

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDIO TAXONÓMICO DE LOS ASCOMYCETES DEL SUELO  
Akberto Miguel Stchingel Glikman  
ISBN:978-84-691-1881-8/DL: T-342-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Unitat de Biologia i Microbiologia

**ESTUDIO TAXONÓMICO DE LOS  
ASCOMYCETES DEL SUELO**

T 150

**Alberto Miguel Stchingel**

Tesis Doctoral

2000

## UNITAT DE MICROBIOLOGIA

*Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut  
Universitat Rovira i Virgili*

**Josep Guarro Artigas**, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, y **José F. Cano Lira**, Catedrático de Escuela Universitaria de la Facultad de Enología, de la Universidad Rovira y Virgili

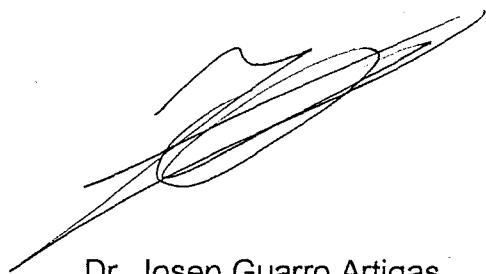
### CERTIFICAN:

Que D. Alberto Miguel Stchingel

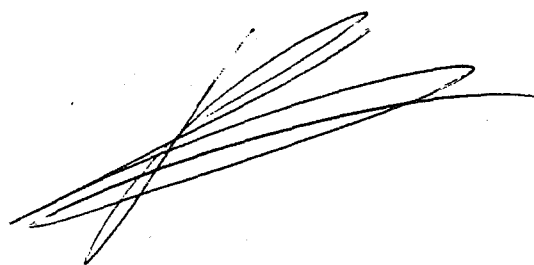
ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral titulada "ESTUDIO TAXONÓMICO DE LOS ASCOMYCETES DEL SUELO", estando en condiciones de ser presentada para la obtención del grado de Doctor.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos la presente.

Reus, a 26 de abril 2000



Dr. Josep Guarro Artigas



Dr. José F. Cano Lira

“Un científico es una persona a la que el sistema educativo no ha logrado destruir su curiosidad de niño y que sigue preguntándose cosas cómo por que el cielo es azul”

LEÓN LEDERMAN

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

ALBERT EINSTEIN

“El error obliga a rehacer el camino, y enseña muchas cosas. La duda, no. Entre el error y la duda, opto siempre por el primero”

JUAN BENET

“Lo que no está escrito, no existe”

RAMÓN ALBERTO DE TORRES

*Dedicada a la memoria de Jorge Stchingel, padre y amigo*

*Dedicada a mi compañera Cori, a mi madre Felisa y a mi hermano Daniel Omar, mi  
familia y mi fortaleza*

**El presente trabajo ha podido ser realizado gracias a las becas que me otorgaron en su oportunidad las siguientes Instituciones:**

- .- Instituto de Cooperación Iberoamericana (ICI, AECI)**
- .- Fundació Ciència i Salut**
- .- Universidad Rovira y Virgili**

**A todas éstas, mi más sincero agradecimiento por la confianza depositada en mi persona.**

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi reconocimiento a aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a hacer posible el presente trabajo:

Al Profesor Josep Guarro Artigas, mentor y amigo, por la dirección de la presente tesis, por solventar mis criterios taxonómicos, por sus consejos siempre útiles y la confianza depositada en mí a lo largo de todos estos años.

Al Dr. José Cano Lira, por la co-dirección de la presente tesis, por su ayuda en la resolución de problemas relacionados con la biología molecular y su amistad.

Al Profesor Dr. Ramón Alberto DeTorres, por su gran aptitud como educador y por despertar en mí la inquietud acerca del estudio de los hongos.

Al Profesor Eduardo Piontelli Laforet, mentor y amigo, con el cual comencé a dar mis primeros pasos en el mundo de la taxonomía fúngica.

Al Profesor Dr. Samir Abdullah y al Dr. Rafael Castañeda Ruíz, con los que he compartido techo y amistad, reafirmando mis convicciones acerca de que la convivencia es posible, aún exhibiendo religión y filosofía distintas.

A la Lic. Mercè Moncusí, por su inestimable ayuda en el arte del manejo de los microscopios electrónicos de transmisión y barrido, su paciencia y amistad.

A las Lic/s. Montserrat Sagués, Lydia Figuera, Lucía B. Pitarch y María Soler por su inestimable ayuda en la puesta a punto y realización de las técnicas de biología molecular empleadas en esta tesis, así como por su paciencia y amistad.

A los Dres. Joan Salas y Joan Fernández, y a la Lic. Mabel Inza, por su ayuda en el análisis estadístico de la presente tesis, así como por su paciencia y compañerismo.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi reconocimiento a aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a hacer posible el presente trabajo:

Al Profesor Josep Guarro Artigas, mentor y amigo, por la dirección de la presente tesis, por solventar mis criterios taxonómicos, por sus consejos siempre útiles y la confianza depositada en mí a lo largo de todos estos años.

Al Dr. José Cano Lira, por la co-dirección de la presente tesis, por su ayuda en la resolución de problemas relacionados con la biología molecular y su amistad.

Al Profesor Dr. Ramón Alberto DeTorres, por su gran aptitud como educador y por despertar en mí la inquietud acerca del estudio de los hongos.

Al Profesor Eduardo Piontelli Laforet, mentor y amigo, con el cual comencé a dar mis primeros pasos en el mundo de la taxonomía fúngica.

Al Profesor Dr. Samir Abdullah y al Dr. Rafael Castañeda Ruíz, con los que he compartido techo y amistad, reafirmando mis convicciones acerca de que la convivencia es posible, aún exhibiendo religión y filosofía distintas.

A la Lic. Mercè Moncusí, por su inestimable ayuda en el arte del manejo de los microscopios electrónicos de transmisión y barrido, su paciencia y amistad.

A las Lic/s. Montserrat Sagués, Lydia Figuera, Lucía B. Pitarch y María Soler por su inestimable ayuda en la puesta a punto y realización de las técnicas de biología molecular empleadas en esta tesis, así como por su paciencia y amistad.

A los Dres. Joan Salas y Joan Fernández, y a la Lic. Mabel Inza, por su ayuda en el análisis estadístico de la presente tesis, así como por su paciencia y compañerismo.

A las Dras. María José Figueras Salvat y Josepa Gené Díaz, por sus inestimables recomendaciones en la redacción de esta tesis, así como por su compañerismo.

A los Dres. Emilio Mayayo, Xavier Pastor, Isabel Pujol y Francisco Miró, por la amistad y apoyo mostrados en estos largos cuatro años.

A los Dres. Marcelo L. Wagner, Alberto A. Gurni, Rafael Ricco y Laureano Amorín, por el cobijo que me ofrecieron en la Cátedra de Farmacobotánica y el Museo de Farmacobotánica (FFyB, UBA), permitiendo que prosiguiera con mis inquisiciones acerca de la taxonomía de los hongos, así como por su invaluable amistad.

A los Dres. Ricardo Negroni, Cristina Iovannitti, Alicia Arechavala y María Rosa Elías Costa (Centro de Micología, FM, UBA), por compartir vuestra amistad y conocimientos.

A las Dras. María Cristina Díaz, María Alicia Toro San Martín y Adriana Saubois, y al Dr. Luís Zaror, por la amistad que nos une desde hace ya muchos años.

A mis compañeros y ex-compañeros (becarios, técnicos de laboratorio y secretarías) de la Unidad de Microbiología, con los cuales he pasado muchos momentos agradables, compartiendo amistad, opiniones personales y conocimientos. A ellos, un especial reconocimiento por soportar estoicamente a este “pesado” y fanático entusiasta de la taxonomía de los hongos.

A mis padres Jorge y Felisa, y a mi hermano Daniel Omar, por su amor mostrado a lo largo de todos estos años, por su confianza “ciega” en mi persona y en mis capacidades.

A mis suegros Rosa y Albert, a mi cuñado Albert, y al resto de mi familia “política”, por aceptarme como uno más del “clan”, así como por el cariño que me han demostrado durante todo este tiempo.

Muy especialmente a Cori Calduch Estrem, amiga, confidente y esposa, mi ancla y mi timón.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDIO TAXONOMICO DE LOS ASCOMYCETES DEL SUELO  
Akberto Miguel Stchingel Glikman  
ISBN:978-84-691-1881-8/DL: T-342-2008

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. DIVISIÓN (PHYLUM) ASCOMYCOTA</b>	2
<b>1.1. Biología de los ascomicetos</b>	2
1.1.1. <i>Introducción</i>	2
1.1.2. <i>Estructura y morfología</i>	3
1.1.3. <i>Nutrición</i>	4
1.1.4. <i>Reproducción sexual</i>	5
1.1.5. <i>Biogeografía</i>	6
<b>1.2. Clasificación de los ascomicetos. Relaciones filogenéticas con otros taxones del reino Fungi</b>	14
<b>2. LOS ASCOMICETOS DEL SUELO</b>	21
<b>2.1. Introducción</b>	21
<b>2.2. Metodología de estudio</b>	23
<b>2.3. Fenómenos de micostasis y latencia</b>	25
<b>2.4. Estado actual del conocimiento de los ascomicetos del suelo</b>	27
<b>II. OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO</b>	29
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
<b>1. TÉCNICAS DE CAMPO</b>	33
<b>1.1. Origen de las muestras</b>	33
<b>1.2. Muestreo</b>	34

<b>1.3. Conservación de las muestras</b>	34
<b>2. TÉCNICAS DE LABORATORIO</b>	34
<b>2.1. Métodos de aislamiento mediante la activación de ascosporas durmientes presentes en el suelo</b>	34
2.1.1. <i>Modificación de las técnicas de Warcup y Baker</i>	34
2.1.1.1. Activación por calor	35
2.1.1.2. Activación mediante la acción del etanol	35
2.1.2. <i>Modificación del método de Furuya y Naito</i>	35
2.1.3. <i>Técnica de activación por acción de la acetona (dimetilcetona)</i>	36
2.1.4. <i>Técnica de activación por acción del 2-furfuraldehido</i>	36
<b>2.2. Examen de las muestras activadas</b>	36
<b>2.3. Aislamiento y obtención de cultivos puros</b>	37
<b>2.4. Identificación de los ascomicetos aislados en cultivo puro</b>	38
2.4.1. <i>Características culturales</i>	38
2.4.2. <i>Morfología microscópica</i>	39
<b>2.5. Medios de cultivo y medios de montaje empleados</b>	40
2.5.1. <i>Medios de cultivo</i>	40
2.5.2. <i>Medios de montaje para la observación microscópica de los aislamientos</i>	44
<b>2.6. Conservación de las cepas</b>	45
2.6.1. <i>Conservación en tubos con medio de cultivo inclinado ("agar en pico de flauta")</i>	45
2.6.2. <i>Conservación en agua</i>	46
2.6.3. <i>Material destinado a herborización</i>	46

<b>2.7. Preservación de los cultivos vivos</b>	47
<b>2.8. Microscopía óptica</b>	47
<b>2.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)</b>	48
2.9.1. <i>Fijación</i>	48
2.9.2. <i>Deshidratación</i>	48
2.9.3. <i>Secado</i>	50
2.9.4. <i>Montaje y metalización</i>	50
2.9.5. <i>Observación y fotografía de las muestras</i>	50
<b>2.10. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b>	51
2.10.1. <i>Fijación</i>	51
2.10.2. <i>Deshidratación</i>	51
2.10.3. <i>Inclusión</i>	52
2.10.4. <i>Obtención de cortes ultrafinos y tinción</i>	52
2.10.5. <i>Observación y fotografía de las muestras</i>	52
<b>2.11. Biología molecular</b>	53
2.11.1. <i>Obtención del DNA</i>	53
2.11.2. <i>Amplificación rDNA mediante la técnica de PCR</i>	53
2.11.3. <i>Secuenciación y análisis filogénico</i>	54
2.11.4. <i>Archivo de las secuencias nucleotídicas</i>	54
<b>2.12. Estudio estadístico de las técnicas de activación</b>	55
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	56
<b>1. TAXONOMÍA</b>	57

- 1.1. Una nueva especie de *Melanospora* de la India** 58
- 1.1.1. A. M. Stchigel, J. Guarro & M. J. Figueras. 1996. A new species of *Melanospora* from India. *Mycological Research* 101, 446-448
- 1.2. Una nueva especie de *Emericella* del suelo de India** 62
- 1.2.1. A. M. Stchigel & J. Guarro. 1997. A new species of *Emericella* from Indian soil. *Mycologia* 89, 937-941
- 1.3. Una nueva especie de *Ascotricha* del suelo de España** 68
- 1.3.1. A. M. Stchigel & J. Guarro. 1998. A new species of *Ascotricha* from Spanish soil. *Mycological Research* 102, 510-512
- 1.4. Una nueva especie de *Gelasinospora* del suelo de Argentina** 72
- 1.4.1. A. M. Stchigel, J. Cano & J. Guarro. 1998. A new species of *Gelasinospora* from Argentinian soil. *Mycological Research* 102, 1405-1408
- 1.5. Una nueva especie de *Emericella* y una rara variante morfológica de *E. quadrilineata*** 77
- 1.5.1. A. M. Stchigel, J. Cano & J. Guarro. 1999. A new species of *Emericella* and a rare morphological variant of *E. quadrilineata*. *Mycological Research* 103, 1057-1064
- 1.6. Una nueva especie de *Melanospora* de Isla de Pascua (Chile)** 86
- 1.6.1. A. M. Stchigel, J. Cano & J. Guarro. 1999. A new species of *Melanospora* from Easter Island soil. *Mycological Research* 103, 1305-1308

**1.7. Tres nuevas especies termotolerantes de *Corynascus* (Sordariales, Chaetomiaceae) del suelo, con una clave dicotómica de las especies conocidas** 91

1.7.1. A. M. Stchigel, M. Sagués, J. Cano & J. Guarro. 2000. Three new thermotolerant species of *Corynascus* (Sordariales, Chaetomiaceae) from soil, with a key to the known species. *Mycological Research* (en prensa)

**1.8. Ascomicetos del suelo de España. XII. *Ascotricha canariensis* sp. nov.** 101

1.8.1. A. M. Stchigel, J. Guarro, D. García & B. Acosta. Soil ascomycetes from Spain. XII. *Ascotricha canariensis* sp. nov. *Mycologia* (en prensa)

**1.9. Una nueva *Apiosordaria* de Nigeria, con una clave dicotómica de las especies del suelo** 114

1.9.1. A. M. Stchigel, J. Cano, J. Guarro & C. Gugnani. A new *Apiosordaria* from Nigeria, with a key to the soil-borne species. *Mycologia* (en prensa).

**1.10. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., un nuevo ascomiceto de la Antártida** 127

1.10.1. A. M. Stchigel, J. Cano, W. Mac Cormack & J. Guarro. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycological Research* (aceptado)

**1.11. Dos nuevas especies termotolerantes de *Thielavia* del suelo, y estudio molecular de la región ITS1-2 de especies representativas del género** 146

1.11.1. A. M. Stchigel, L. Figuera, J. Cano & J. Guarro. Two new soil-borne thermotolerant species of *Thielavia* and a molecular study (ITS region) of representative species of the genus. *Mycologia* (sometido)

2. ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO TÉCNICAS DE ACTIVACIÓN DE ASCOSPORAS PARA EL AISLAMIENTO DE ASCOMICETOS DEL SUELO	169
3. DISCUSIÓN GENERAL	173
<b>V. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>177</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>180</b>
<b>VII. ANEXO 1</b>	<b>203</b>
<b>VIII. ANEXO 2</b>	<b>211</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**



# 1. DIVISIÓN (PHYLUM) ASCOMYCOTA

## 1.1. BIOLOGÍA DE LOS ASCOMICETOS

### 1.1.1. Introducción

La división (*phylum*) Ascomycota está constituida por más de 30.000 géneros y 250 familias, agrupados en casi 50 órdenes (Hawksworth *et al.*, 1995). Es un grupo monofilético (con un ancestro común) (Sugiyama, 1998) y representa, aproximadamente, el 75 % de todos los hongos descritos hasta el presente (Hawksworth *et al.*, 1995). Como característica común presentan la formación de ascos, dentro de los cuales se lleva a cabo la fusión nuclear y posterior meiosis, seguido de un proceso mitótico que genera un número par de núcleos que, eventualmente, formarán parte de las ascosporas (o meiosporas). Las ascosporas se forman dentro del asco mediante la envoltura de dichos núcleos dentro de un sistema de membranas, las cuales también engloban parte del citoplasma circundante. Dichas membranas derivan, aparentemente, de la membrana plasmática del asco en todos los miembros de la división Ascomycota, excepto en los Pneumocystidales, Protomycetales, Saccharomycetales, Schizosaccharomycetales y Taphrinales, en los cuales se forman a partir de la membrana nuclear (Raju, 1992; Wu y Kimbrough, 1992). Los ascos maduros (unitunicados o bitunicados, según posean una o más capas formando parte de su pared) se rompen y liberan las ascosporas, o disponen de mecanismos activos para su dispersión. Estas últimas son haploides, es decir, poseen un solo juego ( $n$ ) de cromosomas, y están rodeadas por una gruesa pared multilaminar que las hace resistentes a condiciones medioambientales adversas. Las ascosporas son capaces de germinar en condiciones apropiadas para formar un nuevo

individuo haploide.

