



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE HONGOS
FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS: SCEDOSPORIUM, ACREMONIUM,
PHIALEMONIUM, LECYTHOPHORA Y PAECILOMYCES**
Haybrig Mercedes Perdomo Ziems

Dipòsit Legal: T. 1717-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Haybrig Perdomo Ziems

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE
HONGOS FILAMENTOSOS OPORTUNISTAS:
*SCEDOSPORIUM, ACREMONIUM, PHIALEMONIUM,
LECYTHOPHORA Y PAECILOMYCES***

TESIS DOCTORAL

Dirigida por
Josep Guarro, Josepa Gené y José F. Cano

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2011



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

Carrer Sant Llorenç 21
43201 Reus
Tel. 34-977759321
Fax. 34- 977759322

Josep Guarro Artigas, Catedrático de Microbiología de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, **Josepa Gené Díaz**, Profesora Titular de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, y **José F. Cano Lira**, Catedrático de Microbiología de la *Facultat d'Enologia*, de la *Universitat Rovira i Virgili*

HACEN CONSTAR:

Que la presente tesis doctoral titulada “**Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces***” presentada por Haybrig Mercedes Perdomo Ziems, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para optar por el título de Doctor.

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

Reus, 10 de Julio de 2011

Josep Guarro Artigas

Director de la tesis

Josepa Gené Díaz

Codirector

José F. Cano Lira

Codirector

A mi Madre
A Sergio

“Cada trecho recorrido enriquece al peregrino y
lo acerca un poco más a hacer realidad sus sueños”. Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Este aparatado está dedicado a todas aquellas personas que me han acompañado durante estos 4 años...

Al Dr. Josep Guarro, el jefe celestial, muchas gracias por todos los momentos compartidos, los buenos y los malos, por ser siempre el ejemplo al trabajo constante, por ser mi guía, mi empujón y muchas veces, mí martirio... Son tantos los aprendizajes, que las palabras se quedan cortas. Gracias de corazón.

A la Dra. Josepa Gené, gracias por todo el tiempo invertido en la corrección de esta tesis y de todos los trabajos generados durante este tiempo. Su meticulosidad y dedicación es un ejemplo a seguir.

A la Dra. Dania García, si enumero todas las cosas que me has enseñado no terminaría nunca!, gracias por el gran apoyo incondicional, por enseñarme esos “truquitos morfológicos” que sólo la experiencia aporta, por enseñarme a ser la “Sherlock Holmes” de la micología, por ser la chispa constante de las grandes ideas, por todos los momentos compartidos: los de risas, los de llantos, los de injusticia, los de ánimo... pufff.... Gracias.

Al Dr. Josep Cano, por su confianza y apoyo, por esos: como lo tenemos?, por esos momentos de enojos, de risa y de complicidad, gracias por el cariño.

A los Drs. Alberto Stchigel, Francesc Xavier Pastor, María José Figueras y Emilio Mayayo, por su disponibilidad de aclarar siempre las dudas planteadas y corregir los errores. Quiero agradecer especialmente a Beto por esas charlas tan animadas, llenas de risas y de ocurrencias, que hacían que el trabajo detrás del microscopio fuese ameno y divertido y al Dr. Pastor por escuchar mis tonterías mientras “el vecino” se desocupaba.

A la Dra. D. A. Sutton por permitirnos trabajar con esos tesoros llamados “aislados” y por sus grandes aportes. Al Dr. Richard Summerbell por sus acertados aportes científicos y especialmente gracias por esas palabras que me han servido de aliento y energía para culminar este ciclo.

A Núria Pilas, Cati Nuñez y Carme Sanmartí, porque el mejor OA del mundo sale de sus manos, por esas ayudas maravillosas, por esos momentos de risas a la hora del café/té, gracias.

A las Drs. Roxana Báez y Anabel Alperi por la enseñanza, el apoyo, la ayuda y la amistad.

Al Dr. Hugo Madrid (madrilito) y Eduardo Álvarez (el niño), mis compañeros de despacho, gracias por todos los momentos que durante estos 4 años hemos compartido, por el silencio, las charlas filosóficas, científicas, las risas, la complicidad, el apoyo incondicional. Ustedes y el amarillo siempre permanecerán en mis mejores recuerdos, los adoro.

A las amigas que la vida me ha regalado durante estos años de doctorado: Fabiola Fernández, mi loca adorada, mi amiga querida; Jessica Pérez, mi osita; Mónica Azor, monii; Carolina Silvera, mi caracolilla; Valentina Salas, locaaa.... gracias, son parte de mi vida y ocupan un lugar muy importante de mi corazón. A mi amiga/madre Claudia Hartung por ser mi fuente de buena energía y optimismo, por escucharme y estar siempre conmigo en los momentos difíciles.

A todas aquellas personas con las cuales he compartido el maravilloso mundo del laboratorio: Xavi, Luis, Marçal, Félix, Mar, Enrique, Yasmina, Margarita, Sarah, Keith, Arturo, Katihuska, Max, Catañeda (mi padre), Julio...

A Montse Pallas, Immaculada Abello, Amparo, María, Teresa... gracias.

A mi alma mater, por ser la luz que siempre ha vencido a la sombra.

A los Profesores Vilma Llovera, Rosa Cristina Pérez, Armando Suarez, Juan Luis León y Elizabeth Ferrer, por sus consejos y por el cariño. A todo el personal administrativo, técnico y profesoral del Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo, La Morita.

A la familia con la que España me ha bendecido, Antonio, Carmen, Tony, Patri, gracias por el apoyo, el cariño, por esos momentos compartidos alrededor de la mesa, por darme ese calor y la estabilidad que sólo una familia puede dar, gracias!

A mi familia, mis tíos, primos, ahijados-sobrinos, a la memoria de mi tía Cruz, a mi tía Mercedes, a mi padre, a mis hermanos: Julio Ángel, Amilkar y José Antonio, a mi sobrino Víctor Julio, y especialmente a ti mamá, los amo con todo mi corazón, son mi inspiración, mi fuerza, mi puerto seguro, sin palabras...!

A Sergio, mi ilusión, mi compañero, mi amigo, mi cómplice, hemos transitado este largo camino tomados de la mano, sin tu amor hubiera sido imposible culminar esta meta. Me has aportado todo lo que he deseado y más, me has dado todo lo que he deseado y más, has llenado de luz y de risas cada días que pasamos juntos, sabes lo importante que eres para mí, tú eres el autor de mi felicidad. T.A.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades de los hongos filamentosos.....	2
1.2. La biología molecular aplicada a la taxonomía y tipado de los hongos filamentosos.....	6
1.2.1. Métodos filogenéticos.....	8
1.2.2. Tipado mediante secuenciación multilocus (MLST).....	11
1.3. Infecciones causadas por los hongos filamentosos.....	13
1.4. Hongos filamentosos oportunistas.....	14
1.4.1. <i>Scedosporium</i>	15
1.4.1.1. Taxonomía.....	15
1.4.1.2. Importancia clínica.....	16
1.4.2. <i>Acremonium</i>	18
1.4.2.1. Taxonomía.....	18
1.4.2.2. Importancia clínica.....	20
1.4.3. <i>Phialemonium</i>	21
1.4.3.1. Taxonomía.....	22
1.4.3.2. Importancia clínica.....	22
1.4.4. <i>Lecythophora</i>	23
1.4.4.1. Taxonomía.....	24
1.4.4.2. Importancia clínica.....	25
1.4.5. <i>Paecilomyces</i>	26
1.4.5.1. Taxonomía.....	27
1.4.5.2. Importancia clínica.....	28
2. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Origen, aislamiento y conservación de los aislados.....	34
3.1.1. Origen de los aislados.....	34
3.1.2. Activación de muestras de suelo, aislamiento y obtención de cultivos puros.....	36
3.1.3. Conservación de los aislados.....	36
3.2. Caracterización fenotípica de los aislados.....	37
3.2.1. Estudio macroscópico.....	38

3.2.2. Estudio microscópico.....	38
3.2.2.1. Preparaciones microscópicas y líquidos de montaje.....	39
3.2.2.2. Técnicas de microscopía.....	40
3.3. Caracterización molecular de los aislados.....	41
3.3.1. Extracción de ADN.....	41
3.3.2. Amplificación de los genes.....	42
3.3.3. Comprobación y purificación del producto amplificado.....	46
3.3.4. Secuenciación de los productos de la PCR.....	46
3.3.5. Obtención de la secuencia consenso e identificación molecular de los aislados.....	47
3.3.6. Alineamiento de secuencias nucleotídicas.....	47
3.3.7. Depósito y obtención de secuencias de bases de datos Internacionales.....	47
3.3.8. Análisis filogenético.....	47
3.3.9. Asignación de número a los alelos encontrados en el estudio MLST.....	48
3.4. Estudio de compatibilidad sexual.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Métodos moleculares destinados a la tipificación de <i>Scedosporium</i> spp.	50
4.1.1. Harun A, Perdomo H , Gilgado F, Chen S, Cano J, Guarro J, Meyer W. 2009. Genotyping of <i>Scedosporium</i> species: a review of molecular approaches. <i>Medical Mycology</i> . 47: 406–414.....	51
4.1.2. Tipificación con MLST de <i>Scedosporium aurantiacum</i> y <i>S. prolificans</i>	60
4.2. Estudio morfológico y molecular de <i>Acremonium</i> spp. de importancia clínica.....	62
4.2.1. Perdomo H , Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J. 2011. Spectrum of clinically relevant <i>Acremonium</i> species in the United States. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . 49: 243–256.....	63
4.3. Caracterización morfológica y molecular de especies de <i>Phialemonium</i> y <i>Lecythophora</i>.....	77
4.3.1. Perdomo H , Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J. 2011. Molecular and	

phenotypic characterization of <i>Phialemonium</i> and <i>Lecythophora</i> isolates from clinical samples. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> 49: 1209–1216.....	78
4.3.2. Perdomo H , García D, Gené J, Cano J, Sutton DA, Summerbell, Guarro J. 2011. Polyphasic study of clinical isolates of the opportunistic fungi <i>Phialemonium</i> and <i>Lecythophora</i> . Proposal of the new genus <i>Phialemoniopsis</i> . <i>Medical Mycology</i> . (En preparación).....	86
4.4. Diversidad genética de aislados de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	135
4.4.1. Perdomo H , Cano J, Gené J, García D, Hernández M, Guarro. 2011. Polyphasic analysis of <i>Paecilomyces lilacinus</i> isolates from different origins and proposal of the new species <i>Paecilomyces lavendulus</i> . <i>Mycologia</i> . (Enviado, en fase de revisión).....	136
5. DISCUSIÓN GENERAL	157
5.1. Métodos moleculares destinados a la tipificación de <i>Scedosporium</i> spp.....	158
5.2. Estudio morfológico y molecular de <i>Acremonium</i> spp. de importancia clínica	161
5.3. Caracterización morfológica y molecular de especies de <i>Phialemonium</i> , <i>Lecythophora</i> y hongos relacionados.....	164
5.4. Diversidad genética de aislados de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	168
6. CONCLUSIONES	170
7. BIBLIOGRAFIA	173
8. ANEXO	192

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
atm	Atmósfera
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> (Holanda)
CI	Índice de consistencia
cm ²	Centímetro cuadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CZA	Agar Czapek
dNTPs	Desoxiribonucleótidos
DRBC	Agar Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol
Fig.	Figura
FMR	<i>Facultat de Medicina</i> de Reus (España)
g	Gramos
GenBank	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
h	Hora
HI	Índice de homoplasia
HTUs	Unidades taxonómicas hipotéticas
IHEM	<i>Biomedical Fungi and Yeasts Collection</i> (Bélgica)
ILD	Incongruencia en la diferencia de la longitud
IMI	<i>International Mycological Institute</i> (Gran Bretaña)
IRTA	<i>Institut de Recerca i Tecnològica Agroalimentaria</i> (España)
ISSR-PCR	PCR de secuencia entre repeticiones simples
JCM	<i>Japan Collection of Microorganisms</i> (Japón)
L	Litro
LSU	Subunidad grande del ADN ribosómico
M	Molar
MEA	Agar extracto malta
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro

MLEE	<i>Multi-Locus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	Sistema de tipificado mediante secuenciación multilocus
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro cuadrado
MPT	Árbol más parsimonioso
mTorr	MiliTorr
MUCL	<i>Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain</i> (Bélgica)
NBRC	<i>NITE Biological Resource Center</i> (Japón)
O ₄ O _s	Tetraóxido de osmio
OA	Agar harina de avena
OTUs	Unidades taxonómicas operacionales
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PCA	Agar patata-zanahoria
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Agar patata-dextrosa
PHT	Prueba de partición de homogeneidad
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>
RI	Índice de retención
rpm	Revoluciones por minutos
s	Segundo
SNPs	Nucleótidos polimórficos simples
ST	Secuencia tipo
T	Cepa tipo
U	Unidad
UTHSC	<i>Fungus Testing Laboratory of the University of Texas Health Science Center</i> (Estados Unidos)
v/v	Volumen/Volumen
WM	<i>Molecular Mycology Research Laboratory</i> (Australia)

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son organismos eucarióticos que presentan pared celular, carecen de clorofila y sus células se disponen longitudinalmente formando largos filamentos denominados **hifas** (Jahn, 1949; Whittaker, 1969). Son organismos heterótrofos por lo que utilizan compuestos orgánicos como fuente primaria de energía. A través de la secreción de enzimas degradan moléculas grandes y poco solubles en agua (carbohidratos, proteínas o lípidos) convirtiéndolos en moléculas más pequeñas y más solubles, las cuales son absorbidas por la membranas plasmáticas de la células fúngicas y asimiladas como nutrientes. La mayoría de los hongos filamentosos son organismos saprófitos que utilizan una gran variedad de sustratos como fuente de carbono, aunque un considerable número de especies son parásitos de animales, plantas, o incluso de otros hongos (Webster y Weber, 2009).

