

1 The genus *Thielavia* Zopf (Chaetomiaceae, Sordariales) is characterized by
2 spherical, non ostiolate ascomata, with a thin peridium, and one-celled, darkly
3 pigmented ascospores. Revisions of this genus are due to Mouchacca (1973),
4 Malloch and Cain (1973) and Arx et al (1988). Arx (1973) excluded *T. sepedonium*
5 Emmons and other similar species with ascospores with two germ pores and
6 *Myceliophthora* Constantin anamorphs, and erected the genus *Corynascus* Arx to
7 accommodate these species. The last, most comprehensive, revision is due to Arx
8 et al (1988) who accepted 14 species. Later, two more species have been
9 described (Chen and Chen 1996, Ito et al 1998). Here we describe two new
10 species recently isolated from Easter Island and Indian soils respectively.

11

12 MATERIALS AND METHODS

13

14 Indian soil samples were collected close Jaipur, state of Rajasthan. It is a tropical
15 semiarid region dominated by a hot climate. The average temperature is 23 C in
16 winter and 35 C in summer, and the total annual precipitation is about 900 mm.
17 Vegetation is mainly grasses and shrubs. Easter Island soil samples were collected
18 near Hanga-Roa city. It is a triangular, volcanic, semiarid island of 162 km² located
19 in the middle of the Pacific Ocean. The vegetation is composed mainly of grasses,
20 with reduced forest masses which are composed of a few imported trees, such as
21 *Eucaliptus* spp. and *Melia azederach* L. The area is dominated by a subtropical
22 maritime climate. The average temperature is 17.8 C in winter and 23.7 C in
23 summer. The total annual precipitation is about 1140 mm, with no dry season.
24 Collections were taken mainly from the superficial layer of soil with sterilized
25 polyethylene bags. These were closed with rubber bands and labelled. On their

1 arrival at the laboratory the materials were placed at 4-7 C until used. Approx 1 g of
2 the soil sample was treated with 65% (v/v) ethyl alcohol according to Warcup and
3 Baker (1963). The suspensions were cultured on tap water agar (TWA; agar, 20 g;
4 tap water, 1000 ml; home-made) and incubated at 42 C under 12 h of darkness
5 alternating with 12 h of cool white fluorescent light. The morphological study was
6 performed growing the isolates on oatmeal agar (OA; Difco), potato carrot agar
7 (PCA; potatoes, 20 g; carrot, 20 g; agar, 20 g; tap water, 1000 ml; prepared by
8 ourselves), potato dextrose agar (PDA; Difco) and malt extract agar (MEA; Difco) at
9 15 C, room temperature (22-25 C), 37 C, and 45 C, under 12 h of darkness
10 alternating with 12 h of cool white fluorescent light. Color notations in parentheses
11 are from Kornerup and Wanscher (1984). The measurement of the structures was
12 performed on water and lactophenol. Photomicrographs were obtained with a Leitz
13 Dialux 20 EB microscope. Scanning electron microscopy techniques were
14 described previously by Figueras and Guarro (1988).

15
16 The strains sequenced are shown in the Table I. *Gelasinospora bonaerensis*
17 Stchigel & Guarro (Stchigel et al 1998) was used as outgroup. Fungal DNA was
18 isolated as described by Estruch et al (1989) with some modifications (Guillamón et
19 al 1996). The strains were grown at 28 C in Sabouraud broth (Difco) in
20 Ehrlenmeyer flasks shaken at 20 rpm. The mycelium was collected by filtration
21 through nylon mesh (42 µm pore size), washed with distilled water, blotted with
22 paper towels, frozen with liquid nitrogen and ground to a fine powder with a mortar
23 and pestle. The powder was incubed for 1 h at 65 C in 2 ml of extraction buffer
24 (80.2 M TrisHCl pH 8.0, 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). The lysate was
25 extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution (25:24:1) and DNA was

1 recovered by isopropanol precipitation. The pellet was washed with 70% v/v
2 ethanol, dried under vacuum and resuspended in TE buffer (10 mM TrisHCl pH
3 8.0, EDTA 1mM). The rDNA ITS region containing ITS1 and ITS 2 and the
4 intervening 5.8S rRNA gene were amplified as described by Gené et al (1996), by
5 using a Perkin Elmer 2400 thermal cycler (Perking Elmer Cetus corporation,
6 Emeryville, California). The primers ITS5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-
7 3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al 1990) were used.
8 The amplification program consisted of pre-denaturalisation at 94-6 C for 5 min, 30
9 cycles at 95 C for 30 sec, 50 C for 1 min and 72 C for 1 min, and final incubation at
10 72 C for 7 min to complete the last extension. The final products were resolved by
11 electrophoresis in a 2% agarose MP gel (Boehringer Mannheim), and cleaned
12 following the GENE CLEAN II protocol (BIO 101). The molecular weights of
13 amplified DNA were estimated by comparison with 100 bp DNA leader (Gibco BRL)
14 standard lane. The protocol Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit
15 (Applied Biosystems, Gouda) was used for sequencing. Reactions were performed
16 using the primers ITS5 and ITS4 (White et al 1990) and were run on a 310 DNA
17 sequencer (Applied Biosystems). The sequences published in this paper were
18 aligned using the Clustal W, version 1.5, of multiple sequence alignment computer
19 program (Thompson et al 1994). Cladistic analyses using the neighbor-joining
20 method (Saitou and Nei 1987) with confidence values for individual branches were
21 determined by bootstrap analyses (500 pseudoreplicates), and the parsimony-
22 heuristic method were performed with the MEGA 1.0 computer program (Kumar et
23 al 1993). The nucleotide composition, the observed frequencies from pairwise
24 comparisons and the alignment gap sequences were performed with the MEGA

1 1.0 computer program. The EMBL accession numbers of the sequences are in
2 Table I.

3
4 TAXONOMY

5
6 ***Thielavia intermedia*** Stchigel et Guarro, sp. nov. Figs. 1-8

7 *Mycelium* ex hyphis hyalinis vel brunneis, ramosis, anastomosans, septatis,
8 1--5 μm diam composito. *Coloniae* 22--25 C in agar cum decocto tuberorum et
9 carotarum crescentes supra 70 mm diam post 14 d, brunneae, expansae, planae,
10 granulosa; reversum brunneum; sine exsudatum. *Ascomata* superficialia vel
11 immersa, globosa, non-ostiolata, translucida, atrobrunnea vel nigrae, glabrae, 130--
12 300 μm diam., *peridium* 7--8 stratorum compositum, 10--15 μm crassum, ex
13 textura epidermoidea vel textura intricata compositum; *paraphisibus* nullis. *Asci*
14 octospori, sub-globosi vel late ellipsoidei, brevi-stipitati, 30--40 x 22--30 μm ,
15 tenuitunicati, evanescentibus. *Ascosporae* obovatis vel limoniformis, brunneae,
16 laevis, 12--17 x 9--12 μm , cum poro germinalibus apicalis unicus, protrudente.
17 *Status conidialis* nullis.

18
19 *Mycelium* composed of hyaline to brown, branched, anastomosing, septate,
20 smooth hyphae, 1--5 μm broad. *Colonies* on PCA attaining a diam over 70 mm in
21 14 d at room temperature, brown (M 6E4), expanding, flat, granulose due to
22 ascomata production; the reverse present the same color than the surface; exudate
23 and soluble pigment absent. *Ascomata* superficial to immersed, globose,
24 nonostiolate, translucent, dark brown to black, glabrous, 130--300 μm diam;

1 *peridium* 7--8-layered, 10--15 μm thick, with *textura epidermoidea* to *textura*
2 *intrincata*, composed of thickened, brown to dark brown, irregular cells, 4--15 x 3--
3 13 μm ; *paraphyses* absent. *Asci* 8--spored, subglobose to broadly ellipsoidal, short-
4 stipitate, 30--40 x 22--30 μm , thin-walled, evanescent. *Ascospores* obovate to
5 limoniform, hyaline when young and dark brown when mature, one-celled, smooth
6 walled, 12--17 x 9--12 μm , with one distinctive, apical, protruding, 1 μm diam, germ
7 pore. *Anamorph* not observed. *Colonies* on OMA growing at room temperature
8 show the same characteristics as those on PCA. *Colonies* on MEA growing at room
9 temperature, attaining a diam over 70 mm in 14 d, raw umber (M 5F8), expanding,
10 flat to slightly cottony, granulose by *ascomata* production; exudate hyaline; reverse
11 raw umber (M 5F8); soluble pigment orange yellow. *Colonies* on PDA growing at
12 room temperature, attaining a diam over 70 mm in 14 d, yellowish white to greyish
13 yellow (M 4A2 to 4B3), cottony, zonate; exudate hyaline; reverse raw umber to
14 deep yellow (M 5F8 to 4A8); soluble pigment orange yellow. *Ascomata* sterile
15 produced. Thermotolerant. At 37 C growing rapidly, producing white colonies,
16 *ascomata* absent. At 45 C and at 15 C growing scarcely, producing white colonies;
17 *ascomata* absent. No growth below 12 C.

18

19 *Specimens examined*. INDIA: JAIPUR (26°N 75°E), from soil, 29-X-1995,
20 col. J. Guarro, isol. A. M. Stchigel (IMI 370868:HOLOTYPE, FMR 5594:ISOTYPE).