### 1.1.2. Estructura y morfología

La estructura básica de los ascomicetos, al igual que el resto de los miembros del reino, es una típica célula eucariota rodeada de una gruesa pared celular. Pueden estar constituidos por una célula (talo levaduriforme) o formar parte de largos filamentos tubulares denominados hifas (talo miceliar), los cuales están divididos en segmentos mediante septos (o tabiques) transversales. Los núcleos y el citoplasma pueden desplazarse de un compartimento a otro de la hifa a través de los poros presentes en dichos septos. Tanto las formas unicelulares como las miceliarias (o filamentosas) tienen paredes celulares constituidas por quitina y  $\beta$ -glucanos. Las levaduras se multiplican asexualmente por gemación o fisión, generando copias más o menos similares a la célula madre, formando ocasionalmente cadenas de células denominadas pseudohifas. Las hifas, en cambio, crecen por elongación apical y emisión de ramas laterales. La mayoría de los ascomicetos levaduriformes y miceliarios son haploides, aunque ocasionalmente pueden ser diploides (dos juegos de cromosomas;  $2n$ ). Los ascomicetos, como fue mencionado anteriormente, se reproducen sexualmente mediante la producción de ascosporas, y asexualmente mediante la producción de conidios (o mitosporas). Los conidios, a diferencia de las ascosporas, contienen uno o más núcleos de origen mitótico, y su pared celular procede de la pared de la hifa o de la célula madre ligeramente modificada. Los conidios pueden originar un nuevo individuo, o bien actuar como gametos. Los individuos pueden ser heterotálicos, es decir, que necesitan de otro individuo compatible para poder reproducirse sexualmente, u homotálicos, es decir, que poseen ambas polaridades sexuales en el mismo individuo (Alexopoulos *et al.*, 1996). Algunas de las principales características morfológicas y estructurales de este grupo de hongos se muestran en la Figura 1a.

### 1.1.3. Nutrición

Al igual que los otros miembros del reino Fungi, los individuos de la división Ascomycota son heterótrofos y obtienen los nutrientes esenciales a partir de otros organismos vivos (parásitos o biótrofos) o muertos (saprófitos) (Carroll y Wicklow, 1992; Griffin, 1994). Como saprófitos (o saprobios) juegan un papel muy importante en el reciclaje de material vegetal en descomposición. Como biótrofos, son capaces de formar simbiosis mutualistas con algas (dando lugar a la formación de líquenes), con raíces (micorrizas) o con hojas y/o tallos de plantas (endofitos o endobiontes). Otras asociaciones mutualistas se evidencian con artrópodos, tales como las termitas y hormigas. Alrededor de unas 18.000 especies de ascomicetos son capaces de establecer algún tipo de asociación mutualista (Kendrick, 1998). En cuanto a su actividad parasitaria, los ascomicetos son los agentes etiológicos más importantes en infecciones fúngicas humanas y de los animales. Podemos citar, entre muchos otros, a *Pneumocystis carinii* P. Delanoë & Delanoë, responsable de infecciones pulmonares en pacientes humanos inmunocomprometidos (Nuesch *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 1999; Wilkin y Feinberg, 1999), *Ajellomyces capsulatus* (Kwon-Chung) McGinnis y *A. dermatitidis* McDonough & Lewis, agentes etiológicos de la histoplasmosis y la blastomicosis, respectivamente (Hoog y Guarro, 1995), *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A. A. Padhye & Ajello, hongo oportunista responsable de micosis diseminadas o de micetomas de granos blancos (Hoog *et al.*, 1994) y *Aspergillus fumigatus* Fres., el principal causante de aspergilosis pulmonar (Hoog y Guarro, 1995). En el caso de los patógenos vegetales podemos destacar a *Taphrina deformans* (Berk.) Tul, responsable del “torque” del melocotón y la nectarina, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst., que genera cáncer en árboles destinados a la explotación maderera, *Microsphaera alni* (Wall.) Salm., un “mildiu pulverulento” que afecta un amplio rango de especies, y *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannfeldt, productor de la

enfermedad del olmo alemán (Agrios, 1988; Brown y Brotzman, 1979), tan solo por mencionar algunos de los taxones más frecuentes.

#### 1.1.4. *Reproducción sexual*

La regulación genética de la expresión sexual y el proceso de cruzamiento de las cepas de diferentes orígenes han sido estudiados en detalle en algunos miembros de la división Ascomycota. En las especies miceliares, a la fusión citoplasmática (plasmogamia), que puede no estar seguida inmediatamente de la fusión nuclear (cariogamia), le sucede una corta etapa denominada dicariofase o fase dicariótica (coexistencia de dos núcleos genéticamente diferentes y sexualmente compatibles en el mismo segmento de la hifa). La hifa dicariótica suele estar protegida dentro un cuerpo fructífero (ascoma), el cual se forma a partir del crecimiento y diferenciación de las hifas vegetativas haploides. El ascoma puede ser de tipo cleistotecial, peritecial o apotecial, pudiendo presentar otras formas menos frecuentes (Figura 1b). En el interior del ascoma se hallan los ascos, estructuras con forma de saco dentro de los cuales se forman las ascosporas. Los ascos se clasifican en base al número de estratos o capas que forman su pared, distinguiéndose tres tipos principales: ascos protunicados, unitunicados y bitunicados (Figura 1c). Algunos ascos presentan diferenciaciones apicales que les permiten liberar las ascosporas al medio. Otros, en cambio, no poseen dichas estructuras, por lo que las ascosporas quedan libres por lisis de la pared del mismo. Las ascosporas son células que poseen una gruesa pared formada por tres capas principales: una externa (el perisporio), una intermedia (el episporio, que es la pared verdadera) y una interna (el endosporio, que puede estar ausente). Las ascosporas pueden ser uni o pluricelulares, pigmentadas o hialinas, y tener (o no) poros o surcos germinativos y otras estructuras accesorias tales como cápsula y/o apéndices mucilaginosos (Figura 1d). Dependiendo de la

naturaleza de los taxones, los ascomas periteciales pueden presentar diferentes tipos de hifas vegetativas estériles (las paráfisis, las pseudoparáfisis, y las perifisis) en su interior. Las ascosporas son liberadas por ruptura del ascoma o a partir de aperturas preformadas en la parte apical del mismo, y, bajo ciertas condiciones ambientales, pueden germinar dando origen a un nuevo individuo haploide.

#### 1.1.5. Biogeografía

Muchos géneros y especies de la división Ascomycota, tales como *Chaetomium globosum* Kunze, *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill., *Neosartorya fischerii* (Wehmer) Malloch & Cain o *Talaromyces flavus* (Klöcker) Stolk & Samson, han sido reportados como cosmopolitas, y están presentes en los principales trabajos monográficos sobre los hongos del suelo (Domsch y Gams, 1972; Domsch *et al.*, 1980; Moubasher, 1993; Watanabe, 1994). Sin embargo, muchas especies han sido aisladas de una localización geográfica mucho más restringida. Tal es el caso de taxones como *Apiosordaria microcarpa* Udagawa & Muroi (Japón), *Canariomyces thermophila* Guarro & Samson (Camerún) y *Melanospora singaporensis* Morinaga, Minoura & Udagawa (Singapur) (Arx *et al.*, 1988; Morinaga *et al.*, 1978; Udagawa y Muroi, 1981), entre otros muchos.

La falta de conocimientos acerca de la biología, ecología y taxonomía de los ascomicetos de áreas tropicales es crítica, debiéndose en gran medida a la falta de una infraestructura apropiada, lo que condiciona la presencia y permanencia de micólogos especializados en dichas zonas (Hyde y Hawksworth, 1997).

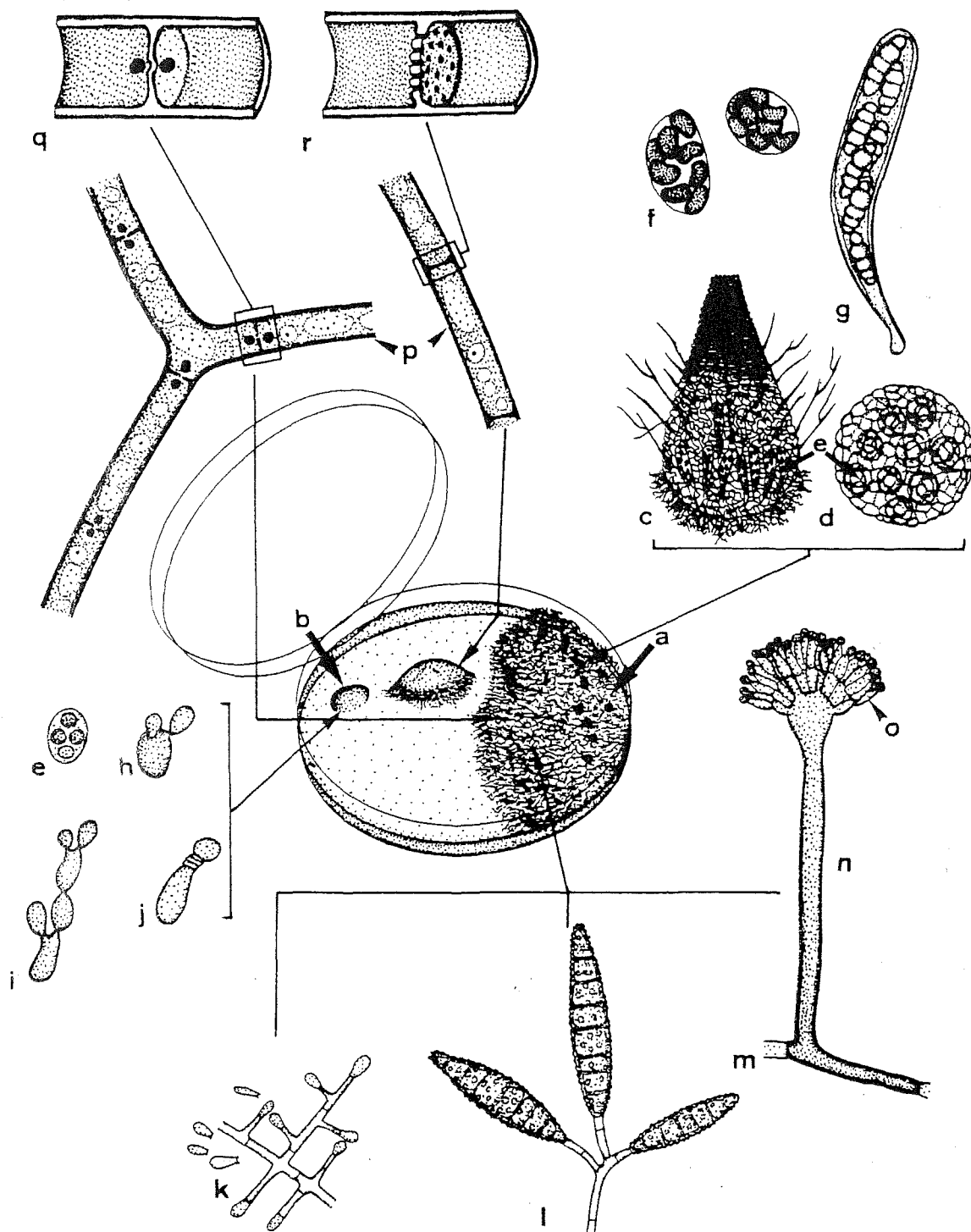


Figura 1a. Características generales de los ascomicetos. a, colonia miceliar. b, colonia levaduriforme. c, peritecio. d, cleistotecio. e, asco. f, ascos unitunicados. g, asco bitunicado. h-m, anamorfos. n, conidióforo. o, célula conidiógena. p, hifa. q, detalle de un septo uniporado. r, detalle de un septo multiporado (Guarro *et al.*, 1999).

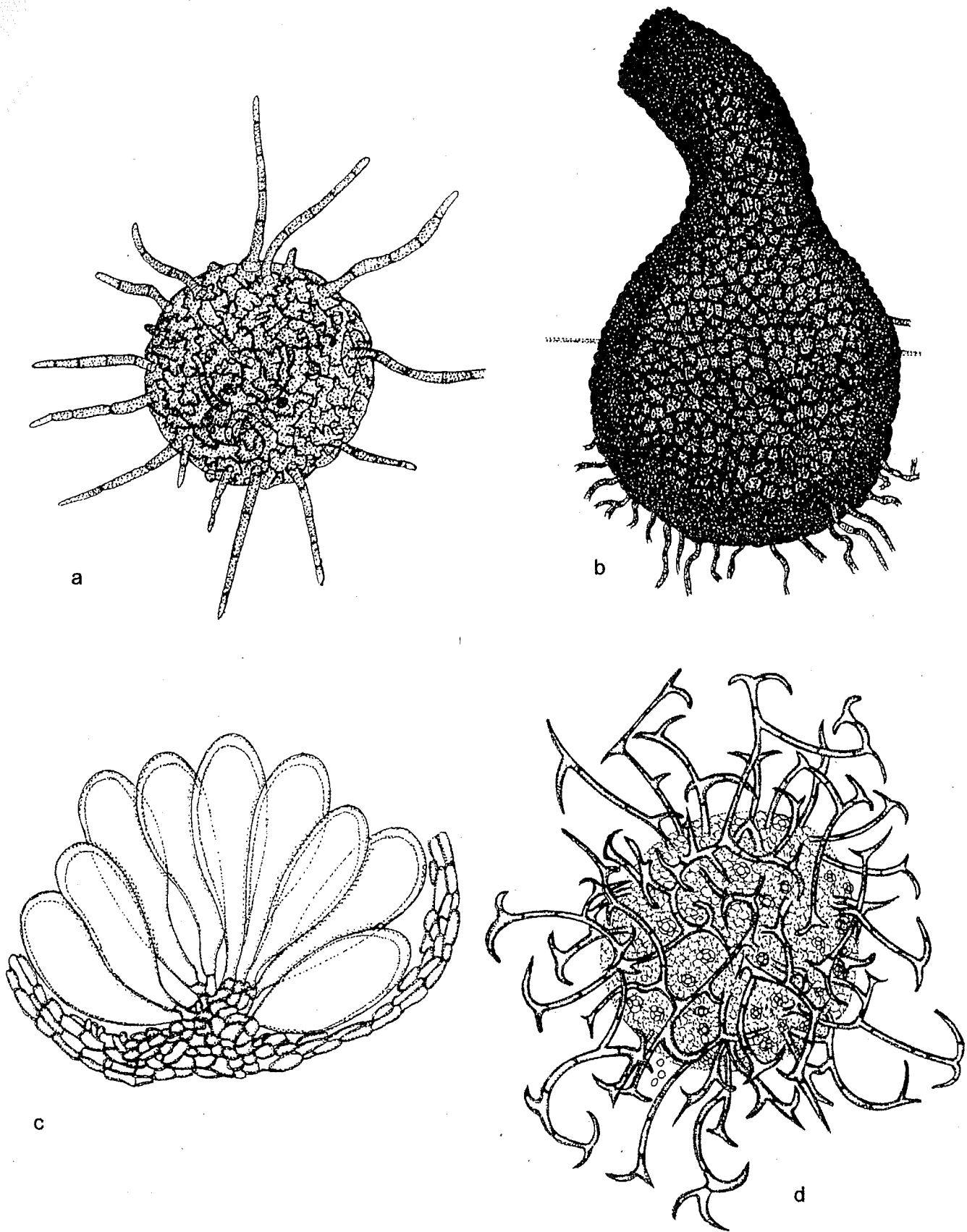


Figura 1b. Tipos de ascomas. a, cleistotecial (*Corynascella* sp.). b, peritecial (*Neurospora* sp.). c, apotecial (*Thelebolus* sp.). d, gimnotecial (*Gymnoascus* sp.).

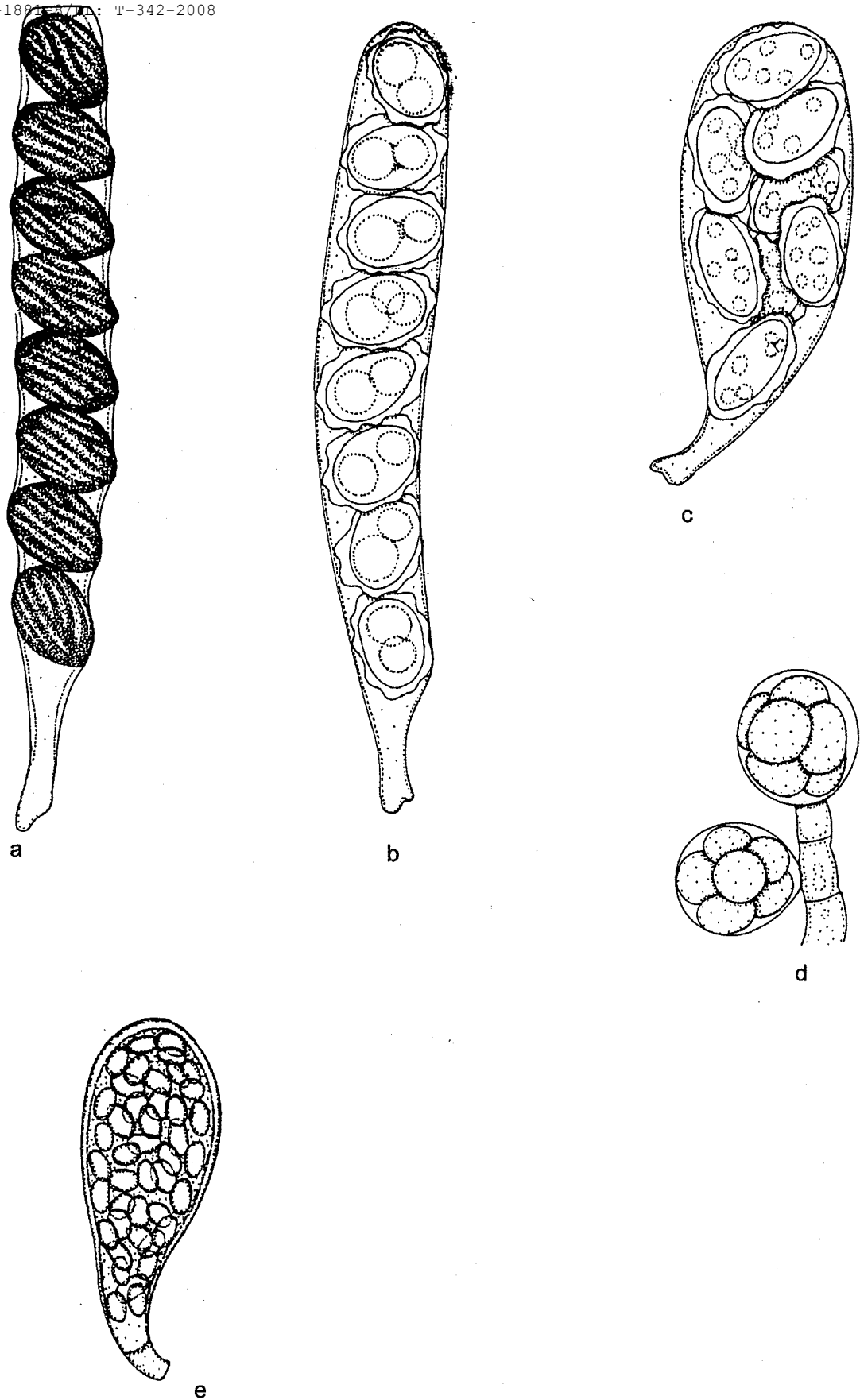


Figura 1c. Ascus. a-b, ascos unitunicados cilíndricos (*Neurospora* sp. y *Neocosmospora* sp.). c, ascos unitunicados claviformes (*Neocosmospora* sp.). d, ascos prototunicados esféricos (*Gymnascella* sp.). e, ascos bitunicados (*Preussia* sp.).