Los hongos filamentosos se reproducen por **esporas**, tanto de origen asexual como sexual. En algunos grupos, las esporas se forman a partir de estructuras bien diferenciadas, exhibiendo una gran variedad de formas y de mecanismos de ontogenia. Cuando un hongo se reproduce asexualmente nos referimos al mismo como **anamorfo** o fase anamórfica, mientras que a la reproducción sexual se le conoce como **teleomorfo** o fase teleomórfica. Algunas especies fúngicas pueden desarrollar a su vez dos o más anamorfos, a los que se denominan **sinanamorfos**. El término **holomorfo** se emplea para designar a una especie como un todo, comprendiendo todas sus morfologías y fases (anamorfo, sinanamorfo y teleomorfo). El teleomorfo de una especie y sus anamorfos pueden o no coincidir en el tiempo, o pueden desarrollarse sobre sustratos diferentes como organismos aparentemente distintos, pero también nos encontramos con especies que han perdido la capacidad de reproducirse sexualmente o asexualmente (Kendrick, 1992; Kirk *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta la morfología asociada principalmente a la reproducción sexual conjuntamente con los resultados obtenidos de la aplicación de técnicas de biología molecular, todos los hongos filamentosos con hifas septadas y esporas sin flagelos se clasifican en el subreino Dikarya (Hibbett *et al.*, 2007). Dicho grupo a su vez está subdividido en dos *phyla*, Ascomycota y Basidiomycota, siendo en el grupo de los ascomicetes donde se clasifican la mayoría de los hongos filamentosos de importancia clínica (Guarro *et al.*, 1999a).

La fase sexual de los ascomicetes se caracteriza por la formación de esporas endógenas (**ascosporas**), las cuales se desarrollan en el interior de estructuras en forma de saco denominadas **ascos**. Los ascos pueden contener una o varias ascosporas, las cuales son el resultado de una cariogamia y posterior meiosis de un núcleo diploide. En la mayoría de los ascomicetes filamentosos, los ascos se desarrollan en cuerpos fructíferos denominados **ascocarpos o ascomas** (Fig. 1), los cuales pueden ser:

- **Gimnotecio:** cuerpo fructífero formado por pequeños grupos de ascos rodeados por una red laxa de hifas (Fig. 1A).
- **Cleistotecio:** cuerpo fructífero cerrado, el cual está delimitado por una pared que se rompe irregularmente o se desintegra al madurar para liberar las ascosporas (Fig. 1B).
- **Peritecio o pseudoperitecio:** cuerpo fructífero piriforme, provisto de una apertura apical denominada ostiolo (Fig. 1C).
- **Apotecio:** cuerpo fructífero abierto, en forma de disco o copa, donde los ascos se encuentran en la parte superior (Fig. 1D).
- **Ascostroma o pseudotecio:** cuerpo fructífero donde los ascos se desarrollan directamente en la cavidad de un estroma, formado por el agrupamiento de hifas somáticas (Fig. 1E).

Existen además varias modificaciones estructurales que determinan numerosas formas intermedias características de ciertos grupos de hongos (Ulloa y Hanlin, 2006; Webster y Weber, 2009).

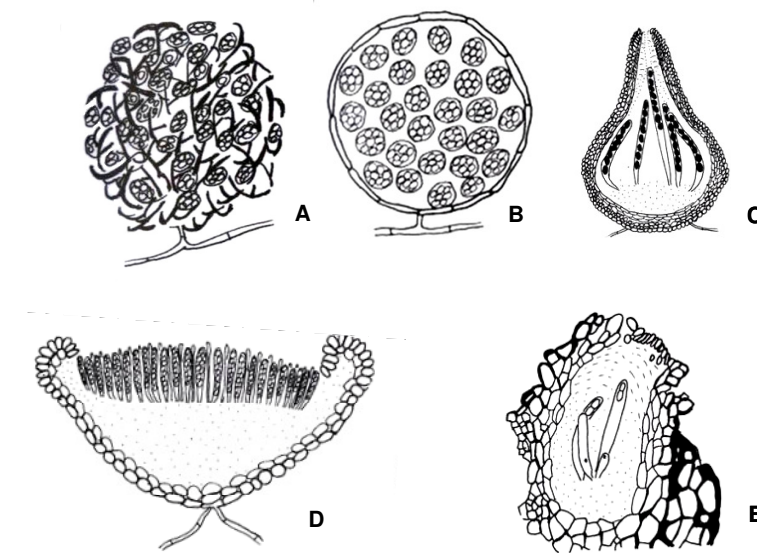


Fig. 1. Tipos de ascas. A, gimnotecio, B, cleistotecio. C, peritecio. D, apotecio. E, pseudotecio (Webster y Weber, 2009).

El desarrollo sexual de estos hongos está controlado por un complejo sistema de genes, en el cual interviene un único locus denominado *mat* que presenta dos alternativas o “idiomorfos” (Metzenberg y Glass, 1990). Los hongos en su fase sexual pueden seguir tres estrategias reproductoras diferentes: heterotalismo, homotalismo o pseudohomotalismo. Los individuos de especies heterotálicas poseen un único idiomorfo y sólo la interacción con un individuo sexualmente compatible (idiomorfo complementario) hace posible la conjugación y la formación de esporas sexuales. Las especies homotálicas poseen ambos idiomorfos en un mismo individuo. En estos organismos la reproducción sexual no requiere la interacción de dos

individuos haploides. Las especies pseudohomotáticas desarrollan algunas esporas con dos núcleos, uno con cada idiomorfo, y por tanto los individuos que derivan de éstas son capaces de completar el ciclo sexual por sí mismos. Sin embargo, otras esporas del mismo individuo sólo contienen un núcleo, necesitando de un individuo de talo complementario para poder completar el ciclo sexual (Alexopoulos *et al.*, 1996; Pöggeler y Kück, 2000).

Aunque el estudio de las estructuras asociadas a la reproducción sexual es fundamental para la identificación de los ascomicetes, muchas de las especies de importancia clínica no desarrollan dichas estructuras al crecer *in vitro*, la mayoría de ellas desarrollan exclusivamente las formas anamórficas.

Tradicionalmente, los anamorfos de ascomicetes filamentosos con fase sexual desconocida se ubicaban taxonómicamente en el *phylum* Deuteromycota, principalmente en la clase Hyphomycetes. Para la identificación de estos hongos se desarrolló todo un sistema de clasificación basado principalmente en el estudio de la morfología de las esporas asexuales (**conidios**) y de las células formadoras de conidios (**células conidiógenas**), así como del proceso de formación de conidios (**conidiogénesis**). Actualmente, no se admite tratar a los anamorfos en categorías taxonómicas separadas de la sistemática de los ascomicetes o basidiomicetes (Guarro *et al.*, 1999a; Kirk *et al.*, 2008). Con fines prácticos, especialmente en clínica, los anamorfos de ascomicetes se siguen tratando de hifomicetes y para su identificación se siguen utilizando los criterios morfológicos derivados del estudio de las estructuras o procesos antes mencionados. En este sentido, cabe destacar que la mayoría de los hongos filamentosos patógenos para el hombre son hifomicetes (De Hoog *et al.*, 2000) y sólo el examen microscópico de sus estructuras nos permite un rápido diagnóstico micológico.

El criterio morfológico principal que nos ayuda a diferenciar géneros de hongos anamórficos es la conidiogénesis (Webster y Weber, 2009). Hay dos tipos básicos de conidiogénesis, **tálica** y **blástica**. En la tálica los conidios se forman a partir de la conversión de una porción de hifa preexistente (Fig. 2A), mientras que en la blástica por la formación *de novo* de la pared del conidio a partir de un punto (punto conidiogénico) de la célula conidiógena (Fig. 2B-H). La conidiogénesis blástica puede ser: **enteroblástica** u **holoblástica**. En la enteroblástica la pared del conidio crece y se extiende a través de un orificio ubicado en la capa externa de la pared de la célula conidiógena (Fig. 2C-H). Esta conidiogénesis se diferencia en dos tipos de desarrollo, **fialídico**, en donde los conidios, formados en una secuencia basípeta, se generan a partir de un punto conidiogénico fijo generalmente ubicado en el ápice de la célula conidiógena (Fig. 2E). En este caso, después de la formación del primer conidio, a menudo en la célula conidiógena, queda restos de pared a la cual denominamos collarete. En el desarrollo **anelídico**, la célula conidiógena se alarga durante la producción de conidios, dando lugar a una serie de cicatrices anulares (Fig. 2F). En ambos casos los conidios pueden disponerse en cadenas o en cabezas mucosas (Fig. 2G-H). En la conidiogénesis holoblástica toda la pared de la

célula conidiógena está implicada en la formación del conidio (Fig. 2D). Los hongos anamórficos estudiados en la presente tesis desarrollan diferentes tipos de conidiogénesis blástica.

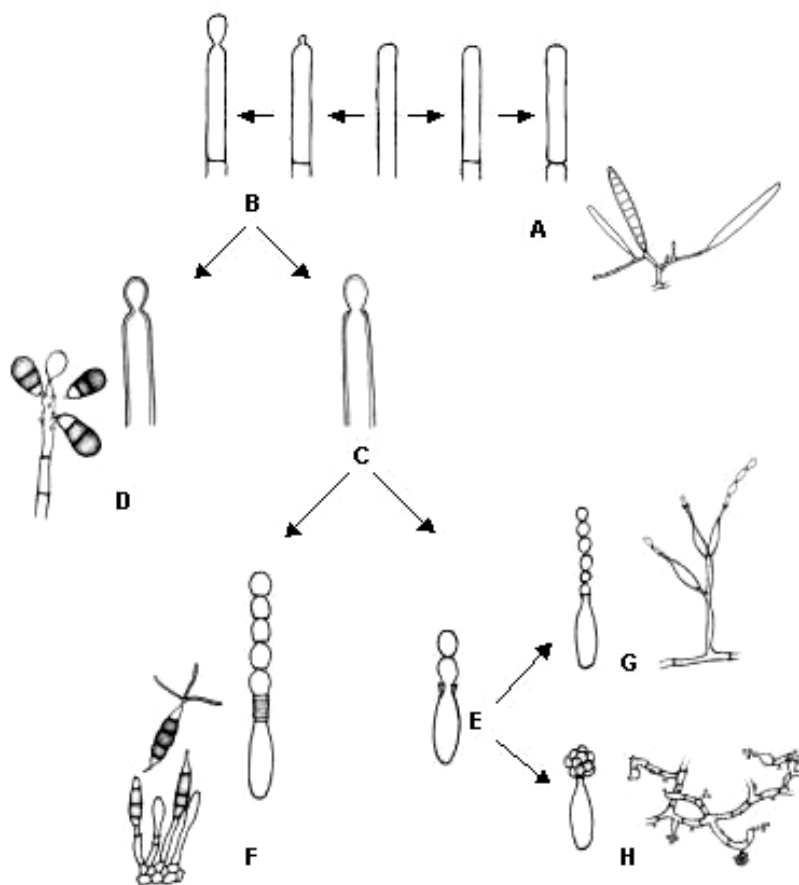


Fig. 2. Tipos de conidiogénesis. A, Tállica. B-H, Blástica. C-H, Enteroblástica. D, Holoblástica. E, Fialídica. F, Anelídica. G, Conidios catenulados. H, Conidios formando agregados mucosos (Dibujos obtenidos de García, 2005).

Las células conidiógenas pueden localizarse sobre hifas especializadas llamadas **conidióforos**. En ciertos hongos, los conidióforos se agregan formando **conidionomas**, los cuales pueden ser (Ulloa y Hanlin, 2006; Webster y Weber, 2009):

- **Sinema:** agrupación compacto de conidióforos erectos con conidios ubicados generalmente en el ápice (Fig. 3A).
- **Esporodoquio:** masa compacta de conidióforos en forma de cojín, a menudo creciendo sobre un estroma (masa compacta de hifas vegetativas) (Fig. 3B).
- **Acérvulo:** conidionoma en forma de plato o copa cuya superficie está cubierta de hifas fértiles que dan lugar a los conidios (Fig. 3C).
- **Picnidio:** cuerpo esférico o piriforme, ostiolado, formado por tejido fúngico y con la superficie interior cubierta de células conidiógenas (Fig. 2D).

Existen además numerosas formas intermedias, presentes en distintos grupos de hongos (Okada y Tubaki, 1986).

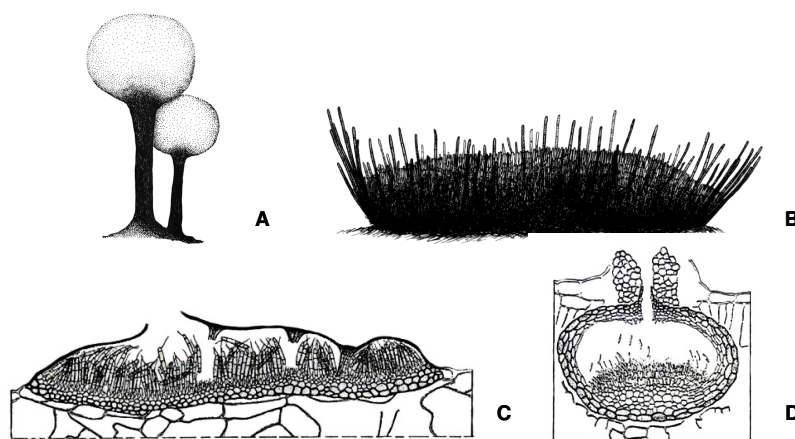


Fig. 3. Algunos tipos de conidiomas. A, Sinema. B, Esporodoquio. C, Acérvulo. D, Picnidio (Dibujos obtenidos de De Hoog *et al.*, 2000; Guarro *et al.*, 2002; Webster y Weber, 2009)

Los hifomicetes pueden presentar sinemas o esporodoquios, que junto a la presencia o ausencia de otras estructuras, tales como **esclerocios** (cuerpo de resistencia formado por una masa compacta de hifas que carece de esporas, tanto en la superficie como en el interior) y **clamidosporas** (espora de origen asexual y de pared gruesa, cuya principal función es de resistencia) son de gran utilidad para la identificación de estos hongos.