21 The main features of the *Thielavia intermedia* ITS1-2 and 5.8S rDNA region
22 sequence are: 498 bp; 117 A; 152 C; 124 G and 105 T. The location of ITS1 region
23 is from nucleotide 7 to 154, the gene 5.8S rRNA from nucleotide 155 to 328 and the
24 ITS2 region from nucleotide 329 to 465.

1 *Thielavia intermedia* shows certain similarities with *T. fragilis* (Natarajan) v.
2 Arx and *T. ovispora* Pidoplichko *et al.* All them have obovate ascospores, however,
3 they are smaller in *T. fragilis* (11--14 x 6--7 μm) and in *T. ovispora* (8--10 x 5.5--6.5
4 μm).

6 ***Thielavia rapa-nuiensis* Stchigel et Guarro, sp. nov.** Figs. 9-16

7 *Mycelium* ex hyphis sub-hyalinis vel brunneis, ramosis, anastomosans,
8 septatis, 2--5 μm diam composito. *Coloniae* 22-25 C in PCA crescentes ad 35--45
9 mm diam post 14 d, fusco-grisae, expansae, planae, granulosae; reversum fusco-
10 griseum; exsudatum hyalinum. *Ascomata* superficialia, globosa, non-ostiolata,
11 translucida, brunnea, glabrae, 40--250 μm diam; *peridium* 3--5-stratorum
12 compositum, 5--10 μm crassum, ex textura epidermoidea compositum;
13 *paraphisibus* nullis. *Asci* octospori, sub-globosi vel late ellipsoidei, brevi-stipitati, 35-
14 -55 x 25--40 μm , tenuitunicati, evanescentibus. *Ascosporae* late fusiformis,
15 brunneae vel fusco-brunneae, laevis, 12--22 x 8--12 μm , cum poro germinalibus
16 sub-apicalis vel lateralis unicus. *Status conidialis* nullis.

17 *Mycelium* composed of subhyaline to brown, branched, anastomosing,
18 septate, smooth hyphae, 2--5 μm broad. *Colonies* on PCA attaining a diam of 35--
19 45 mm in 14 d at room temperature, dark grey, expanding, flat, granulose by
20 *ascomata* production; exudate hyaline and soluble pigment, when present, olive;
21 reverse dark grey. *Ascomata* superficial, globose, non ostiolate, translucent, brown,
22 glabrous, 40--250 μm diam; *peridium* 3--5-layered, 5--10 μm thick, with *textura*
23 *epidermoidea*, composed of light brown, irregular cells, 3--18 x 3--13 μm ;
24 *paraphyses* absent. *Asci* 8--spored, subglobose to broadly ellipsoidal, 35--55 x 25--

1 40 μm , thin-walled, evanescent. *Ascospores* broadly fusiform, hyaline when young
2 and brown to dark brown when mature, one-celled, smooth walled, 12--22 x 8--12
3 μm , with one sub-terminal to medial distinctive germ pore, 1--2 μm diam. *Anamorph*
4 absent. *Colonies* on OMA growing at room temperature similar to those shown on
5 PCA, attaining a diam upon 70 mm in 14 d. *Colonies* on PDA growing at room
6 temperature, attaining a diam over 70 mm in 14 d, white to dark grey, expanding,
7 felty to cottony, radiate, sulcate, and granulose by *ascomata* production; exudate
8 pale yellow; reverse olive brown to deep yellow (M 4F8 to M 4A6); soluble pigment
9 orange yellow. *Colonies* on MEA similar to those growing on PDA, but not sulcate
10 and slightly radiate. Thermotolerant. At 37 C and at 42 C, growing rapidly,
11 producing white *colonies* and fertile *ascomata*; at 45 C growing rapidly, without
12 production of *ascomata*. At 15 C growing scarcely, without production of *ascomata*.
13 No growth below 12 C.

14 *Specimens examined*. CHILE. EASTER ISLAND: Hanga-Roa (27.1°S
15 109.4°W), from soil, 15-IX-1995, col. L. Zaror, isol. A. M. Stchingel (IMI
16 374725:HOLOTYPE, FMR 5875:ISOTYPE).

17 The main features of the *Thielavia rapa-nuiensis* ITS1-2 and 5.8S rDNA
18 region sequence are: 529 bp; 117 A; 158 C; 139 G and 115 T. The location of the
19 ITS1 region is from nucleotide 7 to 1173, the gene 5.8S rRNA from nucleotide 174
20 to 348 and the ITS2 region from nucleotide 349 to 493.

21

22 *Thielavia aegyptiaca* Moustafa & A. Wahid, *T. appendiculata* Srivastava et
23 al, *T. arenaria* Mouchacca, *T. coactilis* Nicot, *T. hyrcaniae* Nicot and *T.*
24 *subtermophila* Mouchacca, also have *ascospores* with a subapical to lateral germ
25 pore. However, the *ascospores* of *T. rapa-nuiensis* are bigger than those of *T.*

1 *aegyptiaca* (13--14 x 8--10 μm), *T. arenaria* (9--12.5 x 6--7.5 μm), *T. coactilis* (9--
2 12.5 x (5)6--7 μm) and *T. hyrcaniae* (12--15 x 5--6 μm). *Thielavia appendiculata*
3 and *T. subtermophila* have ascospores of similar size to those of the new species,
4 but *T. appendiculata* have setose ascomata and *T. subtermophila* shows ascomata
5 associated with numerous aleurioconidia which are absent in *T. rapa-nuiensis*.
6 Moreover, *T. rapa-nuiensis* is the only species of the genus that has a germ pore in
7 a medial position in the ascospores.

9 RESULTS

11 The phylogram obtained from the analysis of the ITS1-2 sequences using
12 the neighbor-joining method (Fig. 17) in general has clades obtained with low
13 bootstrap values. Some of the terminal clades received consistent statistical
14 support which demonstrated some species of the genus are genetically very close.
15 The new proposed species *Thielavia intermedia* constituted a basal clade.

17 DISCUSSION

18 The main clade is formed by the rest of the studied species which was divided into
19 three sister clusters supported by bootstrap index of 56%. One grouped the
20 species *Thielavia microspora* Mouchacca, *T. subtermophila* Mouchacca and *T.*
21 *arenaria* Mouchacca, receiving a bootstrap value of 78%. These species have
22 ellipsoidal ascospores and aleurioconidia. The terminal group constituted by *T.*
23 *subtermophila* and *T. arenaria* received a bootstrap value of 100%. Both species
24 have a thermotolerant habit and ascospores with a subapical to lateral germ,
25 differentiated only in their size. *Thielavia ovispora* Pidoplichko et al formed a

1 monospecific clade. In a previous study this species was considered
2 indistinguishable from *T. microspora* (Arx et al 1988). However, both species are
3 different in 98 bp and in our study the latter clustered with *T. subtermophila* and *T.*
4 *arenaria*. The third cluster was formed of the remaining species. It is composed by
5 two clades that received a low statistical support (49%). One is composed of *T.*
6 *tortuosa* Uragawa & Sugiyama, *T. australiensis* Tansey & Jack and *T. basicola*
7 Zopf. These species are morphologically distant, especially *T. tortuosa* with its
8 peculiar combination of cylindrical, sinuouse asci and big ascospores with a
9 subapical to lateral germ pore. The other clade was successively ramified forming
10 several branches also with a low confidence value. However, three groups received
11 a strong statistical support. In one of them the new species *Thielavia rapa-nuiensis*
12 was placed together with *T. terricola* var. *terricola* (Gilman & Abbott) Emmons, *T.*
13 *hyrcaniae* Nicot and *T. terricola* var. *minor* (Rayss & Borut) C. Booth. They formed
14 a well defined clade, supported by a bootstrap index of 98%. On the basis of the
15 morphology of the two varieties of *T. terricola* (ellipsoidal ascospores with a terminal
16 germ pore) we expected them to cluster jointly, but not with the other two species of
17 the clade which show clearly distinct features. *Thielavia rapa-nuiensis* is easily
18 distinguishable by its fusiform ascospores with a lateral to medial germ pore, and its
19 thermotolerant habit, while that *T. hyrcaniane* has hairy ascomata and ellipsoidal
20 ascospores with a subapical-lateral germ pore, and a mesophilic habit. In another
21 clade, with a bootstrap index of 78%, the two morphologically related species *T.*
22 *appendiculata* Srivastava et al and *T. coactilis* Nicot were placed, which show
23 ellipsoidal to slightly fusiform ascospores with a subapical germ pore. However,
24 *Thielavia appendiculata* can be differentiated from *T. coactilis* by the presence of
25 setose ascomata, larger ascospores and the absence of chlamydospores.

1 *Melanocarpus thermophilus* Guarro et al and *Thielavia minuta* (Cain) Malloch &
2 Cain grouped together with a high bootstrap support (99%) as it was expected.
3 They show striking morphological similarities such as short, septate and rugose
4 setae, peridium with *textura epidermoidea* and 8-spored, broadly ovoid asci,
5 differing only in the temperature habit and in the morphology of the ascospores
6 (Guarro et al 1996). The differences between *Melanocarpus* Arx and *Thielavia* Zopf
7 are based in the peridium type (*textura angularis* in *Melanocarpus* and *textura*
8 *epidermoidea* in *Thielavia*), the morphology of the ascospores (oblate, thick-walled
9 and opaque in *Melanocarpus* and fusiform, ellipsoidal or ovate, thin-walled and
10 brownish in *Thielavia*), and in their anamorphs when are present (*Chrysonilia*-like
11 arthroconidia in *Melanocarpus* and *Chrysosporium*-like aleurioconidia in *Thielavia*)
12 (Arx et al 1988). However, it is probable that future molecular studies will
13 demonstrate that they are not too genetically distinct.

