from Himalayan soil. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **15**: 196-205.
- Jeng, R. S. & Krug, J. C. (1976) *Emblemispora*, a new genus of the *Sordariaceae*. *Canadian Journal of Botany* **54**: 1971-1976.
- Khan, R. S. & Krug, J. C. (1989a) New species of *Gelasinospora*. *Mycologia* **81**: 226-233.
- Khan, R. S. & Krug, J. C. (1989b) A new terricolous species of *Gelasinospora*. *Stalioa* **41**: 180-184.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution* **16**: 11-120.
- Kornerup, A. & Watscher, J. H. (1984) *Methods Handbook of Colour*: 3rd edn. Eyre Methuen, London.
- Krug, J. C. & Khan, R. S. (1991) A new homothallic species of *Neurospora* from Hungary. *Mycologia* **83**: 829-832.
- Krug, J. C., Khan, R. S. & Jeng, R. S. (1994) A new species of *Gelasinospora* with multiple germ pores. *Mycologia* **86**: 250-255.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. & Nei, M. (2001) MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1. Analysis software. *Bioinformatics* **17**: 244-245.
- Lundqvist, N. (1967) On spore ornamentation in the *Sordariaceae*, exemplified by the new cleistocarpus genus *Coprosicytes*. *Arkiv för Botanik, ser. 27*: 327-337.
- Lundqvist, N. (1972) Nordic *Sordariaceae* s. lat. *Symbolae Botanicae Upsalenses* **20** (1): 1-374.
- Mahoney, D. P., Huang, L. H. & Backus, M. P. (1969) New homothallic *Neurosporas* from tropical soils. *Mycologia* **61**: 264-274.
- Malloch, D. & Cain, R. F. (1970) New cleistothecial *Sordariaceae* and a new family, *Cosmochloetaceae*. *Canadian Journal of Botany* **49**: 869-880.
- Manibotis, J. (1965) A cleistothecial mutant of the perithecial fungus *Gelasinospora callospora*. *Mycologia* **57**: 21-35.
- Matsushima, T. (1971) *Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Guinea*. T. Matsushima, Kobe.
- Matsushima, T. (1975) *Icones Microfungorum a Matsushima Lectisore* T. Matsushima, Kobe.
- Matsushima, T. (1989) *Matsushima Mycological Memories, No. 6*. Matsushima Fungus Collection, Kobe.
- Matsushima, T. (1996) *Matsushima Mycological Memories, No. 9*. Matsushima Fungus Collection, Kobe.
- Miller, A. N. & Hubudorf, S. M. (2002) Character evolution in the *Lustigphaerinae sensu lato*. *Seventh International Mycological Congress, Book of Abstracts, Oslo 11-17 August 2002*: 4.
- Moreau, C. & Moreau, M. (1949) Quelques ascomycètes du Congo. *Revue de Mycologie* **2**: 50-66.
- Moreau, C. & Moreau, M. (1951) Le genre *Gelasinospora*. *La Mycologie, Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris)* **3**: 46-49.
- Nelson, A. C., Novak, R. O. & Backus, M. P. (1964) A new species of *Neurospora* from soil. *Mycologia* **56**: 384-392.
- O'Donnell, K. (1993) *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (D. R. Reynolds & J. W. Taylor, eds): 225-233. CAB International, Wallingford.
- Perkins, D. D. & Raju, N. B. (1986) *Neurospora discreta*, a new heterothallic species defined by its crossing behavior. *Experimental Mycology* **10**: 323-328.
- Perkins, D. D. & Turner, B. C. (1988) *Neurospora* from natural populations: toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental Mycology* **12**: 91-131.
- Perkins, D. D., Turner, B. C. & Barry, E. G. (1976) Strains of *Neurospora* collected from nature. *Evolution* **30**: 281-313.
- Pöggeler, S. (1999) Phylogenetic relationships between mating-type sequences from homothallic and heterothallic ascomycetes. *Current Genetics* **36**: 222-231.
- Pöggeler, S. (2001) Mating-type genes for classical improvements of ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**: 589-601.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Shear, C. L. & Dodge, B. O. (1927) Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia strobilica* group. *Journal of Agricultural Research* **34**: 1019-1042.
- Sülé, M., Cano, J., Pitarich, L. B., Sichel, A. M. & Guarro, J. (2002) Molecular phylogeny of *Grimmia* and related genera. *Studies in Mycology* **47**: 141-152.
- Sichel, A. M., Cano, J. & Guarro, J. (1998) A new species of *Gelasinospora* from Argentinian soil. *Mycological Research* **102**: 1405-1408.
- Sugiyama, M., Sumnerbell, R. C. & Mikawa, T. (2002) Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit (SSU) and large subunit (LSU) ribosomal DNA sequences. *Studies in Mycology* **47**: 5-23.
- Sussman, A. S. (1966) Types of dormancy as represented by conidia and ascospores of *Neurospora*. *Cuban Papers* **18**: 235-257.
- Tai, F. L. (1955) Two new species of *Neurospora*. *Mycologia* **27**: 328-330.
- Takada, M. (1973) Notes on soil-borne ascomycetes. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo* **16**: 529-531.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by a quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- Turner, B. C., Perkins, D. D. & Fairfield, A. (2001) *Neurospora* from natural populations: a global study. *Fungal Genetics and Biology* **32**: 67-92.
- Udagawa, S. (1980) New or note worthy Ascomycetes from southeast Asian soil. I. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **21**: 17-34.
- Udagawa, S., Furuya, K. & Horie, Y. (1973) Mycological reports from New Guinea and the Solomon Islands. 19. Notes on some ascomycetous microfungi from soil. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo* **16**: 503-520.
- Udagawa, S. & Sugiyama, Y. (1982) *New records and new species of ascomycetous microfungi from Nepal, a preliminary report on the expedition of 1980*. In *Reports on the Cryptogamic Study in Nepal* (Y. Otani, ed.): 11-46. [Miscellaneous Publication.] National Science Museum, Tokyo.
- Udagawa, S. & Takada, M. (1967) Notes on some Japanese ascomycetes. *Transactions of Mycological Society of Japan* **8**: 50-55.
- Valldosera, M. & Guarro, J. (1990) Estudios sobre hongos coprófilos aislados en España. XI. Ascomycetes. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* **14**: 75-80.
- Zhang, N. & Blackwell, M. (2002) Molecular phylogeny of *Melanospore* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycological Research* **106**: 148-155.

Corresponding Editor: D. L. Hawksworth

4.7. Estudio molecular de la familia Coniochaetaceae

D. García, A. M. Stchigel, J. Cano, M. Calduch, D. L. Hawksworth and J. Guarro. A molecular approach to the taxonomy of *Coniochaetaceae*.
(Somenido a publicación. *Mycological Research*)

A molecular approach to the taxonomy of *Coniochaetaceae*

Dania GARCÍA ^{1,2}, Alberto M. STCHIGEL ², José CANO ², Misericordia CALDUCH ², David L. HAWKSWORTH ³, Josep GUARRO ^{2*}

¹ *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical Alejandro de Humbold, calle 1 esq.2, Santiago de las Vegas, Boyeros, C. de La Habana, Cuba.*

² *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Tarragona, Spain.*

³ *Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, E-20840 Madrid, Spain.*

* *E-mail: josep.guarro@urv.net*

In recent years the taxonomy of pyrenomycetes has changed dramatically, however, the genera delimitation within the recently proposed order *Coniochaetales* is not yet resolved. In order to clarify the phylogenetic relationships of *Coniochaetaceae* members we have performed a molecular study based on the analyses of the sequences of the partial SSU and of the variable domains of the LSU rDNA genes. The phylogenetic trees obtained do not support the monophyly of the genera *Coniochaeta*, *Coniochaetidium*, *Ephemeroascus*, and *Poroconiochaeta*. A detailed morphological study confirmed that there are not enough differences to distinguish among these genera. Thus, the three latter mentioned genera are formally treated here as synonyms of *Coniochaeta*. The phialidic anamorph has proven to be an informative phylogenetic character in *Coniochaetales*, while that the type of ascomata (cleistothecial or perithecial) and the ornamentation of the ascospore were of scarce taxonomical value at generic level. The description of the genus *Coniochaeta* has been emended. The genera *Coniocessia*, *Pseudorosellinia*, and *Novaxylaria* are proposed as new within the order *Xylariales* to accommodate *Coniochaeta nodulisporioides*, *Coniochaeta emodensis*, and *Coniolaria murandii*, respectively. The taxonomic positions of the genus *Synaptospora* and *Wallrothiella subiculosa* are discussed.

* Corresponding author

INTRODUCTION

The family *Coniochaetaceae* was erected by Malloch and Cain to accommodate the genera *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke and *Coniochaetidium* Malloch & Cain (Malloch & Cain 1971). The most distinctive morphological features of this family are the presence of germ slits in the ascospores, which differentiate these fungi from *Sordariaceae*, and its phialidic anamorphs, which belongs to *Lecythophora* Nannf. (Barr 1990, Weber 2002). *Xylariaceae* Tul & C. Tul is a close family with stromatic ascomata and holoblastic conidiogenesis, which are absent in *Coniochaetaceae*.

Coniochaetaceae has been traditionally included in *Sordariales* (Checa *et al.* 1988, Barr 1990, Lee & Hanlin 1999, Kirk *et al.* 2001, Eriksson *et al.* 2004), however, this is not universally accepted (Weber, Görke & Begerow 2002) and the new order *Coniochaetales* has been recently proposed based on this family (Huhndorf, Miller & Fernández 2004). *Coniochaetaceae*, apart from the two mentioned genera, currently encompasses also *Barrina* A. W. Ramaley, *Coniolaria* Seigle-Mur., Guiraud, Seteiman & Sage (not validly published, Eriksson & Hawksworth 1998), *Ephemeroascus* Emden, *Poroconiochaeta* Udagawa & Furuya, and *Synaptospora* Cain (Eriksson 2004, Huhndorf *et al.* 2004). The genus *Ascotrichella* Valldos. & Guarro is a morphologically similar genus, characterized by non-stromatic ascomata, non-amyloid asci, ascospores with germ slit, and a *Humicola*-like anamorph, however, it has been considered to be a member of *Xylariaceae* (Valldosera & Guarro 1988, Whalley 1996).

The genera of the *Coniochaetaceae* were primarily delimited by the differences in their ascomata (ostiolate in *Coniochaeta*, and non-ostiolate in *Coniochaetidium* and *Ephemeroascus*) (Malloch & Cain 1971, van Emden 1973). The ornamentation of the ascospore wall was also considered a useful criterion, and the presence of pitted ascospores justified the erection of *Poroconiochaeta* (Udagawa & Furuya 1979). The presence of phialidic, verticillate conidiogenous cells was considered a distinctive character to separate *Ephemeroascus* from *Coniochaetidium* (van Emden 1973). Recent studies have demonstrated that a taxonomic classification based only on morphological characters frequently does not correlate with the

phylogenetic relationships inferred from DNA sequences (Réblova & Winka 2000, Réblova & Seifert 2004). Thus, the usefulness of some of these morphological characters for delimiting supra-specific taxa has been questioned. For instance, the presence of ostiole in the ascoma has proven to be a variable character, not useful for the delimitation of genera (von Arx 1973, Suh & Blackwell 1999). The shape and ornamentation of the ascospores have also been considered homoplastic characters with poor phylogenetic value in some groups of ascomycetes (Dettman, Harbinski & Taylor 2001, Zhang & Blackwell 2002, Solé *et al.* 2002, Miller 2003). In addition, the structure and morphology of the conidiogenous cells seem to be insufficient for delimitation of taxa at the generic level (Réblová & Winka 2000).

The main aim of this study was to determine the phylogenetic relationships among the members of the *Coniochaetaceae*. For this purpose we have performed analyses of the ribosomal small subunit (SSU) and large subunit (LSU) rDNA genes sequences from a set of strains of representative species of such family.

MATERIALS AND METHODS

Strains studied

The fungi sequenced in this study are listed in Table 1. Additional sequences obtained from GenBank are listed in Table 2.

DNA extraction, PCR amplification, sequencing, and sequence alignment

The DNA was isolated as described by Cano Guarro and Gené. (2004). Detailed protocols for amplification and sequencing of the SSU and LSU rDNA genes were described in Cano *et al.* (2002a) and García *et al.* (2004), respectively.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei 1987) with the MEGA 2.1 computer program (Kumar *et al.* 2001). The trees were constructed using

the Kimura-2-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

General analysis

Fig. 1 shows the phylogenetic tree of the partial SSU rDNA sequences of 29 strains, belonging to 11 species of *Coniochaetaceae*, some representative members of the class *Sordariomycetes* and *Aphanoascus mepitalis* (Malloch & Cain) Cano & Guarro as out-group. Three major clades were formed, which corresponded to the three sub-classes of *Sordariomycetes* i.e. *Hypocreomycetidae* (98 % bootstrap value), *Sordariomycetidae* (86 % bootstrap value), and *Xylariomycetidae* (73 % bootstrap value). The recently erected order *Coniochaetales* (Huhndorf et al. 2004) formed a well-supported sub-clade (81 % bootstrap value) within the *Sordariomycetidae*. In this analysis the genus *Coniochaeta*, as currently circumscribed, was found to be polyphyletic. *Coniochaeta nodulisporioides* D. Hawksw. was placed within the *Xylariomycetidae* very far from the other species of the genus, which were mixed with species of the genera *Coniochaetidium*, *Ephemeroascus*, and *Poroconiochaeta*.

Since in pyrenomycetes domains of LSU rDNA gene have been found to evolve more rapidly than SSU rDNA gene (Zhang & Blackwell 2002), partial sequences of the former were used to study the relationships between *Coniochaeta* and allied genera and to investigate more precisely the placement of *C. nodulisporioides*. Fig. 2 shows the phylogenetic tree obtained from the analysis of 44 strains, belonging to different species of the class *Sordariomycetes*. In this analysis we have included also the genera *Barrina*, recently related to *Coniochaetales* (Huhndorf et al. 2004), *Coniolaria*, genus very similar to *Coniochaeta* but with a holoblastic anamorph (Seigle-Murandi et al. 1995); and moreover *Wallrothiella subiculosa* Höhn., which showed a confused taxonomical position within *Sordariales* (Réblová & Winka 2000). The topology of the tree was similar to that derived from SSU sequences data. The order

Coniochaetales received a high bootstrap support (96%), the species of *Coniochaeta* again was revealed as polyphyletic, and the placement of *C. nodulisporioides* within the sub-class *Xylariomycetidae* was also confirmed. Similarly to *Coniochaeta* the genera *Coniochaetidium*, *Ephemeroascus*, and *Poroconiochaeta* did not form natural groups. The species of these genera were distributed in different branches, interspersed with species of other genera. Interestingly, *W. subiculosa* appeared within the *Coniochaetales* clade, and *Coniolaria murandii* was in the sub-class *Xylariomycetidae*, related with two species of *Xylaria* Hill ex Schrank (*Xylariaceae*) included in the study (73 % bootstrap value)

Fig. 3 shows the phylogenetic tree derived from the analysis of LSU rDNA sequences but restricted only to members of *Coniochaetales*. In this study *Aporothielavia leptoderma* (C. Booth) Malloch & Cain, *Lasiosphaeria ovina* (Pers.) Ces. & De Not., and *Sordaria fimicola* (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not. (*Sordariales*) were used as out-group. All the strains of *Coniochaetales* formed an in-group with 98 % of bootstrap support. They were distributed among four major clades, although neither of them received a significant bootstrap support. *Coniochaeta* was revealed as paraphyletic and its species appeared distributed into the four clades interspersed with members of the other genera included in the study. *Barrina polyspora*, *Coniochaeta cruciata*, *Coniochaeta hansenii*, and *Wallrothiella subiculosa*, formed a first basal clade (clade I), although, they were genetically distant each other. Three strains of *Coniochaeta malachotricha* (Auersw. ex Niessl) Traverso, the type species of *Coniochaetidium*, *C. ostreum* Malloch & Cain, and *E. verticillatus* formed another clade (clade II) although not well-supported. Clade III included a branch with the single species *Lecythophora hoffmannii* (J. F. H. Beyma) W. Gams & McGinnis and a well-supported group (85 % bootstrap value) constituted by three strains of *Coniochaeta ligniaria* (Grev.) Cooke, one of *Coniochaeta vetulina* (Fuckel) Munk, and one of each of the following four species of *Lecythophora*, *L. fasciculata* (J. F. H. Beyma) E. Weber, Görke & Bergerow, *L. lignicola* Nannf., *L. mutabilis* (J. F. H. Beyma) E. Weber, Görke & Bergerow, and *L. luteovirides* (J. F. H. Beyma) E. Weber, Görke & Bergerow. Clade IV was divided into two branches. The basal branch was only formed by the type species of genus *Poroconiochaeta*, *P. discoidea* Udagawa & Furuya, that appeared very far from the other

species of this genus included in the study. The second branch encompassed three well-supported groups. The first comprised *Coniochaetidium boothii*, *Coniochaeta subcorticalis* (Fuckel) Munk, and *Coniochaeta pulveracea* (Ehrh.) Munk (100 % of bootstrap value); the second one comprised *Coniochaeta tetraspora* Cain and *L. decumbes* (J. F. H. Beyma) E. Weber, Görke & Bergerow (97 % of bootstrap support); and the third grouped three species of *Poroconiochaeta*, *P. punctulata* Udagawa & Furuya, *P. savoryi* (Booth) D. García, Stchigel & Guarro, and *P. tetraspora* D. García, Stchigel & Guarro (96 % bootstrap support).

The Fig. 4 shows the phylogenetic tree obtained from the analysis of LSU sequences of 27 strains of six families of *Xylariales* (*Apiosporaceae*, *Clypeosporaceae*, *Diatrypaceae*, *Graphostomataceae*, *Hyponectriaceae*, and *Xylariaceae*), and the aim of this analysis was to determine more precisely the phylogenetic relationships of *C. nodulisporioides* and *C. murandii*, which previous threes excluded from *Coniochaetales*, with members of such families. Some members of *Sordariales*, i.e. *Aporoethelium leptoderma*, *Lasiosphaeria ovina*, and *Sordaria fimicola* were used as out-group. Although few members of each family were included in the analysis, only *Diatrypaceae* (98 % bootstrap value) and *Apiosporaceae* (100 % bootstrap value) were phylogenetically supported. *Xylariaceae* was clearly revealed as polyphyletic. *Hypoxylon fragiforme* (Pers.: Fr.) J. Kickx fil. and *Daldinia concentrica* (Bolton: Fr.) Ces. & De Not. were grouped in the basal clade (98 % bootstrap support), which was very distant from the other species of *Xylariaceae* such as *Astrocystis cocoës* (Henn.) Laessøe & Spooner, *Fasciatispora petrakii* (Mhaskar & V.G. Rao) K.D. Hyde, *Halorosellinia oceanica* (S. Schatz) Whalley, E.B.G. Jones, K.D. Hyde & Laessøe, *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill., *Xylaria curta* Fr., and *X. hypoxylon* (L.) Grev. *Coniochaeta nodulisporioides* showed a certain although distant relationship with *Oxydothis frondicola* K.D. Hyde, and members of *Hyponectriaceae* (*Appendicispora* sp. and *Hyponectria buxi* (DC.) Sacc.). *Coniolaria murandii* appeared related with *A. cocoës* and *R. necatrix*, members of *Xylariaceae* (78% bootstrap value).

In general, the analyses from the LSU rDNA sequences correlated poorly with the morphological criteria used for delimiting genera in *Coniochaetales*, suggesting that the current taxonomical classification is clearly artificial.

The genus Coniochaeta

Concerning *Coniochaeta*, the different analyses have demonstrated that *C. hansenii* and *C. cruciata* were the most divergent species. Both were included in a basal clade together with *Barrina* and *Wallrothiella* (Fig. 3). *C. hansenii* has only been reported from dung (Mahoney & LaFavre 1981, Checa *et al.* 1988), and as other coprophilic species [e.g. *C. multispora* Cain, *C. philocoproides* (Griffiths) Cain, *C. polymegasperma* M. J. Richardson, and *C. polysperma* Furuya & Udagawa] this species is characterized by multispored asci. *C. cruciata* was described based on only one strain isolated from *Quercus ilex* L. (Fort & Guarro in Checa *et al.* 1988). This species is easily differentiated by its cruciform ascospores (in section view), which resemble those of the soil-borne species *C. extramundana* Mahoney & LaFavre. Recent studies in *Sordariales* and *Xylariales* demonstrated that the number of ascospores per ascus and the ascospore morphology are homoplastic characters, which have appeared several times in the evolution, and without phylogenetic value at generic level (Miller 2003, Acero *et al.* 2004). In spite of the this peculiar characteristic and of the relative genetic distance from the rest of the species of *Coniochaeta* we think that *C. cruciata* and *C. hansenii* have to be included in *Coniochaeta* because on the other hand they have the most distinctive morphological features of this genus. This distant phylogenetic position from the rest of *Coniochaeta* could be as result of a limited number of species included in the analyses. The close genetic relationships between *C. tetrasperma* Cain and *Lecythophora decumbes* (J. F. H. Beyma) E. Weber, Görke & Begerow indicates that probably they are two states of the same species. The latter had not been connected to any teleomorph up to now (Weber 2002, Weber *et al.* 2002), but the conidial state of *C. tetrasperma* described by Cain (1961) was very similar to *L. decumbes*. Both form reduced adelophialides, and the shape and size of conidia are also similar (Cain 1961, Weber 2002). The different colour of the colonies, dark in *L. decumbes* and pinkish in *C. tetrasperma* does not seem to be of phylogenetic value, because the well-supported clade III formed by *C.*

ligniaria, *C. vetulina*, and some species of *Lecythophora* (Fig. 3) encompasses species with pinkish to salmon orange colonies as well as species with darker colonies.