Cabe destacar que en ocasiones la identificación morfológica es laboriosa de realizar debido a las condiciones del propio hongo o a la metodología empleada. En clínica, el diagnóstico microbiológico no siempre es inmediato debido al lento crecimiento de muchos de los hongos patógenos, y a veces imposible de realizar debido a la ausencia de crecimiento *in vitro* o a la falta de esporulación. Además, la similitud morfológica entre especies o incluso la inexperiencia del clínico puede conducir a realizar diagnósticos erróneos o identificaciones sólo a nivel genérico (Guarro *et al.*, 1999a). Por dichos motivos la aplicación de técnicas moleculares para la identificación de los hongos patógenos resulta de gran utilidad en el diagnóstico clínico.

1.2. La biología molecular aplicada a la taxonomía y tipificado de los hongos filamentosos

La taxonomía e identificación de los hongos se ha basado tradicionalmente en la caracterización fenotípica de los mismos. La sistemática atribuía valores taxonómicos a aspectos asociados a la morfología, tanto macroscópica como microscópica, es decir, presencia o ausencia de septos en las hifas, formación de esporas y mecanismos de liberación de las mismas, o aspectos de la biología y ecología de estos organismos, así como resultados obtenidos a través de pruebas bioquímicas o el estudio de su ultraestructura. Datos que, en conjunto, han permitido establecer las diferentes categorías taxonómicas hasta nivel de especie y, en algunos casos, hasta niveles inferiores (Webster y Weber, 2009). Actualmente, la aplicación de técnicas

de biología molecular, en particular el análisis de secuencias de nucleótidos del ADN y los estudios filogenéticos derivados de ellos, han cambiado muchos los conceptos tradicionales de la taxonomía fúngica (Guarro *et al.*, 1999a).

En micología médica, el uso de las distintas herramientas de diagnóstico molecular constituye una alternativa, cada vez más indispensable, para la correcta y rápida identificación del agente responsable de una determinada patología. Son numerosos los estudios en los cuales la secuenciación es imprescindible para la identificación de hongos patógenos humanos, tales como especies de *Aspergillus* P. Micheli ex Link, *Fusarium* Link, *Scedosporium* Sacc. ex Castell. & Chalm., u otros patógenos emergentes (Guarro *et al.*, 1999a; Atkins y Clark, 2004; Nagy *et al.*, 2004; Gilgado *et al.*, 2005; Balajee *et al.*, 2007; Balajee *et al.*, 2009). En el campo de la epidemiología, los métodos de tipificación molecular han permitido poner en evidencia variaciones genotípicas o mutaciones útiles para el establecimiento de los patrones epidemiológicos de una especie concreta (Wengenack y Binnicker, 2009).

Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado para el estudio de los hongos; desde la cuantificación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear hasta la hibridación ADN-ADN, técnicas clásicas que se han aplicado para determinar diferencias entre especies fúngicas e incluso para su identificación. No obstante, en los últimos años para tal finalidad destacan los métodos electroforéticos y de secuenciación, especialmente el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de un determinado gen o fragmento del mismo (Wengenack y Binnicker, 2009).

Los métodos electroforéticos más frecuentemente utilizados para el estudio de los hongos son el “Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción” (RFLP), que permite en algunos casos diferenciar molecularmente cepas de una misma especie; el análisis de la “Amplificación al azar de Fragmentos Polimórficos de ADN” (RAPD), que se aplica, por ejemplo, para realizar estudios de población al permitir determinar la variabilidad intraespecífica entre cepas de una misma especie; el análisis del “Polimorfismo de los Fragmentos de Amplificación” (AFLP) que presenta similares usos a los descritos en el método anterior. No obstante, estos métodos suelen presentar inconvenientes tales como elevada laboriosidad, problemas de reproducibilidad entre laboratorios, difícil la automatización en los procedimientos, y en algunos casos, como en el RFLP, no tener una suficiente capacidad de discriminación a nivel interespecífico (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003; Webster y Weber, 2009).

En relación a la secuenciación, cabe destacar que existe una amplia lista de genes utilizados para estudios de identificación y/o filogenia de los hongos, siendo los genes que codifican para los ARN ribosómicos (ADNr) los más utilizados para dichos estudios, estos genes se encuentran distribuidos formando tándems (18S-5.8S-28S) (Fig. 4), separados por regiones no codificantes denominadas espaciador interno transcrito (ITS) y espaciador intergénico (IGS). Los ITS generalmente se corresponden con secuencias altamente conservadas

entre las especies fúngicas filogenéticamente próximas, en tanto que los IGS presentan una variabilidad muy elevada, incluso a nivel intraespecífico. Otra característica que determina la amplia utilización de estos genes, es el hecho de encontrarse en un número elevado de copias (hasta 200 copias), facilitando su amplificación mediante la PCR (Butler y Metzenberg, 1989). Para el diagnóstico micológico, las secuencias conservadas se utilizan generalmente para confirmar la existencia de una infección fúngica, en tanto que las variables se emplean en la identificación a nivel de especie del agente etiológico implicado (Guarro *et al.*, 1999a; Wengenack y Binnicker, 2009).



Fig. 4. Representación esquemática de los genes y de los espaciadores internos transcritos que constituyen el ARN ribosómico (O'donnell y Cigelnik, 1996)

En algunos casos, estas regiones no proporcionan suficiente resolución para diferenciar especies filogenéticamente muy próximas, y es cuando se recurre al estudio de otros genes, principalmente estructurales que codifican para diferentes proteínas. Entre los genes más utilizados se pueden citar: la β -tubulina (*TUB* y *BT2*), la actina (*ACT*), la quitina sintasa (*CHS*), el factor de elongación (*EF-1 α*) o la calmodulina (*CAL*). Estos genes, o fragmentos de los mismos, se han utilizado para estudios filogenéticos de algunos hongos patógenos humanos, tales como especies pertenecientes a *Fusarium* (*EF-1 α*), *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. (*BT2*), *Scedosporium* (*TUB* y *BT2*) o *Sporothrix* Hektoen & C.F. Perkins (*CHS*, *CAL*) (Gilgado *et al.*, 2005; Marimon *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009). Las secuencias de los genes obtenidas y su comparación con aquellas depositadas en bases de datos internacionales, como el GenBank, permite ubicar taxonómicamente y/o confirmar la identificación de especies fúngicas e incluso, aunque más raramente, tipificar las cepas de una especie. En relación a este último punto, aunque son muchos los sistemas de tipificación disponibles (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003; Webster y Weber, 2009), el sistema de “Tipificación Mediante Secuenciación Multilocus” (MLST) es el más recomendable por presentar gran sensibilidad y especificidad al trabajar con secuencias de ADN, lo cual disminuye o incluso elimina problemas de reproducibilidad entre laboratorios. Además, permite fácilmente publicar en internet los resultados obtenidos para hacerlos accesibles rápidamente al resto de la comunidad científica (Maiden, 2006).

1.2.1. Métodos filogenéticos

El ADN constituye la principal fuente de información genética de los seres vivos. Por ello, la filogenia molecular establece las relaciones evolutivas entre organismos basándose en la comparación de caracteres moleculares, fundamentalmente a partir de la comparación de

secuencias de regiones codificantes y no-codificantes del ADN. El uso de las secuencias nucleotídicas en estudios filogenéticos presentan las siguientes ventajas: 1) fácil obtención, 2) posibilidad de desarrollar bases de datos objetivas y 3) poder aplicar distintos modelos evolutivos. Por estas razones, las secuencias del ADN constituyen actualmente el pilar sobre el que se asientan la mayor parte de las reconstrucciones evolutivas de los organismos, ya que cada una de las posiciones (nucleótidos) de una secuencia se considera un carácter distinto e independiente (Harrison y Langdale, 2006).

El objetivo de los métodos de reconstrucción filogenética es el utilizar del mejor modo posible la información génica actual para hacer inferencias acerca del pasado, determinando las hipótesis evolutivas más fiables. Las hipótesis resultantes normalmente se expresan en forma de árbol, en el que la topología representa las relaciones filogenéticas entre las distintas entidades y la longitud de sus ramas la distancia que hay entre ellas (Holder y Lewis, 2003). Estas representaciones se denominan **árboles filogenéticos** dado que los diagramas utilizados para describir esas relaciones se asemejan a la estructura de un árbol y los términos que se utilizan para denominar sus partes y componentes (raíz, rama y nodo) también hacen referencia a los mismos. Los nodos externos (terminales) se denominan unidades taxonómicas operacionales (*operational taxonomic units*, OTUs), un término genérico que puede representar cualquier grupo de taxones comparables, por ejemplo: una familia de organismos, individuos o cepas de una única especie o un conjunto de genes relacionados. Asimismo, los nodos internos se denominan unidades taxonómicas hipotéticas (*hypothetical taxonomic units*, HTUs), los cuales representan los progenitores o antecesores hipotéticos de los OTUs (Fig.5).

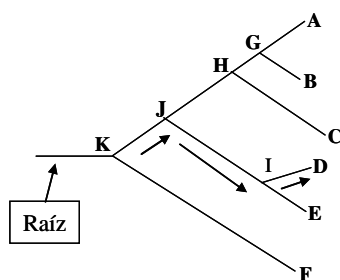


Fig. 5. Estructura de un árbol filogenético enraizado. A, B, C, D, E y F representan los nodos externos u OTUs. Mientras que G, H, I, J y K son los nodos internos o HTUs. K representa el nodo raíz. Las líneas entre los nodos son ramas y las flechas indican la dirección de evolución (Holder y Lewis, 2003).

Un grupo de taxones que pertenecen a la misma rama tienen un origen monofilético y se le denomina clado. En la Fig. 5, los taxones A, B y C forman un clado que tienen como ancestro común a H, y por lo tanto, tienen un origen **monofilético** (grupo monofilético). Un grupo se considera **parafilético** cuando contiene un taxón ancestral (J) y sólo una parte de sus descendientes (D, E, y C). Por último, un grupo se considera **polifilético** cuando contiene algunos taxones terminales, pero no un ancestro común (F y C) (Salemi y Vandamme, 2003, Harrison y Langdale, 2006).

El primer paso implícito en la construcción de los árboles filogenéticos es la realización de una matriz de datos, la cual contendrá las secuencias alineadas. Este alineamiento puede hacerse de forma manual, aunque se recomienda el uso de programas diseñados para tal efecto, como el Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Dicho programa permite visualizar y resaltar las diferencias y similitudes presentes entre secuencias, sin cambiar el orden de los nucleótidos. Asimismo, este paso permite establecer cuantitativamente que tan parecidas son dos secuencias, es decir, nos permite establecer el **porcentaje de identidad o similitud**, el cual se determina cuantificando el número de residuos que son idénticos dividido por la longitud total del alineamiento (Salemi y Vandamme, 2003).

Posteriormente, se aplican métodos para inferir la filogenia, los cuales asumen que las diferencias observadas entre secuencias homólogas de distintos seres vivos son el resultado de procesos evolutivos específicos. Por lo tanto, estos métodos pretenden ser modelos de dichos procesos evolutivos, y de esta forma reconstruir las relaciones existentes entre esos organismos. Los métodos de filogenia molecular basados en secuencias de ADN se pueden diferenciar en dos grupos: **métodos basados en distancias genéticas** y **métodos basados en caracteres conservados** (Salemi y Vandamme, 2003; Harrison y Langdale, 2006).

En los métodos basados en distancias genéticas se calcula un índice de diferencia para cada par de secuencias comparadas, la cual se denomina distancia genética. Con todas las distancias calculadas se elabora una matriz de distancias que sirve para construir el árbol filogenético que mejor se ajuste a ellas, utilizando distintos algoritmos. Estos métodos basados en distancias genéticas tienen el inconveniente que reducen toda la información de la secuencia a un único número, asumiendo que este parámetro refleja la divergencia evolutiva existente (Bowman *et al.* 1992). Uno de los métodos basados en distancias genéticas utilizado en la presente tesis es el método de ***neighbor-joining***, o del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987), el cual agrupa las secuencias con menor distancia genética, siguiendo el principio de mínima evolución propuesto por Saitou y Imanishi (1989). Así, el árbol obtenido es aquel en el que la suma total de las longitudes de las ramas es la menor.