14 The phylogram obtained using the parsimony-heuristic method (Fig. 18)
15 shows a few differences from that obtained with the neighbor-joining method. The
16 same clades that received a strong statistical support (more than 7 % bootstrap
17 value) using the NJ method were shown here. *Thielavia rapa-nuiensis* also
18 clustered with *T. terrestris*. However, the basal clade is now represented by *T.*
19 *ovispora*, and *T. intermedia* formed a clade with *T. fragilis*.

20 This study confirmed that the ITS region is highly conserved in Sordariales
21 as we indicated in previous studies (Stchigel et al 1998, 2000), and that it is not
22 very useful to establish phylogenetical relationships at species level. We are
23 currently evaluating the usefulness of the LSU rDNA gene for this purpose.

1 ACKNOWLEDGEMENTS

2

3 This work was supported by grant PM95-0160 from CICYT (Ministerio de
4 Educación y Ciencia) and the Fundació Ciència i Salut, Reus, Spain. The authors
5 are indebted to L. Zaror (Universidad de Valdivia) for providing the Chilean soil
6 samples and to the curators of CBS, IFO and IMI culture collections for
7 kindly providing fungal cultures used in this study. The senior author is grateful for
8 the fellowship grant from Universitat Rovira i Virgili, Spain.

9

10 LITERATURE CITED

11

12 Arx JA von. 1973. Ostiolate and non-ostiolate Pyrenomycetes. Proceeding of the
13 Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen 76:289--296.

14

15 Arx JA von, Figueras MJ, Guarro J. 1988. Sordariaceous ascomycetes without
16 ascospore ejaculation. Nova Hedwigia 94:1--104.

17

18 Chen K-Y, Chen Z-C. 1996. *Thielavia pingtungia* sp. nov., a thermophilic
19 ascomycete from Taiwan. Mycotaxon 60:241--247.

20

21 Estruch JJ, Antuña C, Ferrer S, Ramón D. 1989. Aislamiento de DNA genómico de
22 *Trichophyton mentagrophytes*. Rev Iber Micol 6:62--66.

23

24 Figueras MJ, Guarro J. 1988. A scanning electron microscopic study of ascoma
25 development in *Chaetomium malaysiense*. Mycologia 80:298--306.

1 Gené J, Guillamón JM, Guarro J, Pujol I, Ulfig K. 1996. Molecular characterization,
2 relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella*
3 species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. Anton
4 Leew Int J G 70:49--57.

5
6 Guarro J, Abdullah SK, Al-Bader SM, Figueras MJ, Gené, J. 1996. The genus
7 *Melanocarpus*. Mycol Res 100: 75--78.

8
9 Guillamón JM, Cano J, Ramón D, Guarro J. 1996. Molecular differentiation of
10 *Keratinomyces (Trichophyton)* species. Anton Leew Int J G 69:223--227.

11
12 Kornerup A, Wanscher, JH. 1984. Methuen Handbook of Colour. 3rd. ed. London:
13 Eyre Methuen. 252 p.

14
15 Kumar S, Tamura K, Nei M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics
16 analysis, v. 1.0. Pennsylvania: The Pennsylvania State University.

17
18 Ito T, Okane I, Nakagiri A. 1998. *Thielavia aurantiaca*, a new species from Japanese
19 soil. Mycoscience 39:93--96.

20
21 Malloch D, Cain, RF. 1973. The genus *Thielavia*, Mycologia 65:1055--1077.

22
23 Mouchacca J. 1973. Les *Thielavia* des sols arides: espèces nouvelles et analyse
24 générique. Bull Soc Mycol Fr 89:295--311.

- 1 Saitou N, Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for
2 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406--425.
- 3
- 4 Stchingel AM, Cano J, Guarro J. 1998. A new species of *Gelasinospora* from
5 Argentina. *Mycol Res* 102:1405--1408.
- 6
- 7 Stchingel AM, Sagués M, Cano J, Guarro J. 2000. Three new thermotolerant
8 species of *Corynascus* (Sordariales, Chaetomiaceae) from soil, with a key of the
9 known species. *Mycol Res* (in press, MS 99--218).
- 10
- 11 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: Improving the
12 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,
13 positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*
14 22:4673--4680.
- 15
- 16 Warcup JH, Baker KF. 1963. Occurrence of dormant ascospores in soil. *Nature*
17 197:1317--1318.
- 18
- 19 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of
20 fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky
21 JJ, White TJ. eds. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. San
22 Diego: Academic Press. 482 p.
- 23
- 24
- 25

1 Figs. 1-3. *Thielavia intermedia* FMR 5594. 1. Detail of the peridium. 2. Asci
2 with immature ascospores. 3. Ascospores. Bar=10 μm .

3
4 Figs. 4-8. *Thielavia intermedia* FMR 5594. 4. Detail of the peridium. 5. Asci.
5 6, 7. Mature ascospores. 8. Ascospores (SEM). Bars, 4-7=15 μm ..8=12.5 μm .

6
7 Figs. 9,10. *Thielavia rapa-nuiensis* FMR 5875. 9. Detail of the peridium. 10.
8 Ascospores. Bar=10 μm .

9
10 Figs. 11-16. *Thielavia rapa-nuiensis* FMR 5875. 11. Ascoma. 12-15.
11 Ascospores. Note the germ pore in lateral to medial position. 16. Ascospores. Note
12 the ascospore showing the germ pore (arrow) (SEM). Bars, 11-15=10 μm . 16=10
13 μm .

14
15 Fig. 17. Neighbor-joining tree based on the nucleotide sequences of ITS 1-2
16 regions. Branch lengths are proportional to distance. Scale: each - is aprox.equal to
17 the distance of 0.00581. Bootstrap replication frequencies are indicated above the
18 internodes.

19
20 Fig. 18. Parsimony-heuristic tree based on the nucleotide sequences from
21 ITS 1-2 regions.