The present study also showed that *C. nodulisporioides*, which possesses an anamorph with holoblastic conidiogenesis (Hawksworth 1978), is close to *Xylariales* (Figs 1, 2, and 4). This agrees with previous authors [Barr 1990, Laessøe 1994, Hawksworth, and Rogers (in: Barr & Cannon 1994)], who considered that *Coniochaeta* should be restricted to the species with phialidic anamorphs and that those species with *Nodulisporium*- or *Geniculosporium*- like anamorphs, e.g. *C. nodulisporioides* and *C. emodensis* Udawaga & Y. Horie should be excluded from the genus. In *Xylariales* molecular studies have demonstrated that the type of anamorph is of taxonomical value (Sánchez-Ballesteros *et al.* 2000, Sánchez-Ballesteros 2001). The hyaline anamorph of *C. nodulisporioides* is unique in *Xylariales*, and in spite of the members of *Nodulisporium* are pigmented, it has been considered *Nodulisporium*-like (Hawksworth 1978). Based on molecular and morphological data, we propose the new genus *Coniocessia* to accommodate *C. nodulisporioides*, although its inclusion in any of the known families of *Xylariales* needs further investigations.

The morphological features of *Coniocessia* are similar to those of *Xylariaceae* but this study proved that this species is phylogenetically closer to *Hyponectriaceae* than to *Xylariaceae* (Fig. 4). Members of *Hyponectriaceae* as well as members of the other families of *Xylariales*, with the exception of *Xylariaceae*, can be differentiated from *Coniocessia* by their hyaline, yellow to pinkish or light brown ascospores, and by the absence of an elongate germ slit (Barr 1990, Hyde, Fröhlich & Taylor 1998). In this study, *Oxydothis frondicola* K.D. Hyde was the most genetically close species to *Coniocessia* (Fig. 4), however, species of *Oxydothis* Penz. & Sacc. are characterized by long, cylindrical asci with an amyloid sub-apical apparatus, and hyaline to light brown, long to filiform, bicellular ascospores lacking elongate germ slit. In addition, they have a *Selenosporella*-like anamorph (Samuels & Rossman 1987, Barr 1990, Fröhlich & Hyde 1994).

Udagawa and Horie (1982) proposed *Coniochaeta emodensis* for a single isolate from the soil of Nepal. It is characterized by non-stromatic ascomata, non-amyloid asci, dark brown

ascospores with a longitudinal germ slit, and an anamorph with holoblastic, sympodial conidiogenesis, and denticulate conidiogenous cells. Unfortunately, material of this species is not available for study; however, the authors provided a complete description and very informative illustrations of the species, which allow to recognize this taxon as a member of *Xylariales*. Some authors have considered *C. emodensis* and *C. nodulisporioides* to be very related species (Udagawa & Horie 1982, Barr 1990, Laessøe 1994), however, we think that they are not congeneric. Their anamorphs are very different from each other. *C. nodulisporioides* has hyaline conidiophores and conidia, swollen conidiogenous cells with persistent conspicuous denticles, whereas *C. emodensis* possesses pale yellowish brown conidiophores and conidiogenous cells with very short and fragile denticles. The anamorph of *C. emodensis* as well as those of some members of *Xylariaceae* [*Collodiscula*, *Entoleuca* Syd., *Euepixylon* Füsting, *Hypocora* (Fr.) J. Kickx f., *Leprieuria* Laessøe, J.D. Rogers & Whalley, *Nemania* S. F. Gray, *Podosordaria* Ellis & Holw., *Rosellinia*, and *Whalleya* J. D. Rogers, Y. –M. Ju & San Martín (Whalley 1996, Rogers, Ju & Adams 2002)] has been referred as *Geniculosporium* Chester & Greenhalg or *Geniculosporium*-like. However, all these species are morphologically very different from *C. emodensis*. They are characterised by the presence of well-developed stromatic tissues, which in some genera are also multiperitheciate (*Entoleuca*, *Euepixylon*, *Leprieuria*, *Nemania*, *Podosordaria*, and *Whalleya*), bipartite (*Whalleya*) or stipitate (*Leprieuria*); and by asci with distinct, often amyloid apical apparatus. Ascospores in *Euepixylon* show moreover a poroid germ slit and an inconspicuous, hyaline appendage in immature stages (Rogers *et al.* 2002, Fournier & Magni 2004), and *Collodiscula*, has two-celled ascospores which lacking germination site (Samuels, Rogers & Nagasawa 1987). Although the circumscription of *Xylariaceae* and the delimitation of their genera remain unclear (Whalley 1996, Sánchez-Ballesteros 2001, Smith, Liew & Hyde 2003) we think that *C. emodensis* belongs to an undescribed genus of that family. The new genus *Pseudorosellinia*, is proposed for this taxon.

The genus Coniochaetidium

The genus *Coniochaetidium* is only distinguished from *Coniochaeta* by the presence of cleistothecial ascomata. It encompasses four species, *C. boothii*, *C. mirabile* Udagawa & Tsubouchi, *C. nuciforme* Guarro, Gené, Al-Bader & Abdullah, and *C. ostreum* (Malloch & Cain 1971, von Arx 1975, Udagawa & Tsubouchi 1986, Guarro *et al.* 1997, García, Stchigel & Guarro 2003). However, our phylogenetic analyses confirmed that this character is of poor taxonomical value. The two species included in the study, *C. ostreum* and *C. boothii*, were nested in different groups, interspersed with species of *Coniochaeta* and *Ephemeroascus*. *Coniochaetidium* is formally treated here as a synonym of *Coniochaeta*, and four new combinations are proposed. As it was mentioned above, the type of anamorph has demonstrated to be a phylogenetic informative character in *Coniochaetales*. However, the conidial state in *C. ostreum* was simply described as producing aleuriospores (Malloch & Cain 1971), which is an obsolete and confused term (Hughes 1953, Kendrick 1971, Kirk *et al.* 2001). von Arx (1975) referred the presence of blastoconidia, although, we were not able to see such conidia in an ex-type culture. Instead we observed only abundant clamydospores in chains or terminal. A holoblastic anamorph with a retrogressive conidiogenesis was described for *C. mirabile*, and identified as a member of *Cladobotryum* Ness, emend. Rogerson & Samuels (Udagawa & Tsubouchi 1986). Retrogressive conidiogenesis is quite rare in conidial fungi (Kendrick 1985), they have been described for some anamorphic states of *Hypomyces* (Fr.) Tul. such as *Cladobotryum* and *Trichothecium* Link (Rogerson & Samuels 1993, Gams *et al.* 1998). However, phylogenetic studies in *Hypomyces* suggested that retrogressive conidiogenesis does not have taxonomical value at supra generic level. Species of *Hypomyces* with retrogressive conidiogenesis formed a clade, which also included other species with phialidic conidiogenesis (*Verticillium* Ness: Fr. and *Gliocladium* Corda) (Pöldmaa, Larsson & Kõljalg 1999). Therefore, *C. mirabile* is accepted here as member of the re-described genus *Coniochaeta*.

The genus Ephemeroascus

van Emden (1973) erected the genus *Ephemeroascus* for a single species isolated from soil in Netherlands, characterized by cleistothecial ascomata and ascospores with an elongate germ slit. That author separated *E. verticillatus* from *Coniochaetidium* by the presence of phialoconidia and excluded it from *Coniochaetaceae* by the absence of pinkish orange colonies, because Malloch and Cain (1971) had referred this feature as one of the most distinctive character in the family. However, *C. vetulina* and some species of *Lecythophora* are characterized by the production of darker pigmented colonies (Weber 2002). The anamorph of *Ephemeroascus* was described having erect conidiophores and discrete phialides in a verticillate arrangement (van Emden 1973), which was later defined as *Verticillium*-like (von Arx 1975, Mahoney & LaFavre 1981, Kirk *et al.* 2001). A similar anamorph was observed in *Coniochaeta cypraespora* van der Linde (van der Linde 1991) and was referred as *Paecilomyces*-like. Future molecular studies are needed to evaluate if the presence of a verticillate anamorph has phylogenetic value within *Coniochaeta*, however, our results suggest that this character or the presence of cleistothecial ascomata are insufficient for excluding *Ephemeroascus* from the genus *Coniochaeta*. Both genera are treated here as synonyms.

The genus Poroconiochaeta

The distinctive character to segregate *Poroconiochaeta* from *Coniochaeta* was the presence of pitted ascospores in the former (Udagawa & Furuya 1979). The ornamentation of the ascospore wall had been traditionally considered an important taxonomic character to define genera in many groups of ascomycetes. However, in recent years numerous studies have demonstrated that the generic distinction based only on this character does not has a phylogenetic support (Sánchez-Ballesteros 2001, Dettman *et al.* 2001, Cano *et al.* 2002b, Solé *et al.* 2002, Sugiyama, Summerbell & Mikawa 2002, Zhang & Blackwell 2002, Huhndorf *et al.* 2004, García *et al.* 2004). This has been confirmed by our results. The species of *Poroconiochaeta* did not

form a monophyletic group, they were interspersed with species of *Coniochaeta* and *Coniochaetidium* (Figs 2 and 3). A detailed examination of all the species accepted in the genus *Poroconiochaeta* revealed that the most representative features of the colonies, ascomata, asci, and even the anamorph state of *P. discoidea* (Udagawa & Furuya 1979) are similar to those described for the genus *Coniochaeta*. Therefore, *Poroconiochaeta* is considered to be a synonym of *Coniochaeta*.

Other genera

Wallrothiella Sacc. is a large and confuse genus which has been considered to be a member of *Trichosphaeriaceae* (*Trichosphaeriales*) (von Arx & Müller 1954), *Niessliaceae* (*Hypocreales*) (Barr 1990) or related to *Chaetosphaeriaceae* (*Chaetosphaeriales*) (Samuels & Barr 1997, Réblová & Winka 2000). Phylogenetic studies based on LSU sequences excluded it from the cited families but did not resolve its taxonomical position (Zhang & Blackwell 2002, Réblová & Winka 2000, Réblová & Seifert 2004). *Wallrothiella* is characterized by non-stromatic perithecia, asci with non-amyloid apical ring, hyaline, globose ascospores with no germ pore or slit, and a phialidic anamorph described for *W. subiculosa* [*Pseudogliomastix protea* (Sacc.) W. Gams (Gams & Boekhout 1985)] characterized by branched, pigmented conidiophores and somewhat darker conidia. Our LSU rDNA sequences analyses showed that *W. subiculosa* belongs to *Coniochaetales*.

Barrina A. W. Ramaley is a monotypic genus characterized by immersed ascomata, multispore asci, and one-celled, hyaline ascospores, which germinate within the ascus producing a phialidic anamorph (ascoconidia) (Ramaley 1997). Ramaley (1997) and Gams (2000) considered this genus to be related to *Lasiosphaeriaceae* and indicated a close resemblance of that anamorph with *Lecythophora*. Our results agree with Huhndorf et al. (2004), who demonstrated a close phylogenetic relationship between *Barrina* and *Coniochaeta*.

The placement of *Wallrothiella* and *Barrina* in *Coniochaetales* revealed here (Figs 2 and 3) was unexpected because the ascospores of these genera are hyaline and do not have germ slits. However, according to Rogers (1994) this feature is of poor phylogenetic value at supra

generic level because the presence of germ slit has showed a convergent evolution and appeared many times in different groups of fungi such as *Hypocreales* (*Hypocreomycetidae*) and *Xylariales* (*Xylariomycetidae*). Our results suggest that the presence of a phialidic anamorph in *Coniochaetales* is more phylogenetically informative than the presence of germ slits, and that *Barrina* and *Wallrothiella* must be included in *Coniochaetales*.

Synaptospora is another genus included in *Coniochaetaceae* (Eriksson & Hawksworth 1993) that has also ascospores without germ slit. Its ascospores are one-celled, brown, and globose, and tend to fuse in groups (Cain 1957). Although some authors considered that its relationships with members of *Coniochaetaceae* are unclear (Huhndorf, Fernández & Candoussau 1999, Réblova 2002) our studies demonstrated that the absence of germ slit is not an excluding character for pertaining to *Coniochaetales*. The type of perithecia and the absence of germ slit relate this genus with *W. subiculosa*.

Seigle-Murandi *et al.* (1995) proposed the genus *Coniolaria* for a single isolate with some features typical of *Coniochaeta* but with a holoblastic *Dactylaria*-like anamorph. Recently, Eriksson *et al.* (2004) accepted *Coniolaria* as a member of *Coniochaetaceae*. Our results demonstrated that the accommodation of this genus in *Xylariales*, as proposed by other authors (Index Fungorum, CABI Bioscience, CBS, & Landcare Research <http://www.indexfungorum.org>, 2004), is more appropriate. Genera of *Xylariaceae* that do not have stromatic tissues are *Ascotricha* Berk, *Ascotrichella*, and *Calceomyces* Udagawa & Ueda. *Coniolaria* can be differentiated from the mentioned genera by the type of anamorph, which have been described as *Dicyma* Boulanger, *Humicola*-like, and *Nodulisporium*-like respectively (Hawksworth 1971, Udagawa & Ueda 1988, Valldosera & Guarro 1988, Whalley 1996, Rogers *et al.* 2002, Fournier & Magni 2004). Moreover, *Calceomyces* has reticulate ascospores, and asci with an amyloid apical ring (Udagawa & Ueda 1988).

In the original description of *C. murandii*, a *Dactylaria* Sacc. anamorph was described and illustrated (Seigle-Murandi *et al.* 1995). However, we have examined the type culture of this species and noticed some characters not typical of that genus. *Dactylaria* forms hyaline conidia from cylindrical denticulate conidiogenous cells on sympodially proliferating erect conidiophores

(de Hoog 1985, Goh & Hyde 1997). However, *C. murandii* shows branched conidiophores from which emerge pigmented conidia which often giving rises to one or several short chains of secondary conidia. These characters do not fit with the description of *Dactylaria*, but they are distinctive of *Rhinocladiella* Nannf. (de Hoog 1977), which has some resemblance with *Geniculosporium* and *Nodulisporium* (Barron 1983). *Rhinocladiella* has been connected with some xylariaceous genera such as *Hypoxylon* Bull. and *Obolarina* Pouzar (Candoussau & Rogers 1990, Laessøe 1994, Whalley 1996), but in recent revisions of *Xylariaceae* its anamorphs have been assigned to *Nodulisporium*- or *Virgariella*-like genera (Ju et al. 1998, Rogers et al. 2002). In addition, some molecular studies have connected *Rhinocladiella* with *Capronia* Sacc. (*Herpotrichiellaceae*, *Chaetothyriales*) (Spatafora, Mitchell & Vilgalys 1995, Haase et al. 1999). Further studies are required to ascertain a more concrete position of the anamorph of *C. murandii* among the hyphomycetes genera.

Coniolaria has some morphological resemblance with the genus *Obolarina*. Both genera have non-amyloid, short stipitate asci with absence of apical apparatus (Candoussau & Rogers 1990, Seigle-Murandi et al. 1995, Rogers et al. 2002, Fournier & Magni 2004). However, *Obolarina* has bipartite, multiperitheciate stromata, and an anamorph characterized by unbranched conidiophores, and an inconspicuous conidial secession scars, being ramoconidia are absent (Candoussau & Rogers 1990). The generic name *Coniolaria* was not validly published and we propose the new name *Novaxylaria*.

TAXONOMY

Coniochaeta (Sacc.) Cooke, *Grevillea* **16**: 16 (1887) (Figs 5–27, 29–35).

Coniochaetidium Malloch & Cain, *Can. J. Bot.* **49**: 878 (1971).

Ephemeroascus Emden, *Trans. Br. mycol. Soc.* **61**: 599 (1973).

Poroconiochaeta Udagawa & Furuya, *Trans. mycol. Soc. Japan* **20**: 5 (1979).

Ascomata superficial or semi immersed in natural substrate, superficial or sometimes immersed in culture, pyriform and ostiolate or globose and non-ostiolate; setose, hairy or glabrous; dark or slightly pigmented. *Peridium* membranaceous to pseudoparenchymatous, rarely coriaceous; *textura angularis*, *intrincata*, or less frequently *cephalothecoid*. *Asci* cylindrical, clavate, sub-globose or near globose, short-stipitate, with a truncate to rounded apex, usually with a conspicuous to indistinct non-amyloid apical ring, 4-, 8- to multispored, thin-walled, evanescent. *Hamathecium* paraphysate or absent. *Paraphyses* when present numerous, hyaline, filiform, simple, septate, and evanescent. *Ascospores* narrowly ellipsoid to fusoid, broadly ellipsoidal to globose, lenticular or cruciform, with rounded to apiculate ends, flattened on one or both sides; one-celled, smooth or pitted; brown to dark brown, olive-greenish to dark olivaceous or black; germ slit straight, longitudinal, conspicuous or indistinct, rarely go all the way around the spore; sheath hyaline, gelatinous, present in some species. *Anamorphs* belonging to *Lecythophora* Nannf., *Verticillium* Ness:Fr., *Paecilomyces* Bairnier, and *Cladobotryum* Ness emend. Rogerson & Samuels.

Type species: Coniochaeta ligniaria (Grev.) Masee *Grevillea* **16**: 37 (1887).

Coniochaeta boothii (Manohar. & P. Rama Rao) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 13 and 29).

Thielavia boothii Manoharachary & Ramao, *Trans. Br. mycol. Soc.* **61**: 196 (1973)

Coniochaetidium boothii (Manoharachary & Ramao) Arx, *Stud. Mycol.* **8**: 26 (1975).

Strain examined: CBS 381.74^T

Coniochaeta discoidea (Udagawa & Furuya) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 5 and 16).

Poroconiochaeta discoidea Udagawa & Furuya, *Trans. Mycol. Soc. Japan* **20**: 6 (1979).

Strain examined: CBS 158.80^T

Coniochaeta mirabile (Udagawa & Tsub.) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 18).

Coniochaetidium mirabile Udagawa & Tsubouchi, *Mycotaxon* **27**: 63 (1986).

Coniochaeta nuciforme (Guarro, Gené, Al-Bader & Abdullah) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Fig. 19).

Coniochaetidium nuciforme Guarro, Gené, Al-Bader & Abdullah, *Mycoscience* **38**: 123 (1997).

Strain examined: FMR 5776

Coniochaeta ornata (D. García, Stchigel & Guarro) D. García, Stchigel & Guarro, **nom. nov.** (Figs 6, 7, and 20).

Poroconiochaeta tetraspora García, Stchigel & Guarro, *Mycologia* **95**: 525 (2003).

Strain examined: FMR 7408^T

Coniochaeta ostrea (Malloch & Cain) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 21 and 33).

Coniochaetidium ostreum Malloch & Cain, *Can. J. Bot.* **49**: 879 (1971).

Strain examined: CBS 507.70^T

Coniochaeta punctulata (Udagawa & Furuya) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 8, 9, and 23).

Poroconiochaeta punctulata Udagawa & Furuya, *Trans. Mycol. Soc. Japan* **20**: 8 (1979).

Strain examined: FMR 7408

Coniochaeta savoryi (C. Booth) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 10 and 25).

Thielavia savoryi C. Booth, *Commonw. Mycol. Inst. Mycol. Pap.* **83**: 3 (1961).

Coniochaetidium savoryi (Booth) Malloch & Cain, *Can. J. Bot.* **49**: 880 (1971).

Germislietia savoryi (C. Booth) Lodha, in Subramanian, *Taxonomy of Fungi (Proc. Int. Symp. Madras, 1973)* **1**: 250 (1978).

Poroconiochaeta savoryi (C. Booth) D. García, Stchigel & Guarro, *Mycologia* **95**: 528 (2003).

Strain examined: CBS 725.74^T

Coniochaeta verticillata (Emden) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 27 and 35).