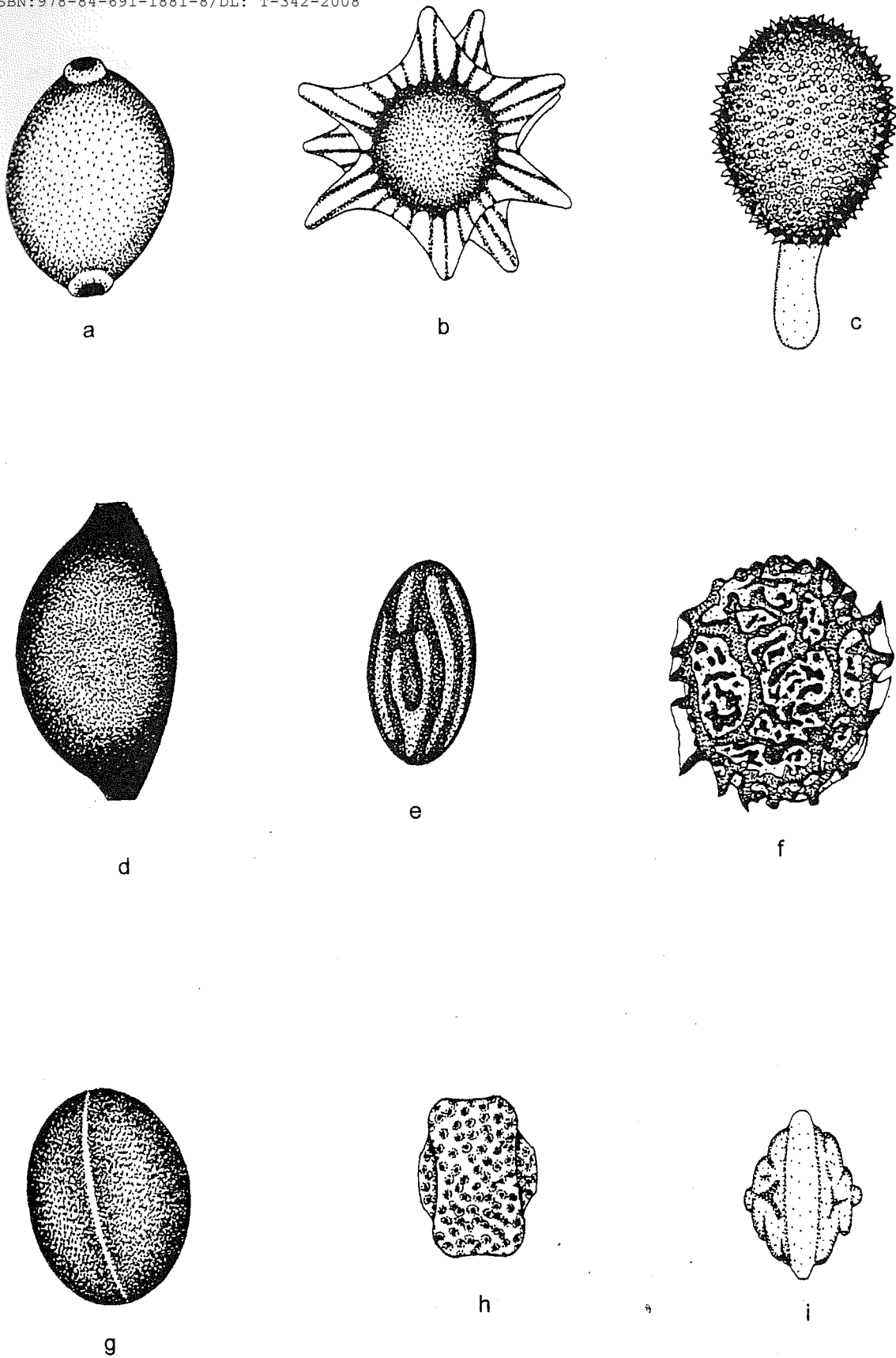


Figura 1d. Ascosporas. a, *Corynascella* sp. b, *Emericella* sp. c, *Apiosordaria* sp. d, *Melanospora* sp. e, *Neurospora* sp. f, *Ascodesmis* sp. g, *Coniochaeta* sp. h, *Amauroascus* sp. i, *Gymnoascus* sp.

Tabla 1. Sistemas más importantes de clasificación de los hongos, propuestos a lo largo de los últimos cincuenta años.

Reino FUNGI	Reino FUNGI	Reino PLANTAE	Reino FUNGI
MYCETOZOA	SYNASCOMYCETES Protomycetales	MYCOTA	MYXOMYCOTA
PHYCOMYCETIDAE	HEMIASCOMYCETES	MYXOMICOTINA	EUMYCOTA
CARPOMYCETIDAE	Dipodascales Endomycetales	EUMYCOTINA	MASTIGOMYCOTINA
BASIDIOMYCETIDAE	Taphrinales	PLASMIDIOPHOROMYCETES	ZYGOMYCOTINA
ASCOMYCETEAEE "Pyrenomycetes"	EUASCOMYCETES	CHYTRIDIOMYCETES	BASIDIOMYCOTINA
HONGOS IMPERFECTOS	Bitunicatae	HYPHOCHYTRIDIOMYCETES	ASCOMYCOTINA
Moniliales	Myriangiales	OOMYCETES	HEMIASCOMYCETES
Sphaeropsidales	Dothideales	ZYGOMYCETES	PECTOMYCETES
Melanconiales	Pseudosphaeriales	TRICHOMYCETES	DISCOMYCETES
	Hysteriales	BASIDIOMYCETES	PYRENOMYCETES
	Trichothyriales	ASCOMYCETES	LOCULOASCOMYCETES
	Unitunicatae	Hemiascomycetidae	LABOULBENIOMYCETES
	Plectomycetes	Euascomycetidae	
	Aspergillales	Plectomycetes	
	Microascales	Pyrenomecetes	
	Onygenales	Discomycetes	
	Pyrenomycetes	Laboulbeniomyces	
	Xylariales	Loculoascomycetidae	
	Hypocreales	DEUTEROMYCETES	
	Diaporthales		
	Erysiphales		
	Coronophorales		
	Coryneliales		
	Laboulbeniomyces		
	Laboulbeniales		
	Discomycetes		
	Pezizales		
	Tuberales		
	Cyttariales		
	Ostropales		
	Helotiales		
	Lecanorales		
	Caliciales		

<u>Wainwright et al. (1993)</u>	<u>Reino FUNGI</u>	<u>Reino MYCOTA</u>	<u>Reino MYCETEAE</u>	<u>Reino EUMYCETEAE</u>
	<b>Reino FUNGI</b>	<b>Reino MYCOTA</b>	<b>Reino MYCETEAE</b>	<b>Reino EUMYCETEAE</b>
	<u>EUMYCOTA</u>	<u>MYXOMYCOTA</u>	<u>GYMNOMYCOTA</u>	<u>CHYTRIDIOMYCOTA</u> CHYTRIDIOMYCETES
	<u>ASCOMYCOTINA</u>	<u>OOMYCOTA</u>	<u>MATIGOMYCOTA</u>	<u>ZYGOMYCOTA</u> ZYGOMYCETES
	<u>HEMIASCOMYCETES</u>	<u>CHYTRIDIOMYCOTA</u>	<u>AMASTIGOMYCOTA</u>	<u>MONOCARYOMYCOTERA</u> <u>ENDOMYCOTA</u> ENDOMYCETES
	Endomycetales	<u>EUMYCOTA</u>	ASCOMYCOTINA	
	Protomycetales	ASCOMYCETES	ASCOMYCETES	
	Taphrinales		Hemiascomycetidae	
	<u>PLECTOMYCETES</u>	<u>DEUTEROMYCETES</u>	Plectomycetidae	<u>DICARYIOMYCOPTERA</u>
	Eurotiales		Hymenomycetidae	
	<u>PYRENOMYCETES</u>		Laboulbeniomycetidae	<u>USTOMYCOTA</u> USTOMYCETES
	Erysiphales		Loculoascomycetidae	
	Meliolales			<u>BASIDIOMYCOTA</u> BASIDIOMYCETES
	Coronophorales		<u>DEUTEROMYCOTINA</u>	
	Sphaeriales		<u>DEUTEROMYCETES</u>	
	<u>DISCOMYCETES</u>		Blastomycetidae	
	Mediolariales		Coelomycetidae	<u>TAPHRINOMYCOTA</u> TAPHRINOMYCETES
	Cyttariales		Hyphomycetidae	
	Tuberales			<u>ASCOMYCOTA</u> ASCOPHAEROMYCETES LABOULBENIOMYCETES ASCOMYCETES Parenchymatomycetidae Erysiphales Diaporthales Sordariales Microascales Eurotiales Coryneliales Coronophorales Calosphaeriales
	Pezizales			
	Phacidiales			
	Ostrapales			
	Helotiales			
	<u>LABOULBENIOMYCETES</u>			Elaphomycetidae Hypodermatales Xylariales Meliolales Onygenales Medeolariales Cyttariales Clavicipitales Pezizales Helotiales Phacidiales Phyllachorales Hypocreales Trichosphaeriales Ostropales Lecanorales Caliciales
	Laboulbeniales			
	<u>LOCULOASCOMYCETES</u>			<u>LOCULOASCOMYCETES</u> Loculoparenchymatomycetidae Myrangiiales Asterinales Dothideales Loculoedaphomycetidae Pleosporales Melanommatales Chaetthyriales Verrucariales
	Myrangiiales			
	Dothideales			
	Pleosporales			
	Hysteriales			
	Hemisphaeriales			

**Tabla 1 (continuación)**

<i>Dictionary of the Fungi</i> (1974)	<i>Names of the Fungi</i> (1963)	<i>Fungal &amp; Plant Kingdom</i> (1970) <i>Dictionary of the Fungi</i> (1984)	<i>Fungal &amp; Plant Kingdom</i> (1970)
Reino FUNGI	Reino FUNGI	Reino FUNGI	Reino FUNGI
<u>EUMYCOTA</u>	<u>MYXOMYCOTA</u>	<u>CHYTRIDIOMYCOTA</u>	<u>CHYTRIDIOMYCOTA</u>
ASCOMYCOTINA	<u>EUMYCOTA</u>	<u>ZYGOMYCOTA</u>	<u>ZYGOMYCOTA</u>
HEMIASCOMYCETES	MASTIGOMYCOTINA	<u>BASIDIOMYCOTA</u>	<u>BASIDIOMYCOTA</u>
PLECTOMYCETES	ZYGOMYCOTINA	<u>ASCOMYCOTA</u>	<u>ASCOMYCOTA</u>
PYRENOAMYCETES	BASIDIOMYCOTINA	Arthoniales	Arthoniales
DISCOMYCETES	ASCOMYCOTINA	Caliciales	Calosphaeriales
LABOULBENIOMYCETES	DEUTEROMYCOTINA	Calosphaeriales	Corneliales
LOCULOASCOMYCETES	COELOMYCETES	Corneliales	Cyrtariales
DEUTEROMYCOTINA	HYPHOMYCETES	Cyrtariales	Diaporthales
BLASTOMYCETES		Diaporthales	Diatrypales
COELOMYCETES		Diatrypales	Dothideales
HYPHOMYCETES		Dothideales	Erysiphales
		Elaphoromycetales	Eurotiales
		Erysiphales	Gyalectales
		Eurotiales	Halosphaeriales
		Gyalectales	Hypocreales
		Halosphaeriales	Laboulbeniales
		Hypocreales	Lahmiales
		Laboulbeniales	Lecanorales
		Lahmiales	Leotiales
		Lecanorales	Lichinales
		Leotiales	Medeolariales
		Lichinales	Meliolales
		Medeolariales	Microascales
		Meliolales	Nelectales
		Microascales	Onygenales
		Nelectales Onygenales	Ophiostomatales
		Ophiostomatales	Ostropales
		Ostropales	Patellariales
		Patellariales Peltigerales	Peltigerales
		Pertusariales	Pertusariales
		Pezizales	Pezizales
		Phyllachoriales Pneumocystidales	Phyllachoriales
		Protomycetales	Pneumocystidales
		Pyrenulales	Protomycetales
		Rhystimatales	Pyrenulales
		Saccaromycetales	Rhystimatales
		Schizosaccharomyce- tales	Saccaromycetales
		Sordariales	Schizosaccharomycetales
		Spathulosporales	Sordariales
		Taphrinales	Spathulosporales
		Teloschistales	Taphrinales
		Triblidiales	Teloschistales
		Trichosphaeriales	Triblidiales
		Trichothelialles	Trichosphaeriales
		Verrucariales	Trichothelialles
		Xylariales	Verrucariales
			Xylariales

## 1.2. Clasificación de los ascomicetos. Relaciones filogenéticas con otros taxones del reino

### Fungi

En la Tabla 1 se muestran los más importantes sistemas de clasificación que se han propuesto en los últimos cincuenta años. Éstos se han basado, generalmente, en determinadas características morfológicas de la reproducción sexual y asexual. La estructura relativamente sencilla de los hongos y su gran diversidad, así como la escasez de fósiles han dificultado el conocimiento de su filogenia y evolución (Bruns *et al.*, 1991). Por lo tanto, los sistemas taxonómicos tradicionales han resultado ser poco objetivos y artificiales. En 1987, Cavalier-Smith propuso una teoría novedosa, ofreciendo un marco para un sistema taxonómico y evolutivo para el reino Fungi basado en la naturaleza química de la pared celular, las rutas metabólicas de síntesis de la lisina, el tipo de células móviles, la ultraestructura celular y la divergencia de la secuencia de nucleótidos del gen 5S del ARN ribosomal (5S rRNA). Este autor incluyó dentro del reino solamente a las clases Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes. También indicó que los hongos y los animales (reino Animalia) tuvieron un ancestro común (un protozoo coanoflagelado -coanociliado-). Por último, concluyó que el reino Fungi era monofilético y que los Entomophthorales procedían de un ancestro quitridiomyceto por pérdida del cilio (flagelo). La aparición de la teoría neutral de la evolución molecular de Kimura (Kimura, 1968, 1980, 1983) produjo un gran impacto en los estudios de filogenia y evolución. Durante la década del 80 y principios de 1990, el desarrollo de las técnicas de biología molecular (clonación de genes, secuenciación de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa), la proliferación de ordenadores de elevadas prestaciones y el progreso de los programas de análisis evolutivo basados en la biología molecular, revolucionaron los estudios sobre filogenia y evolución molecular de diversos organismos, incluyendo a los hongos (Bruns *et al.*, 1991; Hibbett, 1992; Kohn, 1992;

Kurtzman, 1992; Reynolds y Taylor, 1993; Sugiyama, 1994; Sugiyama y Nishida, 1995; Sugiyama *et al.*, 1996). La comparación entre las secuencias de DNA ribosomal (rDNA) y RNA ribosomal (rRNA) resultaron ser de gran utilidad para establecer relaciones evolutivas entre procariontes y eucariontes. El estudio de las secuencias del 5S rRNA produjo un importante incremento en el conocimiento acerca de la evolución y filogenia de los hongos (Blanz y Unseld, 1987; Hori y Osawa, 1987; Walker y Doolittle, 1982). Entre la segunda mitad y finales de la década del 80, los estudios de filogenia molecular se centraron en las subunidades pequeña (18S rRNA) y grande (23 a 28S rRNA) del rRNA. El análisis filogenético a partir de las secuencias del gen 18S rRNA ha proporcionado resultados concluyentes a nivel de los rangos jerárquicos más elevados, tales como reino, división y clase (Berbee y Taylor, 1992 a, b, 1993; Bowman *et al.*, 1992; Bruns *et al.*, 1991, 1992; Nagahama *et al.*, 1995; Nishida y Sugiyama, 1993, 1994 b; Nishida *et al.*, 1995; Suh y Sugiyama, 1993, 1994; Sugiyama, 1998; Swann y Taylor, 1993). Según estos trabajos, el reino Fungi constituye un grupo monofilético, que estaría formado por las divisiones Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Figura 2). Los diferentes árboles filogenéticos obtenidos a partir del análisis de las secuencias del gen 18S rRNA muestran la existencia de dos grupos dentro de los Dikaryomycota, correspondientes a las divisiones Ascomycota y Basidiomycota. Ambas divisiones son monofiléticas y tienen un buen soporte estadístico, pero su origen evolutivo es ambiguo y discutible (Berbee y Taylor, 1993; Bruns *et al.*, 1992; Gargas *et al.*, 1995; Nishida y Sugiyama, 1993, 1994 b; Nishida *et al.*, 1995). Estos estudios también muestran que la división Ascomycota está constituida por tres linajes principales (Figuras 3 y 4.). Los miembros pertenecientes a la divergencia más temprana han sido clasificados como Archaeascomycetes (Berbee y Taylor, 1993; Nishida y Sugiyama, 1994 a; Sugiyama *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1994) y, posteriormente, reclasificados como Taphrinomycotina (Eriksson y Winka, 1997). Los Saccharomycotina y

los Euascomycetes, ambos clasificados como Pezizomycotina por Eriksson y Winka (1997), son dos linajes monofiléticos que poseen un buen soporte estadístico (Gargas *et al.*, 1995; Sugiyama, 1998). La subdivisión Saccharomycotina, comprende la mayor parte de las levaduras. Aproximadamente, el 90 % de los Ascomycota descritos pertenecen a la clase Euascomycetes. La mayor parte de los estudios recientes relacionados con la filogenia molecular están dirigidos hacia este grupo de hongos (ej., Berbee y Taylor, 1992 a, b; Eriksson y Winka, 1997; Spathafora y Blackwell, 1993; Spathafora *et al.*, 1995). En la Tabla 2 se incluye una versión resumida del sistema taxonómico más reciente para la división Ascomycota propuesta por Eriksson (1999), y basada en el estudio de las secuencias del gen 18S rRNA.