22
23
24 ¹Email: umb@astor.urv.es

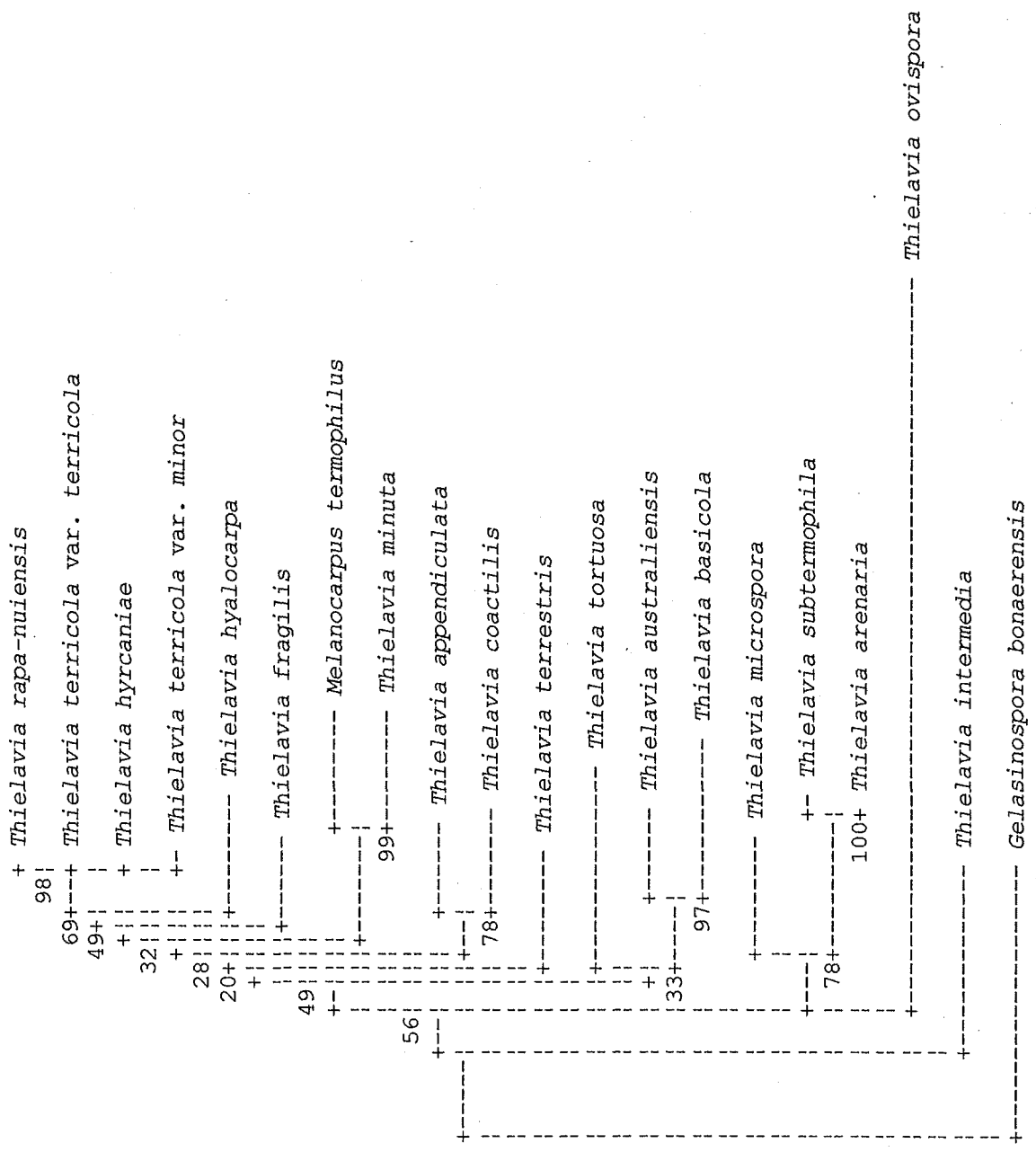


Fig. 17

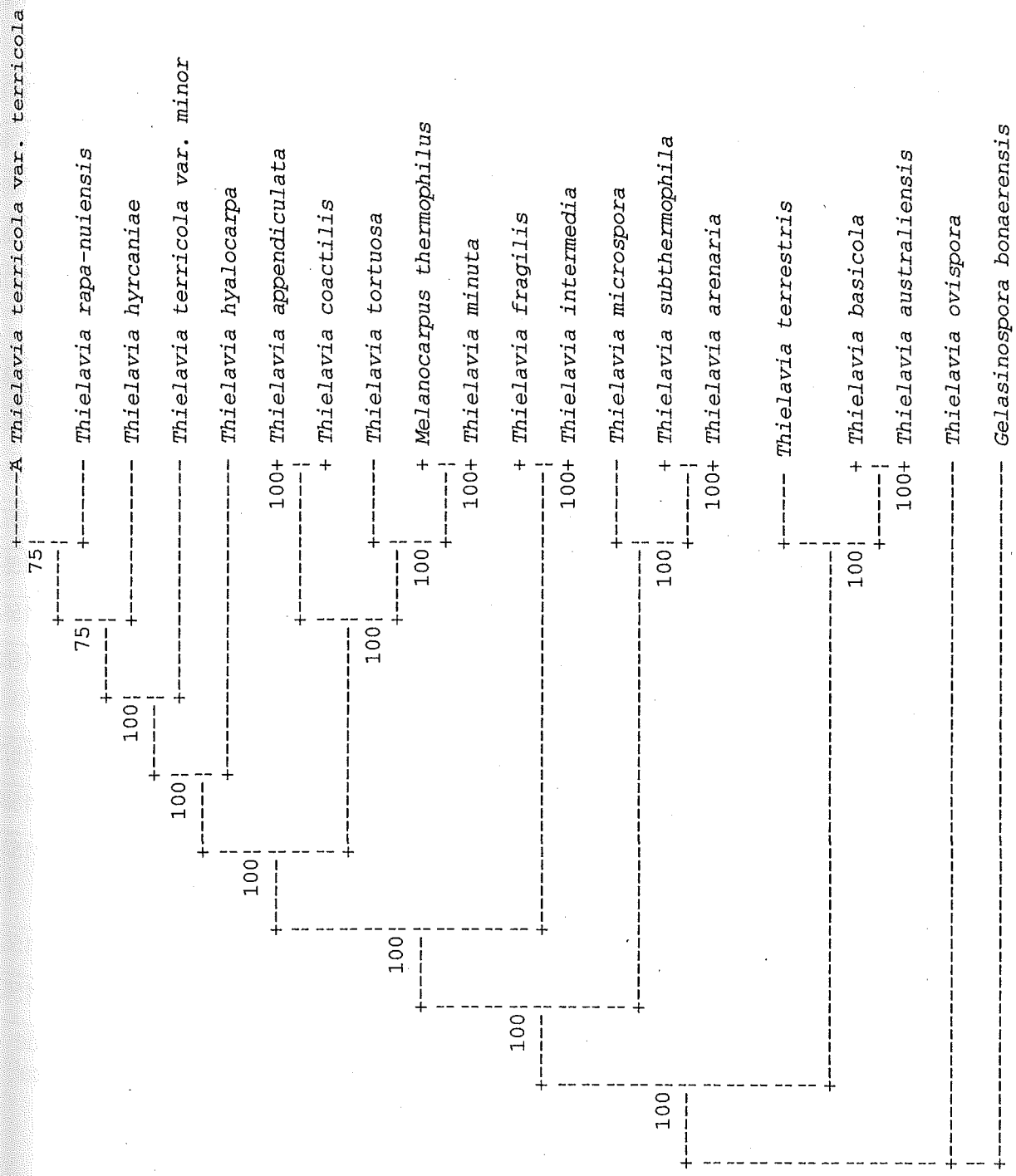
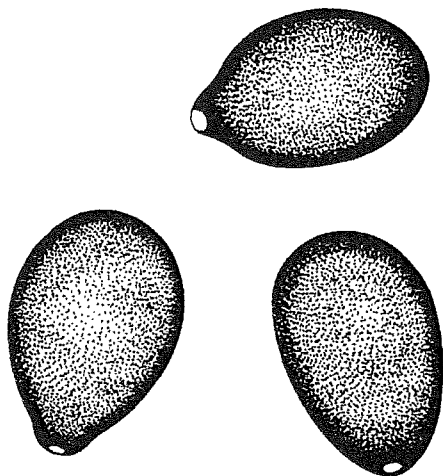
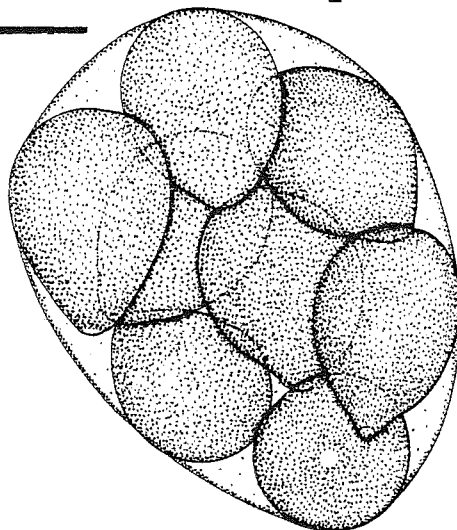
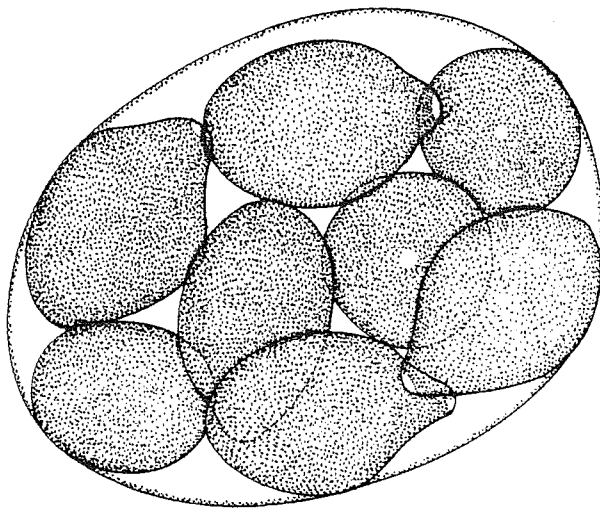
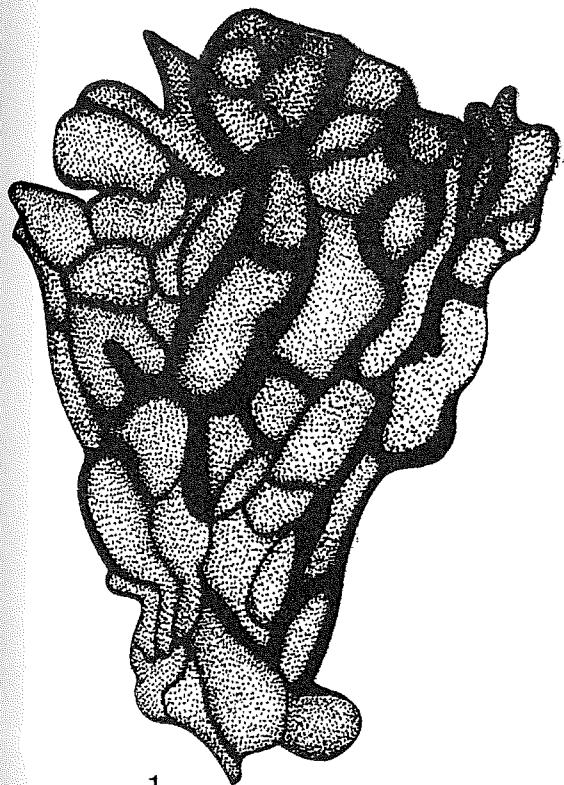