Ephemeroascus verticillatus Emden, *Trans. Br. mycol. Soc.* **61**: 601 (1973).

Strain examined: CBS 816.71^T

Coniocessia D. García, Stchigel & Guarro, **gen. nov.**

Etym.: *cessio* (L)-distant, moved away, referred to the exclusion of *C. nodulisporioides* from *Coniochaeta*, the type species of the new genus.

Ascomata subglobosa vel pyriformia, glabra vel pilosa. *Stroma* nula. *Peridium* pseudoparenchymatum vel coriaceum, textura intricata. *Asci* cylindrici vel subcylindrici, structura apicalis nula. *Ascosporae* unicellulares, ellipsoidea, atrobrunnea, muris laevis, fissura germinali longitudinalis. *Conidiophora* ramosa, hyalina. *Cellulae conidiogenae* denticulata, hyalina. *Conidia* hyalina, laevis at leniter verruculosa, subglobosa vel pyriformia.

Typus: *Coniocessia nodulisporioides*.

Ascomata superficial, sub-globose to pyriform, glabrous or pilose. *Stroma* absent. *Peridium* pseudoparenchymatous to coriaceous, outer layer with *textura intricata*. *Asci* cylindrical to sub-cylindrical, without apical ring. *Hamathecium* paraphysate. *Ascospores* one-celled, ellipsoidal, dark brown, smooth-walled, with a longitudinal germ slit. *Conidiophores* branched, hyaline. *Conidiogenous cells* integrate, terminal, discrete, polyblastic, denticulate, hyaline. *Conidia* hyaline, smooth-walled or slightly verruculose, sub-globose to pyriform, apiculate at the base.

Coniocessia nodulisporioides (D. Hawksw.) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 37–52)

Coniochaeta nodulisporioides D. Hawksw., *Norw. J. Bot.* **25**: 15 (1978).

Strain examined: CBS 281.77^T

Pseudorosellinia D. García, Stchigel & Guarro, **gen. nov.**

Etym.: *pseudo* (G)-false, referred to the similarity with the genus *Rosellinia*.

Ascomata pyriformia, pilosa vel fere glabra. *Peridium* coriaceum, textura intricata. *Asci* cylindrici, structura apicalis non-amyloidea. *Ascosporae* unicellulares, plerumque inaequilateralis-ellipsoidea, interdum triangularis, vel concavo-convexis, atrobrunnea, muris laevis, fissura germinali longitudinalis. *Conidiophora* ramosa, dilute flavo-brunnea. *Cellulae conidiogenae* denticulata, sympodice producere. *Conidia* hyalina, laevis, obovata vel allantoidea, basis truncata.

Typus: *Pseudorosellinia emodensis*.

Ascomata pyriform, covered with loose hypha-like hairs or almost glabrous. *Peridium* coriaceous, textura intricata. *Hamathecium* aparaphysate or with indistinct paraphyses. *Asci* cylindrical, 8-spored, with small apical ring, non-amyloid. *Ascospores* one-celled, mostly inequilateral-ellipsoidal, sometimes triangular, or concavo-convex, brown, dark brown to black, smooth, without sheath, germ slit longitudinal. *Conidiophores* branched, pale yellowish brown. *Conidiogenous* cells integrate, elongating sympodially, conidia-bearing denticles, denticles short and fragile. *Conidia* hyaline, smooth, obovate or allantoid, truncate at the base.

Pseudorosellinia emodensis (Udagawa & Y. Horie) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.**

(Figs 53–55)

Coniochaeta emodensis Udagawa & Y. Horie, *Reports on the Cryptogamic Study in Nepal* (Tokyo): 100 (1982).

Novaxylaria D. García, Stchigel & Guarro, **gen. nov.**

Etym.: *nova* (L)-new, *xylaria*-referring the close relationships with *Xylaria*.

Ascomata globosa, ostiolata, glabra, circumvallata ad basis per hyphis atrobrunneis. *Stroma* nula. *Peridium* pseudoparenchymatum vel coriaceum, textura intricata. *Asci* cylindrici, 8-spori, structura apicalis nula. *Ascosporae* unicellulares, ellipsoidea, brunnea, atrobrunnea, vel nigra, muris laevis, vaina nula, fissura germinali longitudinalis. *Conidiophora* ramosa, dilute colorata. *Cellulae conidiogenae* integrate, conidia in sympodice producere, denticulate, cicatricis brunneis. *Conidia* sub-hyaline vel dilute olivacea, laevis, solitari vel breves series in ramoconidia, magnitudinis variabile, hilum basilaris pigmentatus.

Typus: Novaxylaria murandii.

Ascomata globose, ostiolate, glabrous, surrounded at the base by brown, thick hyphae. *Stroma* absent. *Peridium* pseudoparenchymatous to coriaceous, textura intricata. *Hamathecium* paraphysate. *Asci* cylindrical, 8-spored, without apical structures, non-amyloid. *Ascospores* one-celled, ellipsoidal, brown, dark brown to black, smooth, without sheath, germ slit longitudinal. *Conidiophores* branched, slightly pigmented. *Conidiogenous* cells integrate, sub-hyaline to pale olive-brown, elongating sympodially, conidia-bearing denticles with pigmented scars. *Conidia* sub-hyaline to pale olivaceous, solitary or in small chains on ramoconidia, with pigmented scars at the base.

Novaxylaria murandii (Seigle-Mur., Guiraud, Steiman & Sage) D. García, Stchigel & Guarro, **comb. nov.** (Figs 56–79)

Coniolaria murandii Seigle-Mur., Guiraud, Steiman & Sage, *Cryptogamic Botany* **5**: 347 (1995).

Ascomata globosa, ostiolata, glabra, atrobrunnea vel nigra, 900–1500 µm diam, circumvallata ad basis per hyphis atrobrunneis, et crassitunicatis, 2–5 µm latus. *Peridium* pseudoparenchymatum vel coriaceum, textura intricata. *Paraphysis* numerosa, filiformis, septatis, hyalinis, 135–200 x 1.5–2 µm. *Asci* 8-spori, cylindrici, superne late rotundate, structura apicali nula, (100–)113–125(–130) x 11–13(–16) µm, stipitati, stipe 14–20 µm longae.

Ascospores unicellulares, uniseriatae, ellipsoidea vel citriformis, cum extremus apiculatus, primum hyalinae deinde brunneae, atrobrunnea vel nigra, crassitunicata, cum muris laevis, (16–)17–20 x (10–)11–12 µm, vaina nula, fissura germinali longitudinalis. *Conidiophora* macronemata, ramosa, dilute olivaceo brunnea. *Cellulae conidiogenae* integrate, dilute olivaceo brunnea, laevis, cylindricae, sympodice producere, cicatricis brunneis. *Conidia* sub-hyalina vel dilute olivacea, solitaria vel in series brevis in ramoconidia proferunt, cum muris laevis, ellipsoidea, cylindrica, vel ramoconidia obclavata, magnitudines variabile, (9–)10–16(–21) x 2–4µm, apice rotundate et basis apiculata cum hilum pigmentato.

Ascomata superficial, solitary or in small groups, globose, ostiolate, glabrous, dark brown to black, 900–1500 µm diam, surrounded by brown to dark brown, thick-walled smooth hyphae, 2–5 µm diam. *Peridium* pseudoparenchymatous to coriaceous, two-layered. *Outer layer* of textura intricata, composed by thick-walled, hypha-like cells, brown to dark brown, 2–7 µm wide. *Inner layer* formed by several layers of thick walled, pale-brown to brown, angular to sub-globose, 4–6 µm diam cells, of textura angularis to textura epidermoidea. *Paraphyses* numerous, filiform, septate, hyaline, 135–200 x 1.5–2 µm. *Asci* 8-spored, cylindrical, with rounded tip and without apical structures, non-amyloid, (100–)113–125(–130) x 11–13(–16) µm, stipitate, stipe 14–20 µm long. *Ascospores* one-celled, obliquely uniseriate, broadly ellipsoidal to citriform, with apiculate ends, at first hyaline, becoming brown to black, thick-walled, smooth, (16–)17–20 x (10–)11–12 µm, without gelatinous sheath, germ slit longitudinal, straight to slightly sinuous at one end. *Conidial state* growing on the ascomata or independently. *Conidiophores* macronematous, branched, up to 200 µm long, 2–3 µm wide, pale olive brown, smooth and septate. *Conidiogenous cells* integrate, sub-hyaline to pale olive brown, smooth, cylindrical, polyblastic, elongating sympodially during conidiogenesis, with conspicuous conidia-bearing denticles, denticles plane to slightly prominent, less than 1 µm long, with pigmented scars, often apical branches secedes and functions as conidia (ramoconidia). *Ramoconidia* pale olivaceous, smooth, thin-walled, one- or two-celled, obclavate, apiculate at the base with pigmented seceded scar, apices with small, pigmented, plane denticles, giving rise to secondary conidia,

14–19(–21) x 2–4 µm. *Conidia* sub-hyaline to pale olivaceous, one-celled, cylindrical, rounded apices, with a distinct, small, brown spot; apiculate at the base with pigmented scar, 9–11 x 2–3 µm, solitary or in small chains on ramoconidia.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the curators of Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht (CBS) and Fungal Strain Collection, Laboratory of Cryptogamy, Museum National d'Historie Naturelle, Paris (LCP) for providing strains, and to Nuria Pila and Felix Gilgado for their technical assistance. The senior author is grateful for a fellowship grants from the Universitat Rovira i Virgili, and D. L. H. for support from the Ramón y Cajal programme of the Ministry of Science and Technology of Spain.

REFERENCES

- Acero, F. J., González, V., Sánchez-Ballesteros, J., Rubio, V., Checa, J., Bills, G. F., Salazar, O., Platas, G. & Peláez, F. (2004) Molecular phylogenetic studies on the *Diatrypaceae* based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia* **96**: 249–259.
- Arx, J. A. von (1973) Ostiolate and non ostiolate pyrenomycetes. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, series C, Biological and Medical Science* **76**:289–296.
- Arx, J. A. von (1975) On *Thielavia* and some similar genera of *Ascomycetes*. *Studies in Mycology* **8**: 1–29.
- Arx, J. A. von & Müller, E. (1954) Die gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. *Kryptogamenflora Schweiz* **11**: 1–434.
- Barr, M. E. (1990) Prodomus to nonlichenized pyrenomycetous members of class *Hymenoascomycetes*. *Mycotaxon* **39**: 43–184.
- Barr, M. E. & Cannon, P. F. (1994) *Discussion 3. Calosphaeriales, Clavicipitales, Corineales, Diaporthales, Diatrypales, Halosphaeriales, Hypocreales, Meliolales, Ophiostomatales, Phyllachorales, Sordariales, Trichosphaeriales, and Xylariales*. In *Ascomycete Systematics*.

- Problems and perspectives in the nineties*. (D. L. Hawkworth ed.): 371–378. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Barron, G. L. (1983) *The genera of Hyphomycetes from soil*. (4th ed.) Robert E. Krieger Publishing Co. Inc., Florida.
- Cain, R. F. (1957) *Synaptospora* a new genus of amerosporous *Ascohymeniales* (*Ascomycetes*). *Sydowia Beith* **1**: 4–8.
- Cain, R. F. (1961) Studies of soil fungi. III. New species of *Coniochaeta*, *Chaetomidium*, and *Thielavia*. *Canadian Journal of Botany* **39**: 1231–1239.
- Candousau, F. & Rogers, J. D. (1990) Notes on *Obolarina dryophila* from France. *Mycotaxon* **66**:345–349.
- Cano, J., Guarro, J., & Gené, J. (2004) Molecular and morphological identification of *Colletorhichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 2450–2454.
- Cano, J., Sagués M., Barrio E., Vidal P., Castañeda, R. F., Gené, J., & Guarro J. (2002a) Molecular taxonomy of *Aphanoascus* and description of two new species from soil. *Studies in Mycology* **47**: 153–164.
- Cano, J., Solé, M., Pitarch, L. B. & Guarro, J. (2002b) *Castanedomyces australiensis*, gen. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil. *Studies in Mycology* **47**: 165–172.
- Checa, J., Barrasa, J. M., Moreno, G., Fort, F. & Guarro J. (1988) The genus *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke (*Coniochaetaceae*, *Ascomycotina*) in Spain. *Cryptogamie Mycology* **9**: 1–34.
- Dettman, J. R., Harbinski, F. M. & Taylor, J. W. (2001) Ascospore morphology is a poor predictor of the phylogenetic relationships of *Neurospora* and *Gelasinospora*. *Fungal Genetics and Biology* **34**: 49–61.
- Emden, J. H. van (1973) *Ephemeroascus* gen. nov. (*Eurotiales*) from soil. *Transactions of the British mycological Society* **61**: 599–601.
- Eriksson O. E. (eds) (2004) Outline of *Ascomycota* – 2004. *Myconet* Current outline. (<http://www.umu.se/myconet/curr/current.html>).
- Eriksson, O. E., Baral H.-O., Currah R. S., Hansen K., Kurtzman C. P., Rambold, G. & Laessøe, T. (eds) (2004) Outline of the *Ascomycota* – 2004. *Myconet* **10**: 1–99.

- Eriksson, O. E. & Hawksworth, D. L. (1993) Outline of the ascomycetes. *Systema Ascomycetum* **12**: 51–257.
- Eriksson, O. E. & Hawksworth, D. L. (1998) Notes on ascomycete systematics – Nos 2256–2439. *Systema Ascomycetum* **16**: 39–81.
- Fournier, J. & Magni, J. -F. (2004) Pyrenomycetes from southwestern France. <http://pyrenomycetes.free.fr/index.htm>.
- Fröhlich, J. & Hyde, K. D. (1994) New *Oxydothis* species associated with palm leaf spot in north Queensland, Australia. *Mycological Research* **98**: 213–218.
- Gams, W. (2000) *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. *Studies in Mycology* **45**:187–199.
- Gams, W. & Boekhout, T. (1985) Pigment localization in dematiaceous Hyphomycetes and the segregation of *Pseudogliomastix* gen. nov. from *Acremonium*. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Plant Sci.)* **94**: 273–280.
- Gams, W., O'Donnell, K., Schroers, H.-J. & Christensen, M. (1998) Generic classification of some more hyphomycetes with solitary conidia borne on phialides. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1570–1583.
- García, D., Stchigel, A. M., Cano, J., Guarro, J. & Hawksworth D. L. (2004) A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequences data. *Mycological Research* **108**: 1119–1142.
- García, D., Stchigel, A. M. & Guarro, J. (2003) A new species of *Poroconiochaeta* from Russian soils. *Mycologia* **95**:525–529.
- Goh, T. K. & Hyde, K. D. (1997) A revision of *Dactylaria*, with description of *D. tunicata* sp. nov. from submerged wood in Australia. *Mycological Research* **101**: 1265–1272.
- Guarro, J., Gené, J., Al-Bader, S. M. & Abdullah, S. K. (1997) A new species of *Coniochaetidium* from soil. *Mycoscience* **38**: 123–125.
- Haase, G., Sonntag, L., Melzer-Krick, B. & Hoog, G. S. de (1999) Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. *Studies in Mycology* **43**: 80–97.

- Hawksworth, D. L. (1971) A revision of the genus *Ascotricha* Berk. *Mycological Papers* **126**: 1–28.
- Hawksworth, D. L. (1978) A new species of *Coniochaeta* with an interesting conidial state. *Norwegian Journal of Botany* **25**: 15–18.
- Hoog, G. S. de (1977) *Rhinocladiella* and allied genera. In The black yeast and allied *Hyphomycetes*. *Studies in Mycology* **15**: 1–140.
- Hoog, G. S. de (1985) Taxonomy of the *Dactylaria* complex, IV. *Dactylaria*, *Neta*, *Subulispora*, and *Scolecobasidium*. *Studies in Mycology* **26**: 1–60.
- Hughes, S. J. (1953) Conidiophores, conidia, and classification. *Canadian Journal of Botany* **31**: 577–659.
- Huhndorf, S. M., Fernández F. A. & Candoussau F. (1999) Two new species of *Synaptospora*. *Sydowia* **51**: 176–182.
- Huhndorf, S. M., Miller A. N. & Fernández F. A. (2004) Molecular systematics of the *Sordariales*: the order and the family *Lasiosphaeriaceae* redefined. *Mycologia* **96**: 368–387.
- Hyde, K. D., Fröhlich, J. & Taylor, J. E. (1998) Fungi from palms. XXXVI. Reflections on unitunicate ascomycetes with apiospores. *Sydowia* **50**: 21–80.
- Ju, J. -M., Rogers, J. D., San Martín, F. & Granmo, A. (1998) The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* **39**: 345–349.
- Kendrick, B. (1971) *Taxonomy of Fungi Imperfecti*. (B. Kendrick ed.) University of Toronto Press, Toronto.
- Kendrick, B. (1985) *The fifth kingdom*. Mycologue Publications, Waterloo.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 11–120.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers J. A. (2001) *Dictionary of the fungi*: 9th edn. CAB International, Wallingford.
- Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B. & Nei, M. (2001) MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v. 2.1. Analysis software, *Bioinformatics* **17**: 244–245.

- Laessøe, T. (1994) Index Ascomycetum 1. *Xylariaceae*. *Systema Ascomycetum* **13**: 43–112.
- Laessøe, T. & Spooner, B. M. (1994) *Rosellinia* and *Astrocystis* (*Xylariaceae*): New species and generic concepts. *Kew Bulletin* **49**: 1–70.
- Lee, S. & Hanlin, R. T. (1999) Phylogenetic relationships of *Chaetomium* and similar genera based on ribosómico DNA sequences. *Mycologia* **91**: 434–442.
- Linde, E. J. van der (1991) *Coniochaeta cypraespora* sp. nov. with a *Paecilomyces* conidial state. *Mycological Research* **95**: 510–512.
- Mahoney, D. P. & LaFavre, J. S. (1981) *Coniochaeta extramundana*, with a synopsis of other *Coniochaeta* species. *Mycologia* **73**: 931–952.
- Malloch, D. & Cain, R. F. (1971) New cleistothecial *Sordariaceae* and a new family *Coniochaetaceae*. *Canadian Journal of Botany* **49**: 869–880.
- Miller, A. N. (2003) *Multi-gene phylogenies indicate ascomal wall morphology is a better predictor of phylogenetic relationships than ascospore morphology in the Sordariales*. In *Phylogenetic studies in the Lasiosphaeriaceae and the key genus, Lasiosphaeria*. 81–124. University of Illinois and Field Museum, Chicago.
- Põldmaa, K., Larsson, E. & Kõljalg U. (1999) Phylogenetic relationships in *Hypomyces* and allied genera, with emphasis on species growing on wood-decaying homobasidiomycetes. *Canadian Journal of Botany* **77**: 1756–1768.
- Ramaley, A. W. (1997) *Barrina*, a new genus with polysporous asci. *Mycologia* **89**: 962–966.
- Réblová, M. (2002) *Synaptospora olandica*, a new species from Sweden. *Sydowia* **54**: 248–255.
- Réblová, M. & Seifert, K. A. (2004) *Cryptadelphia* (*Trichosphaeriales*), a new genus for holomorphs with *Brachysporium* anamorphs and clarification of the taxonomic status of *Wallrothiella*. *Mycologia* **96**: 343–367.
- Réblová, M. & Winka, K. (2000) Phylogeny of *Chaetosphaeria* and its anamorphs based on morphological and molecular data. *Mycologia* **92**: 939–954.
- Rogers, J. D. (1994) *Problem genera and family interfaces in the Eupyrenomycetes*. In *Ascomycete Systematics. Problems and perspectives in the nineties*. (D. L. Hawksworth ed.): 321–331. Plenum Publishing Corporation, New York.

- Rogers, J. D., Ju, Y.-M. & Adams, M. J. (2002) Home of the *Xylariaceae*.
<http://mycology.sinica.edu.tw>
- Rogerson, C. T. & Samuels, G. J. (1993) Polyporiculous species of *Hypomyces*. *Mycologia* **85**: 231–272.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Samuels, G. J. & Barr, M. E. (1997) Notes on and additions to the *Niessliaceae* (*Hypocreales*). *Canadian Journal of Botany* **75**:2165–2176.
- Samuels, G. J., Rogers, J. D. & Nagasawa (1987) Studies in the *Amphisphaeriaceae* (*sensu lato*). 1. *Collodiscula japonica* and its anamorph *Achantodochium collodisculae*. *Mycotaxon* **28**: 453–459.
- Samuels, G. J. & Rossman, A. Y. (1987) Studies in the *Amphisphaeriaceae* (*sensu lato*) 2. *Leiosphaerella cocoes* and two new species of *Oxydothis* on palms. *Mycotaxon* **28**: 461–471.
- Sánchez-Ballesteros, J. (2001) *Filogenia y caracterización molecular de hongos ascomycetos de la familia Xylariaceae*. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Sánchez-Ballesteros, J., González, V., Salazar, O., Acero, J., Portal, M. A., Julián, M. & Rubio, V. (2000) Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosómico ITS sequences. *Mycologia* **92**: 964–977.
- Seigle-Murandi, F., Guiraud, P., Steiman, R. & Sage, L. (1995) *Coniolaria*: a new genus of *Ascomycetes* – Description of *Coniolaria murandii* sp. nov. from soil of Monument Valley in Colorado (USA). *Cryptogamic Botany* **5**: 346–350.
- Smith, G. J. D., Liew, E. C. Y. & Hyde, K. D. (2003) The *Xylariales*: a monophyletic order containing 7 families. *Fungal Diversity* **13**: 175–208.
- Solé, M., Cano, J., Pitarch, L. B., Stchigel, A. M. & Guarro J. (2002) Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera. *Studies in Mycoloy* **47**:141–152.