Tabla 2. Clasificación de la división Ascomycota (Eriksson, 1999).

### **División (Phylum) ASCOMYCOTA**

#### **- Subphylum Taphrinomycotina O.E. Erikss. & Winka**

- Clase Neolectomycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Orden Neolectales Landvik, O.E. Erikss., Gargas & P. Gustafsson
- Clase Pneumocystidomycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Orden Pneumocystidales O.E. Erikss.
- Clase Schizosaccharomycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Orden Schizosaccharomycetales O.E. Erikss., Svedskog & Landvik
- Clase Taphrinomycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Orden Protomycetales Luttr. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
  - Orden Taphrinales Gäum. & C.W. Dodge

#### **- Subphylum Saccharomycotina O.E. Erikss. & Winka**

- Orden Saccharomycetales Kudrjanzev

#### **- Subphylum Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka**

- Superclase Pezizomyceta O.E. Erikss. & Winka
  - Clase Pezizomycetes O.E. Erikss. & Winka
    - Orden Pezizales C. Bessey
  - Superclase Leotiomyceta O.E. Erikss. & Winka
    - Clase Arthoniomycetes O.E. Erikss. & Winka
      - Orden Arthoniales Henssen ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
    - Clase Chaetothyriomycetes O.E. Erikss. & Winka
      - Orden Chaetothyriales M.E. Barr
        - 1. Chaetothyriaceae Hansf.
        - 2. Herpotrichiellaceae Munk
    - Clase Dothideomycetes O.E. Erikss. & Winka
      - Orden Dothideales Lindau
    - Clase Eurotiomycetes O.E. Erikss. & Winka

- Orden Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr.
- Orden Onygenales Cif. ex Benny & Kimbr.
- Clase Lecanoromycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Orden Lecanorales Nannf.
    - Suborden Agryrineae
    - Suborden Lecanorineae
    - Suborden Peltigerineae
- Clase Leotiomycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Orden Cyttariales Luttr. ex Gamundi
  - Orden Erysiphales Gwynne-Vaughan
  - Orden Leotiales Carpenter
  - Orden Rhytismatales M.E. Barr ex Minter
- Clase Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka
  - Subclase Hypocreomycetidae O.E. Erikss. & Winka
    - Orden Halosphaeriales Kohlm.
    - Orden Hypocreales Lindau
    - Orden Microascales Luttr. ex Benny & Kimbr.
  - Subclase Sordariomycetidae O.E. Erikss. & Winka
    - Orden Diaporthales Nannf.
    - Orden Ophiostomatales Benny & Kimbr.
    - Orden Sordariales Chad. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
  - Subclase Xylariomycetidae O.E. Erikss. & Winka
    - Orden Xylariales Nannf.

Ordenes de posición taxonómica incierta:

- Orden Calosphaeriales M.E. Barr
- Orden Meliolales Gäum. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
- Orden Phyllachorales M.E. Barr
- Orden Trichosphaeriales M.E. Barr
- Orden Coryneliales Seaver & Chardon
- Orden Gyalectales Henssen ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
- Orden Laboulbeniales Engler
- Orden Lahmiales O.E. Erikss.
- Orden Lichinales Henssen & Büdel
- Orden Medeolariales Korf
- Orden Ostropales Nannf.
- Orden Patellariales D. Hawksw. & O.E. Erikss.
- Orden Pertusariales M. Choisy ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
- Orden Pyrenulales Fink ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.
- Orden Spathulosporales Kohlm.
- Orden Teloschistales D. Hawksw. & O.E. Erikss.
- Orden Triblidiales O.E. Erikss.
- Orden Trichotheliales Hafellner & Kalb.
- Orden Verrucariales Mattick ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.

NOTA ACLARATORIA: Debido a que hasta el presente coexisten varios sistemas taxonómicos y, por lo tanto, varios tipos de nomenclatura, consideramos equivalentes los términos Ascomycota (división) así como su adaptación al idioma castellano, ascomicetos o ascomicetes, siendo empleados indistintamente en el texto de la presente tesis.



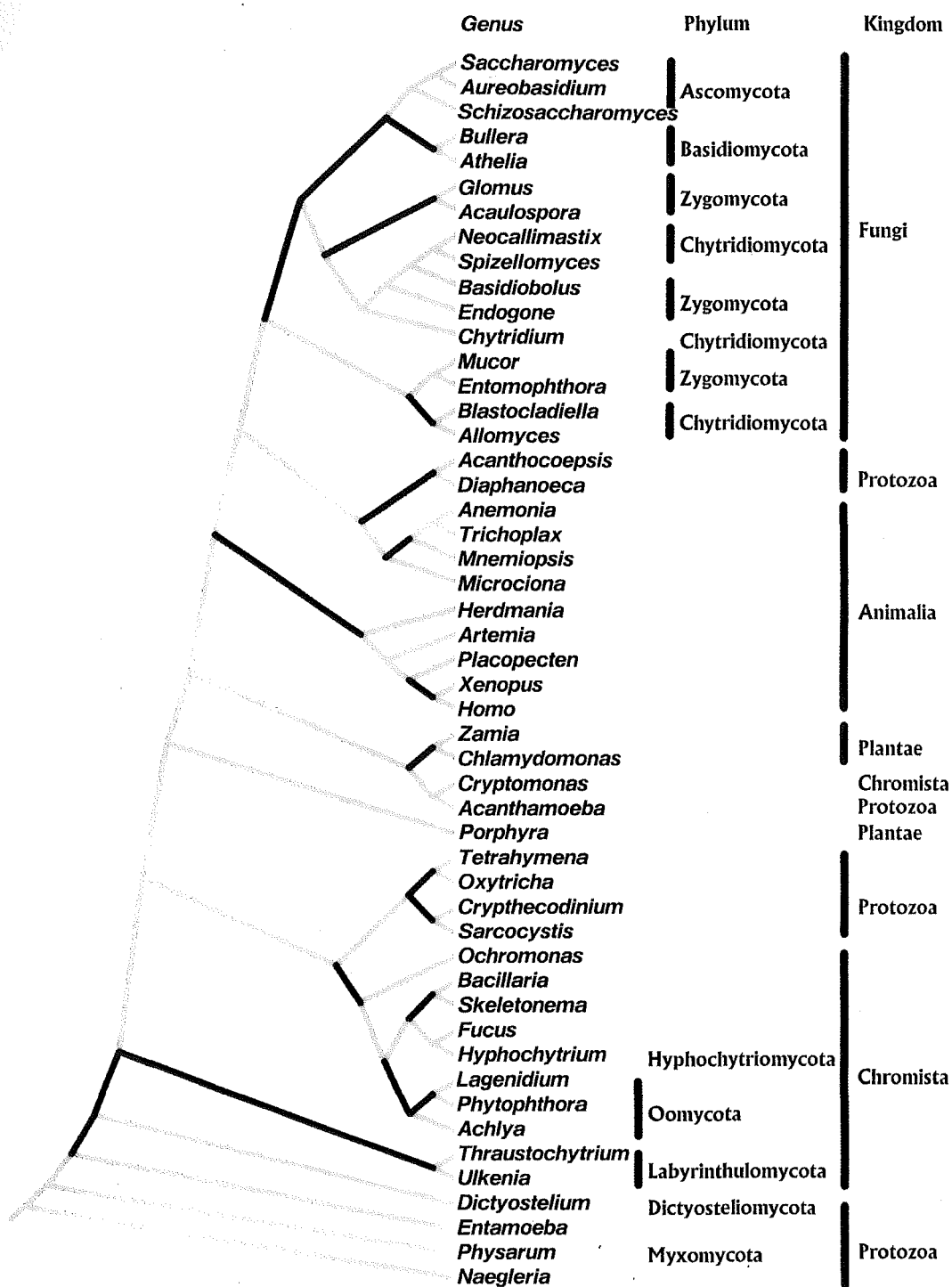


Figura 2. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia parcial de gen 18S rRNA. Las líneas más oscuras indican un soporte estadístico del 95 % o superior (Nagahama, 1995; Sugiyama, 1998).

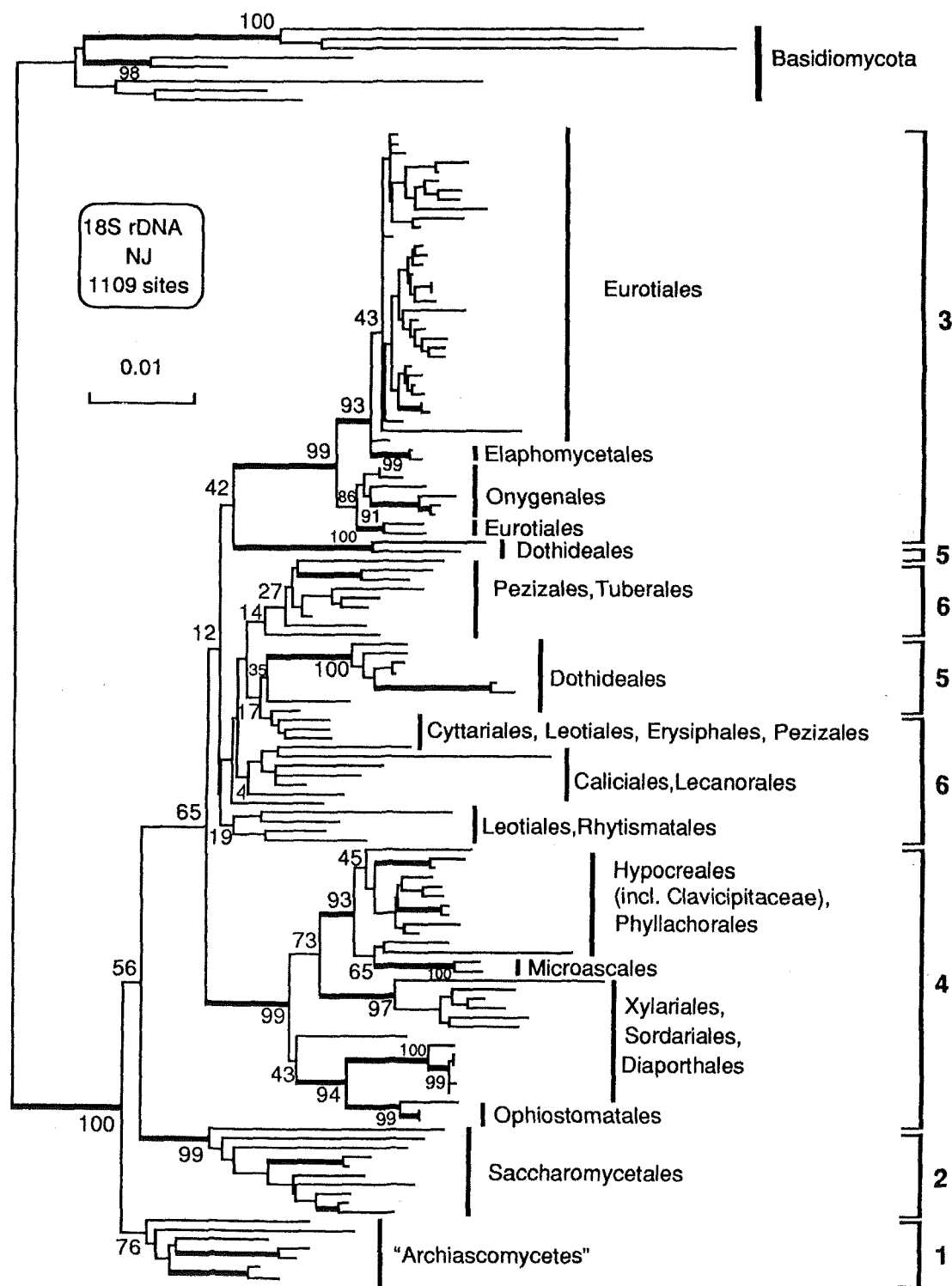


Figura 3. Árbol filogenético obtenido mediante método *neighbour-joining* basado en la secuencia parcial del gen 18S rRNA (Sugiyama, 1998).

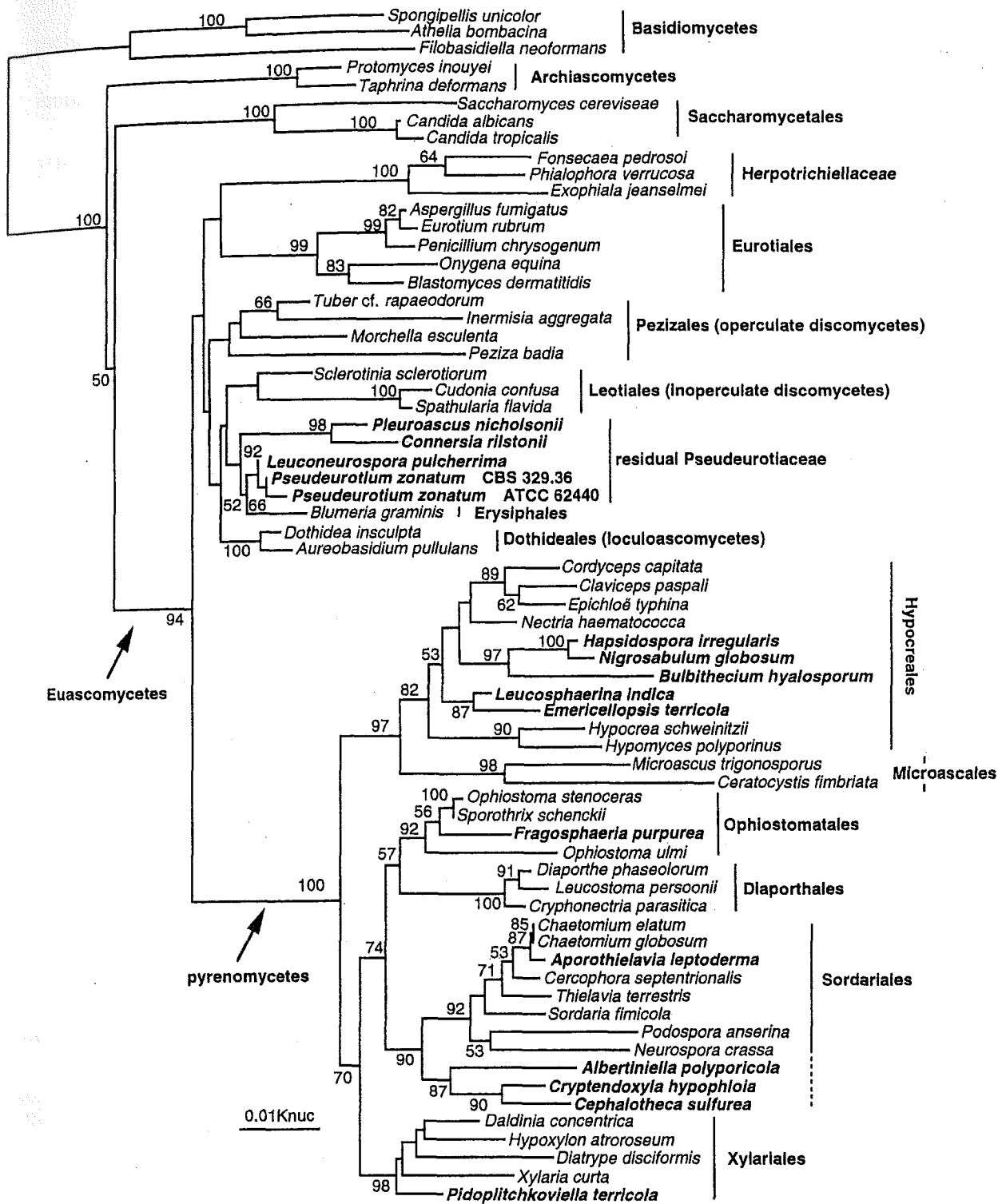


Figura 4. Árbol filogenético obtenido aplicando el método *neighbour-joining*, basado en la secuencia parcial del gen 18S rRNA (Suh y Blackwell, 1999).