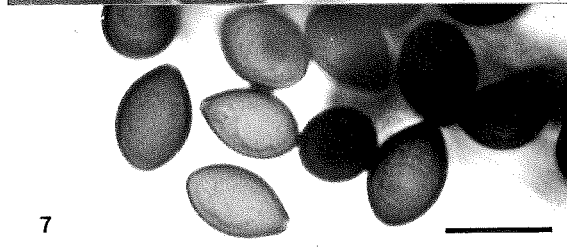
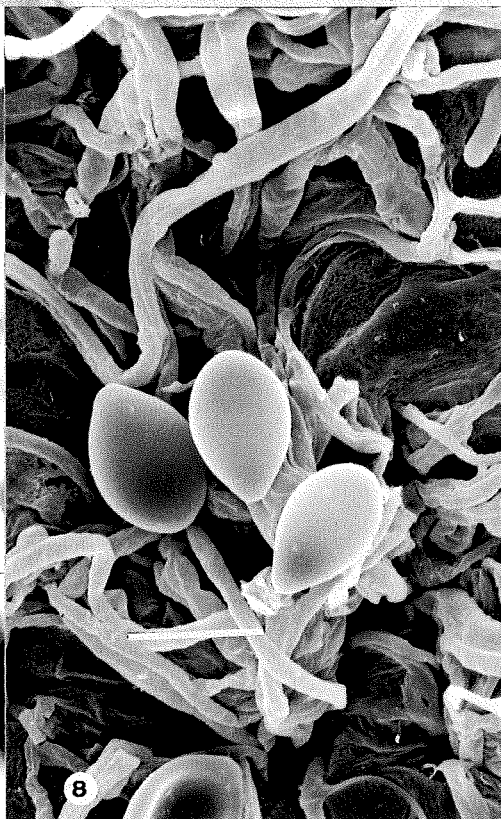
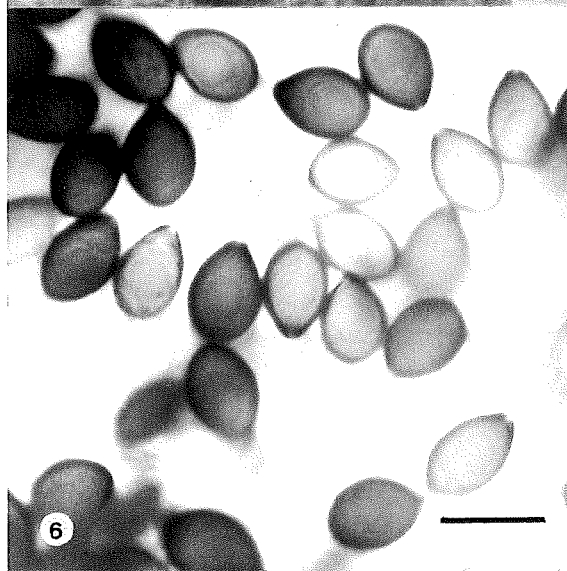
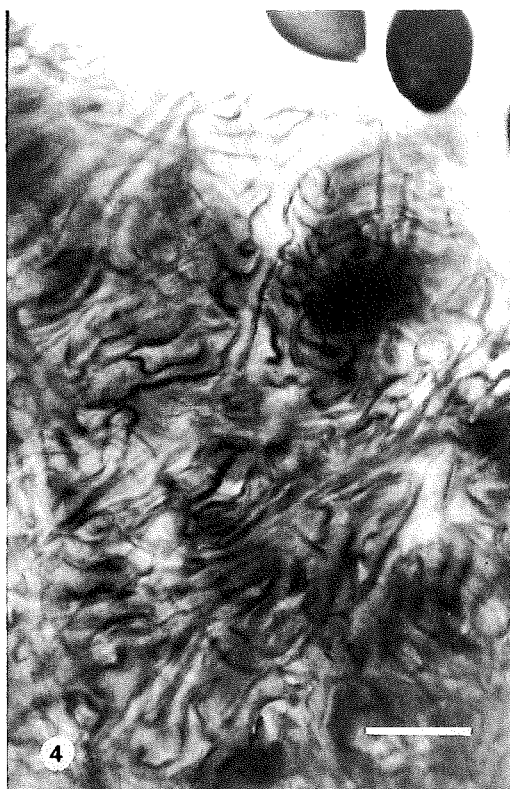
Fig. 18

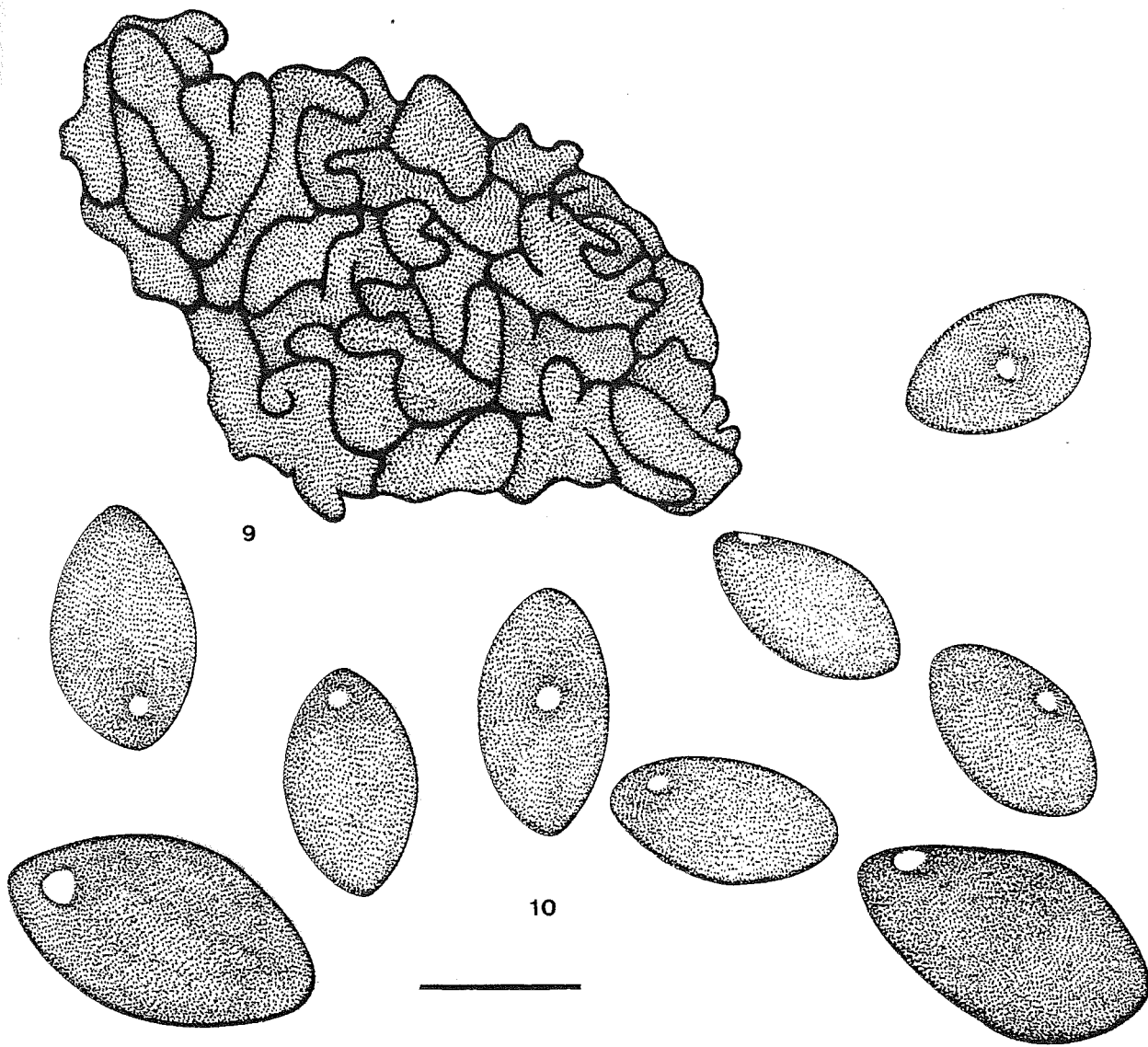
1 Table I. List of strains, sources and sequences used in the molecular study.