- Spatafora, J. W., Mitchell, T. G. & Vilgalys, R. (1995) Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dematiaceous fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 1322–1326.
- Sugiyama, M., Summerbell, R. C., & Mikawa, T. (2002) Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit (SSU) and large subunit (LSU) ribosómico DNA sequences. *Studies in Mycology* **47**: 5–23.
- Suh, S. O. & Blackwell M. (1999) Molecular phylogeny of the cleistothecial fungi placed in *Chephalotecaceae* and *Pseudoeurotiaceae*. *Mycologia* **91**: 836–848.
- Udagawa, S. & Furuya, K. (1979) *Poroconiochaeta*, a new genus of the *Coniochaetaceae*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **20**: 5–12.
- Udagawa, S. & Horie, Y. (1982) *Two new species of terrestrial Ascomycetes from Eastern Nepal*. In *Reports on the Cryptogamic Study in Nepal* (Y. Otani, ed.): 97–104. [Miscellaneous Publication] National Science Museum, Tokyo.
- Udagawa, S. & Tsubouchi, H. (1986) *Coniochaetidium mirabile*, a new ascomycete isolated from salted food. *Mycotaxon* **27**: 63–69.
- Udagawa, S. & Ueda S. (1988) *Calceomyces*, a new genus of the *Xylariaceae* with shoe-shaped ascospores. *Mycotaxon* **32**: 447–455.
- Valldosera, M. & Guarro, J. (1988) Some coprophilous ascomycetes from Chile. *Transactions of the British Mycological Society*. **90**: 601-605.
- Whalley, A. J. S. (1996) The xylariaceous way of life. *Mycological Research* **100**: 897–922.
- Weber, E. (2002) The *Lecythophora-Coniochaeta* complex I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. *Nova Hedwigia* **74**: 159–185.
- Weber, E., Görke, C. & Begerow, D. (2002) The *Lecythophora-Coniochaeta* complex II. Molecular studies based on sequences of the large subunit of ribosómico DNA. *Nova Hedwigia* **74**: 187–200.
- Zhang, N. & Blackwell, M. (2002) Molecular phylogeny of *Melanospora* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycological Research* **106**: 148–155.

Fig. 1. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences of the SSU rDNA gene. Branch lengths are proportional to genetic distance, indicated by a bar. Bootstrap values of 70 % or greater are indicated above the internodes.

Fig. 2. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences of the LSU rDNA gene. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap values of 70 % or greater are indicated above the internodes.

Fig. 3. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences of the LSU rDNA gene from different taxa related with *Coniochaeta*. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap values of 70 % or greater are indicated above the internodes.

Fig. 4. Neighbour-joining tree based on nucleotide sequences of the LSU rDNA gene from different genera of *Xylariales*, *Coniolaria murandii*, and *Coniochaeta nodulisporioides*. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap values of 70 % or greater are indicated above the internodes.

Figs 5–10. Ascospores of ornamented species of *Coniochaeta* (SEM). **Fig. 5.** *Coniochaeta discoidea*. **Figs 6, 7.** *Coniochaeta ornata*. **Figs 8, 9.** *Coniochaeta punctulata*. **Fig. 10.** *Coniochaeta savoryi*. Bars = 10 µm.

Figs 11–20. Some representative types of *Coniochaeta* ascospores. **Fig. 11.** *Coniochaeta angustispora*. **Fig. 12.** *Coniochaeta arxii*. **Fig. 13.** *Coniochaeta boothii*. **Fig. 14.** *Coniochaeta cephalothecoides*. **Fig. 15.** *Coniochaeta cruciata*. **Fig. 16.** *Coniochaeta discoidea*. **Fig. 17.** *Coniochaeta malacotricha*. **Fig. 18.** *Coniochaeta mirabile*. **Fig. 19.** *Coniochaeta nuciforme*. **Fig. 20.** *Coniochaeta ornata*. Bars = 10 µm.

Figs 21–27. Some representative types of *Coniochaeta* ascospores. **Fig. 21.** *Coniochaeta ostrea*. **Fig. 22.** *Coniochaeta ovata*. **Fig. 23.** *Coniochaeta punctulata*. **Fig. 24.** *Coniochaeta saccardoi*. **Fig. 25.** *Coniochaeta savoryi*. **Fig. 26.** *Coniochaeta scatigena*. **Fig. 27.** *Coniochaeta verticillata*. Bars = 10 µm.

Figs 28–36. Some representative types of *Coniochaetaceae* anamorphs. **Fig. 28.** *Barrina polyspora* (*Lecythophora*-like). **Fig. 29.** *Coniochaeta boothii* (clamydospores). **Fig. 30.** *Coniochaeta cypraespora* (*Paecilomyces*-like). **Fig. 31.** *Coniochaeta ligniaria* (*Lecythophora* sp.). **Fig. 32.** *Coniochaeta mirabile* (*Cladobotryum*-like). **Fig. 33.** *Coniochaeta ostrea* (clamydospores). **Fig. 34.** *Coniochaeta vetulina* (*Lecythophora* sp.). **Fig. 35.** *Coniochaeta verticillata* (*Verticillium*-like). **Fig. 36.** *Wallrothiella subiculosa* (*Pseudogliomastix protea*). Bars = 10 µm.

Figs 37–49. *Coniooessia nodulisporioides*. **Figs 37 and 38.** Ascomata. **Figs 39 and 40.** Asci. **Figs 41–43.** Ascospores. **Fig. 44.** Ascospores (SEM). **Figs 45–49.** Anamorph (SEM). Bars = 10 µm.

Figs 50–52. *Coniooessia nodulisporioides*. **Fig. 50.** Asci with ascospores. **Fig. 51.** Ascospores. **Fig. 52.** Conidiophore, conidiogenous cells, and conidia. Bars = 10 µm.

Figs 53–55. *Pseudorosellinia emodensis*. **Fig. 53.** Asci with ascospores. **Fig. 54.** Ascospores. **Fig. 55.** Conidiophores, conidiogenous cells, and conidia. Bars = 10 µm.

Figs 56–76. *Novaxylaria murandii*. **Fig. 56.** Ascomata. **Fig. 57.** Detail of the outer layer of the peridium. **Fig. 58.** Detail of the inner layer of the peridium. **Fig. 59.** Asci with ascospores. **Fig. 60.** Detail of the ascus. **Figs 61–63.** Ascospores. **Figs 64–66.** Ascospores (SEM). **Figs 67–69.** Conidiophores, conidiogenous cells, and conidia. **Figs 70–72.** Detail of the formation of

secondary conidia (ramoconidia). **Figs 73–76.** Conidiophores, conidiogenous cells, and conidia (SEM). Bars, Fig. 56 = 100 μm , Figs 57–76 = 10 μm .

Figs 77–79. *Novaxylaria murandii*. **Fig. 77.** Conidiophores, conidiogenous cells, and conidia.

Fig. 78. Asci with ascospores. **Fig. 79.** Ascospores. Bars = 10 μm .

Table 1. Strains sequenced in this study.

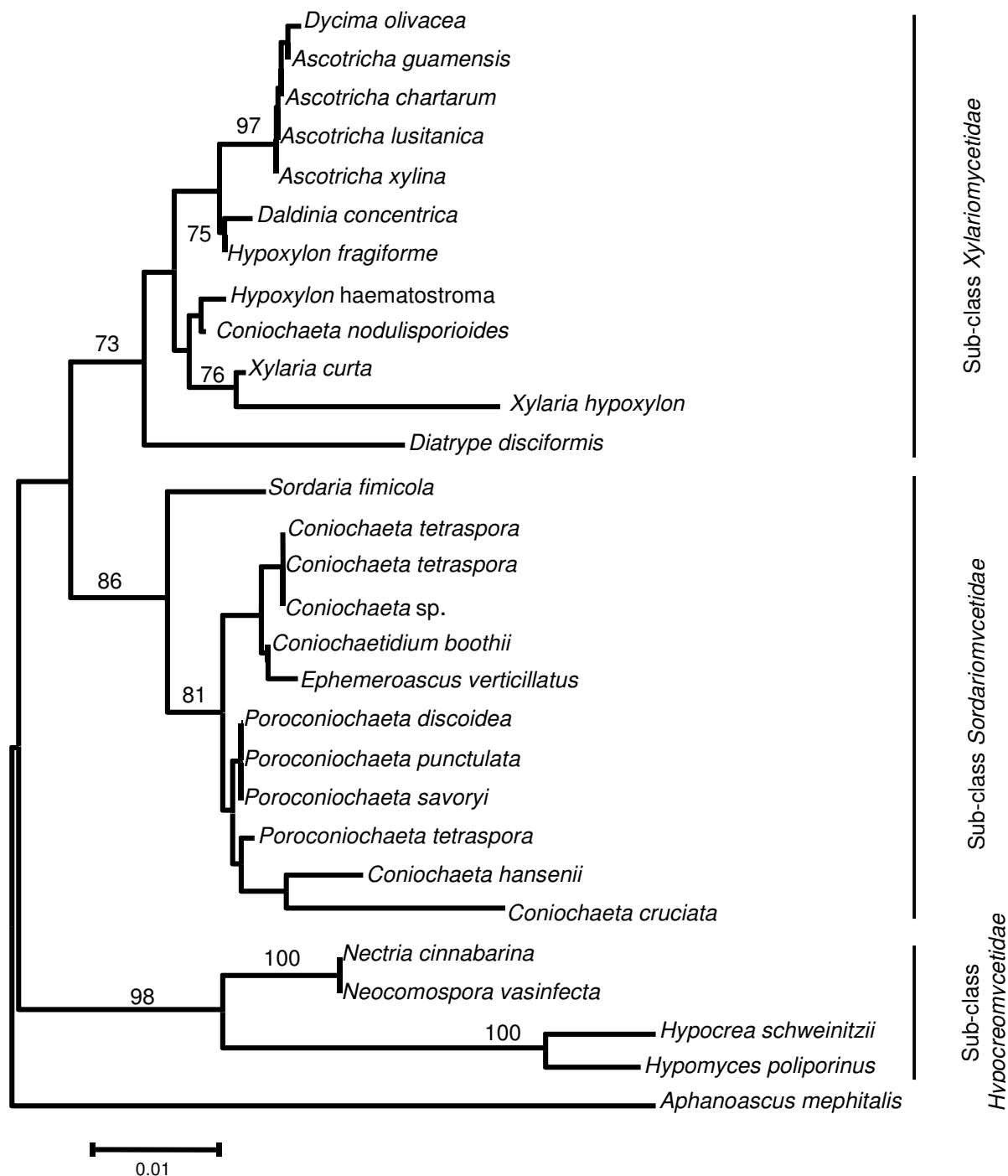
| Species | Strains | Source | EMBL no. | |
|---|-------------------------------|--|----------|----------|
| | | | SSU | LSU |
| <i>Coniochaeta cruciata</i> | FMR 7409 | Soil, Nigeria | AJ875176 | AJ875222 |
| <i>Coniochaeta hansenii</i> | CBS 885.68 | Dung of rabbit, Netherlands | AJ875182 | AJ875223 |
| <i>Coniochaeta nodulisporioides</i> | CBS 281.77 ^{type} | Soil, Jordan | AJ875185 | AJ875224 |
| <i>Coniochaeta tetraspora</i> | FMR 8167 | Soil, Spain | AJ875178 | AJ875225 |
| <i>Coniochaetidium boothii</i> | CBS 381.74 ^{ex-type} | Soil, India | AJ875181 | AJ875226 |
| <i>Coniochaetidium ostreum</i> | CBS 507.70 ^{type} | Twig of <i>Larrea</i> sp. | AJ875184 | AJ875227 |
| <i>Coniolaria murandii</i> | LCP 04.5004 | Soil, USA | | AJ875233 |
| <i>Ephemeroascus verticillatus</i> | CBS 816.71 ^{type} | Soil, Netherlands | AJ875183 | AJ875232 |
| <i>Poroconiochaeta discoidea</i> | CBS 158.80 ^{type} | Soil, Japan | AJ875179 | AJ875230 |
| <i>Poroconiochaeta punctulata</i> | FMR 7408 | Soil, Argentina | AJ875175 | AJ875231 |
| <i>Poroconiochaeta savoryi</i> (≡ <i>Thielavia savoryi</i>) | CBS 725.74 ^{ex-type} | Wood of <i>Juniperus scopulorum</i> , UK | AJ875180 | AJ875229 |
| <i>Poroconiochaeta tetraspora</i> | FMR 7415 ^{type} | Soil, Russia | AJ875177 | AJ875228 |

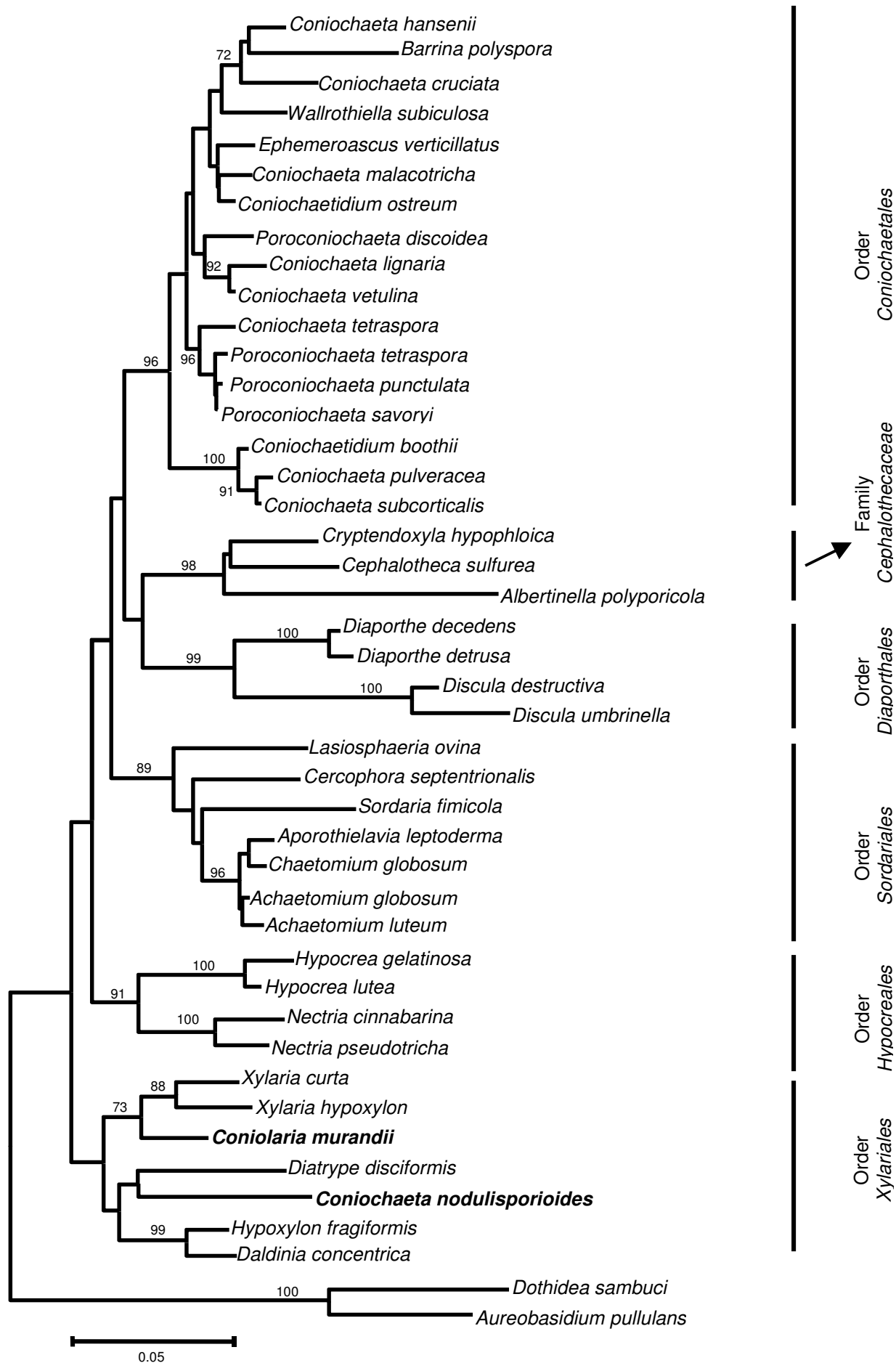
CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht; FMR, Culture Collection Facultad de Medicina, Reus; LCP, Fungal Strain Collection, Laboratory of Cryptogamy, Paris. ^{type} = type culture, ^{ex-type} = ex-type culture.

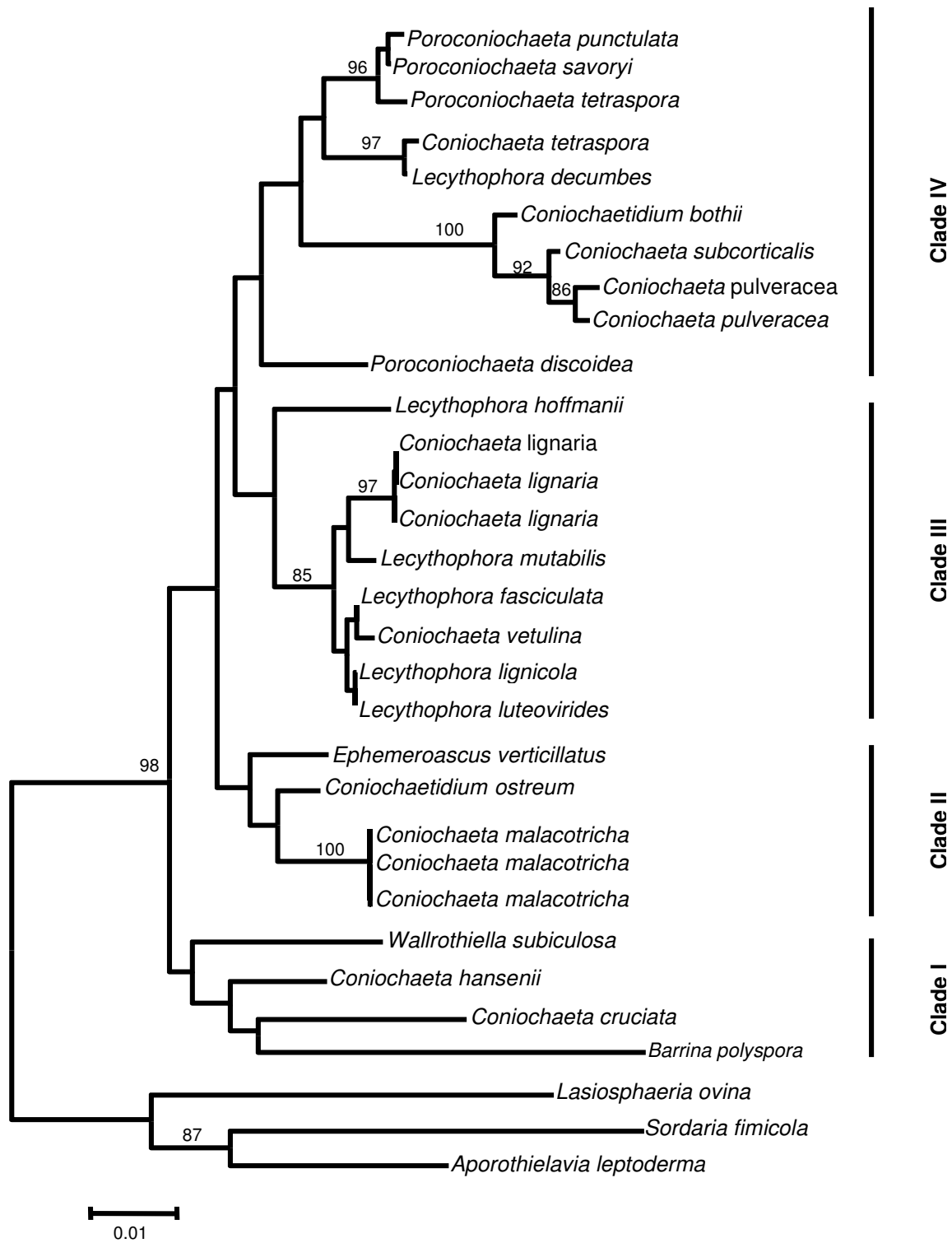
Table 2. Sequences used in this study obtained from GenBank.