## 2. LOS ASCOMICETOS DEL SUELO

### 2.1. Introducción

En el suelo subsisten numerosos organismos tales como bacterias, hongos, algas, protozoos, helmintos y artrópodos, formando poblaciones que se encuentran en equilibrio ecológico. Muchos de ellos son los encargados de degradar plantas y restos de animales muertos, así como otras formas de materia orgánica, en moléculas menos complejas, contribuyendo a la formación del humus y manteniendo la fertilidad del suelo (Garret, 1981). Los hongos crecen en los espacios presentes entre las partículas que constituyen el suelo, de tal manera que la materia orgánica y/o las raíces proveen un sustrato apropiado para el desarrollo de los mismos. Los productos derivados de la degradación enzimática están fácilmente disponibles, generando la competencia entre las especies presentes en este nicho ecológico. Muchos hongos producen sustancias con actividad antibiótica que, muy probablemente, les ayudan a competir más eficazmente con otros organismos por los recursos nutricionales disponibles.

Los ascomicetos son frecuentes sobre las partículas del suelo. Estos atacan sustratos insolubles que han persistido después de que los nutrientes solubles han sido removidos por los "colonizadores tempranos", tales como bacterias, hongos mitospóricos, levaduras y, si el sustrato es muy rico, Mucorales (Carlile y Watkinson, 1994). Los ascomicetos del suelo y sus anamorfos toleran mejor los choques térmicos, la desecación y la radiación ultravioleta que otros grupos de hongos. Conidios, ascosporas y ascomas poseen sustancias melánicas en sus paredes, que les protegen de la radiación ultravioleta. Muchos toleran cortas exposiciones a altas temperaturas (probablemente debido a la composición química y la estructura de las paredes fúngicas), o

incluso son termotolerantes o termofílicos. El calentamiento ocasional de su hábitat es un fenómeno natural en muchos suelos, tal como ocurre durante los incendios o en las superficies expuestas a una elevada irradiación solar (Dix y Webster, 1995; Sussman, 1981).

Adametz (1886) fue el pionero en el estudio de los hongos del suelo, aislando y nombrando 4 especies de levaduras y 11 especies de hongos miceliares. Posteriormente, un número importante de investigadores de diferentes países fueron incrementando paulatinamente el conocimiento de la microbiota del suelo. Entre ellos podemos citar a Butler (1907), Hagem (1908), Jensen (1912), Oudemans y Koning (1912), Waksman (1916, 1917), Takahashi (1919), Chesters (1949) y Warcup (1959). Sin embargo, el primer paso importante se debe a Gilman (1945), que publica la primera edición de "A manual of soil fungi", donde se reportan alrededor de 600 especies de hongos, incluyendo unos 200 pertenecientes a la división Zygomycota (Phycomycetes), 32 a la división Ascomycota y 385 hongos mitospóricos. Esta obra, aunque con algunas imperfecciones, constituye el primer compendio de referencia sobre los hongos de suelo. Posteriormente, una serie de extensos trabajos monográficos sobre taxonomía y ecología de los hongos del suelo fueron publicados por diversos autores. Litvinov (1967) editó un manual de los hongos del suelo pertenecientes al orden Moniliales, procedentes de la ex Unión Soviética. Dicho manual comprende alrededor de 360 especies pertenecientes a 128 géneros, y se incluye gran número de claves dicotómicas, tablas e ilustraciones. Otro trabajo de referencia sobre los hongos del suelo, aunque solo trate de hifomicetos, se debe a Barron (1968). En el mismo se incluye la descripción de 192 géneros de hongos mitospóricos. Posteriormente, Domsch y Gams (1972), describen de forma pormenorizada 204 especies pertenecientes a las clases Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes, Oomycetes y Zygomycetes, incluyendo su distribución geográfica, el tipo de

suelo y/o sustrato sobre el cual se desarrollan, la temperatura óptima de crecimiento, la utilización de determinados nutrientes, etc. Dicho trabajo tiene continuidad en la monumental obra "Compendium of soil fungi" (Domsch *et al.*, 1980), donde se describen 389 especies, y frecuentemente citada aún en la actualidad. Las monografías más recientes, que tienen una importancia relativa debido a que las citas corresponden a áreas geográficas de extensión limitada, se deben a Moubasher (1993) y Watanabe (1994).

## 2.2. Metodología de estudio

Han sido desarrollados muchos métodos para estudiar los microorganismos en hábitats naturales, incluyendo técnicas para el examen directo de muestras mediante el uso del microscopio, las que permiten evidenciar distribución de las poblaciones microbianas sobre las partículas de suelo (Gams *et al.*, 1987; Garrett, 1981). Sin embargo, para lograr identificar un hongo miceliar es necesario observar la morfología de las estructuras que originan los propágulos de dispersión. Éstas pueden estar ausentes en el medio natural, o ser difícilmente visibles. Así, la identificación de los mismos es solo posible si el hongo puede ser inducido a crecer y multiplicarse en un medio de cultivo. Los métodos de aislamiento, que permiten que los hongos crezcan en cultivo puro, pueden ser directos, en los cuales las esporas o el micelio son transferidos desde el sustrato natural a un medio de cultivo estéril, o indirectos (Carlile y Watkinson, 1994). En este último caso, una porción de la muestra de suelo se inocula directamente en el medio de cultivo, y las colonias fúngicas que se desarrollen son posteriormente transferidas a un nuevo medio de cultivo (que puede ser igual o no al medio de aislamiento primario). En los métodos directos los hongos se aíslan a partir de una suspensión de suelo, recogiendo fragmentos de hifas o esporas bajo la

lupa estereoscópica (o microscopio de disección), siendo posteriormente lavadas con solución fisiológica estéril y transferidas a un medio de cultivo apropiado (Warcup, 1955, 1957). También resultan de utilidad las técnicas de “pesca con anzuelo” (Barnett *et al.*, 1974) en las que diversos tipos de sustrato (semillas, frutos, papel, hojas, madera, pelo, etc.) son colocados sobre las muestras de tierra contenidas en cajas de Petri, las que serán luego humedecidas e incubadas a la temperatura apropiada, para luego transferir a un nuevo medio de cultivo las estructuras fúngicas que hayan desarrollado sobre los mismos. Por lo general, estos métodos resultan tediosos y presentan el gran inconveniente de requerir que los hongos se encuentren en fase de crecimiento activo. Los métodos indirectos producen usualmente un gran número de colonias que compiten en su desarrollo y deben ser transferidas a un nuevo medio de cultivo para obtener cultivos puros. Tres son los métodos más frecuentemente empleados para aislar microorganismos del suelo: dilución seriada y siembra en placa (Garrett, 1981; Johnson y Curl, 1972), siembra en superficie (Carlile y Watkinson, 1994) y siembra directa de suelo (Johnson y Curl, 1972; Warcup, 1950). Los dos primeros son considerados técnicas de dilución, donde una suspensión de suelo se somete a una dilución seriada y, posteriormente, un volumen de la misma (generalmente 0.5 ml) es inoculado a un volumen de medio de cultivo antes de su solidificación, o sobre la superficie de dicho medio una vez solidificado, mediante nebulización de la suspensión, o transfiriendo una alícuota de la misma, la que posteriormente es distribuida mediante el uso de un asa de Drigalsky. El propósito de la dilución es obtener colonias separadas, las cuáles permitan realizar la transferencia de micelio y/o esporas a un nuevo medio de cultivo, donde se desarrollen en forma axénica. En la técnica de Warcup (Warcup, 1950) una pequeña cantidad de suelo (1-15 mg) se mezcla con una alícuota de medio agarizado en estado líquido a 40-45 °C y homogeneiza por agitación.

El estudio de los ascomicetos del suelo cobra real importancia cuando Warcup y Baker (1963) describen dos nuevos métodos de aislamiento, basados en la activación de las ascosporas por la acción del calor y del etanol, los que permitieron recuperar especies hasta entonces inéditas. El primero consiste en realizar suspensiones de tierra en agua e incubar durante 30 minutos alícuotas al baño María a 60 °C. El segundo método consiste en exponer una porción de tierra a una solución de etanol 60 % durante unos minutos, y, posteriormente, sembrar diluciones seriadas de la misma. Más recientemente, Furuya y Naito (1979) proponen un novedoso método de aislamiento para el ascomiceto *Boothiella tetraspora* Lodhi & Mirza, mediante la exposición de las muestras de suelo a una solución de ácido acético al 5 % p/v. Esta técnica también ha sido de utilidad para la recuperación en cultivo de otros ascomicetos presentes en dichas muestras.

### **2.3. Fenómenos de micostasis y latencia**

La rápida desaparición de los nutrientes es, probablemente, una de las principales causas del efecto inhibitorio del suelo sobre la germinación de las esporas fúngicas (Chinn y Ledingham, 1957; Dobbs y Hinson, 1953; Ko y Lockwood, 1967; Lingappa y Lockwood, 1964; Lockwood, 1964, 1977; Steiner y Lockwood, 1969), fenómeno conocido como micostasis o fungistasis. La presencia de sustancias inhibitorias producidas por diversos microorganismos (ej. actinomicetos, hongos) sería otro factor condicionante de la micostasis en el suelo (Bristow y Lockwood, 1975; Gupta y Tandon, 1977).

El suelo, además de ser el hábitat primario de los hongos geofílicos metabólicamente activos, es también un reservorio de propágulos fúngicos “durmientes” (Carlile y Watkinson, 1994). Existen



dos tipos de latencia: la exógena y la endógena o constitutiva (Sussman, 1965). La primera, está condicionada por el medio donde se encuentran los propágulos. Por ejemplo, la temperatura puede ser inapropiada para la germinación, o pueden faltar los nutrientes esenciales. Debido a que los nutrientes son rápidamente removidos, el suelo es un medio usualmente pobre. Una probable consecuencia de ello es que muchos hongos del suelo estén la mayor parte de su ciclo biológico en estado de latencia, y se desarrollen solo cuando los nutrientes estén ocasionalmente disponibles. La latencia constitutiva depende de la estructura y/o metabolismo propios del propágulo, y requieren de condiciones precisas e inusuales para su disrupción. Los mecanismos involucrados son de diversa naturaleza, tales como la escasa permeabilidad de la pared celular o la producción de auto-inhibidores de la germinación (Cooke y Whipps, 1993). La germinación de las esporas involucra el inicio de su actividad bioquímica (ausente o reducida al mínimo durante la fase de latencia) con un incremento gradual de la velocidad metabólica hasta llegar a los niveles normales de las células vegetativas y producir cambios morfológicos que se hacen evidentes por la producción de un "tubo germinativo". Las circunstancias que llevan a la finalización del estado latente de los propágulos fúngicos varía mucho entre especies y grupos ecológicos. En todos los casos se requieren unas condiciones fisico-químicas medioambientales favorables, pero el estímulo inicial es fundamental. Algunos propágulos, tales como las ascosporas y los conidios de hongos pirófilos, necesitan de un choque térmico para salir del estado de latencia (Dix y Webster, 1995). Hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehidos y terpenos, producidos en condiciones naturales por plantas, son capaces de activar la germinación de un gran número de especies fúngicas. Emerson (1948, 1954) y Sussman (1953) demostraron la capacidad del furfural, derivados del furano, tiofeno y pirrol para activar ascosporas latentes de varias especies de *Neurospora* Shear & Dodge en concentraciones tan bajas como  $10^{-3}$  M.

Sussman *et al.* (1959) estudiaron la activación de ascosporas mediante la acción de alcoholes alifáticos, cetonas y ésteres en concentraciones 1 M. Varios autores han demostrado también que otros compuestos químicos tales como los derivados fenólicos (Barnett *et al.*, 1974; Furuya y Naito, 1980; Lingapa *et al.*, 1970) tienen efectos importantes sobre la activación de las ascosporas de los Sordariales. También la congelación seguida de un breve período de calentamiento, la desecación, la irradiación solar o ultravioleta, así como la acción de ciertas sustancias lipofílicas (que son capaces de alterar la permeabilidad celular) también se han mostrado efectivas (Allen, 1965; Cochrane, 1958, 1960; Gottlieb, 1959, Sussman, 1965, 1966).

#### **2.4. Estado actual del conocimiento de los ascomicetos del suelo**

En los últimos 25 años, los estudios sobre este grupo de hongos se han intensificando. Esto se debe a que un gran número de científicos de diferentes países se han dedicado a indagar diversos aspectos de su taxonomía y filogenia. Entre ellos podemos citar a Arx, autor de la monografía "Fungi sporulating in pure culture" (Arx, 1981), una obra de referencia para la identificación, entre otros, de los ascomicetos del suelo. En Europa, Canon, Guarro, Hawksworth, Samson y Stolk han aportado un gran número de nuevos géneros y especies para la Ciencia. En Estados Unidos, Hanlin ha publicado en tres volúmenes su obra "Illustrated genera of Ascomycetes" (Hanlin, 1990, 1998 a, b), donde se describen e ilustran 200 géneros de ascomicetos, muchos de ellos, de origen geofílico, incluyendo claves dicotómicas para su identificación. En Canadá, diversos investigadores tales como Cain, Currah, Khan, Krug y Malloch han tenido un papel destacable en el estudio la taxonomía de los hongos del suelo. Currah destaca por su trabajo "Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnascaceae, Myxotrichaceae and

*Onygenaceae*” (Currah, 1985), en el que establece un nuevo esquema taxonómico para los hongos queratinofílicos del suelo, realizando una revisión exhaustiva de un gran número de géneros y especies. Por otra parte, el uso de la técnica desarrollada por Vanbreuseghen (1952) para el aislamiento de los hongos queratinofílicos ha permitido el desarrollo en nuestro país de varias tesis doctorales (Abril, 1989; Cano, 1989; Punsola, 1985; Vidal, 2000), donde se incluyen varias especies de ascomicetos del suelo. Sin embargo, con excepción de la contribución realizada por Fort (1983), no existen en España extensos trabajos sobre el estudio taxonómico de dicho grupo de hongos. En Asia, destacan los trabajos realizados por Furuya, Horie, Matsushima y Udagawa, los que han aportado decenas de nuevos taxones, si bien su área de estudio está limitada, casi exclusivamente, al Japón y algunos países del sudeste asiático e islas del Pacífico. Sin embargo, y a pesar del esfuerzo de muchos científicos que se dedican al estudio de este grupo de hongos, el conocimiento que poseemos de los mismos es fragmentario, debido a que solamente se han descrito entre el 5 y 10 % del total de las especies pertenecientes al reino (Hawksworth, 1991, 1993), o una cantidad inferior aún (Pascoe, 1990).

## II. OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO

Los hongos microscópicos constituyen una importante reserva de metabolitos secundarios de interés terapéutico y biotecnológico. Como ejemplos, podemos mencionar algunos de los antibióticos de mayor eficacia clínica, tales como la penicilina, la fosfomicina y las cefalosporinas; la ciclosporina, potente inmunosupresor que ha permitido el gran avance experimentado en los últimos años en transplantes de órganos; el mevinolin y el lovastatin, potentes hipocolesterolemiantes de reciente aparición y ya ampliamente utilizados.

En la actualidad, numerosos grupos de investigación en todo el mundo están llevando a cabo prospecciones acerca de la capacidad metabólica de diferentes microorganismos, procedentes de los más variados ambientes y cultivándolos sobre los más diversos substratos, con la finalidad de que produzcan sustancias de potencial uso en terapéutica humana y animal. Entre ellos, los hongos microscópicos son los más prometedores. Se estima que solo se han descrito hasta el momento un 5 % de las especies fúngicas existentes, por lo que todavía existe un enorme potencial de especies por descubrir. Hasta el presente, han sido estudiados esencialmente los hongos mitospóricos sin fase sexual conocida. Sin embargo, los ascomicetos han sido escasamente investigados. La principal dificultad de su estudio radica en que es necesario "activar" sus ascosporas, es decir, interrumpir su estado de latencia constitutiva, para que éstas puedan germinar en medios de cultivo artificial.

Los objetivos del presente trabajo consisten en el estudio de diversos aspectos de los ascomicetos del suelo, concretamente en:

- Ensayar diferentes técnicas de activación de ascosporas presentes en muestras de suelo,

proponiendo modificaciones de algunas de ellas para su optimización.

.- Seleccionar una o más técnicas que permitan evidenciar la diversidad biológica real de las muestras de tierra.

.- Empleando dichas técnicas, contribuir al conocimiento taxonómico de los miembros de la división Ascomycota presentes en distintos tipos de suelos, especialmente los de zonas tropicales y subtropicales. Se utilizarán técnicas de microscopía electrónica como complemento de la microscopía tradicional, y técnicas de biología molecular para establecer las relaciones filogenéticas entre aquellas especies fúngicas consideradas interesantes o novedosas para la Ciencia, o para comprobar la categoría de nuevo taxón en el caso de hongos con escasa diferenciación morfológica respecto a las morfo-especies próximas.

.- Depositar las cepas en colecciones internacionales de cultivos microbianos, quedando así disponibles para posteriores investigaciones acerca de sus capacidades fisiológicas, metabólicas y genéticas.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. TÉCNICAS DE CAMPO

### 1.1. Origen de las muestras

Las muestras de suelo se recolectaron durante diferentes campañas llevadas a cabo por personal investigador de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universidad Rovira y Virgili). Éstas se realizaron, por lo general, en países de clima tropical y/o subtropical (Argentina, Australia, Brasil, Cuba, Ecuador, India, Irak, Jordania, México, Nepal, Nicaragua, Nigeria, Singapur y Tailandia), seleccionando como zonas fitogeográficas de especial interés los bosques lluviosos, debido a que están reportados como las áreas de mayor biodiversidad del planeta (Hawksworth, 1993). Sin embargo, también se incluyeron para su estudio muestras procedentes de regiones de climas templado (Chile, España, Italia y Portugal), semiárido continental (India, Irak, Jordania y Nepal) y marítimo muy frío (región insular de la Antártida). El período de recolección abarcó desde 1994 hasta 1998, y un total de mil ochocientos veinte muestras fueron analizadas. El tipo de clima, el régimen de precipitaciones, la temperatura media anual, el área biogeográfica y el tipo de suelo de dichas zonas (reportados en los artículos) se obtuvieron a partir del Atlas Universal de la editorial Aguilar (edición 1988).