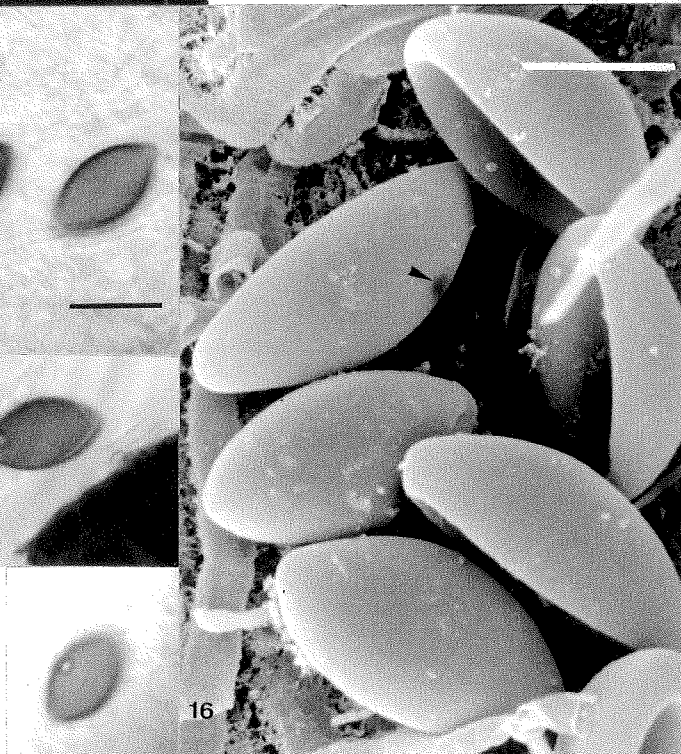
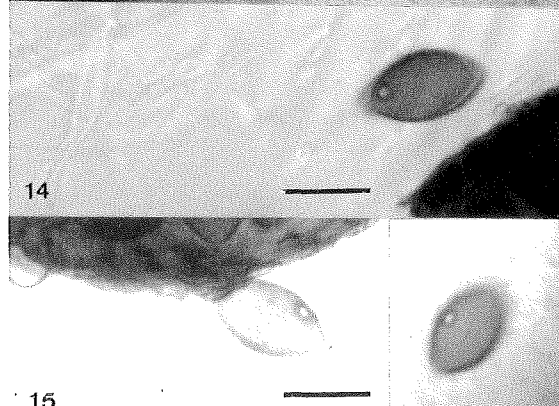
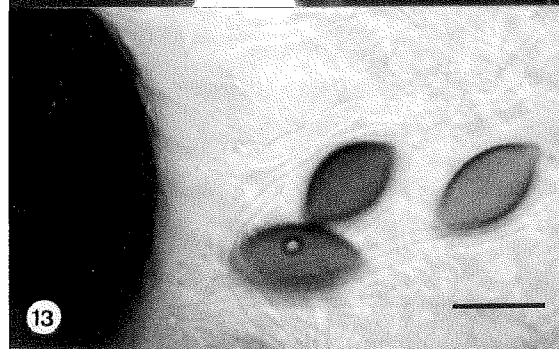
Taxon	Origen	Strain nº	EMBL nº
<i>Gelasinospora bonaerensis</i>	soil; Argentina	FMR 5962.	AJ002029
<i>Melanocarpus thermophilus</i>	soil; Irak	FMR 6190	AJ271586
<i>Thielavia appendiculata</i>	dung of rabbit; UK	CBS 731.68	AJ271584
<i>T. arenaria</i> (T)	desert soil; Egypt	CBS 507.74	AJ271576
<i>T. australiensis</i> (T)	nesting material of incubator bird; Australia	CBS 493.74	AJ271590
<i>T. basicola</i>	on <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> ; Switzerland	CBS 229.82	AJ271591
<i>T. coactilis</i>	salt marsh; Kuwait	IMI 182707	AJ271585
<i>T. fragilis</i> (T)	rhizosphere of <i>Pennisetum thyphoideum</i> ; India	IMI 169641	AJ271578
<i>T. hyalocarpa</i>	desert soil; Egypt	CBS 646.74	AJ271583
<i>T. hyrcaniae</i>	Niger	CBS 773.85	AJ271581
<i>T. intermedia</i> , sp. nov.	soil; India	FMR 5594	AJ271588
<i>T. microspora</i>	saline desert soil; Kuwait	CBS 808.73	AJ271577
<i>T. minuta</i>	cotton jacket; Switzerland	CBS 541.76	AJ271587
<i>T. ovispora</i> (T)	root of <i>Avena sativa</i> ; Ukraine	CBS 165.75	AJ271593
<i>T. rapa-nuiensis</i> , sp. nov.	soil; Easter Island, Chile	FMR 5875	AJ271580
<i>T. subthermophila</i>	on <i>Vigna radiata</i> ; India	IMI 319643	AJ271575
<i>T. terrestris</i>	ground soil;	IFO 9732	AJ271589
<i>T. terricola</i> var. <i>terricola</i>	on <i>Polygala senega</i> ;	IFO 30068	AJ271579
<i>T. terricola</i> var. <i>minor</i>	on leaf of <i>Elaeis guineensis</i> ;	CBS 611.74	AJ271582
<i>T. tortuosa</i>	soil; India	FMR 5780	AJ271592

2 (T) = type species; CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures; FMR = Facultad de
 3 Medicina de Reus; IFO = Institute for Fermentation, Osaka; IMI = International Mycological
 4 Institute (CABI); European Molecular Biology Laboratory (EMBL).









2. ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO TÉCNICAS DE ACTIVACIÓN DE ASCOSPORAS PARA EL AISLAMIENTO DE ASCOMICETOS DEL SUELO

Los resultados obtenidos, después de ensayar las cinco técnicas de activación propuestas (la acción del calor, del etanol, del 2-furfuraldehído, de la acetona y del ácido acético) (véase MATERIALES Y MÉTODOS, apartado 2.1.) sobre diecinueve muestras de tierra, figuran en las Tablas 3 y 4. Las diferentes técnicas se realizaron de forma paralela. En la Tabla 3 se indica el número total de especies que se identificaron en cada muestra, variando entre 0 y 4 para el ácido acético, 0 y 5 para el calor, el etanol y el 2-furfuraldehído, y 0 y 6 para la acetona. El número de ascomicetos aislados por muestra varió mucho según la técnica usada. La técnica de activación con etanol fue con la que se obtuvo el mayor número de muestras positivas, permitiendo recuperar ascomicetos en 17 muestras. La media más baja del número de especies recuperadas por muestra correspondió a la técnica de activación con 2-furfuraldehído (1.40), siendo el valor más alto para la técnica de activación con acetona (2.26). La Tabla 4 muestra la frecuencia relativa de recuperación de cada especie, es decir, el número de veces en que se aisló una especie. Con excepción de *Sordaria fimicola* (Roberge) Cesati & de Notaris, el número de cepas de ascomicetos aislados fue muy variable, oscilando entre 0 y 10 para el ácido acético, 0 y 8 para el calor, el etanol y la acetona, y 0 y 6 para el 2-furfuraldehído. El mayor número de especies (21) y de cepas (46) de ascomicetos correspondió a la activación con acetona, mientras que el menor número (13 especies y 24 cepas) correspondió a la técnica de activación con 2-furfuraldehído.

Cuando se estudiaron las medias (Tablas 3 y 4) empleando la prueba t de Student, no se

observaron diferencias significativas entre los distintos métodos de activación, a excepción del par 2-furfuraldehído / acetona, obteniéndose un valor $t = -2.45$, con una significación de 0.025 para los datos de la Tabla 3, y un valor $t = -2.02$, con una significación de 0.05 para los datos de la Tabla 4. Esto implica que, la media de especies por muestra de tierra, así como la media de la frecuencia de recuperación de las especies, es comparativamente similar entre las distintas técnicas, con excepción de la técnica del 2-furfuraldehído, que se muestra menos eficiente en ambos casos.

Para conocer el grado de concordancia de los resultados mostrados en las Tablas 3 y 4 se determinó el coeficiente de correlación intraclase (ICC). Los valores que puede adoptar están comprendidos entre -1 y +1, siendo mayor el grado de concordancia entre las diferentes técnicas cuanto más cercano a 1 es el ICC calculado. Los ICC obtenidos fueron los siguientes:

Para los datos de la Tabla 3:

$$\text{ICC} = 0.2043$$

(IC 95% de 0.0349 a 0.4587)

Para los datos de la Tabla 4:

$$\text{ICC} = 0.5770$$

(IC 95% de 0.4213 a 0.7308)

El valor del ICC muestra que el grado de concordancia entre las diferentes técnicas ensayadas, en lo referente al número de total de cepas de cada especie (Tabla 4), fue relativamente alto (ICC = 0.5770), es decir, que la frecuencia relativa con que una determinada especie fue recuperada en cultivo, resultó comparativamente similar entre las técnicas. Sin embargo, cuando el parámetro analizado fue el número de especies recuperadas por muestra (Tabla 3), el grado de concordancia resultó más bajo (ICC = 0.2043), es decir, que el número de especies recuperadas para una muestra de tierra fue diferente entre las distintas técnicas de activación ensayadas.

Tabla 3. Número de especies pertenecientes a la división Ascomycota recuperados a partir de 19 muestras de suelo empleando distintas técnicas de activación.

MUESTRAS	TIPO DE ACTIVACIÓN				
	Calor	Etanol	2-furfural- dehido	Acetona	Ácido acético
B-1	3**	4	2	6	3
P-1	0	1	1	1	1
P-2	0	1	1	2	1
T-1	2	1	2	2	3
T-2	5	5	2	5	2
GLF-1	0	3	0	1	4
GLF-6	4	2	0	2	3
GLF-7	4	3	2	0	1
GLF-8	1	1	0	0	2
GLF-9	0	1	1	3	0
PC-1	3	2	0	0	4
I-19	2	4	1	3	3
I-21	2	3	3	4	2
I-22	5	1	4	4	0
I-37	1	3	2	4	0
CA-6	1	1	1	1	1
CA-7	2	2	0	3	3
CA-16	2	0	0	0	1
CA-13	0	0	5	3	2
Media	1.95	2.00	1.40	2.26	1.89
(IC 95%*)	(1.14 a 2.76)	(1.32 a 2.68)	(0.73 a 2.11)	(1.45 a 3.08)	(1.27 a 2.51)
Mediana	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00
Desviación típica	1.682	1.414	1.427	1.695	1.287

B = Bernal, Argentina; P = Palencia, España; T = Tailandia; GLF = La Mussara - Gorgs de La Febró, España; PC = Faro, Portugal; I = Jaipur, India; CA = Cantabria, España.

* Intervalo de confianza para la media al 95 %

** nº de especies recuperadas en cultivo

Tabla 4. Especies y número de cepas recuperadas al aplicar las distintas técnicas de activación en 19 muestras de suelo.