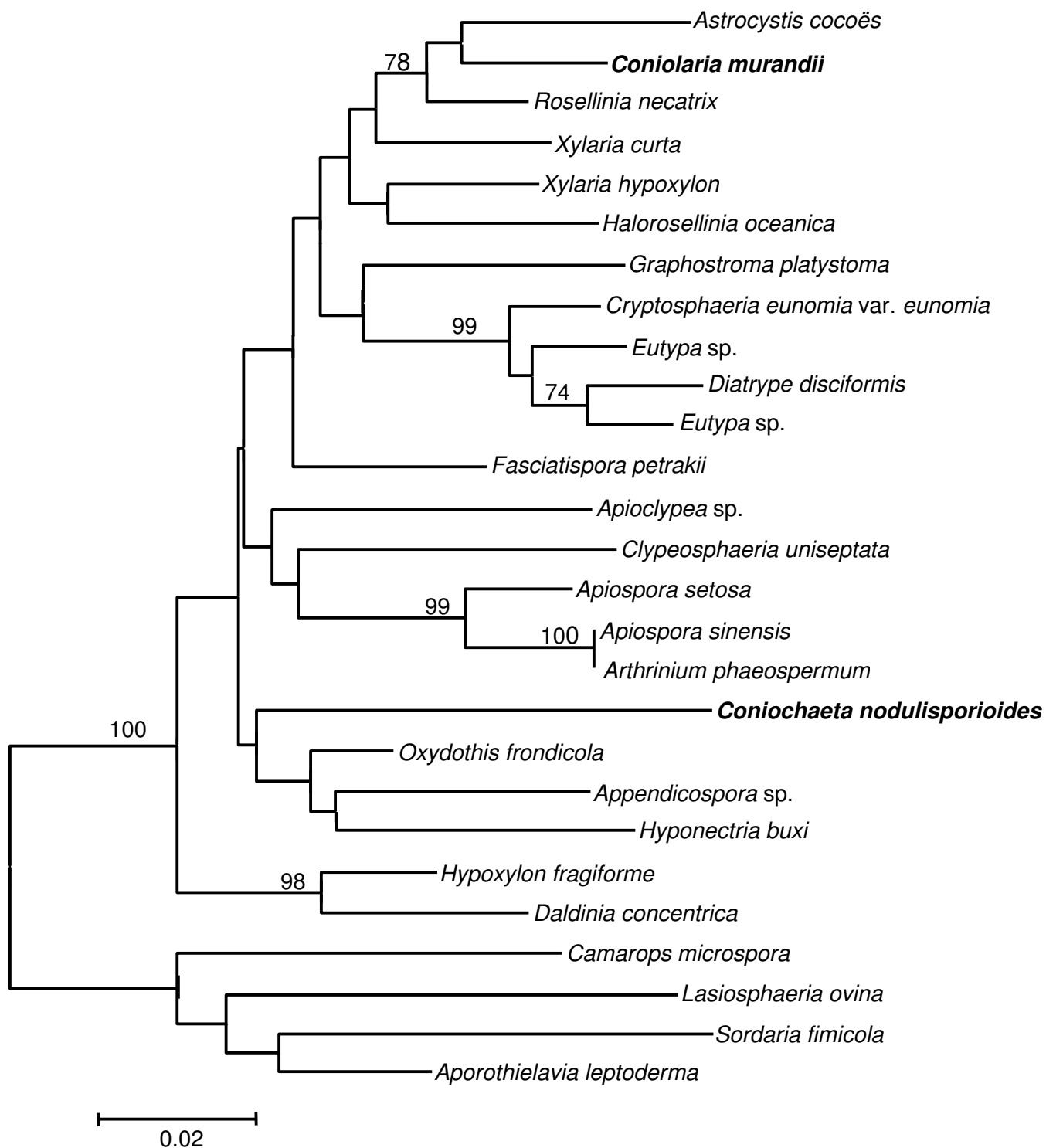
| Species | EMBL no. | |
|-----------------------------------|----------|----------|
| | SSU | LSU |
| <i>Achaetomium globosum</i> | – | AJ312097 |
| <i>Achaetomium luteum</i> | – | AJ312105 |
| <i>Albertinella polyporicola</i> | – | AF096185 |
| <i>Aphanoascus mephitalis</i> | AB015779 | – |
| <i>Apioclypea</i> sp. | – | AY083836 |
| <i>Apiospora setosa</i> | – | AY346259 |
| <i>Apiospora sinensis</i> | – | AY083831 |
| <i>Aporothielavia leptoderma</i> | – | AF096186 |
| <i>Appendicospora</i> sp. | – | AY083833 |
| <i>Arthrinium phaeospermum</i> | – | AY083832 |
| <i>Ascotricha chartarum</i> | AB048283 | – |
| <i>Ascotricha guamensis</i> | AB048281 | – |
| <i>Ascotricha lusitanica</i> | AB048282 | – |
| <i>Ascotricha xylina</i> | AB048789 | – |
| <i>Astrocystis cocoës</i> | – | AY083823 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | – | AF050239 |
| <i>Barrina polyspora</i> | – | AY346258 |
| <i>Camarops microspora</i> | – | AY083821 |
| <i>Cephalotheca sulfurea</i> | – | AF096188 |
| <i>Cercophora septentrionalis</i> | – | U47823 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | – | U47825 |
| <i>Glypeosphaeria uniseptata</i> | – | AY083830 |
| | | AF353583 |
| <i>Coniochaeta lignaria</i> | – | AF353584 |
| | | AF353586 |

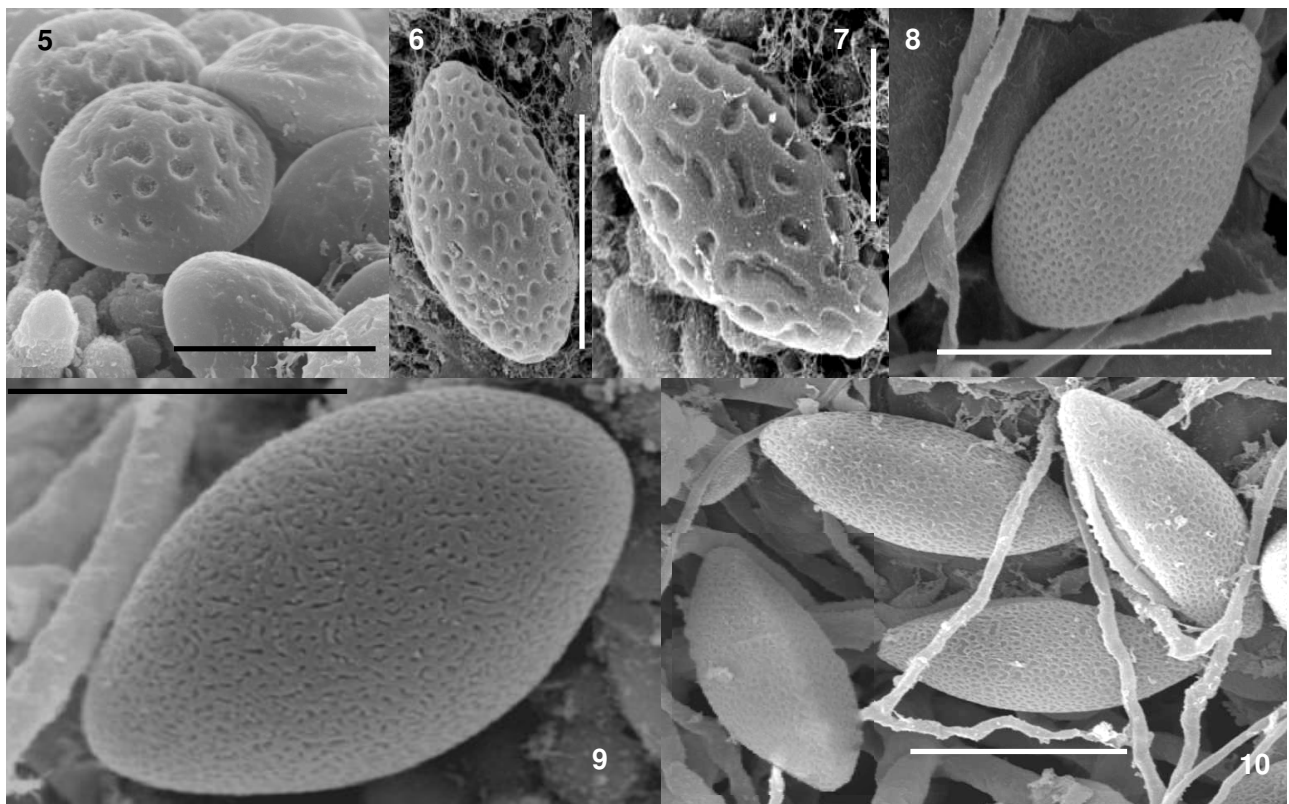
| | | |
|---|----------|----------|
| | | AF353588 |
| <i>Coniochaeta malacotricha</i> | – | AF353589 |
| | | AF353590 |
| <i>Coniochaeta pulveracea</i> | – | AF353591 |
| | | AF353592 |
| <i>Coniochaeta subcorticalis</i> | – | AF353593 |
| <i>Coniochaeta tetraspora</i> | AF048813 | – |
| <i>Coniochaeta</i> sp. | AF048799 | – |
| <i>Coniochaeta vetulina</i> | – | AF353594 |
| <i>Cryptendoxyla hypophloica</i> | – | AF096190 |
| <i>Cryptosphaeria eunomia</i> var. <i>eunomia</i> | – | AY083826 |
| <i>Daldinia concentrica</i> | U32402 | U47828 |
| <i>Diaporthe decedens</i> | – | AF408348 |
| <i>Diaporthe detrusa</i> | – | AF408349 |
| <i>Diatrype disciformis</i> | U32403 | U47829 |
| <i>Discula destructiva</i> | – | AF408359 |
| <i>Discula umbrinella</i> | – | AF408359 |
| <i>Dothidea sambuci</i> | – | AF382387 |
| <i>Dycima olivacea</i> | AB048284 | – |
| <i>Eutypa</i> sp. | – | AY083825 |
| | | AY346280 |
| <i>Fasciatispora petrakii</i> | – | AY083828 |
| <i>Graphostoma platystoma</i> | – | AY083827 |
| <i>Halorosellinia oceanica</i> | – | AY083822 |
| <i>Hypocrea gelatinosa</i> | – | U00737 |
| <i>Hypocrea lutea</i> | – | U00739 |
| <i>Hypocrea schweinitzii</i> | L36986 | – |
| <i>Hypomyces poliporinus</i> | U32410 | – |
| <i>Hyponectria buxi</i> | – | AY083834 |
| <i>Hypoxylon fragiforme</i> | AY083810 | AY083829 |
| <i>Hypoxylon haematostroma</i> | AF346543 | – |
| <i>Lasiosphaeria ovina</i> | – | AF064643 |
| <i>Lecythophora decumbes</i> | – | AF353597 |
| <i>Lecythophora fasciculata</i> | – | AF353598 |
| <i>Lecythophora hoffmanii</i> | – | AF353599 |
| <i>Lecythophora lignicola</i> | – | AF353601 |
| <i>Lecythophora luteovirides</i> | – | AF353603 |
| <i>Lecythophora mutabilis</i> | – | AF353605 |
| <i>Nectria cinnabarina</i> | U32412 | U00748 |
| <i>Nectria pseudotricha</i> | – | U17410 |
| <i>Neocomospora vasinfecta</i> | U32414 | – |
| <i>Oxydothis frondicola</i> | – | AY083835 |
| <i>Rosellinia necatrix</i> | – | AY083824 |
| <i>Sordaria fimicola</i> | – | AF132330 |
| <i>Sordaria humana</i> | AF48811 | – |
| <i>Wallrothiella subiculosa</i> | – | U17428 |
| <i>Xylaria curta</i> | U32417 | U47840 |
| <i>Xylaria hypoxylon</i> | U20378 | U47841 |