En el ANEXO 1 se incluyen los mapas de las zonas muestreadas de donde fueron aislados los nuevos taxones. Los mapas fueron obtenidos de la siguiente dirección de Internet: [http://www.lib.utexas.edu/Libs/PCL/Map\\_collection/Map\\_collection.html](http://www.lib.utexas.edu/Libs/PCL/Map_collection/Map_collection.html). El mapa de la isla de Gran Canaria se obtuvo de la siguiente dirección de Internet: <http://www.gran-canaria-info.com/general/maps.html>.



## **1.2. Muestreo**

La recolección de muestras se realizaba recogiendo aproximadamente 50-100 g de la capa más superficial de suelo libre de materia orgánica forme (estratos u horizontes A-A<sub>0</sub>), para lo cual se empleaban espátulas estériles, y se colocaba la muestra en recipientes apropiados (bolsas de polietileno o viales de plástico estériles para recolección de muestras de orina).

## **1.3. Conservación de las muestras**

Una vez en el laboratorio, las muestras se conservaban en una cámara fría a 4-7 °C hasta su posterior estudio.

# **2. TÉCNICAS DE LABORATORIO**

## **2.1. Métodos de aislamiento mediante la activación de ascosporas durmientes presentes en el suelo**

Con la finalidad de simplificar al máximo la metodología empleada para obtener los ascomicetos en cultivo, fueron utilizadas las siguientes modificaciones de los métodos más tradicionalmente empleados.

### *2.1.1. Modificación de las técnicas de Warcup y Baker (1963)*

#### 2.1.1.1. Activación por calor

Aproximadamente 1-2 g de suelo se introducían asépticamente dentro de un tubo de ensayo de 15-20 ml al cual se le agregaban 10 ml de agua destilada. El contenido del tubo se homogeneizaba por agitación y se incubaba al baño María a 80 °C durante 30 minutos. El tubo se retiraba del baño, se agitaba manualmente y su contenido se repartía en 6 placas de Petri (aproximadamente 1.6 ml/placa). A cada placa se le adicionaban aproximadamente 15 ml de PCA fundido a 40-45 °C, con cloranfenicol y dieldrin (para prevenir el desarrollo bacteriano y de ciertos artrópodos que podían estar presentes en las muestras de tierra). Se mezclaban mediante agitación y se dejaban solidificar a temperatura ambiente. Las placas se incubaban a 42-45 °C (2 placas), 22-25 °C (2 placas) y a 11-12 °C (2 placas), alternando 12 horas de iluminación con luz fluorescente, y un período de 12 horas de oscuridad.

#### 2.1.1.2. 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 agregaban 5 ml de solución de etanol 60 o 70% v/v, se homogeneizaba por agitación y se dejaba en reposo durante 10 minutos. Se decantaba rápidamente el sobrenadante y el residuo sólido se resuspendía en 10 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, su contenido se repartía en 6 placas de Petri (aproximadamente 1.6 ml/placa). Se procedía de igual forma que en la técnica de activación por calor.

#### 2.1.2. *Modificación del método de Furuya y Naito (1979)*

A 1-2 g de suelo colocados dentro de un tubo de ensayo se le adicionaban 5 ml de solución de ácido acético al 5% v/v, se agitaba vigorosamente durante 1 minuto y se dejaba en reposo durante otros 9 minutos. El sobrenadante se eliminaba por decantación y el residuo sólido se resuspendía en 10 ml de agua estéril. Posteriormente, se homogeneizaba por agitación y su contenido se repartía en 6 placas de Petri (aproximadamente 1.6 ml/placa). Se procedía de igual forma que en la técnica de activación por calor.

### 2.1.3. *Técnica de activación por acción de la acetona (dimetilcetona)*

1-2 g de suelo eran introducidos asépticamente dentro de un tubo de ensayo de 15-20 ml, se agregaba 5 ml de acetona pura, se homogeneizaba por agitación y se dejaba en reposo durante 10 minutos. Se procedía de igual forma que en el método de la activación por calor.

### 2.1.4. *Técnica de activación por acción del 2-furfuraldehído*

1-2 g de suelo eran introducidos asépticamente dentro de un tubo de ensayo de 15-20 ml al cual se le agregaban 5 ml de 2-furfuraldehído  $10^{-3}$  M y se incubaban al baño María durante 30 minutos a 65 °C. Se añadían 5 ml de agua destilada estéril en forma aséptica y se procedía de igual forma que en el método de la activación por calor.

## 2.2. Examen de las muestras activadas

Las colonias de hongos que se desarrollaban eran examinadas mediante una lupa estereoscópica

Carl Zeiss o Cambridge Instruments. Los ascomas se extraían mediante agujas hipodérmicas estériles (tipo tuberculina o insulina), se depositaban sobre una gota de lactofenol o lactofenol-azul de algodón previamente colocada sobre un portaobjetos limpio, se cubría con un cubreobjetos y se sellaba con esmalte de uñas incoloro. Si el espécimen examinado se consideraba de interés, se procedía a su aislamiento.

### **2.3. Aislamiento y obtención de cultivos puros**

Para la obtención de cultivos puros a partir del desarrollo primario de una cepa considerada de interés se procedía de manera similar a lo descrito para la preparación de montajes semipermanentes. Ascomas libres de contaminantes se recogían mediante una aguja hipodérmica estéril y se inoculaban en placas de Petri desechables de 5 cm de diámetro conteniendo PCA y OMA (los aislamientos se realizaban por duplicado). Dichas placas se rotulaban pertinentemente y se incubaban en la mismas condiciones que el cultivo original.

En el caso de que los ascomas o la proximidad de otra colonia fúngica indujeran a sospechar la presencia de hongos contaminantes, se procedía a la descontaminación superficial de varios ascomas mediante su inmersión en una solución 1 % de NaClO durante diferentes períodos de tiempo (por ejemplo 30'', 1', 2' y 5'), procediendo luego a su siembra en los medios de cultivo ya referidos e incubándolos en la mismas condiciones que el cultivo original.

Una vez obtenido el cultivo puro, y con la finalidad de realizar el estudio de las características culturales y morfológicas del mismo, se recogía una porción de la colonia con la ayuda de una aguja hipodérmica estéril, y se inoculaba en la parte central de las placas de Petri de 10 cm de

diámetro conteniendo medio de cultivo. Las siembras se realizaban por duplicado. La incubación se realizaba a diferentes temperaturas (véase apartado 2.4.1.), con un período de iluminación 12 horas (luz fluorescente blanca ) seguido de otro de oscuridad, de igual duración.

## **2.4. Identificación de los ascomicetos aislados en cultivo puro**

Una vez obtenidos los cultivos puros, se procedía a su identificación de acuerdo con los criterios establecidos para cada género. Los taxones eran identificados y/o caracterizados mediante el estudio de sus características culturales y micromorfológicas.

### *2.4.1. Características culturales*

Las colonias se examinaban colocando la placa de Petri sobre un papel blanco, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se consideraban las siguientes características:

- .- Diámetro de la colonia (el que se medía, generalmente, a los 14 días de incubación)
- .- Color de la superficie y del reverso (Kornerup y Wanscher, 1984)
- .- Textura
- .- Topografía
- .- Prominencias
- .- Borde
- .- Zonas de crecimiento
- .- Pigmento difusible
- .- Exudado

.- Olor

Dichas características se observaban a 4-6, 11-12, 15, 22-25, 37, 42 y 45 °C (excepcionalmente a 50-55 °C), lo que permitía determinar a su vez las temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento.

Los medios de cultivo empleados para describir las características culturales variaban para cada taxón. Sin embargo, los más empleados eran: PCA, OMA, MEA y PDA (véase apartado 2.5.).

#### 2.4.2. *Morfología microscópica*

En lo referente a las características microscópicas se tenían en cuenta las siguientes estructuras y sus características.

.- Hifas: color, forma, diámetro, septos, presencia de anastomosis

.- Ascoma: formas sexuales iniciales, tipo, color, forma y tamaño; presencia, color, forma, ornamentación y tamaño de pelos (setas) peridiales; espesor, capas y textura del peridio; color, forma, ornamentación y tamaño de las células peridiales; presencia, forma, número de septos y tamaño de las paráfisis; forma, disposición, presencia de estructuras apicales, presencia de estipe, tipo de pared y tamaño de los ascos; número de ascosporas dentro del asco y su disposición espacial; color, forma, presencia de septos, tipo de ornamentación superficial, número y posición de los poros o surcos germinativos, presencia de capa mucosa o cápsula, presencia y tipo de apéndices mucilaginosos, afinidad por determinados colorantes y tamaño de las ascosporas

.- 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

- Clamidosporas: presencia, color, forma, ornamentación, disposición y tamaño

## 2.5. Medios de cultivo y medios de montaje empleados

### 2.5.1. Medios de cultivo

- Agar harina de avena (OMA) (Hawksworth *et al.*, 1995):

Harina de avena.....	30.0 g
Agar.....	20.0 g
Agua.....	1000 ml

Se colocaban en un recipiente apropiado la harina de avena y 500 ml de agua y se calentaba hasta ebullición manteniéndola durante 1 hora. Se filtraba a través de gasa y se adicionaba el agar disuelto en 500 ml de agua previo calentamiento a ebullición. Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

- Agar harina de maíz (CMA) (Hawksworth *et al.*, 1995):

Harina de maíz.....	30.0 g
Agar.....	20.0 g
Agua.....	1000 ml

Se procedía como en el caso anterior.

- Agar de Czapek Dox (CZ) (Hawksworth *et al.*, 1995):

Se preparaban las siguientes soluciones, que se conservaban en la nevera:

- Solución A.

NaNO <sub>3</sub> .....	40.0 g
KCl.....	10.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	10.0 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	0.2 g
Agua destilada.....	1000 ml

- Solución B.

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	20.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se adicionaban 20 g de agar a 900 ml de agua destilada. Se agregaban 30 g de sacarosa y 50 ml de las soluciones A y B. Por último, se agregaba 1 ml de solución 1% p/v de ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O y 1 ml de de solución 0.5 % p/v de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O. Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

- Agar de Czapek con levadura autolisada (CYA) (Pitt, 1973):



K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.0 g
Solución concentrada de Czapek.....	10.0 ml
Extracto o autolizado de levadura.....	5.0 g
Sacarosa.....	30.0 g
Agar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

.- Agar extracto de malta (MEA) (Hawksworth *et al.*, 1995):

Extracto de malta.....	20.0 g
Agar.....	20.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se dispensaba en frascos de vidrio y esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

.- Agar patata-glucosa (PDA) (Hawksworth *et al.*, 1995):

Patatas.....	200.0 g
Glucosa.....	15.0 g
Agar.....	20.0 g

Agua destilada.....1000 ml

Se pelaban, lavaban y cortaban las patatas en cubos de unos 10 mm de lado, se volvían a lavar y se colocaban en un recipiente apropiado con 1000 ml de agua y llevaban a ebullición durante 1 hora. Se trituraban las patatas hervidas junto al agua de cocción en una licuadora, se agregaba el agar y se llevaban nuevamente a ebullición hasta su disolución completa. Se agregaba la glucosa y se reponía el agua hasta un volumen final de 1000 ml. Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

.- Agar patata-zanahoria (PCA) (Hawksworth *et al.*, 1995):

Patatas.....20.0 g

Zanahoria.....20.0 g

Agar.....20.0 g

Agua destilada.....1000 ml

Se cortaban las patatas y las zanahorias en cubos, se colocaban en un recipiente apropiado con 500 ml de agua, se llevaban a ebullición manteniéndola durante 1 hora y se filtraban a través de gasa desechando el residuo sólido. En otro recipiente se agregaban 20 g de agar a 500 ml de agua y se disolvía calentando hasta ebullición. Se mezclaban ambas soluciones y se agregaba agua hasta completar 1000 ml; se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

- Agar con 25 % de glicerol (G25N) (Pitt, 1973):

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.75 g
Solución concentrada de Czapek.....	7.5 ml
Extracto o autolizado de levadura.....	3.7 g
Glicerol.....	250 g
Agar.....	12.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaba durante 20 minutos a 121 °C.

### 2.5.2. Medios de montaje para la observación microscópica de los aislamientos

- Lactofenol (Barnett *et al.*, 1974):

Ácido láctico.....	20 g
Fenol.....	20 g
Glicerol.....	40 g
Agua destilada.....	20 ml

- Lactofenol-azul de algodón (Barnett *et al.*, 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 (Barnet *et al.*, 1974):

Hidrato de cloral.....	100 g
KI.....	5 g
I <sub>2</sub> .....	1.5 g
Agua destilada.....	100 ml

## 2.6. Conservación de las cepas

### 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 OMA, CMA o PDA a 45 °C) era introducido asepticamente en tubos de polietileno estériles con tapa del mismo material o, en su defecto, en tubos de cristal con tapa de rosca de bakelita esterilizados en autoclave. Otra opción consistía en introducir el medio de cultivo en dichos tubos y esterilizarlos conjuntamente. Antes de dejar solidificar el medio a temperatura ambiente, los tubos se inclinaban para obtener un “pico de flauta”. Una vez solidificado, y pasado el control de esterilidad, se inoculaban con las cepas de interés. Se incubaban a la temperatura óptima durante el período de tiempo necesario para la

formación de ascomas maduros. Posteriormente, se almacenaba en el refrigerador a 4 °C. Se realizaban siembras periódicas (usualmente cada 1-3 meses). Para la conservación durante períodos más prolongados, se cubría totalmente el cultivo con aceite de vaselina o parafina líquida estéril (2 ó 3 ciclos de esterilización en autoclave, esperando un intervalo de 2-3 horas). Estos cultivos se almacenaban a temperatura ambiente.

### 2.6.2. *Conservación en agua*

Los hongos de interés se sembraban en un medio de cultivo adecuado para la producción de ascomas. Se incubaban en condiciones óptimas y, una vez desarrolladas, las colonias con el medio agarizado se cortaban con hojas de bisturí estériles de manera tal que se formaban cubos de unos 10 mm de lado. Éstos se introducían en forma aséptica dentro de viales de cristal conteniendo agua destilada estéril, se cerraban herméticamente (tapa de rosca o tapón de caucho sintético) y se almacenaban a temperatura ambiente.

### 2.6.3. *Material destinado a herborización*

Los cultivos destinados a la micoteca se desecaban en una estufa de secado a 45-55 °C, y se almacenaban en sobre de papel encerado, rotulado apropiadamente. 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 de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (FMR), Reus, España.

## 2.7. Preservación de los cultivos vivos

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

- Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Holanda
- Colección de cultivos de la Facultad de Medicina de Reus (FMR), Tarragona, España
- Institute for Fermentation (IFO), Osaka, Japón (no los nuevos taxones)
- International Mycological Institute (IMI), CABI, Egham, Gran Bretaña
- University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH), Alberta, Canadá

## 2.8. Microscopía óptica

Para el estudio morfológico de las cepas de interés se utilizaban los siguientes microscopios:

- Leitz Dialux 20 EB con contraste de fases
- Olympus CH2
- Olympus BH2 con contraste de fases e interferencia de fases de Nomarski

Para realizar las ilustraciones en tinta se utilizaba 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. Los dibujos al lápiz se realizaban sobre un papel blanco mate DIN A4, con un lápiz negro de mina de grafito de dureza B ó H (Staedtler o Faber-Castell). Para los dibujos a la tinta se empleaban papel vegetal DIN A4, rotuladores Staedtler Marsmatic con punta de 0.1 y 0.2 milímetros de diámetro, tinta china negra Rotring GmbH, plantillas de dibujo Faber-Castell 972 A, B y C, y compás Forcel.

Para la obtención de las microfotografías se utilizaba película FX Kodak de 35 milímetros.

## 2.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

(Técnica abreviada descrita por Figueras y Guarro, 1988 a, b).

### 2.9.1. Fijación

Mediante el empleo de la lupa estereoscópica se seleccionaban las áreas de las colonias con desarrollo óptimo y se cortaban dichas zonas mediante el empleo de una hoja de bisturí estéril de un cubreobjetos descontaminado con alcohol 70 % v/v. Las muestras (de unos 5-7 mm de lado) se sumergían 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 *et al.*, 1963), contenida 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 agregaba una gota de Tween 80 (Carroll y Carroll, 1973). Los viales se colocaban dentro de un desecador y se sometían a la acción del vacío generado por una bomba acoplada durante 1 hora (Campbell, 1972; Hanlin, 1982; Rosing, 1982). Transcurrido dicho tiempo las muestras eran separadas del fijador por decantación cuidadosa y se lavaban durante 15 minutos con solución de tampón fosfato 0.1 M. Se llevaba a cabo una fijación secundaria mediante una solución de tetróxido de osmio (O<sub>4</sub>Os) 1 % p/v en solución de tampón fosfato 0.1 M (Palade, 1952).

### 2.9.2. Deshidratación

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

- a.- Solución 30 % v/v.....15 minutos
- b.- Solución 50 % v/v.....15 minutos
- c.- Solución 70 % v/v.....15 minutos
- d.- Solución 80 % v/v.....15 minutos
- e.- Solución 90 % v/v.....15 minutos
- f.- Solución 96 % v/v.....15 minutos
- g.- 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 del mismo en etanol absoluto. A continuación se describen las concentraciones y el tiempo que se empleaba para lograr dicha sustitución de solventes.

- a.- Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:3 v/v.....15 minutos
- b.- Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:2 v/v.....15 minutos
- c.- Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 1:1 v/v.....15 minutos
- d.- Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 2:1 v/v.....15 minutos
- e.- Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 3:1 v/v.....15 minutos



- f.- Solución de acetato de amilo en etanol absoluto, 4:1 v/v.....15 minutos
- g.- Acetato de amilo puro.....60 minutos

### 2.9.3. *Secado*

Para secar las muestras se realizaba la técnica del punto crítico, previa sustitución del agua que pueda contener la muestra por CO<sub>2</sub> (Anderson, 1953; Bartlet y Burstyn, 1975).