Los métodos basados en caracteres conservados consideran cada posición nucleotídica como un carácter independiente. Por tanto, cuando más largas son las secuencias que comparamos, habrá un mayor número de caracteres y se obtendrá más información. Este método, a partir del alineamiento de las secuencias, evalúa los cambios que han tenido lugar en cada posición nucleotídica entre las distintas secuencias y establece las posibles relaciones filogenéticas siguiendo distintos criterios (DeSalle *et al.*, 1994). A diferencia de los métodos basados en distancias genéticas, los métodos basados en caracteres conservados utilizan toda la información contenida en la secuencia. Un inconveniente de estos métodos, es el mayor requerimiento de tiempo y potencia de cálculo que necesita. En muchas ocasiones no es posible realizar una búsqueda exhaustiva del mejor árbol posible, siendo inevitable el uso de algoritmos

de búsqueda heurística. Estos algoritmos permiten una estimación bastante aproximada de las relaciones filogenéticas, aunque no garantizan que el árbol obtenido sea el mejor de todos los posibles (DeSalle *et al.*, 1994). El método más utilizado es el de **máxima parsimonia** (Swofford y Olsen, 1990). En él se calcula el número de cambios evolutivos que requiere cada uno de los árboles posibles y a dicho número se le considera como la longitud del árbol. De todos los árboles posibles, se selecciona el que requiere un menor número de cambios (el árbol de menor longitud). Una vez obtenido el árbol, es necesario determinar el grado de fiabilidad del mismo. Existen diferentes métodos para determinar la fiabilidad, uno de los más utilizados es el **análisis de bootstrap** (Felsenstein, 1985; Hillis y Bull, 1993), el cual se basa en generar un número elevado de pseudoreplicas de la matriz original y analizarlas utilizando cualquiera de los métodos de reconstrucción filogenética. Las pseudoreplicas se obtienen mediante muestreos sucesivos, al azar, con repeticiones de las columnas (caracteres) de la matriz original para obtener una nueva matriz del mismo tamaño que la original (Felsenstein, 1985). El resultado final es el valor de *bootstrap*, que indica el total de veces que una rama determinada se ha obtenido en el total de réplicas. Dicho valor, se expresa en tanto por ciento, considerando que los grupos que presentan un valor superior al 70% tienen un buen soporte estadístico (Felsenstein, 1985; Salemi y Vandamme, 2003).

En el caso particular de estudios multigénicos, en los cuales se construyen árboles con los datos aportados por la unión de varios genes, se debe realizar una prueba estadística que permita determinar si los *loci* escogidos se pueden combinar (congruencia filogenética). Para ello, el método más ampliamente utilizado es la prueba de partición de homogeneidad (PHT) (Farris *et al.*, 1995).

1.2.2. Tipado mediante secuenciación multilocus (MLST)

El MLST es una técnica de tipificación genérica utilizada para la caracterización de aislados a nivel molecular. Este método permite diferenciar cepas de una misma especie, al comparar nucleótidos polimórficos simples (SNPs) de cinco a siete fragmentos de genes, tradicionalmente *housekeeping*, es decir, genes que codifican proteínas necesarias para las funciones básicas de las células (Tavanti *et al.*, 2005). En algunos casos, la cantidad de SNPs presentes en un fragmento de gen no *housekeeping* ha permitido su selección para ser utilizado en este esquema, dado que la finalidad de esta metodología es la búsqueda de variabilidad para lograr identificar cepas (Bain *et al.*, 2007; Jacobsen *et al.*, 2007). Entre los pasos implícitos en el esquema MLST se encuentran:

1.- **Seleccionar el panel de genes a ensayar.** Los genes se seleccionan según trabajos moleculares previos (estudios de filogenia, variabilidad genética y tipificado) que incluyan aislados pertenecientes a la especie motivo de estudio o a especies molecularmente relacionadas. Durante esta preselección, debemos tener en cuenta que el panel final debe incluir

5–10 genes que estén lo más repartidos posible a lo largo del genoma fúngico. Se recomienda no escoger zonas concretas del genoma, especialmente, las sometidas a procesos de recombinación y/o mutación (Maiden, 2006). Estos genes deberían tener entre 400 a 500 pares de bases (pb), aunque el tamaño del gen no es excluyente, tal y como se observa en los trabajos MLST de Tavanti *et al.*, (2005), Bain *et al.* (2007) y O'Donnell *et al.* (2009).

2.- Elección de los aislados a los cuales se le aplicará el esquema MLST. Se recomienda que dichos aislados sean de diferentes zonas geográficas, orígenes (clínicos y/o ambientales) y años de aislamiento. El número total de aislados se establece en función a la cantidad disponible, aunque se recomienda un mínimo de 100 y que preferiblemente hayan sido caracterizados mediante otra metodología molecular, como RFLP, AFLP, RAPD, entre otras. Este procedimiento permitirá validar los resultados que se obtengan con MLST. Del total de aislados se seleccionarán 10–15 que representen a tipos genéticos y/o fenotípicos lo más diverso posible, los cuales se utilizarán para evaluar el panel de genes preseleccionados (Maiden, 2006).

3.- Secuenciación de todos los genes preseleccionados a los aislados representativos. Se determinará la cantidad de SNPs presente en cada gen y para cada cepa, con la finalidad de seleccionar entre 5–7 genes que ofrezcan un mayor grado de polimorfismo. Si no hubiera 5–7 genes con un nivel aceptable de polimorfismo, se debe analizar una nueva batería de genes hasta conseguir el objetivo planteado (Taylor y Fisher, 2003).

4.- Secuenciación de los genes seleccionados a los restantes aislados. Se identifican los SNPs y se les asigna un número a cada alelo generado. Para ello, las secuencias (alelos) de cada *locus* se alinean en una base de datos centralizada; a aquellas secuencias idénticas entre si, se les asigna un mismo número de alelo, en caso contrario, es decir, si presentan distintos SNPs se les asignará un nuevo número y así sucesivamente. Posteriormente, se procede a generar un perfil alélico que será la combinación de los cinco o siete genes previamente asignados, estas combinaciones se denominan Secuencias Tipo (ST) (Fig. 6) (Maiden, 2006). Asimismo, los alelos se pueden analizar con algunos algoritmos, tales como el eBURST, el cual permite agrupar todos los aislados relacionados en complejos clonales. Incluso en algunos casos dicho programa puede predecir el origen de los mismos. Además, estos alelos pueden ser utilizados para establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas estudiadas (Feil *et al.*, 2004).

5.- Publicar la base de datos en internet. El incluir dicha base en una página web como <http://mlst.net>, o cualquier otra, permitirá a la comunidad científica consultar los alelos obtenidos, los perfiles alélicos y anexar secuencias con el objetivo de relacionarlas con otras ya existentes en la base de datos.

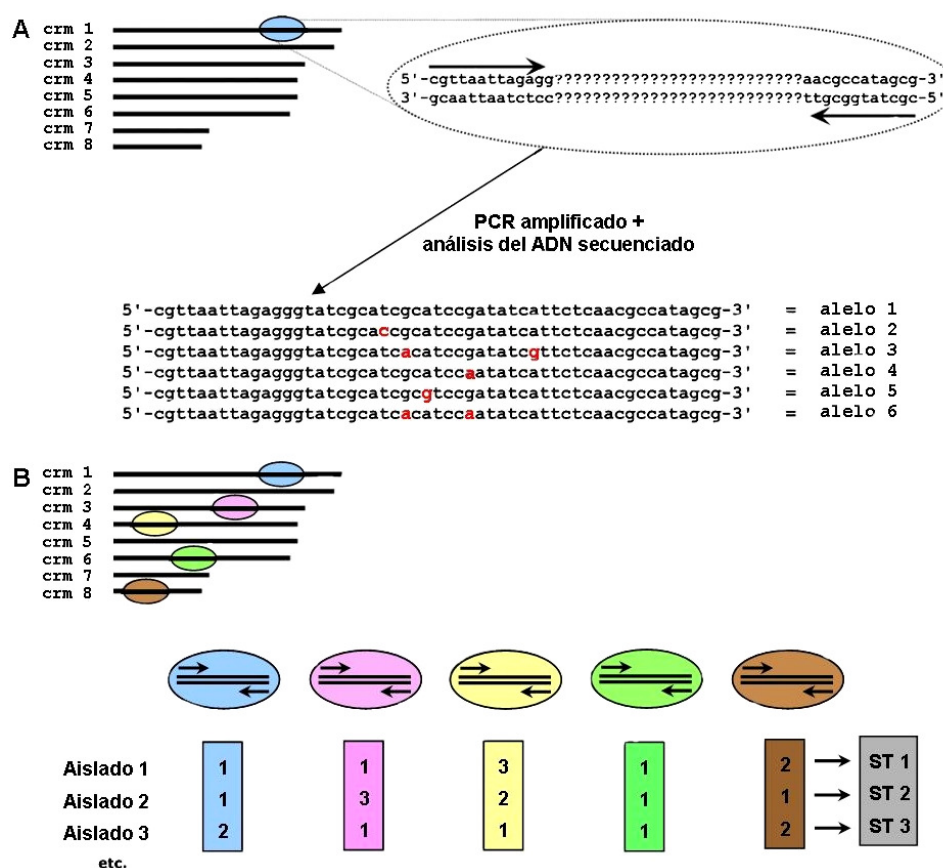


Fig. 6. Principios del esquema MLST. (A) Los fragmentos de genes seleccionados son amplificados por PCR y posteriormente secuenciados. Las variantes alélicas son enumeradas. (B) Una secuencia tipo (ST) es una única combinación de variantes alélicas (Klaassen, 2009).

El esquema MLST se ha aplicado a hongos de importancia médica, como *Aspergillus fumigatus* Fresen. (Bain *et al.*, 2007), especies de *Candida* Berkhout (Bougnoux *et al.*, 2003; Dodgson *et al.*, 2003; Tavanti *et al.*, 2005; Jacobsen *et al.*, 2007), *Coccidioides immitis* G.W. Stiles (Koufopanou *et al.*, 1997), especies de *Cryptococcus* Vuill. (Halliday y Carter 2003; Litvintseva *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009), especies de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2009; Debourgogne *et al.*, 2010), *Histoplasma capsulatum* Darling (Kasuga *et al.*, 1999) y *Penicillium marneffeii* Segretain (Lasker, 2006), lo cual ha permitido correlacionar ST obtenidas con distribución geográfica, grado de virulencia y actividad frente a los antifúngicos.

1.3. Infecciones causadas por hongos filamentosos

A los procesos infecciosos por hongos se les conoce con el nombre de micosis. El establecimiento de una micosis implica la capacidad del microorganismo de crecer en las condiciones de pH, temperatura y potencial redox presentes en tejidos del huésped, siendo dichas condiciones generalmente poco favorables para el crecimiento y desarrollo de los

hongos. La mayoría de hongos poseen escaso poder patógeno, sin embargo, algunas especies han logrado adaptarse a las condiciones desfavorables impuestas por el huésped y desarrollarse en sus tejidos. Los patógenos deben poseer ciertas características que les permitan sobrevivir en tal ambiente, así como mecanismos para evadir las defensas del huésped. Las formas de virulencia de un microorganismo dependen tanto de las características del microorganismo como del propio huésped, por lo que el establecimiento de una enfermedad infecciosa depende del estrecho equilibrio entre el huésped y el microorganismo (Clemons y Stevens, 2000; Casadevall y Pirofski, 2001).

Durante los últimos años se ha observado un incremento de las micosis, sobre todo las de tipo oportunista, es decir, aquellas infecciones producidas por hongos que forman parte de la microbiota del hombre, o bien, por aquellos hongos considerados saprófitos y que se encuentran en el ambiente colonizando una gran diversidad de sustratos (suelo, agua o aire). Estos hongos, en situaciones de inmunodeficiencia del huésped, pueden colonizar, infectar y producir enfermedad, incluso llevarlo a la muerte (Webster y Weber, 2009). Son numerosos los factores que propician la aparición de infecciones fúngicas oportunistas, entre ellos podemos citar: el incremento de tratamientos médicos quirúrgicos invasivos, el aumento de pacientes inmunocomprometidos como pacientes con cáncer, receptores de trasplantes y pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además de lo expuesto, los mecanismos de adaptación de algunos microorganismos que conllevan a la aparición de resistencia a los antifúngicos han complicado el cuadro de estas patologías (Fridkin y Jarvis, 1996; Richardson y Lass-Flörl, 2008). Los factores antes mencionados han producido incluso la aparición de micosis con nuevas presentaciones clínicas o con localizaciones poco habituales. Asimismo, en los últimos años se ha registrado un aumento del diagnóstico de especies fúngicas (hongos patógenos emergentes), que excepcionalmente producían enfermedad en individuos inmunocomprometidos (Richardson y Lass-Flörl, 2008; Horr  *et al.*, 2010).

1.4. Hongos filamentosos oportunistas

En la actualidad, la mayoría de las micosis oportunistas siguen siendo ocasionadas por especies fúngicas pertenecientes a los géneros anamórficos, entre los más frecuentes podemos citar: *Aspergillus*, *Fusarium* o *Scedosporium*. Sin embargo, el número de casos clínicos atribuidos a especies de *Acremonium* Link, *Paecilomyces* Bainier, *Phialemonium* W. Gams & McGinnis, *Scopulariopsis* Bainier, *Trichoderma* Pers., entre otros, han aumentado considerablemente en los últimos veinte años. Son hongos que producen infecciones, generalmente, difíciles de diagnosticar y con un alto porcentaje de morbilidad y de mortalidad (Guarro *et al.*, 1999a; Richardson y Lass-Flörl, 2008; Revankar y Sutton, 2010). Las especies de hongos oportunistas estudiadas en la presente tesis pertenecen a los siguientes géneros

anamórficos: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Lecythophora* Nannf., *Phialemonium* y *Paecilomyces*.

1.4.1. *Scedosporium*

El género *Scedosporium* comprende cuatro especies de importancia clínica: *S. boydii* (Shear) Gilgado, Gené, Cano & Guarro, anamorfo de *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *S. apiospermum* Sacc. ex Castell. & Chalm. anamorfo de *P. apiosperma* Gilgado, Gené, Cano & Guarro, *S. prolificans* (Hennebert & B.G. Desai) E. Guého & de Hoog y la especie recientemente descrita *S. aurantiacum* Gilgado, Cano, Gené & Guarro (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008; Cortez *et al.*, 2008; Gilgado *et al.*, 2010). Estos hongos son de distribución mundial y se aíslan con frecuencia a partir de muestras de suelo o de agua procedente de alcantarillas, arroyos, aguas estancadas o de estiércol. Aunque son especialmente abundantes en clima templado, también se han aislado de regiones tropicales (Domsch *et al.*, 2007; Cortez *et al.*, 2008, Harun *et al.*, 2009a). Sin embargo, el nicho ecológico de estos hongos sigue siendo incierto. Un limitado número de estudios han indicado que estas especies se aíslan predominantemente en ambientes muy explotados por actividades agrícolas o entornos urbanos, tales como ciudades y zonas industrializadas, pero la asociación entre la aparición de *Scedosporium* spp. en el medio ambiente y la prevalencia de escedosporiosis sigue siendo dudosa (Cortez *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2010a).