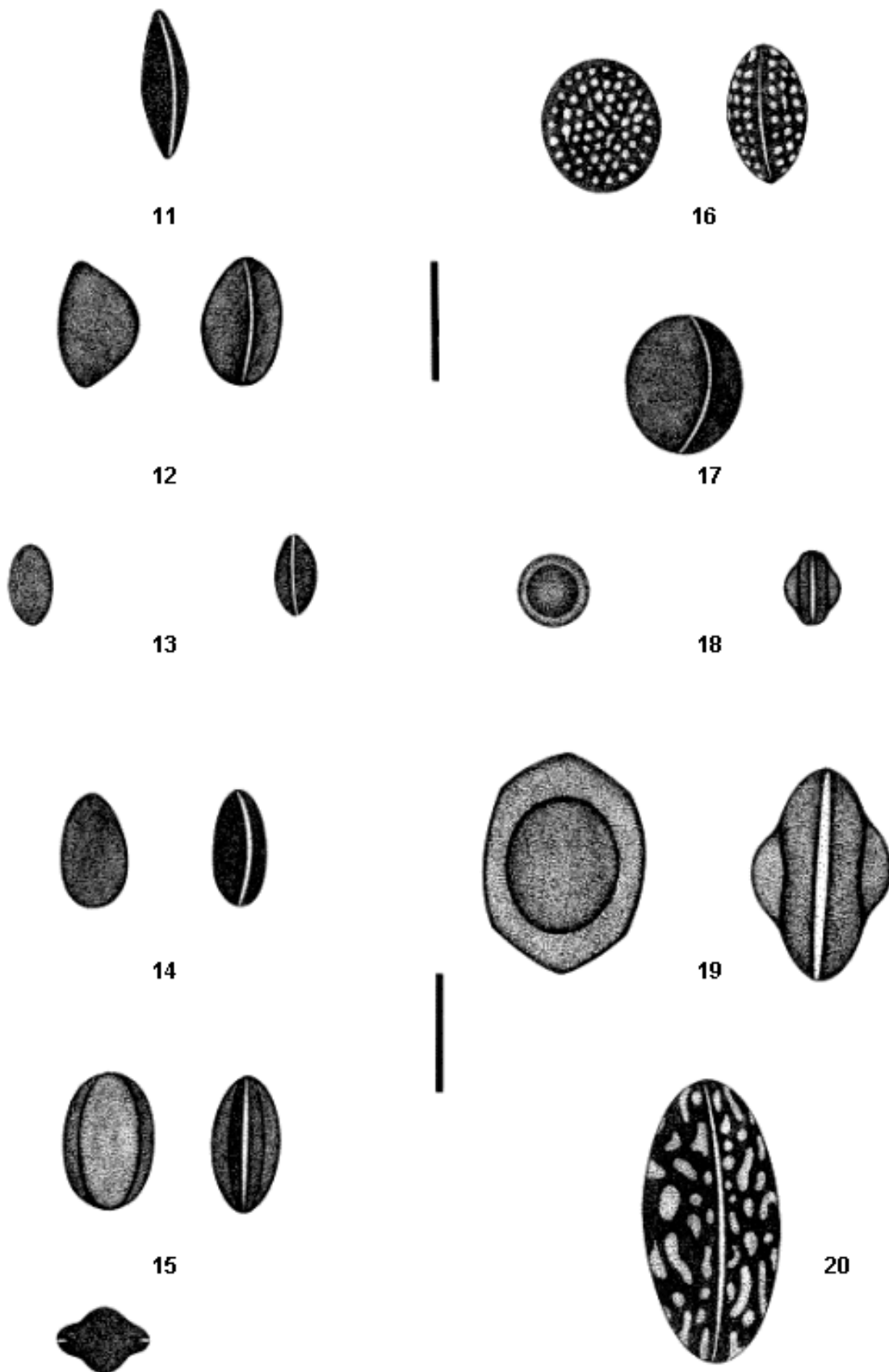


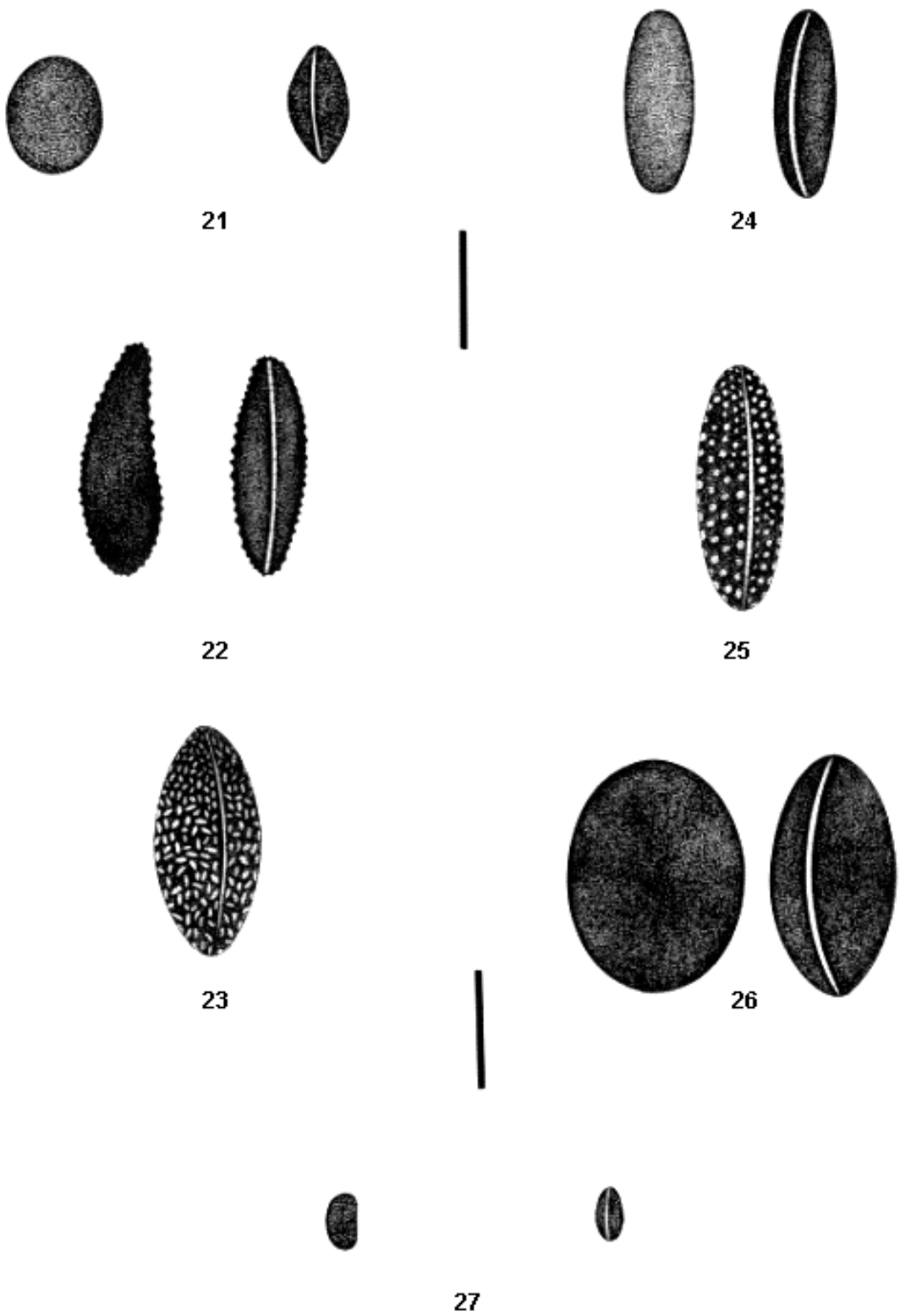


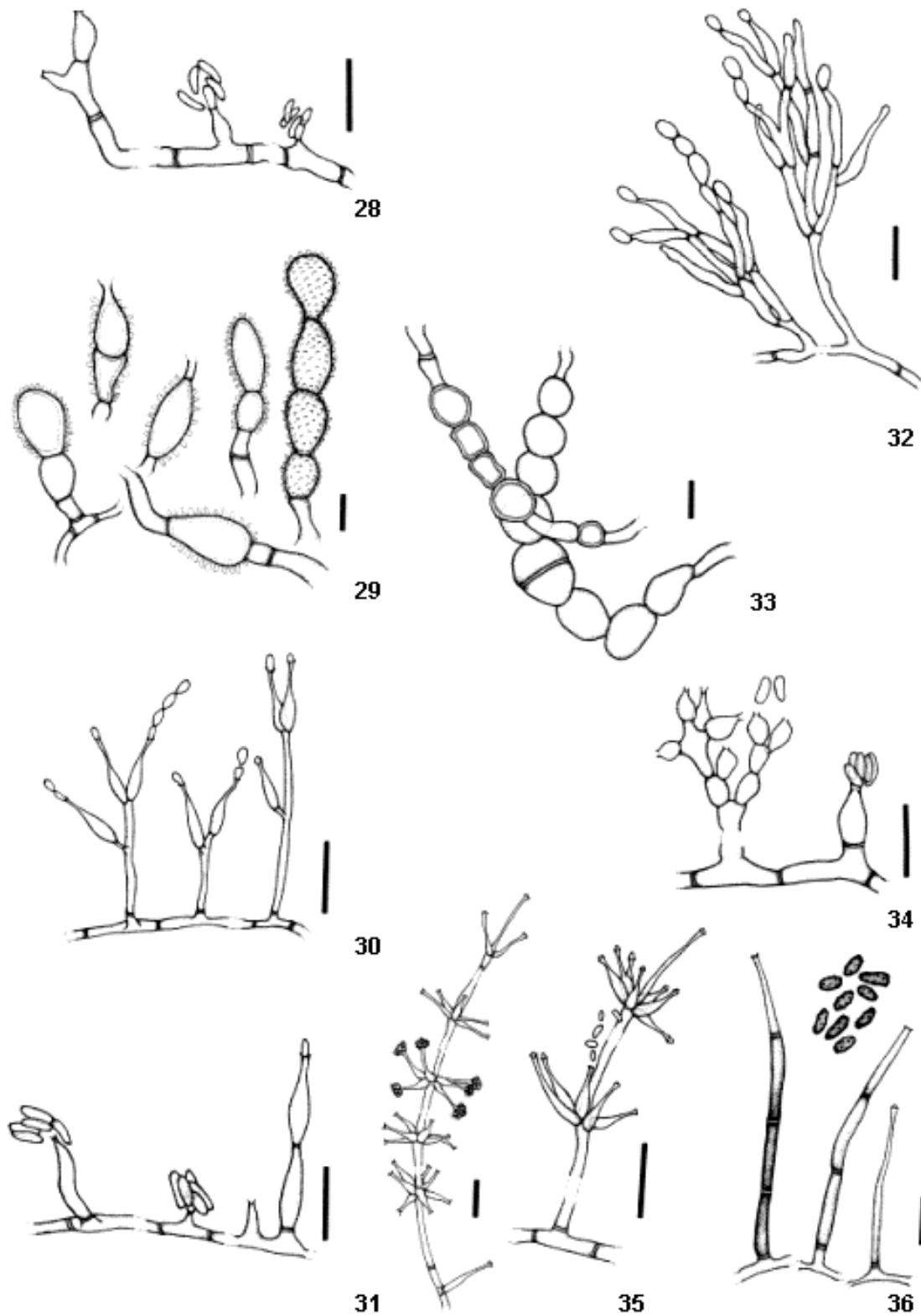


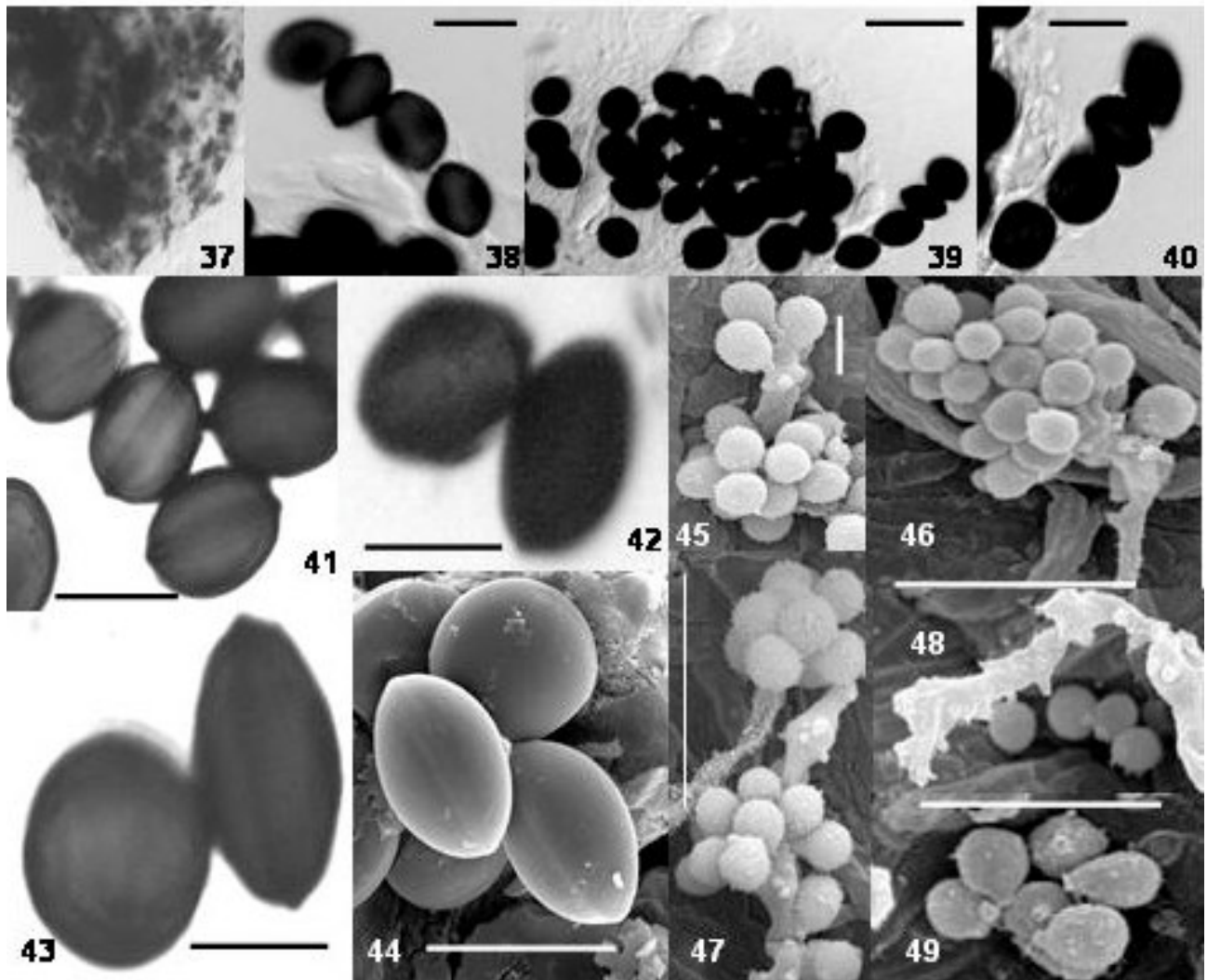










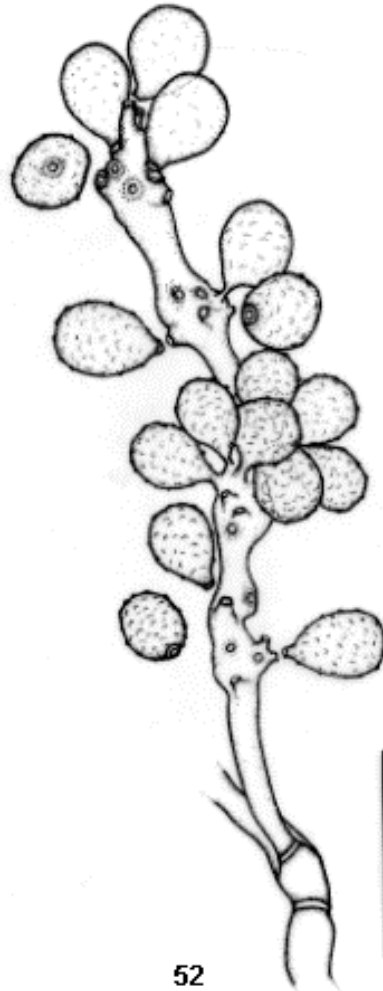




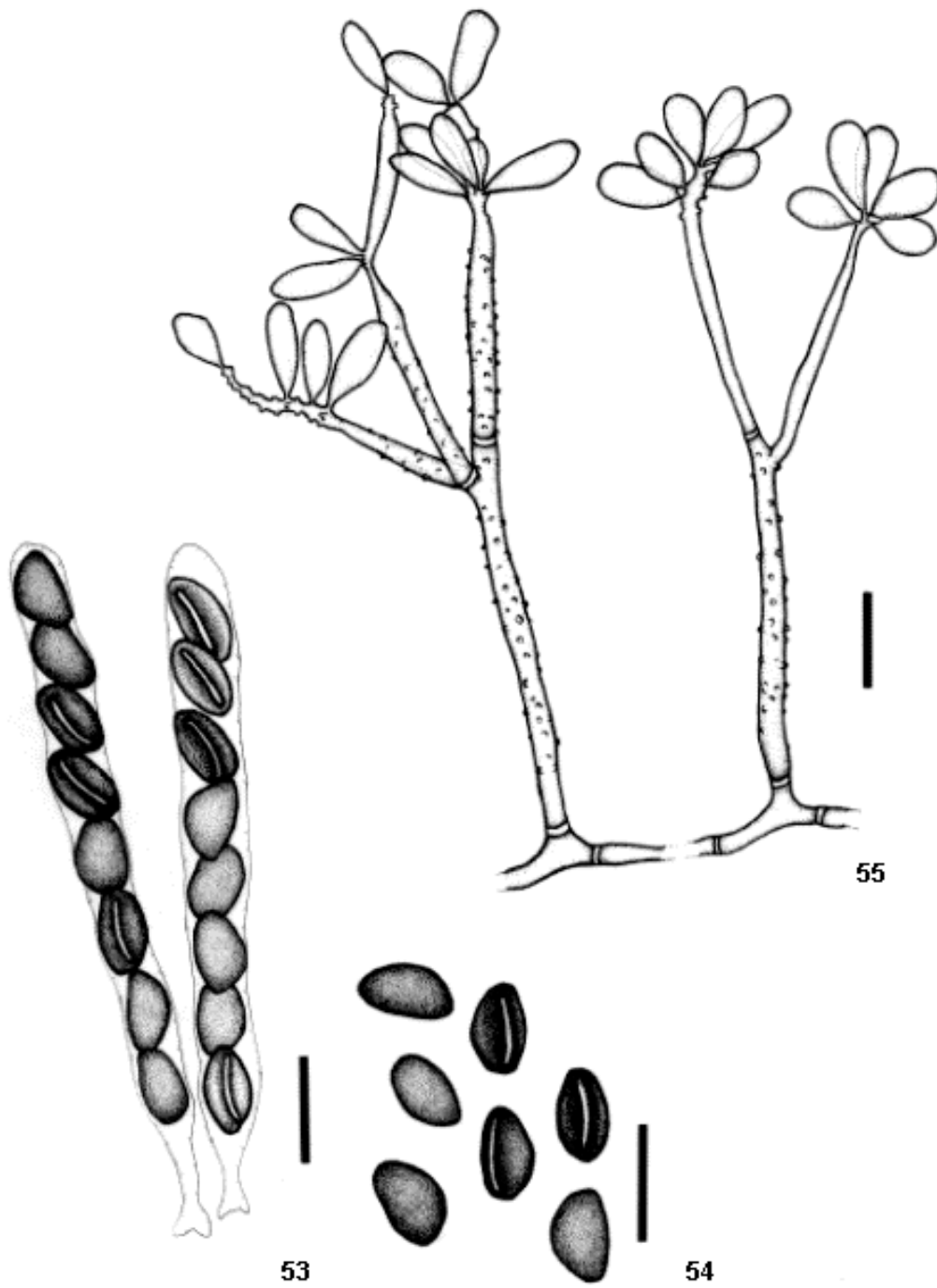
50

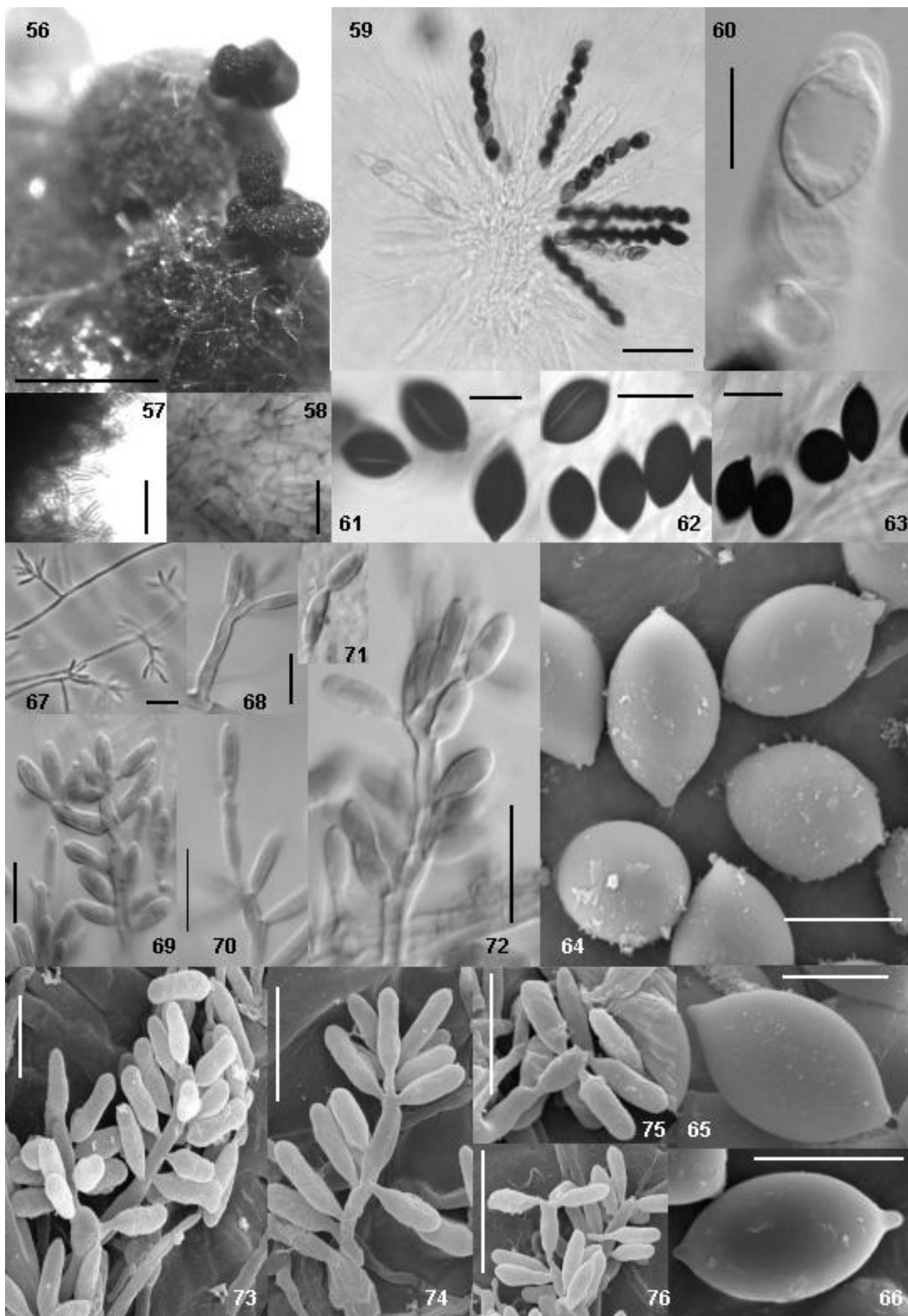


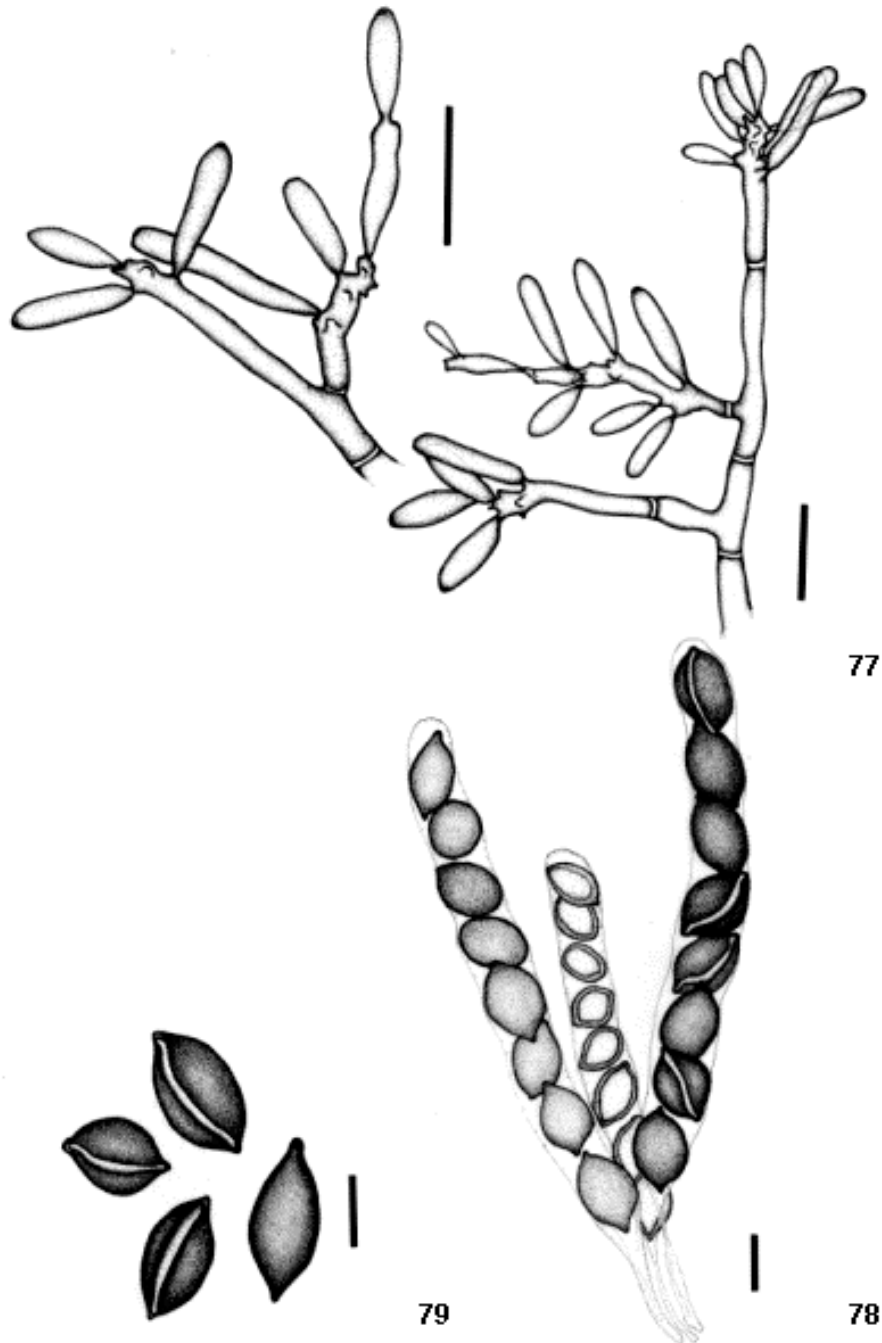
51



52







V DISCUSIÓN

En los ascomicetos se ubican la mayoría de los organismos descritos para el reino de los hongos. Muchos ascomicetos del suelo y sus anamorfos son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios que son utilizados con fines industriales, agrícolas y terapéuticos. En los últimos años el número de compuestos farmacológicamente activos obtenidos a partir de los ascomicetos del suelo se ha incrementado notablemente y en consecuencia también ha crecido el interés por el aislamiento y conservación de estos organismos. Sin embargo, los estadios teleomórficos han sido los menos estudiados debido a que el número de especies que se aíslan en cultivo es muy reducido. En el suelo los ascomicetos se encuentran en forma de ascosporas latentes y es necesaria la interrupción de éste estadio para conseguir su germinación.

5.1. Ascosporas latentes: activación química o métodos indirectos.

En este trabajo se han analizado más de 1500 muestras de suelo procedentes de 15 países. Los métodos escogidos para la activación de las ascosporas latentes fueron los ensayados anteriormente por Stchigel (2000). Sus resultados indicaron que entre las técnicas ensayadas (acetona, ácido acético, calor, etanol, y fenol) no existían diferencias significativas en cuanto al promedio de especies recuperadas ni en la frecuencia relativa con las que estas aparecían. En consecuencia, decidimos utilizar solamente tres de ellas, las basadas en la acción del ácido acético, del etanol y del fenol.