### 2.9.4. *Montaje y metalización*

Una vez secas, las muestras eran pegadas a un portamuestras de aluminio (u otro metal conductor de la electricidad) mediante plata coloidal o pegamento de secado rápido. Una vez logrado esto, los bordes de la muestra se pintaban con plata coloidal para favorecer su conductividad. Las muestras así acondicionadas se introducían en un metalizador Polaron Sputter Coater, se sometían a una atmósfera de gas argón y, siguiendo la técnica de sputtering (Echlin y Kaye, 1979), se cubría con una capa de oro de 100-200 Å de espesor.

### 2.9.5. *Observación y fotografía de las muestras*

Las muestras ya procesadas se examinaban en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universidad Rovira y Virgili, Reus). Las microfotografías se obtenían empleando la película de 35 milímetros Kodak Tri-X Pan 400 ASA. La distancia de trabajo empleada variaba entre los 8 y

39 mm. El voltaje aplicado estaba comprendido entre 10 y 20 kV.

## 2.10. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

### 2.10.1. Fijación

Las muestras se sumergían en la solución fijadora de 2-glutaraldehído 2 % v/v en tampón fosfato de concentración 0.1 M y pH 7.2, contenida en viales de cristal. Se dejaba fijar a temperatura ambiente (22-25 °C) durante dos horas. Transcurrido dicho tiempo, las muestras eran separadas del fijador por decantación y se lavaban durante 15 minutos con solución de tampón fosfato 0.1 M. Se llevaba a cabo una fijación secundaria mediante una solución de tetróxido de osmio (O<sub>4</sub>Os) 1 % p/v en solución tampón de cacodilato de sodio de pH 7.2, durante 1 hora a 4 °C.

### 2.10.2. Deshidratación

Las muestras se deshidrataban progresivamente sometiéndolas a concentraciones crecientes de etanol. A continuación se indican dichas concentraciones y el tiempo de exposición con que eran tratadas las muestras durante los sucesivos pases hasta lograr su deshidratación completa:

- a.- Solución 30 % v/v.....15 minutos
- b.- Solución 50 % v/v.....15 minutos
- c.- Solución 70 % v/v.....15 minutos
- d.- Solución 80 % v/v.....15 minutos

- e.- Solución 90 % v/v.....15 minutos
- f.- Solución 96 % v/v.....15 minutos
- g.- Solución 100 % v/v.....60 minutos (renovando el alcohol absoluto cada 20 minutos)

### 2.10.3. *Inclusión*

Las muestras se incluían en spurr (Spurr, 1969 ).

### 2.10.4. *Obtención de cortes ultrafinos y tinción*

Los cortes se realizaban mediante un ultramicrotomo Ultracut E (Reicher-Jung). Los “semi-finos”, de 0.7  $\mu\text{m}$  de grosor, se cortaban con cuchilla de cristal. Secciones de 60 nm de grosor (“ultra-finos”) se obtenían cortando la muestra con cuchilla de diamante (Diatome). Los “ultra-finos” se colocaban en una rejilla de cobre y se depositaban sobre puentes de formvar, donde se secaban (Rowley y Moran, 1975). Los cortes se teñían con oro coloidal y, posteriormente, con una solución acuosa de acetato de uranilo 4 % p/v y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

### 2.10.5. *Observación y fotografía de las muestras*

Las muestras ya procesadas se examinaban en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universidad Rovira y Virgili, Reus). Las microfotografías se obtenían empleando la película de 35 mm Kodak Tri-X Pan 400 ASA. El voltaje aplicado era de 10-20 kV.

## 2.11. Biología molecular

### 2.11.1. Obtención del DNA

El DNA total de las cepas en estudio se obtenía mediante la técnica descrita por Estruch *et al.* (1989) y modificada posteriormente por Guillamón *et al.* (1996). Las cepas eran inoculadas en frascos Ehrlenmeyer conteniendo 100 ml de caldo Sabouraud, e incubadas a 28 °C en un agitador orbital a 200 rpm. El micelio se recogía mediante filtración a través de una malla de nital (de 42 µm de diámetro de poro, aproximadamente), se lavaba dos veces con agua destilada, se secaba entre varias capas de papel de filtro, se congelaba con nitrógeno líquido y se reducía a polvo mediante el empleo de un mortero estéril. El polvo resultante se resuspendía en 2 ml de tampón de extracción (solución 0.2 M de Tris.HCl de pH 8.0, 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y se incubaba durante 1 hora a 65 °C. El producto de hidrólisis se extraía con solución de fenol:cloroformo:iso-amil-alcohol (25:24:1) y el DNA era recuperado por precipitación con isopropanol. El pellet se lavaba con solución de etanol 70 % v/v, se secaba al vacío y se resuspendía en solución tampón TE (Tris.HCl 10 mM de pH 8.0, EDTA 1mM).

### 2.11.2. Amplificación rDNA mediante la técnica de PCR

La región rDNA-ITS (conteniendo los ITS1 y ITS 2, y el gen 5.8 S rRNA) se amplificaba como fue descrito por Gené *et al.* (1996), usando un termociclador Perkin Elmer 2400 (Perking Elmer Cetus Co., Emervyville, CA). Para obtener amplificadores de dichas regiones se empleaban los cebadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). El programa de amplificación que se empleaba consistía en una etapa de pre-desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, con una incubación final de 7 minutos a 72 °C. Los productos finales de amplificación eran separados mediante electroforesis en gel de agarosa MP al 2 % p/v (Boehringer Mannheim) y, posteriormente, se purificaban siguiendo el protocolo GENE CLEAN II (BIO 101). Los pesos moleculares de los fragmentos de DNA amplificados se calculaban por comparación con el marcador 100 bp (Gibco BRL).

### 2.11.3. Secuenciación y análisis filogénico

Para realizar la secuenciación se usaba el protocolo "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Gouda, Holanda). Las reacciones se llevaban a cabo empleando los iniciadores ITS5 y ITS4 (White *et al.*, 1990), utilizando un secuenciador 310 DNA (Applied Biosystems). Las secuencias se alineaban mediante el programa Clustal W, versión 1.5 (Thompson *et al.*, 1994). Los análisis cladísticos se realizaban empleando los métodos *neighbor-joining* (Saitou and Nei, 1987) y parsimonia-heurístico, mediante el programa MEGA 1.0 (Kumar *et al.*, 1993). Los valores de confianza para las ramas individuales del cladograma eran determinados mediante el análisis de *bootstrap*, empleando 500 ó 1000 pseudoréplicas. La composición nucleotídica, las frecuencias de comparaciones pareadas y el alineamiento de las secuencias GAP se obtenían empleando el programa MEGA 1.0.

### 2.11.4. Archivo de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas eran depositadas en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (*European Molecular Biology Laboratory*, EMBL).

## 2.12. Estudio estadístico de las técnicas de activación

Con la finalidad de conocer cuál de los métodos empleados para activar ascosporas en muestras de suelo permitía recuperar el mayor número de taxones, se procesaron diecinueve muestras de tierra recogidas al azar, procedentes de distintas zonas geográficas (Tabla 3), las que fueron activadas mediante las cinco técnicas previamente descritas. Dichas técnicas estaban basadas en la acción del calor, del etanol al 70 %, del 2-furfuraldehído  $10^{-3}$ M, de la acetona y del ácido acético al 5 % v/v. Fueron calculados los siguientes parámetros estadísticos: media, mediana, varianza, desviación típica y los límites superior e inferior para el intervalo de confianza para la media al 95 %. Para saber si existían diferencias entre las medias, se realizaba el test t de Student, y se consideraba significativas si  $p \leq 0.05$ . Para conocer la fiabilidad de los cinco métodos empleados se utilizaba el coeficiente de correlación intraclase (Shrout y Fleiss, 1979; McGraw y Wong, 1996) calculado mediante el empleo de un modelo de doble efecto mixto, aplicando la definición de agregación absoluta del ICC. El análisis estadístico se realizaba con el programa SPSS versión 9.0.2. (SPSS Inc.) para Windows (Microsoft Co.).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

# 1. TAXONOMÍA



## 1.1. Una nueva especie de *Melanospora* de la India

1.1.1. A. M. Stchigel, J. Guarro & M. J. Figueras. 1996. A new species of *Melanospora* from India. *Mycological Research* 101, 446-448

## A new species of *Melanospora* from India

A. M. STCHIGEL, J. GUARRO AND M. J. FIGUERAS

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

*Melanospora collipora* sp. nov. is described from soil. The most noteworthy feature is the presence of a hyaline rim around the germ pores. Relationships of the new species to other members of Ceratostomataceae and Chaetomiaceae are discussed.

An interesting ascomycete has been isolated from a sample of soil from India. It shows typical characteristics of *Melanospora* Corda (Ceratostomataceae) with the exception of the presence of a raised hyaline rim surrounding the germ pores, which differentiates this taxon from other species of the genus and from species of related genera.

*Melanospora collipora* Stchigel & Guarro, sp. nov.

(Figs 1-14)

Ascocarpis globosis vel ovoideis, superficialibus vel immersis, 140-200 × 100-160 µm, pallide fulvis, ostiolatis. Collo nullo vel brevi, conico, piloso, apice fimbriato. Peridio tenui, translucido, textura globulosa et textura angularis composito. Paraphysibus nullis. Ascis 8-sporis, late clavatis vel ovalis, 50-60 × 25-30 µm, superne late rotundatis, brevistipitatis, evanescentibus. Ascosporis irregulariter biseriatis, primo hyalinis et guttulis, deinde atrobrunneis, ellipsoideis, 23-27 × 11-14 µm, levibus, crassis, biporosis; foramine germinali circiter 2-4 µm diam ad utroque termino ascospori, cum collo hyalino, usque ad 0.5-1.5 µm accrescentes.

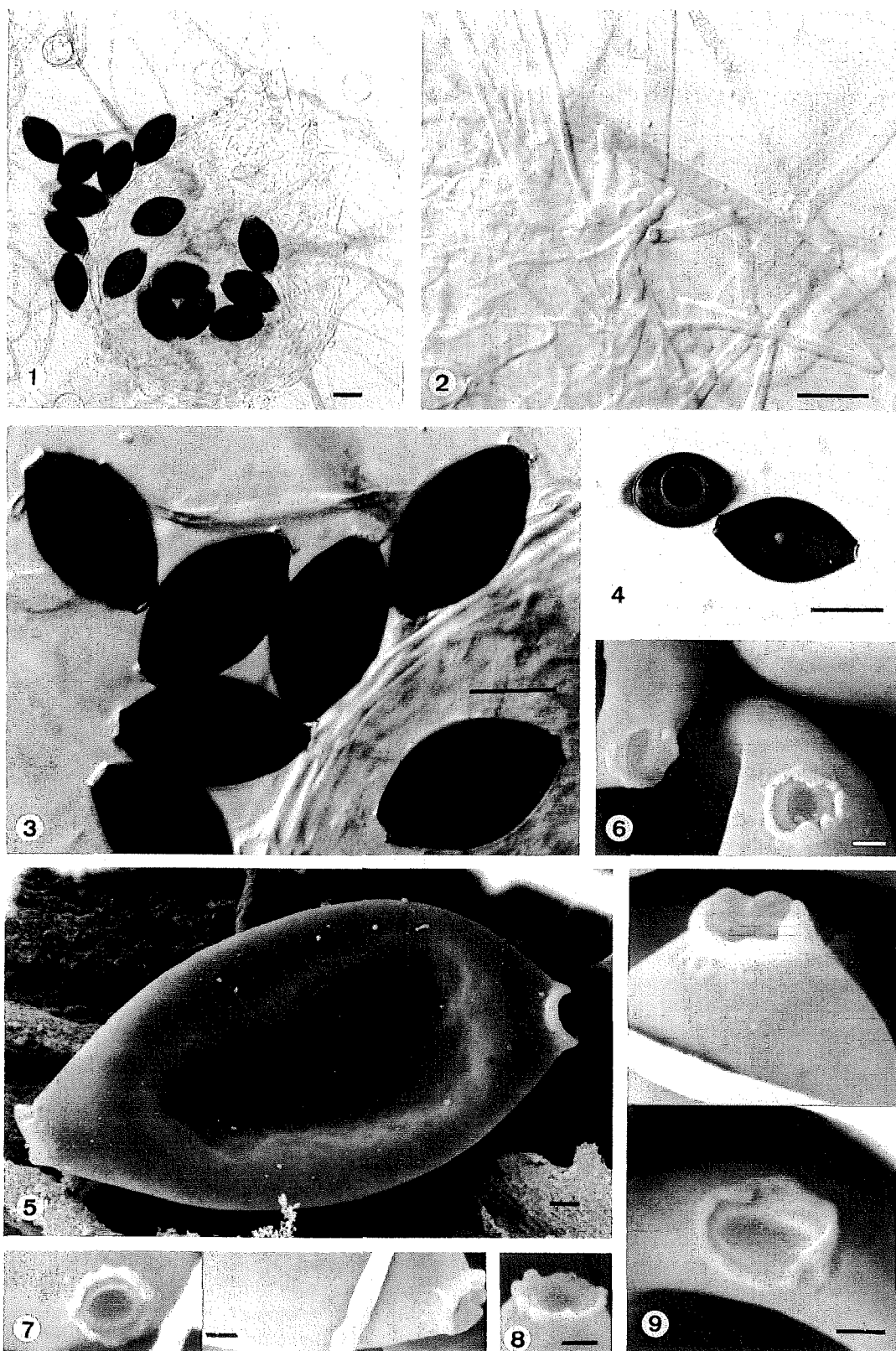
Holotypus: FMR 5538, ex solo, Jaipur, India, 28 Oct. 1995, J. Guarro.

Colonies on potato carrot agar spreading, with scanty, white aerial mycelium and with limited production of ascomata. Hyphae pale yellow to pale yellowish-brown, 2.0-4.5 µm diam, septate. Ascomata globose or ovoid, immersed to superficial, scattered or aggregated, 140-200 × 100-160 µm, ostiolate, occasionally non-ostiolate, ostiole inconspicuous; pale yellow, appearing dark brown when mature due to spore mass; neck absent or short, conical, up to 25 µm long, 20-45 µm wide, with a ring of rigid, hyaline, smooth and thick-walled setae around the ostiole; setae straight, swollen at the base, 15-70 µm long, 5-10 µm at the base, aseptate, tapering gradually to a rounded tip; peridium thin, 5-20 µm thick, composed of 4-6 layers of flattened cells, pale yellow to pale yellowish-brown, translucent, membranaceous, of *textura angularis* or *textura globulosa*, with cells 5-15 µm diam. Paraphyses absent. Ascis broadly clavate to ovoid, without distinct apical structures, broadly rounded above, 8-spored,

stalked, the wall evanescent, 50-60 × 25-30 µm. Ascospores irregularly arranged in the asci, occasionally biseriata, at first hyaline and guttulate, becoming dark brown, ellipsoidal, 23-27 × 11-14 µm, smooth-walled, with a prominent de Bary bubble, with two terminal germ pores; germ pores circular, 2-4 µm diam., with a raised hyaline rim 0.5-1.5 µm high. Chlamydospores yellowish to yellowish brown, one to multicelled; cells globose, 6-20 µm diam., terminal or intercalary, globose, broadly ellipsoidal to irregular, thick-walled, wall smooth to rugose.

Holotype: FMR 5538, from soil, Jaipur, India, 28 Oct. 1995, leg. J. Guarro. Isotype in IMI.

The raised annulus that surrounds the germ pores is rare in *Melanospora* and in the Ceratostomataceae; other species usually have depressed pores without a raised ring, with the exception of *Melanospora singaporensis* Morinaga, Mihoua & Udagawa (1978) and *Microthecium elliposporum* Takada (1973), which is probably also a species of *Melanospora*. Both species are known from only a single isolate. We wanted to examine the germ pores of the ascospores of both species, as they were not illustrated by SEM in the original description, but we were unable to because subcultures of the types were sterile. However, these species can be easily distinguished from *M. collipora* by their smaller ascospores (*M. singaporensis*, 15-18 × 9-11.5 µm; *Microthecium elliposporum*, 16-18 × 6-7.5 µm). In the Ceratostomataceae there are two groups of genera, one with ascospores with longitudinal germ slits; comprised of *Scopinella* Lév. and *Sphaeronaemella* P. Karst., and the other group with germ pores. Of the latter the largest genera are *Melanospora*, with smooth ascospores, and *Sphaerodes* Clem. with ornamented ascospores. The most comprehensive study of these genera is that of Cannon & Hawksworth (1982) who carried out a revision of the British species of *Melanospora* and relatives. The nature of the germ apertures has been considered of particular importance in the delimitation of the taxa. The type of germ pores of *M. collipora* is very different from those of other species of *Melanospora*, but until a complete revision of all the species of



**Figs 1-9. *Melanospora collipora*.** Fig. 1. Setose ascomata with ascospores. Bar, 10  $\mu$ m. Fig. 2. Peristiotiar setae. See the irregular surface of the wall, bar, 10  $\mu$ m. Fig. 3. Ascospores. Notice the presence of hyaline ring. Bar, 10  $\mu$ m. Fig. 4. Ascospores with de Bary bubbles. Bar, 10  $\mu$ m. Fig. 5. Ascospores (s.e.m.). Bar, 1  $\mu$ m. Figs 6-9. Detail of germ pores. Note the raised ring surrounding the pore. Bar, 1  $\mu$ m.