1.4.1.1. Taxonomía

Este género ha sufrido diversos cambios nomenclaturales desde comienzos de 1910, cuando se describió el primer aislado relacionado con este género. Saccardo, en 1911, aisló de un paciente con micetoma un hongo al cual denominó *Monosporium apiospermum*. Años después, el mismo autor denominó a este mismo hongo como *Scedosporium*, sin proponer formalmente el género. En 1919, Castellani y Chalmers validan el nombre *Scedosporium* y hacen la nueva combinación, *S. apiospermum*. En 1922, Shear describe el ciclo de vida de un nuevo ascomycete, *Allescheria boydii*, aislado de un micetoma. En 1944, Emmons sugirió que *M. apiospermum* era el anamorfo de *A. boydii*. En 1970, Malloch reclasificó el teleomorfo como *Petriellidium boydii*, y más tarde este género fue considerado sinónimo de *Pseudallescheria*, otro género de ascomicetos pertenecientes a los Microascales. Hughes consideró *S. apiospermum* como nombre correcto para el anamorfo de *P. boydii* (Hughes, 1958).

En 1984, Malloch y Salkin describieron la nueva especie *Scedosporium inflatum*, aislada de médula de un niño inmunocompetente. En 1991, Gueho y De Hoog, mediante el método de reasociación ADN/ADN, demostraron que *Lomentospora prolificans* tenían 100% de identidad con *S. inflatum*, por lo que propusieron la nueva combinación *S. prolificans*. Más recientemente, a partir de datos genéticos y morfológicos, Gilgado *et al.* (2005, 2008, 2010)

propusieron, tal y como se ha indicado previamente, las especies *S. aurantiacum*, *S. boydii* y *S. dehoogii*.

En los últimos años, se han aplicado diversas técnicas moleculares para tipificar aislados del género *Scedosporium* con el objetivo de discriminar entre cepas, identificar posibles fuentes de infección, determinar grados de virulencia o evaluar la actividad frente a los antifúngicos (San Millan *et al.*, 1997; Gilgado *et al.*, 2006; Delhaes *et al.*, 2008). Los métodos moleculares más discriminatorios para especies de *Scedosporium* son: AFLP, RAPD, la huella genética o PCR *fingerprinting* y PCR de secuencia entre repeticiones simples (ISSR-PCR) (San Millan *et al.*, 1997; Ruiz-Diez *et al.* 1997; Solé *et al.*, 2003; Delhaes *et al.*, 2008). Dichos análisis han mostrado diversos grados de variación genética, incluso en algunos se han obtenido resultados contradictorios. Las inconsistencias de resultados podrían estar influenciadas por varios factores, tales como diferencias en los métodos y marcadores utilizados, la selección de cepas no representativas o el limitado número de aislados estudiados (San Millan *et al.*, 1997; Ruiz-Diez *et al.* 1997; Solé *et al.*, 2003; Delhaes *et al.*, 2008). Estos datos avalan la necesidad de aplicar nuevas metodologías que permitan discernir entre cepas de la misma especie y, en especial, correlacionar estos datos con la epidemiología de estos hongos.

1.4.1.2. Importancia clínica

En los últimos años se ha reportado un incremento en el número de infecciones causadas por especies del género *Scedosporium*, también denominadas escedosporiosis. Actualmente son considerados hongos patógenos emergentes, responsables de infecciones cutáneas y subcutáneas en pacientes con factores de riesgo, tales como linfopenia, tratamientos con esteroides, neutropenia y diabetes. La escedosporiosis se cita frecuentemente como infecciones nosocomiales especialmente en pacientes que presentan daños en el tracto respiratorio, como es el caso de la fibrosis quística (De Hoog *et al.*, 2000; Cortez *et al.*, 2008). También se han descrito casos de escedosporiosis en pacientes inmunocompetentes tras haber sufrido grandes traumas, cirugías o en aquellas personas que han estado cercanas al ahogamiento (Cortez *et al.*, 2008).

Los cuadros clínicos que se han descrito son muy diversos: micetoma, artritis, osteomielitis, endoftalmítis u otras infecciones oculares, onicomycosis, sinusitis, otitis, bolas fúngicas pulmonares, broncopatías alérgicas, cuadros graves con infecciones pulmonares invasivas, endocarditis, infecciones del sistema nervioso central, entre otras (Dalton *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008). Muchas de estas infecciones derivan en micosis sistémicas, las cuales suelen ser mortales debido a la elevada virulencia y a la resistencia a los tratamientos antifúngicos convencionales que presenta este grupo de hongos (Cortez *et al.*, 2008).

En relación a los mecanismos de transmisión son pocos los datos disponibles. Sin embargo, se cree que las infecciones son adquiridas cuando los conidios se introducen en el

organismo por vía respiratoria, a través de inhalación de esporas o aspiración de aguas contaminadas. La escedosporiosis cutáneas, articulares y micetomas se adquieren por vía traumática (Harun *et al.*, 2010a).

La distribución geográfica de las infecciones causadas por *S. prolificans* es muy peculiar. Los principales registros de infecciones por este hongo proceden de Australia y España, países en donde se ha diagnosticado infecciones sistémicas, y de los Estados Unidos, en donde predominan casos de infecciones localizadas (Solé *et al.*, 2003; Cortez *et al.*, 2008). Estudios realizados en Australia indican la relevancia clínica de la especie *S. aurantiacum*, como patógena oportunista, en pacientes con los factores de riesgo antes descrito (Cortez *et al.*, 2008; Delhaes *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2010b).

Aunque son varias las especies de *Scedosporium* de importancia clínica, sólo dos de ellas se han estudiado en la presente tesis, *S. aurantiacum* y *S. prolificans* (Fig. 7). Dado que, estas especies son especialmente prevalentes en España y Australia, y por ende, epidemiológicamente importantes para ambos países. Nuestro laboratorio conjuntamente con el *Molecular Mycology Research Laboratory, The University of Sydney Western* se han planteado efectuar una revisión de las principales metodologías de tipificación molecular aplicadas en hongos, con el objeto de determinar el método de elección para el tipificado de *S. prolificans* y *S. aurantiacum*.

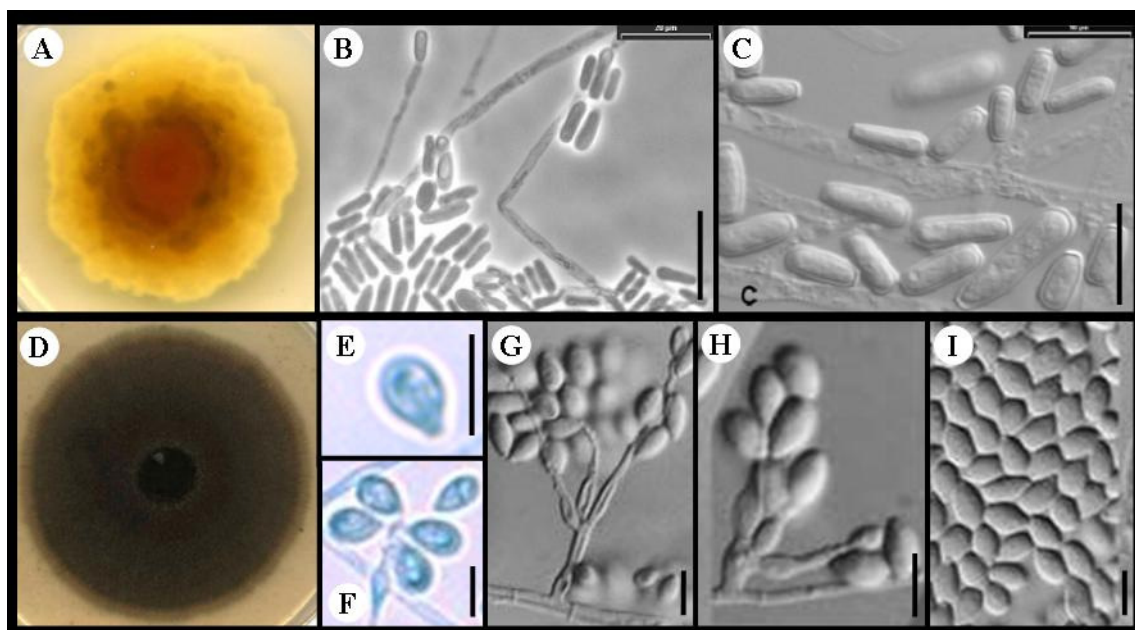


Fig. 7. (A–C) *Scedosporium aurantiacum* (CBS 116910^T); (A) Reverso de la colonia en agar patata dextrosa (PDA) a los 14 días de incubación a 25°C; (B, C) Células conidiógenas y conidios. (D–I) *S. prolificans* (CBS 114.90^T); (D) Colonia en PDA a los 14 días de incubación a 25°C; (F, G, H) Células conidiógenas y conidios; (E, I) Conidios. Escala de las barras: B= 20µm; C= 10µm; E–I= 5µm.

1.4.2. *Acremonium*

Acremonium es un género de hongos anamórficos que incluye especies cosmopolitas, frecuentemente aisladas de suelo y restos vegetales en descomposición. En la actualidad se conocen unas 150 especies, procedentes de Europa, Asia, Egipto y del norte y centro de América. Algunas de estas especies son patógenas oportunistas para el hombre y animales, incluso algunas también lo son para plantas. En animales, se han descrito como agentes causales de mastitis y abortos en vacas (Dion y Dukes, 1979), de alopecia, queratitis y micosis sistémica en gatos y perros (Isaia *et al.*, 2000). En plantas, *A. cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams & García-Jim es un conocido patógeno primario de la raíz del melón (*Cucumis melo*) y *A. lactucae* H.J. Lin, C.Y. Chien & J.W. Huang afecta a plantaciones de lechuga (*Lactuca sativa*) (Armengol *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004). Una especie que destacan en la industria farmacéutica es *A. chrysogenum* (Thirum. & Sukapure) W. Gams por ser un conocido productor de cefalosporina C, cefalosporina P1-P5 y penicilina N (Campos Muñoz *et al.*, 2007).

1.4.2.1. Taxonomía

Acremonium, con *A. alternatum* Link como especie tipo, es un género cuyas especies suelen presentar una morfología muy simple, pero su taxonomía es complicada y confusa. De hecho, las especies de *Acremonium* se han descrito como anamorfos de diversos géneros de ascomicetes, entre los que podemos citar: *Epichloë* J.F. White, *Hapsidospora* Malloch & Cain, *Hypocrea* Fr., *Hypomyces* (Fr.) Tul. & C. Tul., *Mycoarachis* Malloch & Cain, *Nectria* (Fr.) Fr., *Nectriella* Nitschke ex Fuckel, *Nectriopsis* Maire, *Nigrosabulum* Malloch & Cain, *Pronectria* Clem. y *Thielavia* Zopf (Guarro *et al.*, 1997; Glenn *et al.*, 1996). En 1971, Gams realizó un exhaustivo estudio taxonómico del género y transfirió especies de otros géneros anamórficos como *Cephalosporium* Corda, *Gliomastix* Guég. y *Paecilomyces* a *Acremonium*, aceptando un total de 82 especies. Dichas especies se distribuyeron en tres secciones: *Simplex* (renombrada como sección *Acremonium* en 1975), *Nectrioidea* y *Gliomastix* (Gams 1971, 1975). Posteriormente, Morgan-Jones y Gams (1982) propusieron otras dos secciones: *Chaetomioidea*, la cual se creó para aquellos anamorfos que tenía teleomorfos dentro del género *Chaetomium*, y la sección *Albolanosa*, con anamorfos relacionados con la familia Clavicipitaceae.

Acremonium se caracteriza morfológicamente por presentar colonias de crecimiento lento o moderado, con células conidiógenas monofialídicas, delgadas, cilíndricas y con un septo basal. Los conidios son unicelulares y se disponen en cabezas mucosas o en cadenas (Gams, 1971) (Fig. 8). Es un género que presenta características morfológicas similares a otros géneros, tales como *Phialemonium*, *Lecythophora*, *Lecanicillium* W. Gams & Zare, *Simplicillium* W. Gams & Zare, *Cylindrocarpon* Wollenw. o *Fusarium*, entre otros, por lo que algunas de sus especies pueden ser fácilmente confundidas por hongos de otros géneros (Guarro *et al.*, 1999; Summerbell, 2003).

Existen pocos trabajos que aborden las relaciones filogenéticas de las especies de *Acremonium*. Glenn *et al.* (1996) realizaron el primer estudio molecular que incluyó nueve cepas tipos o de referencia de *Acremonium*, las cuales se encontraban distribuidas en las cinco secciones antes mencionadas. Estos autores, mediante el análisis del 18S del ADNr, demostraron que las especies estudiadas estaban relacionadas con tres órdenes de ascomycetes: Sordariales, Clavicipitales e Hypocreales, concluyendo que *Acremonium* era un género polifilético. En este mismo artículo se transfirieron las especies de *Acremonium* incluidas en Clavicipitales al nuevo género *Neotyphodium* Glenn, C.W. Bacon & Hanlin. Además, demostraron que la mayoría de especies del género, incluyendo la especie tipo, y otras especies de importancia clínica, *A. kiliense* Grütz y *A. strictum* W. Gams, estaban relacionadas con los Hypocreales.