Mediante estos métodos de activación pudimos recuperar en cultivo cinco especies nuevas para la ciencia. Cuatro de ellas fueron aisladas por la activación con fenol: *Apiosordaria globosa*, *Apiosordaria hispanica*, *Gelasinospora uniporata*, y *Poroconiochaeta tetraspora*, y una, *Gelasinospora nigeriensis* mediante el tratamiento con etanol. Sin embargo, nosotros no consideramos que estos resultados estén asociados a la efectividad de los métodos, ya que coincidimos con Stchigel (2000) en que probablemente los resultados se deban a características propias de las muestras, como pueden ser el número de propágulos presentes

en la fracción analizada, las condiciones de incubación, o la temperatura de incubación. En su conjunto, las técnicas de activación empleadas permitieron aislar la mayoría de las cepas de los géneros *Gelasinospora* y *Neurospora* incluidas en nuestro trabajo.

El empleo del método indirecto de aislamiento, utilizando un fragmento de madera seca como cebo, nos permitió aislar cinco taxones nuevos para la ciencia, y nos permitió proponer el género nuevo *Coronatomyces*. Consideramos especialmente interesante el hecho de que tres de las especies nuevas, *Sphaerodes quadrangulata*, *Sphaerodes tenuissima*, y *Syspastospora tropicalis*, pertenecen a la familia Ceratostomataceae, y que ninguna de esas especies fuera detectada por los métodos químicos de activación de ascosporas a los que fueron sometidas otras fracciones de las mismas muestras. La madera seca empleada en este método, no es un sustrato adecuado para el crecimiento rápido y masivo de los hongos. Este sustrato no suele ser colonizado a menos que contenga entre 26-32% de humedad. Otra característica de este tipo de material que lo hacen poco favorable al crecimiento fúngico es su bajo nivel de nitrógeno (0.03-1.0%) (Ingold y Hudson, 1993). Es probable que estas restricciones nutricionales limiten el crecimiento de aquellas especies que son incapaces de hidrolizar la celulosa o la lignina. Sin embargo, favorecen el crecimiento de especies que suelen resultar inhibidas competitivamente cuando se emplean métodos de aislamiento que utilizan medios de cultivos ricos en fuentes de carbono. Estos otros métodos de aislamiento favorecen a organismos con crecimiento expansivo. La mayor parte de las especies de la familia Ceratostomataceae presentan un crecimiento lento y otras necesitan de la presencia de otras especies fúngicas (comensalistas o parásitos) para poder desarrollarse (Doguet, 1955; Cannon y Hawksworth, 1982; Horie y col., 1986; Haverson y Kimbrough, 2001). Todo ello implica que muchas de las especies incluidas en esta familia sean difíciles de obtener en cultivo axénico (Ej. *Melanospora* spp., *Microthecium* spp., *Sphaerodes* spp. o *Syspastospora* spp.), y ha hecho sugerir a algunos autores que no son comunes en la naturaleza (Udagawa y Cain, 1969). Con la citada técnica pudimos comprobar que *S. tropicalis* tiene una amplia distribución geográfica, ya que fue detectada en regiones muy distantes entre sí y en ecosistemas diversos.

Nuestros resultados confirman que el empleo de varias técnicas de aislamiento, en diferentes fracciones de una misma muestra permite detectar o aislar una mayor diversidad de especies, lo que repercute en un mayor conocimiento de la microbiota del suelo.

5.2. Filogenia molecular

En la presente tesis la secuenciación del ADN y el análisis de las secuencias a través del método de *neighbour-joining* fueron métodos utilizados para inferir relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos. Estas técnicas nos permitieron resolver problemas en el ámbito de géneros morfológicamente muy cercanos como *Gelasinospora* y *Neurospora* y entre los géneros *Coniochaeta*, *Coniochaetidium* y *Poroconiochaeta*. En el estudio de la familia Coniochaetaceae se solucionaron además problemáticas taxonómicas que involucran a las subclases Sordariomycetidae y Xylariomycetidae. Sin embargo, pudimos comprobar que estos métodos no siempre resultan resolutivos, bien fuera por los marcadores moleculares escogidos o por el número de taxones que fueron incluidos en los estudios. Estas situaciones inciertas las encontramos al tratar de ubicar los géneros nuevos *Coronatomyces* y *Coniocessia* dentro de los órdenes Sordariales y Xylariales, respectivamente.

5.2.1. Los géneros *Gelasinospora* y *Neurospora*

Uno de nuestros principales objetivos fue el estudio de las relaciones filogenéticas entre los géneros *Gelasinospora* y *Neurospora*. Este trabajo tuvo como base la existencia de especies con morfología intermedia (*Neurospora discreta* y *Neurospora sublineolata*) y los resultados obtenidos por Dettman y col. (2001). Estos autores basándose en el estudio de las secuencias de cuatro genes (ITS/5.8S, *mat A1*, *mat a1* y *gpd*) sugirieron que la ornamentación de las ascosporas es un carácter de poco valor filogenético. En nuestro estudio se secuenciaron los

dominios D1 y D2 del gen 28S del ARNr, lo que nos permitió corroborar nuestras principales hipótesis de trabajo:

1. que ambos géneros forman un grupo monofilético,
2. que el patrón de ornamentación de las ascosporas no es un carácter filogenéticamente informativo
3. que las características del episporio tienen valor taxonómico dentro del grupo.

Estos resultados nos condujeron a sugerir la sinonimia de ambos géneros, replantear la descripción de *Neurospora* y proponer treinta y seis combinaciones nuevas para aquellas especies de *Gelasinospora* transferidas a *Neurospora*. Nuestros resultados mostraron además que la especie *Gelasinospora amorphoporcata* era filogenéticamente más próxima a *Sordaria* que al grupo *Neurospora-Gelasinospora*. En consecuencia dicha especie fue excluida de *Neurospora*, y reubicada en el género nuevo *Pseudoneurospora*. Sin embargo, para dilucidar la relación de *Pseudoneurospora amorphoporcata* con los otros miembros de la familia Sordariaceae (Ej. *Copromyces* N. Lundq., *Isia* D. Hawksw. & Manohar. y *Sordaria*) hacen falta nuevos estudios.

5.2.2. El género *Coronatomyces*

El género nuevo *Coronatomyces* fue propuesto dentro del orden Sordariales, sin embargo posee caracteres morfológicos intermedios entre Chaetomiaceae, Lasiosphaeriaceae y Sordariaceae, por lo que su delimitación dentro de alguna de estas familias era confusa. Para tratar de esclarecer su posición taxonómica se recurrió a la secuenciación de las regiones de los espaciadores intergénicos (ITS1 e ITS2) y las del gen 5.8S del ARNr. Trabajos previos empleando estos marcadores moleculares habían permitido definir relaciones filogenéticas en los géneros *Corynascus* Arx, *Thielavia* Zopf. (Stchigel y col., 2000, 2002), *Gelasinospora* y *Neurospora* (Stchigel y col., 1998; Dettman y col., 2001), y en las familias Diatrypaceae y Xylariaceae (Xylariales) (Sánchez-Ballesteros y col., 2000; Sánchez-Ballesteros, 2001; Acero y col., 2004). Nuestro análisis permitió excluir al nuevo género de la familia Chaetomiaceae, pero las relaciones de *Coronatomyces cubensis* con las familias Lasiosphaeriaceae y Sordariaceae no fueron esclarecidas. Nuestros resultados pudieron haber estado influenciados por el limitado número de especies de Lasiosphaeriaceae incluidos en el análisis y por el hecho de que esta familia, tal y como ha sido definida es parafilética (Huhndorf y col., 2004). Pero sobre todo, porque los criterios utilizados en la delimitación genérica y de las familias, como la morfología de las ascosporas y del peridio, son caracteres homoplásicos que han aparecido independientemente y en varias ocasiones en la evolución del orden Sordariales (Cannon, en: Barr y Cannon, 1994, Huhndorf y col., 2004). Para concretar la posición taxonómica del género *Coronatomyces*, se necesitan nuevos estudios, ensayando un mayor número de especies y utilizando otros marcadores moleculares.

5.2.3. La familia Coniochaetaceae

Mediante el análisis de las secuencias de los genes 18S y 28S del ARNr pudimos esclarecer parcialmente las relaciones filogenéticas en la familia Coniochaetaceae. Nuestros resultados coincidieron con Huhndorf y col. (2004), y confirmaron que la familia Coniochaetaceae tiene una posición alejada del resto de los Sordariales y que el orden Coniochaetales tiene una base

filogenética. Nuestro estudio corroboró que la presencia de anamorfos enteroblásticos es un carácter que posee valor taxonómico en el orden y que tiene mayor valor filogenético que la presencia de línea germinativa en las ascosporas. En consecuencia el género *Wallrothiella* debe incluirse en el orden y consideramos que los géneros *Barrina* y *Synaptospora* deben mantenerse en Coniochaetales. Teniendo en cuenta estos resultados, creemos que las especies de *Coniochaeta* que desarrollan anamorfos holoblásticos (*C. emodensis* y *C. nodulisporiodes*), así como el género *Coniolaria* deben ser transferidos al orden Xylariales de la subclase Xylariomycetidae. Hemos propuesto los nuevos géneros *Pseudorosellinia* y *Novaxylaria* para reubicar a *C. emodensis* y a *Coniolaria murandii* en la familia Xylariaceae. Se ha propuesto también el género nuevo *Coniocessia* en el orden Xylariales para introducir la especie *C. nodulisporiodes*, sin embargo su posición taxonómica dentro del orden no pudo resolverse.

Nuestros análisis han demostrado también, que en la familia Coniochaetaceae los caracteres morfológicos utilizados en la delimitación genérica no se relacionan con los agrupamientos obtenidos en los árboles filogenéticos. Hemos demostrado que los géneros *Coniochaeta*, *Coniochaetidium*, *Ephemeroascus* o *Poroconiochaeta* son artificiales; y que el tipo de ascoma (peritecial o cleistotecial), la ornamentación de las ascosporas, o la morfología de los anamorfos solo tienen valor a nivel específico. En consecuencia la descripción del género *Coniochaeta* fue enmendada y los géneros *Coniochaetidium*, *Ephemeroascus* y *Poroconiochaeta* fueron considerados sinónimos de *Coniochaeta*, y sus especies transferidas al mismo. La taxonomía del orden Coniochaetales todavía no está suficientemente elucidada, sus relaciones con otros miembros de la subclase Sordariomycetidae debe ser objeto de futuros estudios. Asimismo, consideramos de interés investigar el valor taxonómico de otros caracteres morfológicos como el tipo de peridio, el número de ascosporas por ascos (4-, 8-, o multiesporados), o la presencia y la disposición de la línea germinativa.

VI CONCLUSIONES

- ✓ El empleo de métodos químicos de activación de las ascosporas mediante la acción del fenol y del etanol nos permitió aislar en cultivo cinco taxones nuevos para la ciencia:

Apiosordaria globosa
Apiosordaria hispanica
Neurospora nigeriensis
Neurospora uniporata
Poroconiochaeta tetraspora

- ✓ La aplicación de la técnica de aislamiento indirecto nos permitió descubrir cinco taxones nuevos para la ciencia; el nuevo género ***Coronatomyces*** y las nuevas especies:

Coronatomyces cubensis
Sphaerodes quadrangularis
Sphaerodes tenuissima
Sypastospora tropicalis

- ✓ Se proponen tres combinaciones nuevas para el género *Sphaerodes*:

Sphaerodes ellipsospora
(≡*Microthecium ellipsosporium*)

Sphaerodes singaporensis
(≡*Microthecium singaporensis*)

Sphaerodes levita
(≡*Microthecium levitum*)

- ✓ Se sugiere la sinonimia de los géneros *Neurospora* y *Gelasinospora*, las especies incluidas en este último son transferidas a *Neurospora*. Basándonos en ello se proponen treinta y seis combinaciones nuevas:

Neurospora bonaerensis

(≡ *Gelasinospora bonaerensis*)

Neurospora brevispora

(≡ *Gelasinospora brevispora*)

Neurospora caffera

(≡ *Gelasinospora caffera*)

Neurospora calospora

(≡ *Rosellinia calospora*)

Neurospora cerealis

(≡ *Gelasinospora cerealis*)

Neurospora cratophora

(≡ *Gelasinospora cratophora*)

Neurospora dictyophora

(≡ *Gelasinospora dictyophora*)

Neurospora endodonta

(≡ *Anixiella endodonta*)

Neurospora fallaciosa

(≡ *Gelasinospora fallaciosa*)

Neurospora foveaconica

(≡ *Gelasinospora foveaconica*)

Neurospora goundaensis

(≡ *Gelasinospora goundaensis*)

Neurospora hapsidophora

(≡ *Gelasinospora hapsidophora*)

Neurospora heterospora

(≡ *Gelasinospora heterospora*)

Neurospora himalayensis

(≡ *Gelasinospora himalayensis*)

Neurospora hippopotama

(≡ *Gelasinospora hippopotama*)

Neurospora indica

(≡ *Anixiella indica*)

Neurospora inversa

(≡ *Gelasinospora inversa*)

Neurospora kobi

(≡ *Gelasinospora kobi*)

Neurospora longispora

(≡ *Gelasinospora longispora*)

Neurospora macrospora

(≡ *Gelasinospora macrospora*)

Neurospora micropertusa

(≡ *Anixiella micropertusa*)

Neurospora mirabilis

(≡ *Gelasinospora mirabilis*)

Neurospora multiforis

(≡ *Gelasinospora multiforis*)

Neurospora novoguineensis

(≡ *Gelasinospora novoguineensis*)

Neurospora pseudocalospora

(≡ *Gelasinospora pseudocalospora*)

Neurospora pseudoreticulata

(≡ *Gelasinospora pseudoreticulata*)

Neurospora reticulata

(≡ *Thielavia reticulata*)

Neurospora retispora

(≡ *Gelasinospora retispora*)

Neurospora saitoi

(≡ *Anixiella saitoi*)

Neurospora santi-florii

(≡ *Gelasinospora santi-florii*)

Neurospora seminuda

(≡ *Gelasinospora seminuda*)

Neurospora sphaerospora

(≡ *Anixiella sphaerospora*)

Neurospora stellata

(≡ *Gelasinospora stellata*)

Neurospora tetraspora

(≡ *Gelasinospora tetrasperma*)

Neurospora udagawae

(≡ *Gelasinospora udagawae*)

Neurospora varians

(≡ *Gelasinospora varians*)

- ✓ Se propone la exclusión de la especie *Gelasinospora amorphoporcata* del género *Neurospora*, y su inclusión en el nuevo género ***Pseudoneurospora***.

- ✓ Se sugiere la sinonimia de los géneros *Coniochaetidium*, *Ephemeroascus*, y *Poroconiochaeta* con *Coniochaeta*, por lo que se proponen nueve combinaciones nuevas:

Coniochaeta boothii

(≡ *Thielavia boothii*)

Coniochaeta discoidea

(≡ *Poroconiochaeta discoidea*)

Coniochaeta mirabile

(≡ *Coniochaetidium mirabile*)

Coniochaeta nuciforme

(≡ *Coniochaetidium nuciforme*)

Coniochaeta ostrea

(≡ *Coniochaetidium ostreum*)

Coniochaeta punctulata

(≡ *Poroconiochaeta punctulata*)

Coniochaeta savoryi

(≡ *Thielavia savoryi*)

Coniochaeta tetrasperma

(≡ *Poroconiochaeta tetraspora*)

Coniochaeta verticillata

(≡ *Ephemeroascus verticillatus*)

- ✓ Se propone la exclusión de las especies *Coniochaeta emodensis* y *Coniochaeta nodulisporioides* del género *Coniochaeta* y de la subclase Sordariomycetidae, y su transferencia al orden Xylariales de la subclase Xylariomycetidae. Se sugieren dos géneros nuevos para reubicarlas, ***Pseudorosellinia*** y ***Coniocessia***, respectivamente. En consecuencia se proponen las siguientes combinaciones nuevas:

Pseudorosellinia emodensis

(≡ *Coniochaeta emodensis*)

Coniocessia nodulisporioides

(≡ *Coniochaeta nodulisporioides*)

- ✓ Se propone la exclusión del género *Coniolaria* de la familia Coniochaetaceae y de la subclase Sordariomycetidae y su ubicación en el nuevo género ***Novaxylaria***, dentro del orden Xylariales, de la subclase Xylariomycetidae. En consecuencia se propone la siguiente combinación nueva:

Novaxylaria murandii
(≡ *Coniolaria murandii*)

VII BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elsalam K. A., Aly I. N., Abdel-Satar M. A., Khalil M. S. y Verreet J. A. 2003. PCR identification of *Fusarium* genes based on nuclear ribosómico-DNA sequence data. *A. J. Biotech.* **2**: 82-85.
- Acero F. J., González V., Sánchez-Ballesteros J. y Rubio V. 2004. Molecular phylogenetic studies on Diatrypaceae based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia* **96**: 249-259.
- Alexopoulos C. J., Mims C. W. y Blackwell M. 1996. *Introductory mycology*. John Wiley & Sons, New York.
- Anderson T. F. 1953. Techniques for preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for electron microscope. *Trans. NY Acad. Sci.* **13**: 130-134.
- Arx J. A. von. 1981. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. 3rd ed. J. Cramer, Vaduz.
- Arx J. A. von. 1982. A key to the species of *Gelasinospora*. *Persoonia* **11**: 443-449.
- Arx J. A. von. y Gams W. 1967. Über *Pleurage verruculosa* und die zugehörige *Cladorrhinum*-Konideform. *Nova Hedwigia* **13**: 199- 208.
- Barnett H. L., Beneke E. S., Emerson R., Farr M. L., Gray W. D., Korf R. P., Simmons E. G. y Stevens R. B. 1974. *Mycology guidebook*. Stevens R. B. ed. University of Washinton Press, Seattle & London.
- Barr M. E. 1990. Prodrumus to nonlichenized, pyrenomycetous members of Class Hymenoascomycetes. *Mycotaxon* **39**: 43-184.

- Barr M. E. y Cannon P. F. 1994. *Discussion 3. Calosphaeriales, Clavicipitales, Coryniales, Diaporthales, Diatrypales, Halosphaeriales, Hypocreales, Meliolales, Ophiostomatales, Phyllachorales, Sordariales, Trichosphaeriales, and Xylariales*. En: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the nineties*. D. L. Hawksworth ed.: 371-378. Plenum Press, New York.
- 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*: 305-316. Chicago.
- Beatty N. P., Smith M. L. y Glass N. L. 1994. Molecular characterization of mating-type loci in selected homothallic species of *Neurospora*, *Gelasinospora*, and *Anixiella*. *Mycol. Res.* **98**: 1309-1316.
- Berbee M. L. 1996. Loculoascomycete origins and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 462-470.
- Berbee M. L. y Taylor J. W. 1992. Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosómico DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 278-284.
- Berbee M. L. y Taylor J. W. 2001. *Fungal Molecular Evolution: Gene trees and geologic time*. En: *The Mycota VII. Part B. Systematics and Evolution*. McLaughlin, McLaughlin, y Lemke ed.: 229-245. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bills G. F., Polishook J. D., Goetz M. A., Sullivan R. F. y White J. F. Jr. 2002. *Chaunopycnis pustulata* sp. nov., a new Clavicipitalean anamorph producing metabolites that modulate potassium ion channels. *Mycol. Prog.* **1**: 3-18.

- Bruns T. D., Vilgalys R., Barns S. M., González D., Hibett D. S., Lane J. D., Simon L., Stickel S., Sarro T. M., Weisburg W. G. y Sogin M. L. 1992. Evolutionary relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**: 231-241.
- Bruns T. D., White T. J. y Taylor J. W. 1991. Fungal molecular systematic. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**: 525-564.
- Bryan G. T., Daniels M. J. y Osbourn A. E. 1995. Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosómico DNA sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 681-689.
- Cailleux R. 1971. Recherches sur la mycoflore coprophile Centrafricaine. Le genres *Sordaria*, *Gelasinospora*, *Bombardia*. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **87**: 461-626.
- Campbell R. 1972. Ultrastructure of conidium ontogeny in the deuteromycete fungus *Stachybotrys atra* Corda. *New Phytologist* **71**: 1143-1149.
- Cannon P. F. y Hawksworth D. L. 1982. A re-evaluation of *Melanospora* Corda and similar Pyrenomycetes, with a revision of the British species. *Bot. J. Linn. Soc.* **84**: 115-160.
- Cano J. F. 1989. *Aportación al conocimiento de los hongos queratinofílicos en España: estudio sobre la taxonomía, ultraestructura, patología experimental y ecología del género Aphanascus*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cano J., Solé M., Pitarch L. B. y Guarro J. 2002. *Castanedomyces australiensis* gen. nov. sp. nov. a keratinophylic fungus from Australian soil. *Stud. Mycol.* **47**: 165-172.