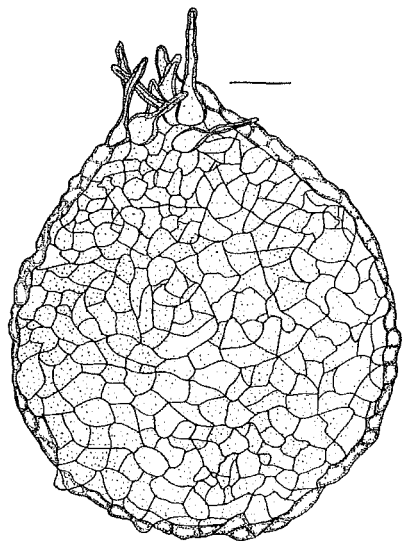
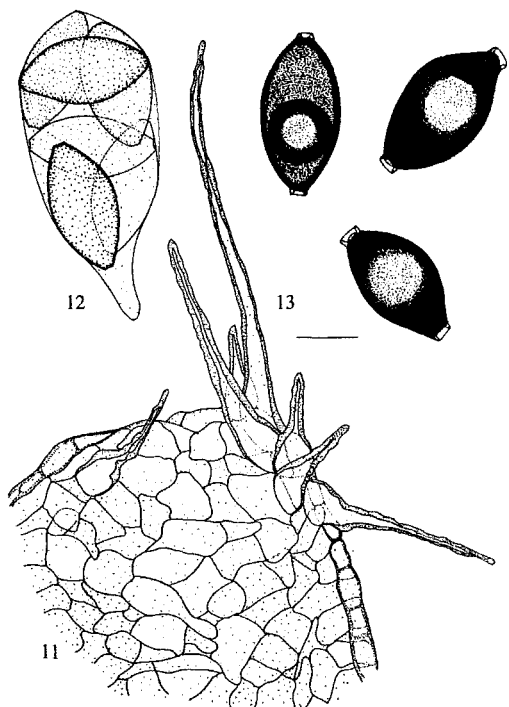


Fig. 10. *Melanospora collipora*. Ascoma. Bar, 25  $\mu$ m.



Figs 11–13. *Melanospora collipora*. Fig. 11. Detail of the top of the ascoma. Fig. 12. Ascus. Fig. 13. Ascospores. Bar, 10  $\mu$ m.

this group is made this new species is maintained tentatively in *Melanospora*. The monotypic *Pustulipora* P. F. Cannon (1982) also has smooth-walled ascospores and well-differentiated germ pores which are at least sometimes surrounded by hyaline cushion-like structures; these structures may also appear pustulate. Hawksworth *et al.*, (1995), have also included *Corynascus* Arx in the Ceratostomataceae. During studies of

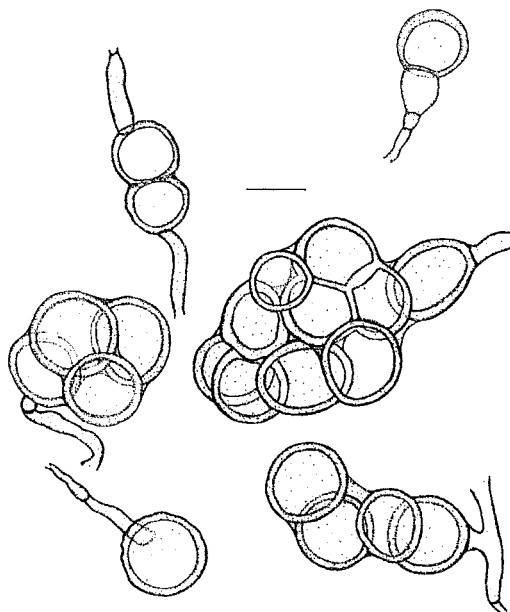


Fig. 14. *Melanospora collipora*. Chlamydospores. Bar, 10  $\mu$ m.

soil fungi of India we had the opportunity to examine numerous strains belonging to that genus, and we consider that *Corynascus* is more closely related to *Corynascella* Arx & Hodges, *Thielavia* Zopf, or *Melanocarpus* Arx than to the genera included by Hawksworth *et al.* (1995) in Ceratostomataceae and we agree with Arx *et al.* (1988) in including those genera in a separate family, the Thielaviaceae. This family is not considered to be different from Chaetomiaceae by Hawksworth *et al.* (1995).

We are grateful to Dr P. F. Cannon (International Mycological Institute, Egham) for comments on the possible relationships of this species, to Fundació Ciència i Salut for financial support and to Institute for Fermentation, Osaka (IFO) for supplying the strains used in this study.

## REFERENCES

- Arx, J. A. von, Figueras, M. J. & Guarro, J. (1988). Sordariaceous ascomycetes without ascospore ejaculation. *Nova Hedwigia* **94**, 1–104.
- Cannon, P. F. (1982). *Pustulipora*, a new genus of the Melanosporaceae. *Mycotaxon* **15**, 523–528.
- Cannon, P. F. & Hawksworth, D. L. (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.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. & Pegler, D. N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th edition. International Mycological Institute, CAB International: Wallingford, U.K.
- 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 Solomon Islands. 20. Notes on soil-borne ascomycetes. *Bulletin of the National Science Museum* **16**, 521–535, pl. 3.

(Accepted 18 September 1996)

## 1.2. Una nueva especie de *Emericella* del suelo de India

1.2.1. A. M. Stchigel & J. Guarro. 1997. A new species of *Emericella* from Indian soil. *Mycologia* 89, 937-941

*Mycologia*, 89(6), 1997, pp. 937-941.  
© 1997 by The New York Botanical Garden, Bronx, NY 10458-5126

## A new species of *Emericella* from Indian soil

A. M. Stchigel

J. Guarro<sup>1</sup>

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

**Abstract:** *Emericella pluriseminata* sp. nov. (Eurotiales, Ascomycota), isolated from Indian soil, is described and illustrated. It differs from the other species of the genus by having ascomata appearing very late, 16-spored asci, large, stellate, violet-brown ascospores and in lacking an anamorph.

**Key Words:** Ascomycota, *Emericella*, Eurotiales, India, soil fungi, systematics

During a study of soil ascomycetes, an undescribed species of *Emericella* Berk. & Br. was isolated from soil samples collected in Northern India. Its morphological characteristics readily differentiate this taxon from all previously described species of the genus (Christensen and Raper, 1978; Christensen et al., 1978; Christensen and States, 1982; Horie, 1978, 1980; Horie et al., 1989, 1990, 1996; Horie and Udagawa, 1995; Kong and Qi, 1986; Malloch and Cain, 1972; Mehrotra and Prasad, 1969; Raper and Fennell, 1965; Samson and Mouchacca, 1974, 1975; Udagawa and Horie, 1976; Udagawa and Muroi, 1979) and it is proposed here as a new species.

The soil samples were collected around Jaipur city, India, a tropical semiarid region covered mainly by grasses and shrubs. The area is dominated by a hot climate. The minimum temperatures are 10–18 C in winter and 25–30 C in summer, and maximum temperatures are 23–35 C in winter and 30–43 C in summer. The total annual precipitation is about 900 mm. The soil samples were treated with 65 % (v/v) ethyl alcohol following the method of Warcup and Baker (1963) and then cultured on potato carrot agar (PCA). The fungus was grown on Difco oat meal agar (OMA), PCA, Difco Czapek-Dox solution agar, Czapek yeast extract agar (CYA) and Difco malt extract agar (MEA), at room temperature (22–25 C), under 12 h darkness alternating with 12 h cool white fluo-

rescent light. Color notations in parentheses are from Kornerup and Wanscher (1984).

***Emericella pluriseminata*** Stchigel et Guarro, sp. nov. FIGS. 1–11

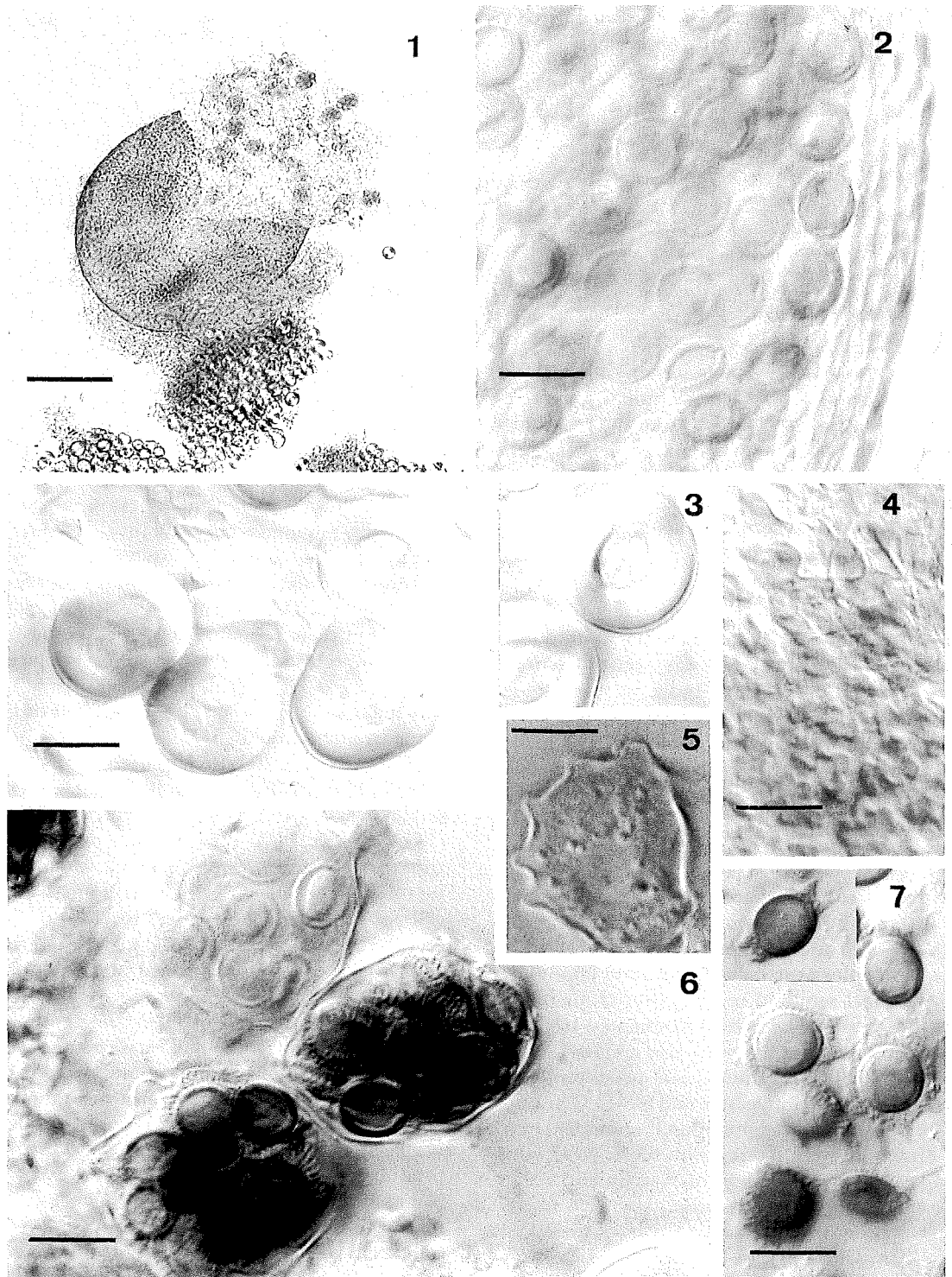
Coloniae in agaro cum decocto tuberorum et carotarum "PCA" plus minusve expansae, "hülle" cellulis abundantibus formantes, cinnamomeae vel brunneae; reversum brunneo-aurantiacum vel brunneum. Ascomata superficialia, non ostiolatae, nigra, globosa, 80–250 µm diam, cum "hülle" cellulis numerosis, globosis vel irregularis, crassitunicatis, 10–22 µm diam, circumdata. Peridium 4–12 µm crassum, dilute flavo-brunneum vel flavo-brunneum, semitranslucens vel translucens, textura intricata vel textura epidermoidea. Asci 16-sporei, globosi vel ellipsoidei, 22–35 µm diam, evanescentes. Ascosporae unicellulares, primo hyalinae, deinde brunneo-violaceae, lenticulares, 7–9 × 6–7 µm, cristis aequatorialibus duabus stelliformis praeditae, parte convexa tuberculata ornatae. Status conidialis nullus.

**HOLOTYPE.** INDIA. Jaipur, 26° 49'N, 75° 48'E, ex solo, 29-X-1995, J. Guarro (FMR 5588, ISOTYPUS IMI 370.867).

Colonies on PCA growing more or less rapidly at room temperature (approx. 25 C), attaining 41–44 mm diam in 14 d, consisting of large masses of hülle cells, zonate, cinnamon (6D6) to cocoa (6E6); submerged mycelium with abundant clusters of hülle cells; margins irregularly lobed and subhyaline; reverse carrot red (6B7), with cocoa (6E6) stained spots and Venetian red (8D8) in the center; hyaline or carrot red (6B7) exudate very abundant; soluble, carrot red (6B7) pigment present. Hyphae 1.5–10.0 µm wide, hyaline to orange-brown, branched, septate. Ascomata superficial, globose, nonostiolate, blackish, with green iridescence, 80–250 µm diam, produced very late, appearing after 2–3 mo, surrounded by a felt of hyphae and hülle cells and supported by masses of scattered hyphae and hülle cells; hülle cells pale yellowish to orange-brown, globose to irregularly shaped, thick-walled, 10–22 µm diam. Peridium 4–12 µm thick, pale to yellowish-brown, semitranslucent to translucent, *textura intricata* to *epidermoidea*, 3–7 layered, cells of the outer layer measuring 3–14 µm diam. Asci 16-spored, globose to broadly ellipsoidal, with several broad wall protrusions, 22–

Accepted for publication June 4, 1997.

<sup>1</sup> Corresponding author. email: umb@ec.urv.es



FIGS. 1-7. *Emericella pluriseminata*. 1. Ascoma and asci. 2. Cross-section of an ascoma showing the peridial layers. 3. Hülle cells. 4. Surface view of the peridium. 5. Young ascus showing its broad wall protrusions. 6. Asci and ascospores. 7. Ascospores. Scale bars: Fig. 1 = 100  $\mu$ m, all others = 10  $\mu$ m.

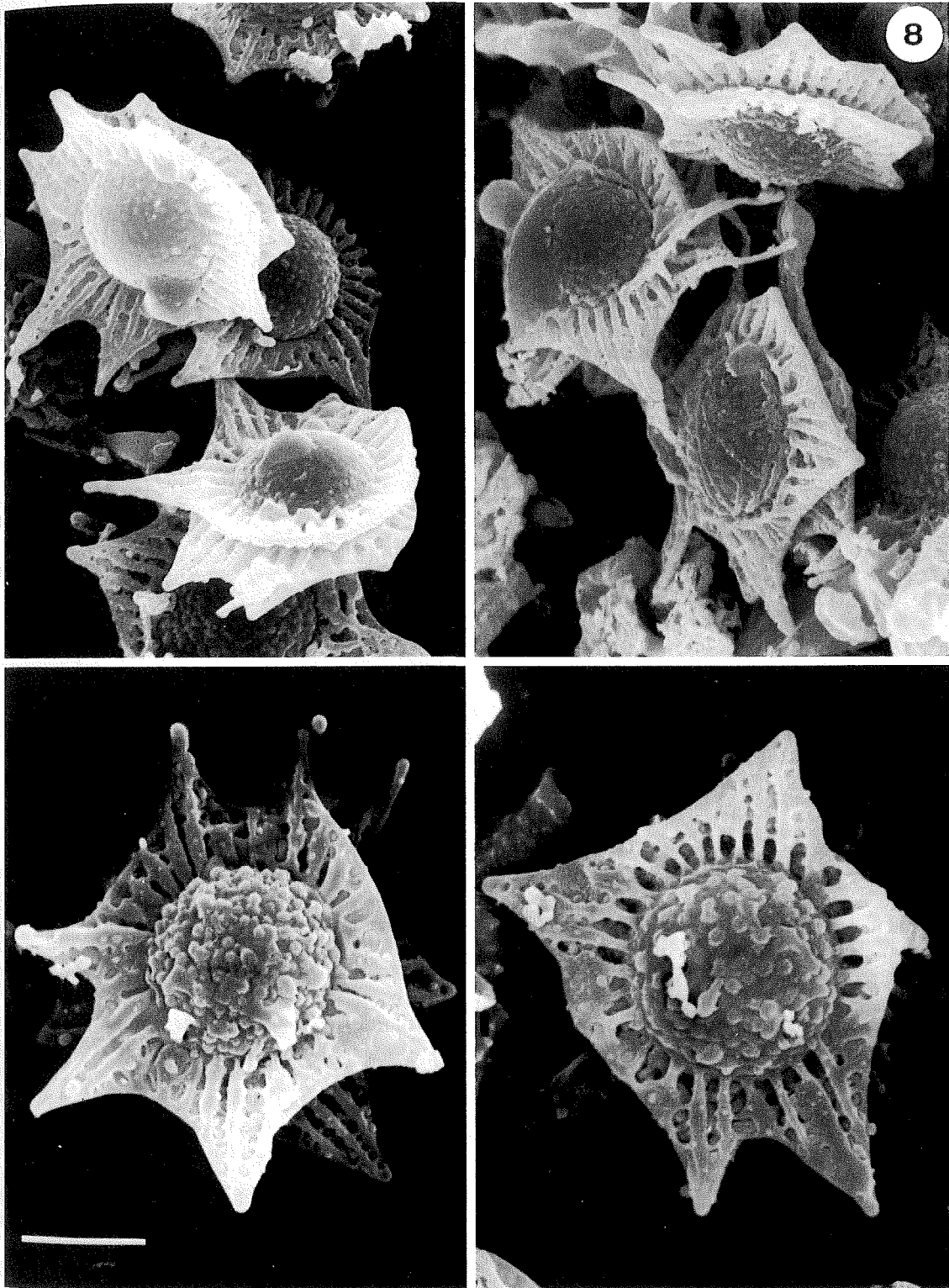


FIG. 8. Scanning electron micrographs of *Emericella pluriseminata* ascospores. Scale bar = 5  $\mu$ m.