Novicki *et al.* (2003) secuenciaron los ITS y los dominios D1-D2 del 28S ADNr de seis aislados clínicos, cinco morfológicamente identificados como *A. strictum* y uno como *Acremonium* sp. De acuerdo al porcentaje de similitud que mostraron frente a las secuencias de la cepa tipo de *A. strictum* y una cepa de referencia de *A. alternatum*, los aislados se distribuyeron en tres genogrupos (I-III): el genogrupo I estaba formado por la cepa de *Acremonium* sp. y la cepa tipo de *A. strictum*; el genogrupo II incluía un aislado clínico identificado como *A. strictum* y la cepa de referencia de *A. alternatum*, y el genogrupo III estaba integrado por el resto de aislados y una cepa de *Nectria mauritiicola* (Henn.) Seifert & Samuels. Este estudio puso en evidencia la problemática sobre la identificación morfológica de las especies de *Acremonium* y la importancia de las técnicas moleculares para la identificación de las mismas. Además, este estudio puso en evidencia que *A. strictum* era probablemente un complejo de especies (Novicki *et al.*, 2003).

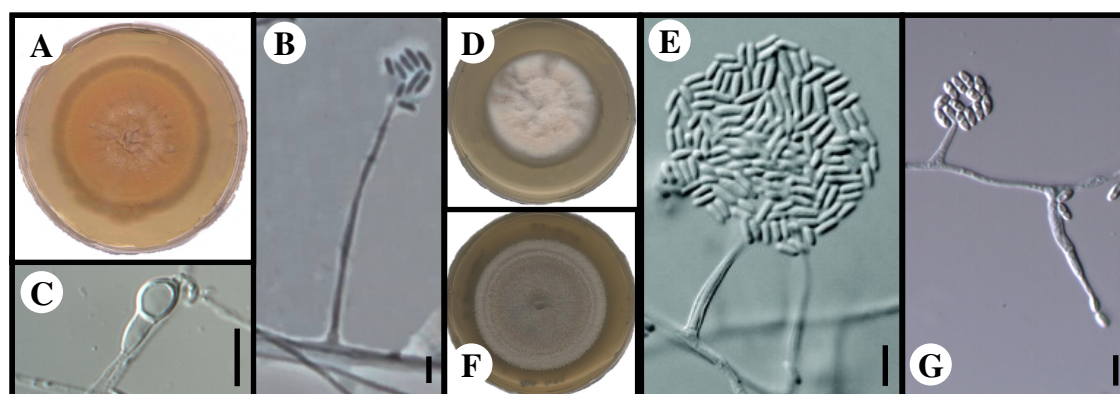


Fig. 8. (A–C) *Acremonium kiliense* (MUCL 9724^T); (A) Colonia en agar harina de avena (OA) a los 14 días de incubación a 25°C; (B) Fiálide y conidios; (C) Clamidospora. (D, E) *A. strictum* (CBS 346.70^T); (D) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (E) Fiálide y conidios. (F, G) *A. atrogriseum* (CBS 604.67^T) (F) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (E) Fiálide y conidios. Escala de las barras: B–G= 10µm.

1.4.2.2. Importancia clínica

Algunos miembros del género *Acremonium* son capaces de causar diversos tipos de infecciones en humanos (Tabla 1), tales como: onicomycosis, infecciones oculares (queratitis, endoftalmitis), peritonitis asociada a catéter, infecciones en tejido blando, micetomas, artritis y fungemia (Fincher *et al.*, 1991; Guarro *et al.*, 1997; Summerbell, 2003; Das *et al.*, 2010). Muchas de estas patologías suelen ir asociadas a pacientes con factores predisponentes como la enfermedad de Addison, neutropenia, inmunosupresión, abuso de drogas intravenosas o quemaduras (Fincher *et al.*, 1991; Guarro *et al.*, 1997; Anadolu *et al.*, 2001). Los casos de micetomas son frecuentes en pacientes inmunocomprometidos con trasplantes de órganos o diabéticos que han sufrido heridas penetrantes, aunque existen casos en los que el paciente no recuerda haber sufrido ningún tipo de traumatismo. Las queratitis por *Acremonium* suelen desarrollarse posteriormente a un traumatismo con material vegetal contaminado o después de tratamientos con esteroides tópicos (Guarro *et al.*, 1997; Fincher *et al.* 1991; Rodríguez-Ares *et al.*, 2000).

En la Tabla 1 se detallan las principales micosis registradas en la literatura y sus respectivos agentes causales, siendo *A. kiliense* y *A. strictum* las especies más frecuentemente identificadas (Fincher *et al.*, 1991; Guarro *et al.*, 1997; Summerbell, 2003; Das *et al.*, 2010). Cabe destacar que el número de casos, en los cuales sólo se llega a la identificación de género, supera a aquellos en los que las cepas se han identificado a nivel de especie (Guarro *et al.*, 1997, Das *et al.* 2010).

Tabla 1. Infecciones causadas por *Acremonium* spp. descritas en la literatura

Agente causal	Sitio o tipo de infección (Nº de casos)	Total de casos
<i>Acremonium</i> sp.	Infección ocular (13)	61
	Onicomycosis (8)	
	Sistémica (6)	
	Fungemia (4)	
	Lesión cutánea (4)	
	Micetoma (4)	
	Neumonía (4)	
	Acceso vascular para hemodiálisis (3)	
	Endocarditis (2)	
	Rodilla (2)	
	Sistema nervioso central (2)	
	Sinusitis (2)	
	Esófago (1)	
	Laringe (1)	
	Osteomielitis vertebral (1)	
	Peritonitis (1)	
Piomiositis (1)		
Velo del paladar (1)		
Tracto gastrointestinal (1)		

Tabla 1. Infecciones causadas por *Acremonium* spp. descritas en la literatura (cont.)

Agente causal	Sitio o tipo de infección (Nº de casos)	Total de casos
<i>Acremonium strictum</i>	Sistémica (10)	21
	Peritonitis (3)	
	Infección ocular (2)	
	Neumonía (2)	
	Sistema nervioso central (2)	
	Lesión cutánea (1)	
	No mencionado (1)	
<i>Acremonium kiliense</i>	Micetoma (3)	9
	Peritonitis (2)	
	Sistémica (2)	
	Endocarditis (1)	
	Infección ocular (1)	
<i>Acremonium recifei</i>	Micetoma (1)	2
	Lesión de piel (1)	
<i>Acremonium alabamense</i>	Sistema nervioso central (1)	1
<i>Acremonium atrogriseum</i>	Infección ocular (1)	1
<i>Acremonium potronii</i>	Infección ocular (1)	1
<i>Acremonium roseogriseum</i>	Rodilla (1)	1

Teniendo en cuenta lo expuesto, podemos indicar que la incidencia real de las especies de *Acremonium* implicadas en infecciones humanas todavía se desconoce. La cual se irá conociendo a medida que se incorpore la identificación molecular como herramienta rutinaria para la identificación de *Acremonium*, pero para ello será imprescindible que antes se resuelva la taxonomía de este complejo género de hongos anamórficos.

1.4.3. *Phialemonium*

El género *Phialemonium* fue propuesto por Gams y McGinnis (1983) para acomodar hongos anamórficos que presentaban una morfología intermedia entre *Acremonium* y *Phialophora* Medlar. En la actualidad, sólo se aceptan dos especies, la especie tipo de género, *P. obovatum* W. Gams & W.B. Cooke y *P. curvatum* W. Gams & McGinnis, ambas descritas como patógenos oportunistas para el hombre (De Hoog *et al.*, 2000). Aunque, estas especies presentan colonias de color blanco u ocráceo, son consideradas hongos dematiaceos dado que presentan melanina en sus paredes celulares, la cual se evidenció a través de la tinción de Fontana-Masson (Wood y Russel-Bell, 1983).

Son hongos ampliamente distribuidos en la naturaleza, habiéndose aislado de agua, suelo y aire. Cabe destacar que el diagnóstico de infecciones asociadas a catéteres, válvulas protésicas o su aislamiento del sistema de distribución de agua de las máquinas de hemodiálisis, ha permitido demostrar la habilidad de estos hongos para colonizar plástico y otros materiales (Gams y McGinnis, 1983; Gavin *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2009). A su vez, *P. curvatum* se ha utilizado para el control biológico de hongos que causan decoloración de la madera (Hiratsuka y Chakravarty, 1999). Esta especie además tiene la capacidad de degradar pepsina y lignina

(compuestos del ácido poligalacturónico), por lo que se le considera un potencial candidato para la deslignificación en el proceso de fabricación de pasta para el consumo humano (Okamura *et al.*, 2010).

1.4.3.1. Taxonomía

Gams y McGinnis (1983) propusieron el género *Phialemonium* para acomodar a tres especies: *P. obovatum*, *P. curvatum* y *P. dimorphosporum* W. Gams & W.B. Cooke. Más tarde, Guarro *et al.* (1999b) demostraron mediante el análisis de patrones de RFLP que *P. curvatum* y *P. dimorphosporum* eran una misma especie, aunque dicha sinonimia no fue aceptada por otros autores (Yaguchi *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2007). Estos hongos se caracterizan por presentar colonias blancas que al envejecer se vuelven de color crema u ocráceo, desarrollan abundantes fialídes cilíndricas, cortas, no delimitadas por un septo basal (adelofialídes), y más raramente de fialídes discretas tipo *Acremonium*, en las cuales no se observan collaretes o son poco evidente (Gams y McGinnis, 1983). En *P. obovatum* las adelofialídes son de cilíndricas a ligeramente infladas, los conidios son obovados, de base estrecha y truncada, y se observan clamidosporas, mientras que en *P. curvatum* las adelofialídes son cilíndricas, los conidios son cilíndricos, rectos o curvados, y no se observan clamidosporas. Algunos aislados de esta última especie desarrollan esporodoquios, una estructura no descrita en el protólogo (Fig. 9) (Gams y McGinnis, 1983; Scott *et al.*, 2004; Weinberger *et al.*, 2006). Un género morfológicamente similar a *Phialemonium* es *Lecythophora*, los miembros de ambos géneros presentan predominancia de adelofialídes. Sin embargo, tanto las fialídes como las adelofialídes de *Lecythophora* presentan ápices con engrosamiento periclinal y un collarete conspicuo de más de 1 μm de alto. La presencia de collaretes prominentes en las células conidiógenas también nos permite diferenciar *Phialophora* de *Phialemonium* (Gams y McGinnis, 1983; Weber, 2002).

Yaguchi *et al.* (2006) describieron a *Cephalotheca foveolata* Yaguchi, Nishim. & Udagawa, un ascomicete con *Phialemonium* como anamorfo. Dichos autores analizaron las secuencias de los dominios D1-D2 del 28S ADNr de las cepas tipo y de referencia de las especies de *Phialemonium* y demostraron que *P. obovatum* estaba filogenéticamente relacionada con los miembros de la familia Cephalothecaceae, mientras que *P. curvatum* y *P. dimorphosporum* se encontraban muy distantes de dicha familia. Por tanto, al igual que *Acremonium*, *Phialemonium* era polifilético.

1.4.3.2. Importancia clínica

El primer caso de infección causada por *Phialemonium* se describió en 1986 y desde entonces se han publicado más de 20 casos en la literatura, la mayoría en los últimos 10 años (Rivero *et al.*, 2009). A diferencia de las infecciones causadas por otros hongos dematiaceos, las causadas por *Phialemonium* son micosis sistémicas que sufren, tanto pacientes

inmunocomprometidos, como inmunocompetentes. Raramente causan infecciones subcutáneas (Rivero *et al.*, 2009).

Phialemonium obovatum se ha descrito como agente causal de sepsis, espondilodiscitis, peritonitis, infección pulmonar y endocarditis en un neonato (King *et al.*, 1993; Gavin *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2009). *Phialemonium curvatum* se ha descrito como agente de endocarditis, endoftalmitis, peritonitis, artritis y fungemias (Guarro *et al.*, 1999b; Gavin *et al.*, 2002; Proia *et al.*, 2004; Oshero *et al.*, 2006; Strahilevitz *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2009; Zayit-Soudry *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2009; Revankar y Sutton, 2010). A pesar de que existen recientes trabajos de revisión sobre infecciones por *Phialemonium*, el diagnóstico del agente causal, en la mayoría de ellos, se ha realizado a partir de datos morfológicos de los aislados. Considerando la dificultad de identificar morfológicamente las especies del género y la ausencia de confirmación del diagnóstico a través de métodos moleculares, hace que la verdadera incidencia en clínica de las especies de *Phialemonium* sea todavía una incógnita.

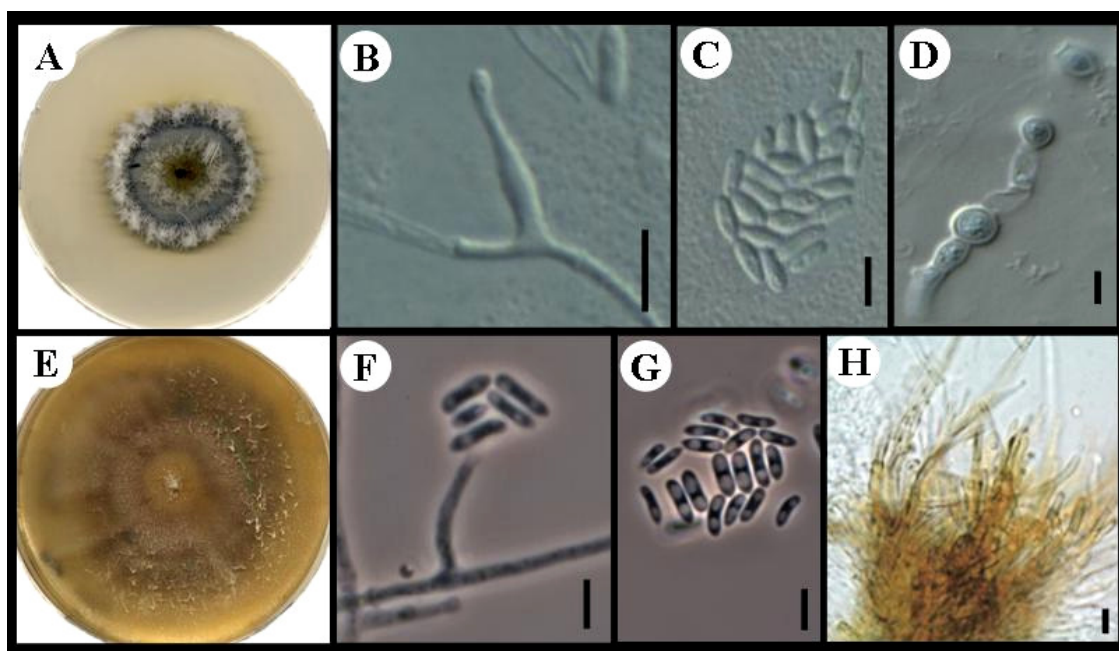


Fig. 9. (A–C) *Phialemonium obovatum* (CBS 279.76^T); (A) Colonia creciendo en PDA a los 14 días de incubación a 25°C; (B) Adelofialide; (C) Conidios; (D) Clamidosporas. (E–H) *P. curvatum* (CBS 490.82^T); (E) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (F) Fiálide produciendo conidios; (G) Conidios; (H) Esporodoquio. Barras: B–D, F–G= 5µm.