- Carlile M. J., Watkinson S. C. y Gooday G. W. 2001. *The Fungi*. Academic Press ed., Great Britain by Bath Press, Avon.
- Carrol F. E. y Carrol G. C. 1973. Senescence and death of conidiogenous cell in *Stemphylium botryosum* Wallroth. *Arch. Microbiol.* **94**: 109-124.
- Checa J., Barrasa J. M., Moreno G., Fort F. y Guarro J. 1988. The genus *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke (Coniochaetaceae, Ascomycotina) in Spain. *Cryptogamie Mycol.* **9**: 1-34.
- Czelusniak J., Goodman M., Monnief N. D. y Kehobe S. M. 1990. Maximum parsimony approach to construction of evolutionary trees from aligned homologous sequences. *Methods Enzymol.* **183**: 601-615.
- Daved P. y Rouxel F. 2000. *Detection and isolation of soil fungi*. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Dettman J. R., Harbinski F. M. y Taylor J. W. 2001. Ascospores morphology is a poor predictor of the phylogenetic relationships of *Neurospora* and *Gelasinospora*. *Fung. Genet. Biol.* **34**: 49-61.
- Dix N. J. y Webster J. 1995. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall ed. University Press. Cambridge.
- Doguet G. 1955. Le genere *Melanospora*. *Le Botaniste* **39**: 39: 1-313.
- Dowding E. S. 1933. *Gelasinospora*, a new genus of Pyrenomycetes with pitted spores. *Can. J. Res.* **9**: 294-305.

- Echlin P. y Kaye G. 1979. Thin films for high electron microscopy and X-ray microanalysis. *Scanning Electron Microsc.* **2**: 21-30.
- Emden J. H. van. 1973. *Ephemeroascus* gen. nov. (Eurotiales) from soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* **61**: 599-601.
- Eriksson O. E., Baral H.-O., Currah R. S., Hansen K., Kurtzman C. P., Rambold G. y Laessøe T. 2004. Outline of Ascomycota – 2004. *Myconet* **10**: 1-99.
- Eriksson O. E. y Hawksworth D. L. 1998. Notes on ascomycete systematics - Nos. 2256-2439. *Systema Ascomycetum* **16**: 59-81.
- Eriksson O. E. y Winka K. 1997. Supraordinal taxones of Ascomycota. *Myconet* **1**: 1-16.
- Eriksson O. E. y Winka K. 1998. Families and higher taxones of Ascomycota. *Myconet* **1**: 17-24.
- Estruch J. J., Antuña C., Ferrer S. y Ramón D. 1989. Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. *Rev. Ibéroam. Micol.* **6**: 62-66.
- Farris J. S. 1983. *The logical basis of phylogenetic analysis*. En: *Advances in Cladistics*. Platnick N. I. y Funk V. A. ed.: 277-302. Columbia University Press, New York.
- Felsenstein J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Sys. Zool.* **27**: 401-410.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

- Figueras M. J. y Guarro J. 1988 a. A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* **80**: 298-306.
- Figueras M. J. y Guarro J. 1988 b. Developmental morphology and fine structure of the ascoma of *Chaetomium repens*. *Nova Hedwigia* **47**: 469-495.
- Fort F. 1983. *Contribución al estudio de los ascomicetes e hifomicetes de los suelos de Cataluña*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Barcelona.
- Fox F. M. 1993. *Tropical fungi: their commercial potential*. En: *Aspects of tropical Mycology*. Isaac S., Frankland J. C. y Whalley A. J. S. ed.: 253-263. University Press. Cambridge.
- Furuya K. y Naito A. 1979. An effective method for isolation of *Boothiella tetraspora* from soil. *Trans. Mycol. Soc. Japan*. **20**: 309-311.
- Furuya K. y Naito A. 1980. Stimulation of ascospore germination by phenolic compounds in members of the Sordariaceae. *Trans. Mycol. Soc. Japan*. **21**: 77-85.
- García D., Stchigel A. M., Cano J., Guarro J. y Hawksworth D. L. 2004. A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data. *Mycologia* **108**: 1119-1142.
- 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.
- Garrett S. D. 1981. *Soil fungi and soil fertility: an introduction to soil mycology*. Pergamon Press. Oxford, New York.

- Gené J. 1994. *Estudio sobre la taxonomía y la actividad antimicrobiana de los deuteromicetos de origen coprófilo y geófilo de España*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Gené J., Guillamón J. M., Guarro J., Pujol I. y Ulfig 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.
- Gochenaur S. E. y Backus M. P. 1962. A new species of *Neurospora* from Wisconsin lowland soil. *Mycologia* **54**: 555-562.
- Hackett C. J. y Chen K. C. 1976. Ultrastructure of developing ascospores in *Sordaria brevicollis*. *J. Bacteriol.* **126**: 883-894.
- Hanlin R. T. 1982. Conidiogenesis in *Spinifer meineckellus*. *Mycologia* **74**: 236-241.
- Hanlin R. T. 1993. *The Ascomycotina: A pragmatic viewpoint*. En: *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Reynolds D. R. y Taylor J. W. ed.: 183-187. CAB International, Wallingford.
- Harveson R. M. y Kimbrough J. W. 2001. Parasitism and measurement of damage to *Fusarium oxysporum* by species of *Melanospora*, *Sphaerodes*, and *Persiciospora*. *Mycologia* **93**: 249-257.
- Hawksworth D. L. 1978. A new species of *Coniochaeta* with an interesting conidial stage. *Norw. J. Bot.* **25**: 15-18.

- Hawksworth D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* **95**: 641-655.
- Hawksworth D. L. 1993. *The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis, and prognosis*. En: *Aspect of tropical mycology*. Isaac S., Frankland J. C. y Whalley A. J. S. ed.: 253-263. University Press. Cambridge.
- Hawksworth D. L. y Eriksson O. E. 1994. *Outline of ascomycetum. Systema Ascomycetum: The concept*. En: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the nineties*. D. L. Hawksworth ed.: 349-355. Plenum Press, New York.
- Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C. y Pegler D. N. 1995. *Dictionary of the fungi*. 8ª ed. CAB International, Wallingford.
- Hawksworth D. L. y Manoharachary C. 1978. *Isia*, a new genus in the Sordariaceae sensu latu for *Thielavia neocaledoniensis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **71**: 332-335.
- Hawksworth D. L. y Mouchacca J. 1994. *Ascomycete systematics in the nineties*. En: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the nineties*. D. L. Hawksworth ed.: 3-11. Plenum Press, New York.
- Hawksworth D. L., Sutton B. C. y Ainsworth G. C. 1983. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi*. 7ª ed., CAB, Kew.
- Hennequin C., Abachi E., Symoens F., Lavarde V., Reboux G., Nolard N. y Berche P. 1999. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3586-3589.

- Henrion B., Chevalier G. y Martin F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosómico 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.
- Horie Y., Udagawa S-I. y Cannon P. F. 1986. Four new Japanese species of Ceratostomataceae (Ascomycetes). *Mycotaxon* **25**: 229-245.
- Huelsenbeck J. P. 1997. Is the Felsenstein zone a fly trap? *Syst. Biol.* **46**: 69-74.
- Huhndorf S. M., Miller A. N. y Fernandez F. A. 2004. Molecular systematics of the *Sordariales*: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia* **96**: 368-387.
- Huzefa A. R., Campbell J. y Shearer C. A. 2003. Freshwater ascomycetes: *Cyanoannulus petersenii*, a new genus and species from submerged wood. *Mycotaxon* **88**: 1-17.
- Hyde K. D. y Hawksworth D. L. 1997. *Measuring and monitoring the biodiversity of microfungi*. En: *Biodiversity of tropical microfungi*. Hyde K. D. ed.: 11-28. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Ingold C. T. y Hudson H. J. 1993. *The biology of fungi*. 6th ed. Chapman & Hall, Alden Press, Oxford.
- 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.

Jahn T. L. 1949. *How to know the Protozoa*. William C. Bown ed. Dubaque, Iowa.

Jeng R. S. y Krug J. C. 1976. *Emblemospora*, a new genus of the Sordariaceae. *Can. J. Bot.* **54**: 1971-1976.

Johnson L. F. y Curl E. A. 1972. *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*. Burgess Publishing Co., Minneapolis.

Kendrick B. 1992. *The fifth kingdom*. Focus Text, Focus Information Group Inc., Newburyport.

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.

Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C. y Stalpers J. A. 2001. *Dictionary of the Fungi*. 9th ed. CAB International, Wallingford, Oxon.

Kohlmeyer J., Spatafora J. W. y Volkmann-Kohlmeyer B. 2000. Lulworthiales, a new order of marine Ascomycota. *Mycologia* **92**: 453-458.

Kornerup A. y Wanscher J. H. 1984. *Methuen handbook of colour*. 3rd ed. Eyre Methuen, London.

Kuhls K., Lieckfeldt E., Samuels G. J., Kovacs W., Meyer W., Petrini O., Gams W., Börner T. y Kubicek C. P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 7755-7760.

- 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.
- Kwan S. K. y Hack S. J. 2002. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **23**: 112-122.
- Laessøe T. 1994. Index Ascomycetum 1. Xylariaceae. *Systema Ascomycetum* **13**: 43-112.
- Lee S. y Hanlin R. T. 1999. Phylogenetic relationships of *Chaetomium* and similar genera based on ribosómico DNA sequences. *Mycologia* **91**: 434-442.
- Lieckfeldt E. y Seifert K. A. 2000. An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of *Hypocreales*. *Stud. Mycol.* **45**: 35-44.
- Liu Y. J., Whelen S. y Hall B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1799-1809.
- Lundquist N. 1967. On spore ornamentation in the Sordariaceae, exemplified by the new cleistocarpus genus *Copromyces*. *Arkiv Bot Sér* **2**: 327-337.
- Lutzoni F., Kauff F., Cox C. J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T. Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G-H., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R. C., Hosaka K., Lim Y-W., Matheny B., Nishida I., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J. yahr R. y Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American J. Bot.* **9**: 1446-1480.

- Maley L. E. y Marshall C. R. 1998. The coming of age of molecular systematics. *Science* **279**: 505-506.
- Malloch D. y Cain R. F. 1971. New cleistothecial Sordariaceae and a new family, Coniochaetaceae. *Can. J. Bot.* **49**: 869-880.
- Miller A. 2003. *Multi-gene phylogenies indicate ascomatal wall morphology is a better predictor of phylogenetic relationships than ascospore morphology in the Sordariales*. En: *Phylogenetic studies in the Lasiosphaeriaceae and the key genus, Lasiosphaeria*. 81-124. PhD Theses. University of Illinois at Chicago & The Field Museum Chicago, I.L.
- Muir G. y Schötterer C. 1999. *Limitations to the phylogenetic use of ITS sequences in closely related species and populations- a case study in Quercus petrea (Matt.) Liebl*. En: *Which DNA marker for which purpose?* Guillet E. M. ed. [http://webdoc.gwdg.de/ebook/1999/URL which marker/m11/chap11.htm](http://webdoc.gwdg.de/ebook/1999/URL%20which%20marker/m11/chap11.htm)
- Nagahama T. 1995. *Studies on phylogeny and molecular evolution among the lower fungi, with special reference to the entomophthoralean fungi*. PhD Theses. Graduate School of University of Tokyo.
- Nelson M. A., Metzenberg R. L., Dunlap J., Borkovich K., Sachs M., Schulte U. y Selker E. 2001. *The Neurospora- Fungal Genome Initiative*. <http://www.unm.edu/~ngp/WhitePaper.html>
- Nishida H. y Sugiyama J. 1994. Archiascomycetes: detection of a major new lineage within the Ascomycota. *Mycoscience* **35**: 361-366.

- O'Donnell K. 1993. *Fusarium and its near relatives*. En: *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Reynolds R. y Taylor J. W. ed.: 225-233. CBA International, Wallingford.
- Olsen G. J. y Woese C. R. 1993. Ribosómico RNA: A key to phylogeny. *FASEB J.* **7**: 113-123.
- Palade J. E. 1952. A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* **95**: 285.
- Parkinson D. y Williams S. T. 1961. A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant soil* **13**: 347-355.
- Payen J. 1965. La méthode des appâts et ses applications en phytopathologie. I. Définition, revue bibliographique et applications à la prévision de la fonte des semis de betterave. *Bull. Ac. Natl. Super. Agron. Nancy* **7**: 29-54.
- Pöggeler S. 1999. Phylogenetic relationships between mating-type sequences from homothallic and heterothallic ascomycetes. *Curr. Genet.* **36**: 222-231.
- Pöggeler S. 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **56**: 589-601.
- Pöggeler S. y Kück U. 2000. Comparative analysis of the mating-type loci from *Neurospora crassa* and *Sordaria macrospora*: identification of novel transcribed ORFs. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 292-301.
- Punsola L. 1985. *Contribución al estudio de los hongos queratinofílicos de los suelos de Cataluña*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Rapilly F. 1968. *Les techniques de mycology en pathologie végétale*. INRA, Paris.

Réblová M. y Seifert K. A. 2004. *Cryptadelphia* (Trichosphaeriales), a new genus for holomorphs with *Brachysporium* anamorphs and clarification of the taxonomic status of *Wallrothiella*. *Mycologia* **96**: 343-367.

Réblová M. y Winka K. 2000. Phylogeny of *Chaetosphaeria* and its anamorphs based on morphological and molecular data. *Mycologia* **92**:939-954.

Réblová M. y Winka K. 2001. Generic concepts and correlations in ascomycetes based on molecular and morphological data: *Lecythothecium duriligni* gen. et sp. nov. with a *Sporidesmium* anamorph, and *Ascolaciola austriaca* sp. nov. *Mycologia* **93**: 478-493.

Rodriguez K. C. 2003. *Estudio taxonómico (morfológico y molecular) del género Chaetomium y otros géneros próximos*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Reus.

Rogers J. D. 1994. *Problem genera and family interfaces in the Eupyrenomycetes*. En: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the nineties*. D. L. Hawksworth ed.: 321-331. Plenum Press, New York.

Rosing W. C. 1982. Ultrastructure of ascus and ascospore development in *Chaetomium brasiliensis*. *Mycologia* **76**: 67-73.

Rossmann A. Y., Tulloss R. E., O'Dell T. E. y Thorn R. G. 1998. *Protocols for an all taxa biodiversity inventory of fungi in a Costa Rican conservation area*. Parkway Publishers, Inc. Boone, North Carolina.

- Sabatini D. D., Bensch K. y Barnetti R. J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cell ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.* **17**: 19.
- Saitou N. e 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.
- Sánchez-Ballesteros J. 2001. *Filogenia y caracterización molecular de hongos ascomicetos de la familia Xylariaceae*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sánchez-Ballesteros J., González V., Salazar O., Acero J., Portal M. A., Julián M. y Rubio V. 2000. Phylogenetic study of *Hypoxyton* and related genera based on ribosómico ITS sequences. *Mycologia* **92**: 964-977.
- Seifert K. A. y Samuels G. J. 2000. How should we look at anamorphs? *Stud. Mycol.* **45**: 5-18.
- Seigle-Murandi F., Guiraud P., Steiman R. y Sage L. 1995. *Coniolaria*: a new genus of Ascomycetes – Description of *Coniolaria murandii* sp. nov. from soil of Monument Valley in Colorado (USA). *Cryptog. Bot.* **5**: 346-350.
- Silva-Hanlin D. M. W. y Hanlin R. T. 1999. Small subunit ribosómico RNA gene phylogeny of several loculoascomycetes and its taxonomic implications. *Mycol. Res.* **103**: 153-160.

- Solé M., Cano J. y Guarro J. 2002 a. Molecular phylogeny of *Amaroascus*, *Auxarthron*, and morphologically similar onygenalean fungi. *Mycol. Res.* **106**: 388-396.
- Solé M., Cano J. y Guarro J. 2002 b. Two new species of *Auxarthron* morphologically and genetically close to *A. kuehnii*. *Stud. Mycol.* **47**: 103-110.
- Spatafora J. W. y Blackwell M. 1993. Molecular systematics of unitunicate perithecial ascomycetes: The Clavicipitales-Hypocreales connection. *Mycologia* **85**: 912-922.
- Spatafora J. W. y Blackwell M. 1994 a. The polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. *Mycol. Res.* **98**: 1-9.
- Spatafora J. W. y Blackwell M. 1994 b. *Cladistic analysis of partial ssrDNA sequences among unitunicate perithecial ascomycetes and its implications on the evolution of centrum development*. En: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the nineties*. D. L. Hawksworth ed.: 233-242. Plenum Press, New York.
- Stchigel A. M. 2000. *Estudio taxonómico de los Ascomycetes del suelo*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Reus.
- Stchigel A. M., Cano J. y Guarro J. 1998. A new species of *Gelasinospora* from Argentina. *Mycol. Res.* **102**: 14045-1408.
- Stchigel A. M., Figuera L., Cano J. y Guarro J. 2002. New species of *Thielavia*, with a molecular study of representative species of the genus. *Mycol. Res.* **106**: 975-983.

- Stchigel A. M., Sagués M., Cano J. y Guarro J. 2000. Three new thermotolerant species of *Corynascus* (Sordariales, Chaetomiaceae) from soil, with a key of the known species. *Mycol. Res.* **104**: 879-887.
- Sugiyama J. 1998. Relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. *Mycoscience* **39**: 487-511.
- Suh S-O. y Blackwell M. 1999. Molecular phylogeny of the cleistothecial fungi placed in Cephalothecaceae and Pseudeurotiaceae. *Mycologia* **91**: 836-848.
- Sussman A. S. 1966. Types of dormancy as represented by conidia and ascospores of *Neurospora*. *Colston Pap.* **18**: 235-257.
- Swofford D. L. y Olsen G. J. 1990. *Phylogeny reconstruction*. En: *Molecular Systematics*. Hillis D. M. y Moritz C., ed.: 411-501. Sinauer Associates; Sunderland, Massachusetts.
- Taylor J. W., Swann E. C. y Berbee M. L. 1994. *Molecular evolution of ascomycete fungi: phylogeny and conflict*. En: *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the nineties*. D. L. Hawksworth ed.: 201-212. Plenum Press, New York.
- Tehler A. 1988. A cladistic outline of the Eumycota. *Cladistics* **4**: 227-277.
- Tehler A., Farris J. S., Lipscomb D. L. y Källersjö M. 2000. Phylogenetic analyses of the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia* **92**: 459-474.
- Tehler A., Little D. P. y Farris J. S. 2003. The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosómico sequences of chitinous fungi. *Mycol. Res.* **107**: 901-916.

- 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. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- 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. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tsuneda A. 1983. *Fungal morphology and ecology. Mostly scanning electron microscopy.* Tokyo Press Co., Ltd., Sakuragawa, Itabashi-ku, Tokyo.
- Udagawa S-I. y Cain R. F. 1969. Notes on the genus *Microthecium*. *Can. J. Bot.* **25**: 229-245.
- Udagawa S-I. y Furuya K. 1979. *Poroconiochaeta*, a new genus of the Coniochaetaceae. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **20**: 5-12.
- Udagawa S-I. y Horie Y. 1982. Two new species of terrestrial Ascomycetes from Eastern Nepal. *Reports on the Cryptogamic Study in Nepal. Miscell. Publ. N. Sc. Mus. Tokyo* **3**: 97-104.
- Valldosera M. y Guarro J. 1988. Some coprophilous ascomycetes from Chile. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **90**: 601-605.
- Vidal P. 2000. *Taxonomía molecular de Chrysosporium*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Reus.
- Warcup J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* **166**: 117-118.

- Warcup J. H. y Barker K. F. 1963. Occurrence of dormant ascospores in soil. *Nature* **197**: 1317-1318.
- Watanabe T. 2002. *Pictorial Atlas of soil and Seed Fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species*. 2nd. ed. CRC. Press LLC. Boca Ratón, Florida.
- Weber E., Görke C. y Begerow D. 2002. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex II. Molecular studies based on sequences of the large subunit of ribosómico DNA. *Nova Hedwigia* **74**: 187-200.
- Whalley A. J. S. 1996. The xylariaceous way of life. *Mycol. Res.* **100**: 897-922.
- White T. J., Bruns T., Lee S. y Taylor J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosómico RNA genes for phylogenetics*. En: *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. Innis M. A., Geldfand D. H., Sninsky J. J. y White T. J. ed.: 315-322. Academic Press. New York.
- Whittaker R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**: 150-160.
- Wildman H. G. 1997. *Potential of tropical microfungi within the pharmaceutical industry*. En: *Biodiversity of tropical microfungi* K. D. Hyde ed.: 29-46. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Winka K. 2000. *Phylogenetic relationships within the Ascomycota based on 18S rDNA sequences*. Doctoral dissertation. Umeå University.
http://www.eg.umu.se/phdpdf/katarina_winka.pdf
- Zhang N. y Blackwell M. 2002. Molecular phylogeny of *Melanospora* and similar pyrenomycetous fungi. *Mycol. Res.* **106**: 148-155.