ESPECIE	TIPO DE ACTIVACIÓN				
	Calor	Etanol	2-furfural- dehido	Acetona	Ácido acético
<i>Anthracobia melaloma</i> (Albertini & Scheinitz: Fries) Boudier	4*	1	0	1	0
<i>Ascodesmis nigricans</i> van Tieghem	0	5	0	2	2
<i>Ascodesmis sphaerospora</i> Batra & Francke-Grosmann	0	2	0	0	1
<i>Ascotricha hispanica</i> , sp. nov.	0	0	0	1	0
<i>Asordaria prolifica</i> (Cailleux) Arx & Guarro	0	0	1	1	0
<i>Byssochlamys nivea</i> Westling	1	0	1	1	0
<i>Corynascus sepedonium</i> (C. W. Emmons) Arx	0	0	1	0	0
<i>Chaetomium bostrychodes</i> Zopf	1	1	0	1	2
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze: Fries	0	1	0	0	1
<i>Dichotomyces cejpii</i> (Milko) D. B. Scott var. <i>cejpii</i>	0	0	0	1	0
<i>Eleutherascus peruvianus</i> Huang	0	1	0	0	0
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuillemin var. <i>nidulans</i>	2	0	1	1	1
<i>Emericella quadrilineata</i> (Thom & Raper) C. R. Benjamin	1	0	2	1	0
<i>Emericella rugulosa</i> (Thom & Raper) C. R. Benjamin	0	0	0	1	0
<i>Emericella variegata</i> Berkeley & Broome var. <i>variegata</i>	1	0	0	0	0
<i>Emericellopsis glabra</i> (van Beyma) Backus & Orpurt	0	0	1	0	1
<i>Emericellopsis terricola</i> van Beyma	0	0	1	0	0
<i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i> D. B. Scott & Stolk	0	1	0	1	0
<i>Eupenicillium javanicum</i> (van Beyma) Stolk & D. B. Scott var. <i>javanicum</i>	0	0	0	0	1
<i>Eupenicillium</i> sp. 1	8	5	4	8	2
<i>Eupenicillium</i> sp. 2	1	1	0	1	0
<i>Eupenicillium</i> sp. 3	1	1	0	1	0
<i>Eurotium rubrum</i> König <i>et al.</i>	0	2	0	2	2
<i>Gelasinospora reticulata</i> (C. Booth & Ebben) Cailleux	2	2	2	0	2
<i>Hamigera avellanea</i> (Thom & Turesson) Stolk & Samson	4	1	0	4	1
<i>Neocosmospora vasinfecta</i> E. F. Smith var. <i>vasinfecta</i>	0	0	0	1	0
<i>Neosartorya</i> sp.	8	8	1	8	5
<i>Neurospora tetrasperma</i> Shear & B. O. Dodge	0	1	1	1	0
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge) Cesati & de Notaris	2	3	6	5	10
<i>Sporormiella minimoides</i> S. Ajmed & Cain	0	2	4	3	2
<i>Talaromyces flavus</i> (Klöcker) Stolk & Samson var. <i>flavus</i>	2	0	0	0	1
TOTAL DE ESPECIES AISLADOS	14	17	13	21	15
TOTAL DE CEPAS AISLADAS	38	38	24	46	34
Media	1.23	1.23	0.84	1.48	1.10
(IC 95%*)	(0.45 a 2.00)	(0.56 a 1.90)	(0.31 a 1.37)	(0.72 a 2.25)	(0.37 a 1.83)
Mediana	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
Desviación típica	2.125	1.839	1.440	1.484	1.970

* número de muestras en las que se aisló la especie.

3. DISCUSIÓN GENERAL

Se han evaluado cinco técnicas de activación de ascosporas con la finalidad de conocer cuáles permitían una mayor recuperación de ascomicetos del suelo en cultivo. El análisis estadístico de los resultados obtenidos con 19 muestras de suelo reveló que los métodos ensayados no mostraban diferencias significativas entre sí respecto al promedio de especies por muestra y a la frecuencia relativa con que las especies eran recuperadas. La única excepción fue la técnica del 2-furfuraldehído, que se mostraba significativamente menos eficiente que la técnica de la acetona. Por otro lado, se observó un bajo grado de concordancia entre las diferentes técnicas cuando se analizaba el número de taxones recuperados por muestra de tierra, si bien ésta mejoraba substancialmente cuando el objeto del análisis era el total de taxones recuperados con independencia de las muestras.

Se han estudiado 1820 muestras procedentes de 17 países y de las Islas Shetland del Sur (región insular de la Antártida), identificándose 164 especies de ascomicetos pertenecientes a 66 géneros (véase ANEXO 2), 14 de las cuales resultaron ser nuevas para la Ciencia, habiéndose recuperado 12 en cultivo puro. Los nuevos taxones, su procedencia, la técnica de activación empleada para su recuperación y la temperatura de incubación se indican en la Tabla 5.

La mayor parte de las nuevas especies (43 %) proceden de la India; Isla de Pascua y Argentina le siguen en orden decreciente con un 14 %. Las tres regiones geográficas presentan, como características en común, un clima templado o cálido con vegetación de tipo paleo o neotropical.

Tabla 5. Relación entre las 14 nuevas especies de ascomicetos de suelo y la procedencia geográfica, la temperatura de incubación y la técnica de activación empleada en su aislamiento.

Especie	Procedencia de la muestra de tierra	Técnica de activación	Temperatura de incubación
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	King George Island, Antártida	ácido acético	11-12 °C
<i>Apiosordaria nigeriensis</i>	Nsukka, estado de Anambra, Nigeria	etanol	22-25 °C
<i>Ascotricha canariensis</i>	La Laguna, Gran Canaria, España	etanol	22-25 °C
<i>Ascotricha hispanica</i>	Palencia, España	acetona	22-25 °C
<i>Corynascus sexualis</i>	Jaipur, estado de Rhajastán, India	2-furfuraldehido	42-43 °C
<i>Corynascus similis</i>	Ajmer, estado de Rhajastán, India	2-furfuraldehido	42-43 °C
<i>Corynascus verrucosus</i>	Quilmes, provincia de Buenos Aires, Argentina	2-furfuraldehido	42-43 °C
<i>Emericella indica</i>	Jaipur, estado de Rhajastán, India	etanol	22-25 °C
<i>Emericella pluriseminata</i>	Jaipur, estado de Rhajastán, India	etanol	22-25 °C
<i>Gelasinospora bonaerensis</i>	Quilmes, provincia de Buenos Aires, Argentina	etanol	22-25 °C
<i>Melanospora collipora</i>	Jaipur, estado de Rhajastán, India	etanol	22-25 °C
<i>Melanospora pascuensis</i>	Hanga-Roa, Isla de Pascua, Chile	etanol	22-25 °C
<i>Thielavia intermedia</i>	Jaipur, estado de Rhajastán, India	etanol	42-43 °C
<i>Thielavia rapa-nuiensis</i>	Hanga-Roa, Isla de Pascua, Chile	etanol	42-43 °C

La activación de ascosporas por acción del 2-furfuraldehído e incubación a 42 °C fue el único método que permitió la recuperación de cepas del género *Corynascus*, permitiendo el aislamiento de tres nuevas especies (Stchigel *et al.*, 2000).

La secuenciación de la región ITS-rDNA y su posterior análisis filogenético se aplicaron en la resolución de varios problemas taxonómicos. En un primer trabajo (Stchigel *et al.*, 1999) permitió establecer que *Emericella indica* Stchigel & Guarro estaba relacionada molecularmente con *E. nidulans* (Eidam) Vuillemin, y que otros dos aislamientos del mismo género, que se caracterizaban por producir ascosporas que “gemaban” dentro de los ascos, tenían una secuencia nucleotídica prácticamente idéntica a la de *E. quadrilineata* (Thom & Raper) C. R. Benjamin. Posteriormente, dicha metodología permitió analizar las relaciones evolutivas entre las especies del género *Corynascus* Arx y miembros de las familias Ceratostomataceae, Chaetomiaceae y Sordariaceae (Stchigel *et al.*, 2000). Se llegó a la conclusión que dicho género debería excluirse de Ceratostomataceae e incluirse en Chaetomiaceae. Sin embargo, las secuencias de las tres nuevas especies y las previamente descritas no mostraron diferencias significativas, con excepción de la especie que formó la rama basal del género (*Corynascus heterothallicus* (v. Klotek) Arx), impidiendo establecer correspondencia alguna entre las características morfológicas y la filogenia del grupo. También se realizó un estudio molecular para establecer la posición taxonómica de un nuevo género propuesto: *Antarctomyces* (Stchigel *et al.*; aceptado). Se secuenció la región ITS-rDNA de varios taxones morfológicamente relacionados, y otros que podían tener algún tipo de relación evolutiva. *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Thelebolus* sp. y *Calypotryma arxii* Boekhout & Spaay formaron un grupo estadísticamente bien soportado, por ello se sugirió que los dos primeros deberían incluirse dentro de la familia Thelebolaceae, a pesar de sus diferencias morfológicas. *Monascella botryosa* Guarro & Arx se agrupó con *Lamprospora*

sp. y *Pyronema domesticum* (Sowerby: Fries) Saccardo, lo que llevaría a su inclusión dentro de la familia Pyronemataceae. Finalmente, un último estudio se realizó para aclarar la posición taxonómica dos nuevas especies dentro del género *Thielavia*, así como para determinar las relaciones evolutivas entre las especies del género (Stchigel *et al.*; sometido). Los resultados fueron un tanto ambiguos, permitiendo tan solo establecer claras correspondencias moleculares y morfológicas entre *Thielavia arenaria* Mouchacca, *T. microspora* Mouchacca y *T. subthermophila* Mouchacca, y entre *Melanocarpus thermophilus* (Abdullah & Al-Bader) Guarro *et al.* y *Thielavia minuta* (Cain) Malloch & Cain. Debido a estos resultados, se concluye que la secuenciación de la región ITS-rDNA en los Sordariales es de utilidad para el estudio de las relaciones evolutivas a nivel de género y familia, pero tiene un valor relativo para solventar la posición taxonómica de una nueva especie, así como para esclarecer las relaciones evolutivas entre especies de un mismo género.