1.4.4. *Lecythophora*

Las especies de *Lecythophora* se han aislado en una amplia variedad de sustratos, entre los que podemos citar suelos, plantas, estiércol, madera de diversos árboles y agua, incluso, aguas con pH bajos y altas concentraciones de metales pesados (Damm *et al.*, 2010). Al igual que en *Phialemonium*, las especies de *Lecythophora* se definen como hongos dematiáceos,

debido a la presencia de melanina en la pared de conidios, hifas o en ambas estructuras (Drees *et al.*, 2007).

1.4.4.1. Taxonomía

Lecythophora fue propuesto por Nannfeldt (Melin y Nannfeldt, 1934) para acomodar a *L. lignicola* Nannf. como única especie del género. Más tarde, Van Beyma (1937) transfirió dicha especie al género *Cadophora* Lagerb. & Melin. En el mismo año, Conant (1937) propuso la sinonimia de *Cadophora* y *Phialophora*, por lo que la especie tipo de *Lecythophora* paso a denominarse *Phialophora lignicola*. Años más tarde, Schol-Schwarz (1970), en una revisión del género *Phialophora*, propuso el complejo *Phialophora hoffmannii*, el cual comprendía las siguientes especies: *P. hoffmannii* (J.F.H. Beyma) Schol-Schwarz, *P. decumbens* (J.F.H. Beyma) Schol-Schwarz, *P. fasciculata* (J.F.H. Beyma) Schol-Schwarz, *P. luteoviridis* (J.F.H. Beyma) Schol-Schwarz y *P. mutabilis* (J.F.H. Beyma) Schol-Schwarz. Posteriormente, Gams y McGinnis (1983) reintrodujeron el género *Lecythophora* y transfirieron *P. lignicola*, *P. hoffmannii* y *P. mutabilis* a este género, indicando además que todas estas especies eran probablemente anamorfos del género de ascomicetes *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke (Moreau y Moreau, 1949; Gams y McGinnis, 1983). Weber (2002) reclasificó el resto de las especies del complejo *P. hoffmannii* (*P. luteoviridis*, *P. fasciculata* y *P. decumbens*) en *Lecythophora* y Weber *et al.* (2002), mediante el análisis de la LSU, confirmaron la asociación anamorfo-teleomorfo de *Lecythophora* y *Coniochaeta*. Huhndorf *et al.* (2004), usando el mismo marcador genético, demostraron que las especies de *Lecythophora* y *Coniochaeta*, además de otros géneros de ascomicetes, concretamente *Coniochaetidium* Malloch & Cain, *Poroconiochaeta* Udagawa & Furuya y *Barrina* A.W. Ramaley, formaban un grupo monofilético, por lo que propusieron el orden Coniochaetales para dichos hongos.

Actualmente el género *Lecythophora* está integrado por seis especies: *L. lignicola* como especie tipo, *L. decumbens* (J.F.H. Beyma) E. Weber, Görke & Begerow, *L. fasciculata* (J.F.H. Beyma) E. Weber, Görke & Begerow, *L. hoffmannii* (J.F.H. Beyma) W. Gams & McGinnis, *L. luteoviridis* (J.F.H. Beyma) E. Weber y *L. mutabilis* (J.F.H. Beyma) W. Gams & McGinnis, todos ellos con teleomorfo desconocido. Hay que tener en cuenta a todos los anamorfos innominados de las distintas especies de *Coniochaeta* presentan los mismos caracteres morfológicos de *Lecythophora* (Weber, 2002; Weber *et al.*, 2002). Morfológicamente dicho género se caracteriza por presentar adelofíalides de forma cónica con collarete prominente, aunque también pueden observarse fiálides semejantes a las del género *Acremonium* (Weber *et al.*, 2002) (Fig. 10). Como se ha indicado anteriormente, *Phialemonium* se distingue de *Lecythophora* por sus adelofíalides cilíndricas carentes de collaretes. *Phialophora* se distingue por la predominancia de fiálides discretas, con collaretes muy evidentes en forma de copa o vasija.

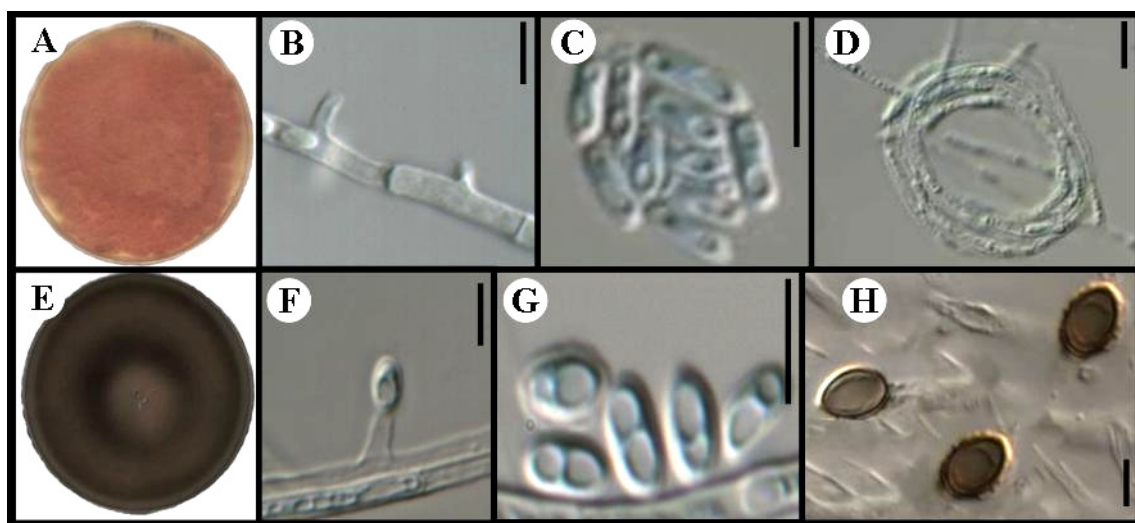


Fig. 10. (A–C) *Lecythophora hoffmannii* (CBS 245.38^T); (A) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (B, D) Adelofiálides; (C) Conidios. (E–H) *L. mutabilis* (CBS 157.44^T); (E) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (F) Adelofiálide produciendo un conidio; (G) Conidios; (H) Clamidosporas. Barras: B–D, F–H= 5μm.

1.4.4.2. Importancia clínica

De las seis especies anteriormente mencionadas, sólo *L. hoffmannii* y *L. mutabilis* se han asociado a patologías que afectan a animales y humanos, tanto inmunocompetentes e inmunocomprometidos, aunque son pocos los casos clínicos publicados. En general, *L. hoffmannii* se ha asociado como agente causal de abscesos subcutáneos, infección uterina, queratitis y sinusitis en humanos (Marriott *et al.*, 1997; Padhye *et al.*, 2002), abortos en ganado (Knudtson y Kirkbride, 1999) y osteomielitis en perros (Sakaeyama *et al.*, 2007). *Lecythophora mutabilis* se ha descrito como agente causal de peritonitis, endocarditis, endoftalmitis y queratitis (Pierach *et al.*, 1973; Ahmad *et al.* 1985; Scott *et al.*, 2004; Drees *et al.*, 2007; Taniguchi *et al.* 2009). En la Tabla 2 se resumen los datos más relevantes de los casos clínicos publicados hasta la fecha.

Tabla 2. Infecciones causadas por especies de *Lecythophora*

Referencia	Año	Especie	Factor de riesgo	Sitios, tipo de infección	Tratamiento	Resultado
Pierach <i>et al.</i>	1973	<i>L. mutabilis</i>	Reemplazo válvula aórtica porcina	Válvula aórtica, pulmón, riñón, ganglios linfáticos	Ninguno	<i>Exitus</i>
Ahmad <i>et al.</i>	1985	<i>L. mutabilis</i>	Diálisis peritoneal	Peritonitis	Miconazol y ketoconazol	Curación
Marriott <i>et al.</i>	1997	<i>L. hoffmannii</i>	VIH	Sinusitis crónica	AmB, ketoconazol	<i>Exitus</i> por infección (VIH)
Padhye <i>et al.</i>	2002	<i>L. hoffmannii</i>	Ninguno	flujo vaginal anormal	ND	ND
Scott <i>et al.</i>	2003	<i>L. mutabilis</i>	Trabeculectomía con mitomicina C.	Ojo	VRC	Curación
Drees <i>et al.</i>	2007	<i>L. mutabilis</i>	Enfermedad coronaria, diabetes	Endocarditis	AmB, VRC	Curación
Taniguchi <i>et al.</i>	2009	<i>L. mutabilis</i>	Encefalopatía mitocondrial	Sangre	AmB liposomal	<i>Exitus</i>

VIH, Virus de la inmunodeficiencia humana; AmB, anfotericina B; VRC, Voriconazol; ND, no disponible.

1.4.5. *Paecilomyces*

Paecilomyces es un género muy heterogéneo, con especies muy diferentes, tanto desde el punto de vista morfológico y ecológico, como desde su utilidad biotecnológica. La especie más destacada en clínica es *P. lilacinus* (Thom) Samson. Ésta es una especie de distribución mundial que se aísla con mucha frecuencia de suelo, aire, y de sustratos orgánicos como diversos tipos de alimentos, semillas o papel. Además, es un contaminante común de soluciones estériles y especímenes clínicos, debido a que muestra resistencia a la mayoría de técnicas de esterilización comercial (Tan *et al.*, 1992). Desde el punto de vista biotecnológico, *P. lilacinus* se utiliza ampliamente en el control biológico de los nemátodos fitoparásitos que infectan, entre otros, cultivos de viñas, patatas, plátanos y tomates (Basualdo *et al.*, 2000; Ciarmela *et al.*, 2005). Específicamente, el hongo actúa infectando huevos y hembras de especies de nemátodos, pertenecientes principalmente a los géneros *Meloidogyne*, *Radopholus*, *Heterodera*, *Globodera* y *Pratylenchus* (Dong y Zhang, 2006). Aunque los mecanismos implícitos en la patogenia de este hongo no están claros, diversos estudios resaltan la importancia de la actividad enzimática, especialmente la producción de quinasas, las cuales se han correlacionado con la patogenicidad contra los nemátodos que parasitan las plantas. La producción de proteasas y lipasas podrían

reforzar la actividad nematocida. Estas enzimas causan deformaciones, destrucción de ovarios, vacuolizaciones y pérdida de movimiento en dichos invertebrados (Park y Hargreaves, 2004; Sexton y Howlett, 2006; Dong *et al.*, 2007).

1.4.5.1. Taxonomía

El género *Paecilomyces* fue introducido por Bainier (1907), para agrupar aquellas especies con morfología similar a *Penicillium* Link, pero con colonias de colores distintos al verde. Posteriormente, el género fue estudiado por Brown y Smith (1957) y Samson (1974), quienes realizaron una extensa revisión en la que acepta 31 especies, agrupadas en dos secciones, según sus características morfológicas, tolerancia a distintas temperaturas y carácter entomógeno. La sección *Paecilomyces* que incluye la especie tipo de género, *P. variotii* Bainier, y aquellas especies que desarrollan colonias de color amarillo-marrón, oliva-marrón u otros colores oscuros, son mesofílicas, termotolerantes, termofílicas, saprófitas y no entomógenas. Estas especies se relacionan con los géneros de ascomicetes: *Talaromyces* C.R. Benj., *Byssochlamys* Westling y *Thermoascus* Miehe. La sección *Isarioidea* contiene especies que presentan colonias de colores blanco, verde claro, rosa, rojo o púrpura, además de ser mesofílicas y entomógenas, y están relacionadas con *Cordyceps* Fr. y *Torrubiella* Boud. Dentro de este último grupo se encuentra la especie motivo de estudio, *P. lilacinus*.

Paecilomyces lilacinus fue descrito en 1907 como *Penicillium lilacinus* Thom, conservando esta denominación hasta que Samson, en 1974, lo transfiere al género *Paecilomyces* en base a su carácter mesófilo y su asociación con insectos. Es un hongo que se clasificó en de la familia Trichocomaceae, orden Eurotiales (Samson, 1974).