V. CONCLUSIONES GENERALES

1.- Durante tres años se han analizado 1820 muestras de suelo procedentes de 17 países (Argentina, Australia, Brasil, Cuba, Chile, España, India, Irak, Italia, Jordania, México, Nepal, Nicaragua, Nigeria, Portugal, Singapur y Tailandia) y de la región insular de la Antártida, habiéndose obtenido un total de 164 especies, pertenecientes a 66 géneros ascomicetos, en cultivo puro.

2.- Se proponen 15 nuevos taxones para la Ciencia. Éstos son el género *Antarctomyces* y las siguientes especies: *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Apiosordaria nigeriensis*, *Ascotricha canariensis*, *Ascotricha hispanica*, *Corynascus sexualis*, *Corynascus similis*, *Corynascus verrucosus*, *Emericella indica*, *Emericella pluriseminata*, *Gelasinospora bonaerensis*, *Melanospora collipora*, *Melanospora pascuensis*, *Thielavia intermedia* y *Thielavia rapa-nuiensis*

3.- Se propone la nueva combinación *Cercophora angulispora* basada en la especie *Triangularia angulispora* Cain & Farrow.

4.- Se describe una nueva variante morfológica de *Emericella quadrilineata* (Thom & Raper) C. R. Benjamin, cuyas ascosporas producen estructuras similares a gemaciones (blastoconidios).

5.- Se propone la exclusión del género *Corynascus* Arx de la familia Ceratostomaceae y su inclusión en la familia Chaetomiaceae (Sordariales).

6.- Se proponen como métodos novedosos y efectivos para la recuperación de ascomicetos del suelo los mencionados a continuación:

- Técnica de activación de ascosporas por acción de una solución acuosa de ácido acético 5 % v/v (modificación del método desarrollado por Furuya y Naito en 1979).
- Técnica de activación de ascosporas por la acción de acetona (dimetilcetona).
- Técnica de activación de ascosporas por la acción de una solución acuosa de 2-furfuraldehído 10^{-3} M.

7.- El método de aislamiento de ascomicetos del suelo mediante la activación de ascosporas por acción del 2-furfuraldehído e incubación a 42 °C se mostró sumamente útil en la recuperación de cepas del género *Corynascus*.

8.- El estudio estadístico de las cinco técnicas de activación demostró que, con excepción de la del 2-furfuraldehído, todas mostraron un rendimiento similar en cuanto al número de especies recuperadas por muestra de tierra, así como en el número total de cepas aisladas. El método de activación con 2-furfuraldehído se mostró significativamente menos eficiente cuando se comparó con el de activación por acetona. El grado de concordancia (indicado por el coeficiente de correlación intraclase, ICC) entre las técnicas fue relativamente bajo en cuanto al número de especies recuperadas por muestra de tierra, pero mejoraba sustancialmente cuando el parámetro analizado era el número total de cepas aisladas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, M. J. 1989. *Contribución al estudio de los dermatofitos y otros hongos queratinófilos de los suelos de Navarra*. Tesis doctoral. Universidad de Navarra.
- Adametz, L. 1886. Untersuchungen über die niederen Pilze der Ackerkrume. *Eröffnungsabhandlung* 1-78. Universität von Leipzig.
- Agrios, G. N. 1989. *Plant pathology*. 3ª ed., Academic Press, San Diego.
- Ainsworth, G. C., James, P. W. y Hawksworth, D. L. 1971. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 6ª ed., CAB, Kew.
- Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. y Sussman, A. S. (eds.). 1973. *The fungi, an advanced treatise*. vols. 4A y 4B, Academic Press, New York-London.
- Alexopoulos, C. J. 1962. *Introductory mycology*. 2ª ed., Wiley, New York-London.
- Alexopoulos, C. J. y Mims, C. W. 1979. *Introductory mycology*. 3ª ed., John Wiley & Sons, New York.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. y Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology*. John Wiley & Sons, New York.

- .- Allen, P. J. 1965. Metabolic aspects of spore germination in fungi. *Annual Review of Phytopathology* 3, 313-342.
- .- Anderson, T. F. 1953. Techniques for the preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. *Transactions of the New York Academy of Science* 13, 130-134.
- .- Arx, J. A. von. 1981. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. J. Kramer, Vaduz.
- .- Arx, J. A. von, Figueras, M. J. y Guarro, J. 1988. *Sordariaceous ascomycetes without ascospore ejaculation*. Beihefte zur Nova Hedwigia 94, J. Cramer, Berlín-Stuttgart.
- .- Barnett, H.L., Beneke, E. S., Emerson, R., Farr, M. L., Gray, W. D., Korf, R. P., Simmons, E. G. y Stevens, R. B. (Stevens, R. B. ed.) 1974. *Mycology guidebook*. University of Washington Press, Seattle and London.
- .- Barr, M. E. 1983. The ascomycete connection. *Mycologia* 75,1-13.
- .- Barron, G. L. 1968. *The genera of hyphomycetes from soil*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- .- Bartlet, A. A. y Burstyn, H. P. 1975. A review of the physics of critical point drying. *Proceedings of the 8th Annual IITRI-SEM Symposium* 1, pp. 305-316, Chicago.

.- Berbee, M. L. y Taylor, J. W. 1992 a. Convergence in ascospore discharge mechanism among pyrenomycete fungi based on 18S ribosomal RNA gene sequence. *Molecular Phylogeny and Evolution* 1, 59-71.

.- Berbee, M. L. y Taylor, J. W. 1992 b. Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 278-284.

.- Berbee, M. L. y Taylor, J. W. 1993. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Canadian Journal of Botany* 71, 1114-1127.

.- Bessey, E. A. 1950. *Morphology and taxonomy of the fungi*. Constable, London.

.- Blanz, P. A. y Unseld, M. 1987. Ribosomal RNA as taxonomic tool in mycology. En: Hoog, G. S. de, Smith, M. Th. y Weijman, A. C. M. (eds.) *The expanding realm of yeast-like fungi*. pp. 247-258. Elsevier, Amsterdam.

.- Bowman, B. H., Taylor, J. W., Brownlee, A. G., Lee, J., Lu, S-D. y White, T. J. 1992. Molecular evolution of the fungi: Relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes and Chytridiomycetes. *Molecular Biology and Evolution* 9, 285-296.

.- Bristow, P. R. y Lockwood, J. L. 1975. Soil fungistasis. Role of the microbial nutrient sink and fungistatic substances in two soils. *Journal of General Microbiology* 90, 147-156.

- .- Brown, M. F. y Brotzman, H. G. 1979. *Phytopathogens fungi: a scanning electron microscopic survey*. University of Missouri Columbia Extension Division.
- .- Bruns, T. D., Vilgalis, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W. G. y Sogin, M. L. 1992. Evolutionary relationships within the Fungi: Analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogeny and Evolution* 1, 231-241.
- .- Bruns, T. D., White, T. J. y Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22, 525-564.
- .- Butler, E. J. 1907. An account of the genus *Pythium* and some Chytridiaceae. *Memmoirs of the Department of Agriculture of India* 15, 1-160.
- .- Campbell, R. 1972. Ultrastructure of conidium ontogeny in the deuteromycete fungus *Stachybotrys atra* Corda. *New Phytologist* 71, 1143-1149.
- .- Cano, J. F. 1989. *Aportación al conocimiento de los hongos queratinofílicos en España: estudio sobre la taxonomía, ultraestructura, patología experimental y ecología del género Aphanoascus*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- .- Carlile, M. J. y Watkinson, S. C. 1994. *The fungi*. Academic Press Ltd., London.

- Carrol, F. E. y Carrol, G. C. 1973. Senescence and death of conidiogenous cell in *Stemphylium botryosum* Wallroth. *Archives of Microbiology* 94, 109-124.

- Carroll, G. C. y Wicklow, D. T. 1992. *The fungal community: Its organization, and role in the ecosystem*. Marcel Dekker Inc., New York.

- Cavalier-Smith, T. 1987. The origin of the fungi and the pseudofungi. En: Rayner, A. D. M., Brasier, C. M. y Moore, D. (eds.) *Evolutionary biology of the fungi*. pp. 339-353. Cambridge University Press, Cambridge.

- Cochrane, V. W. 1958. *Fisiology of the fungi*. John Wiley, New York.

- Cochrane, V. W. 1960. Spore germination. En: Horsfall, J. y Diamond, A. (eds.) *Plant pathology: an advanced treatise*. vol. 2, pp. 167-202. Academic Press, New York-London.

- Cooke, R. C. y Whipps, J. M. 1993. *Ecophysiology of Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Currah, R. S. 1985. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon* 24, 1-216.

- Chesters, C. G. C. 1949. Concerning fungi inhabiting soil. *Transactions of the British Mycological Society* 32, 197-216.