Luangsa-ard *et al.* (2004), a través de la filogenia del 18S ADNr, demostraron que se trataba de un género polifilético ya que sus especies se distribuían entre tres órdenes distintos: Eurotiales, Hypocreales, Sordariales. *Paecilomyces lilacinus* y las otras especies de la sección *Isarioidea* se ubicaron dentro de la familia Clavicipitaceae de los Hypocreales. Más tarde, los mismos autores, a partir del análisis de los genes β -tubulina e ITS1-5.8S-ITS2 ADNr, demostraron que 10 especies de *Paecilomyces* de la sección *Isarioidea* formaban un clado estadísticamente bien soportado, por lo que fueron reclasificados en el género anamórfico *Isaria* (Gams *et al.*, 2005; Luangsa-ard *et al.*, 2005). Las otras especies de la sección *Isarioidea*, entre ellas *P. lilacinus*, se agruparon en clados filogenéticamente muy distantes, pero no se reclasificaron debido a la ausencia de soportes moleculares. Más recientemente, Sung *et al.* (2007a), en un análisis multigénico con siete genes, concluyeron que *P. lilacinus* se situaba en la familia Ophiocordycipitaceae, filogenéticamente alejada de las otras especies de *Paecilomyces* morfológicamente similares. Además, dicho estudio reveló la relación filogenética entre *P. lilacinus* y otras especies como *Nomuraea atypicola* (Yasuda) Samson, *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk. y *Haptocillium* spp. W. Gams & Zare. Sin embargo, dichos

autores dejan abierta la posibilidad de cambios taxonómicos como la propuesta de un nuevo género para *P. lilacinus*. En este sentido, Domsch *et al.* (2007) propuso el nuevo género *Paecillium*, integrado por dos especies: *Paecillium lilacinum* y *Paecillium atypicola*. No obstante, este género no fue propuesto formalmente, por lo que se considera inválido. Otra especie morfológicamente muy similar a *P. lilacinus*, pero que no fue incluida en los trabajos citados anteriormente, es *P. nostocoides* M.T. Dunn (Dunn, 1983). Yokoyama *et al.* (2004) estudiaron el 18S ADNr de algunas especies clasificadas de la familia Clavicipitaceae y encontraron un alto porcentaje de similitud entre las secuencias de *P. lilacinus* y *P. nostocoides*. Asimismo, Van Schooneveld *et al.* (2007) reportaron una infección en un paciente con trasplante de hígado y secuenciaron la región ITS para confirmar la identificación de *P. lilacinus*. Al comparar su secuencia con aquellas depositadas en el GenBank observaron que las secuencias, pertenecientes tanto a *P. lilacinus* como a *P. nostocoides* presentaban un elevado porcentaje de similitud.

Existen pocos trabajos en los que se ha estudiado la diversidad genética de aislados de *P. lilacinus*, pero los pocos realizados muestran resultados contradictorios; mientras que Tigano-Milani *et al.* (1995a) obtuvieron una variabilidad intraespecífica baja, los mismos autores más tarde la destacan como alta (Tigano-Milani *et al.*, 1995b). Asimismo, Inglis y Tigano-Milani (2006) analizaron el ITS de 8 aislados de *P. lilacinus* y observaron que formaban subgrupos, lo cual sugería la existencia de posibles especies crípticas.

En el laboratorio clínico, la identificación de *P. lilacinus* se hace de forma rutinaria mediante el examen macro y microscópico del hongo creciendo en cultivo. Sus colonias son de flocosas a pulverulentas, inicialmente de color blanco, pero con la esporulación cambia a tonos vinaceos. Microscópicamente se caracteriza por presentar conidióforos erectos, ramificados con fiálides de base hinchada y un cuello delgado y largo. Los conidios son de elipsoidales a fusiforme y se disponen en cadenas. Este hongo, además de las estructuras típicas de *Paecilomyces*, en el micelio vegetativo desarrolla un sinamorfo similar a *Acremonium*, con fiálides cilíndricas y conidios formando agregados mucosos (Okada *et al.*, 1995). *Paecilomyces nostocoides* se diferencia de *P. lilacinus* por presentar, entre la cadena de conidios elipsoidales o fusiforme, otros conidios de mayor tamaño, globosos o subglobosos (Dunn, 1983) (Fig. 11).

1.4.5.2. Importancia clínica

Paecilomyces lilacinus es un hongo patógeno oportunista involucrado en un amplio abanico de infecciones (De Hoog *et al.*, 2000). Aunque se considera un hongo de virulencia moderada, puede causar graves infecciones en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes, mostrando tropismo por las estructuras oculares (Pastor y Guarro, 2006). De hecho, la mayoría de los casos reportados por *P. lilacinus* son de queratitis y endoftalmitis, los cuales aparecen posteriormente a la implantación de lentes intraoculares, traumatismos por

cuerpo extraño, cirugía oftálmica y uso de lentes de contacto (Pastor y Guarro, 2006). En muchos de los casos reportados en la literatura, los pacientes mencionan haber recibido tratamiento con corticosteroides tópicos o sistémicos antes del desarrollo de la patología (Tan *et al.*, 1992; Westenfeld *et al.*, 1996; Pastor y Guarro, 2006). Factores predisponentes asociados a infecciones por *P. lilacinus* son trasplante de órganos sólidos, trasplante de médula ósea, terapia con corticosteroides, neoplasias malignas, inmunodeficiencia primaria y cirrosis hepáticas. Se han descrito casos de celulitis profunda, sinusitis maxilar crónica, micosis pulmonares, fungemia relacionados con catéter y abscesos de paredes abdominales. En muchos de estos casos, los pacientes murieron como consecuencia de la infección, ya que este hongo presenta patrones de multiresistencia frente a los antifúngicos de uso clínico (Westenfeld *et al.*, 1996; Summerbell, 2003; Pastor y Guarro, 2006). Por otro lado no se ha descrito ningún caso clínico por *P. nostocoides*.

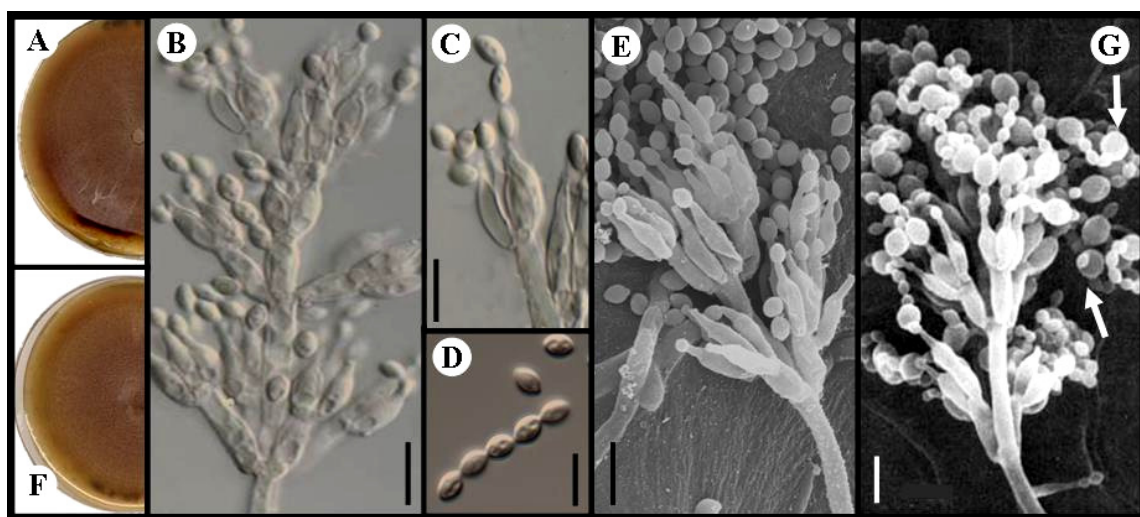


Fig. 11. (A–E) *Paecilomyces lilacinus* (CBS 284.36^T); (A) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (B–E) Conidióforo y conidios. (F–G) *Paecilomyces nostocoides* (JCM 8437^T); (F) Colonia en OA a los 14 días de incubación a 25°C; (G) Conidióforo y conidios elipsoidales y globosos (ver flechas). Escala de las barras: B–E, G= 5µm.

INTERÉS Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha documentado un importante aumento de las infecciones producidas por hongos filamentosos. A pesar de los tratamientos antifúngicos existentes y las técnicas médicas disponibles, las infecciones fúngicas continúan causando una alta mortalidad y morbilidad. Aunque la mayoría de infecciones son producidas por especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, se ha observado un considerable incremento de la incidencia de micosis causadas por hongos pertenecientes a otros géneros, la mayoría de ellos muy poco estudiados, tanto a nivel de diagnóstico como del tratamiento de las infecciones que ocasionan. Todo ello redundando en la elevada mortalidad ya indicada anteriormente y en el desconocimiento de la epidemiología de dichas infecciones.

En la presente tesis hemos escogido a cinco géneros de hongos anamórficos, que por la gravedad de las infecciones que causan algunas de sus especies y por la confusa taxonomía que presentan, su estudio representa un verdadero reto para los microbiólogos clínicos e investigadores en general. Dichos géneros son *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces*. El primero de ellos es el más conocido, habiendo nuestro laboratorio participado en muchos de los estudios realizados recientemente sobre el mismo. Las especies *Scedosporium aurantiacum* y *S. prolificans* presenta un especial interés clínico por la resistencia al tratamiento de las infecciones que causa y por su peculiar distribución geográfica, mostrando una mayor incidencia en España y Australia. Se ha avanzado mucho en la taxonomía, virulencia y sensibilidad a los antifúngicos de dichas especies, pero la tipificación de las cepas involucradas en clínica, especialmente de *S. aurantiacum* y *S. prolificans*, es un tema de especial interés todavía pendiente de realizar.

El principal problema asociado al diagnóstico de las infecciones causadas por especies de *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces* radica en la dificultad de su identificación morfológica. La taxonomía de estos hongos es compleja debido a la simplicidad de sus estructuras microscópicas, las cuales son muy similares entre las especies del mismo género e incluso semejantes a las presentes en otros géneros de mayor incidencia en clínica, como es el caso de *Fusarium*. Otro problema adicional es el hecho de que existen pocas secuencias depositadas en las bases de datos, como la de GenBank, lo que dificulta la identificación molecular mediante comparación de secuencias.

Nuestro laboratorio dispone de una colección importante de hongos patógenos y ambientales, procedentes de regiones geográficas muy diversas y climas muy distintos. Además, en los últimos años nuestro grupo viene colaborando con el *Fungus Testing Laboratory*, *University of Texas Health Science Center*, un laboratorio de referencia en la identificación y estudio de la sensibilidad antifúngica de hongos patógenos de los Estados Unidos, que recibe hongos de prácticamente todo el país. Ello nos ha permitido reunir un número considerable de cepas pertenecientes a los géneros motivo de estudios, aisladas de muestras clínicas provenientes de numerosos hospitales de los Estados Unidos. Todo ello, conjuntamente con la

disponibilidad en nuestro laboratorio de realizar técnicas de biología molecular para el estudio de los hongos, nos ha permitido plantear los siguientes objetivos:

1. Comparar las principales técnicas moleculares utilizadas para la tipificación de las especies de *Scedosporium*, *S. aurantiacum* y *S. prolificans*, con el fin de establecer la mejor herramienta para la caracterización de dichas especies.
2. Correlacionar la identificación morfológica y molecular de cepas de *Acremonium*, *Lecythophora*, *Phialemonium* y *Paecilomyces*, de origen tanto clínico como ambiental, procedentes de diferentes áreas geográficas.
3. Establecer el espectro de especies de *Acremonium*, *Phialemonium* y *Lecythophora* y su incidencia en muestras clínicas procedentes principalmente de diferentes hospitales de los Estados Unidos.
4. Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces*.
5. Detectar la posible existencia de nuevas especies, no reconocibles a través de los métodos de identificación tradicionales.
6. Realizar estudios polifásicos, basados en el análisis de múltiples marcadores genéticos conjuntamente con técnicas morfológicas y fisiológicas, para establecer relaciones filogenéticas y delimitar las nuevas especies detectadas de los géneros motivo de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen, aislamiento y conservación de los aislados

3.1.1. Origen de los aislados

Durante el desarrollo de la presente tesis se estudiaron un total de 285 cepas (ver anexo), de las cuales 231 correspondían a aislados clínicos o ambientales y 54 eran cepas tipos y/o referencia procedentes de diversas colecciones internacionales, tales como: CBS, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda; IHEM, *Biomedical Fungi and Yeasts Collection*, Bélgica; JCM, *Japan Collection of Microorganisms*, Saitama, Japón; NBRC, *NITE Biological Resource Center*, Japón; MUCL, *Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain*, Louvain, Bélgica. Los aislados de origen clínico fueron mayoritariamente facilitados por el *Fungus Testing Laboratory in the Department of Pathology at the University of Texas Health Science Center* (UTHSC) de los Estados Unidos, por el *Hospital Universitari Sant Joan*, Reus, España y por el *Molecular Mycology Research Laboratory, The University of Sydney Western*, Australia. Muchos de los aislados ambientales fueron obtenidos a partir de muestras de suelo procedentes de diversas partes del mundo y activados en nuestro laboratorio (ver apartado 3.1.2.), mientras que otros se aislaron de nemátodos en diferentes estadios de desarrollo, los cuales fueron proporcionados por *Institut de Recerca i Tecnològica Agroalimentaria* (IRTA), Cambrils, España. Todos ellos fueron identificados en la *Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut* de Reus.

Durante el estudio morfológico de los aislados clínicos se identificaron algunos pertenecientes a géneros diferentes a los de motivo de estudio, los cuales fueron excluidos del estudio molecular. En la Tabla 3 se resumen las identificaciones de dichos aislados.

Tabla 3. Aislados identificados en la presente tesis, no incluidos en los análisis moleculares

Identificación morfológica	Nº aislado	Referencia
<i>Fusarium</i> sp.	13	Apartado 4.2
<i>Phaeoacremonium</i> sp.	14	Apartado 4.2 y 4.3
<i>Verticillium</i> sp.	7	Apartado 4.2
<i>Lecanicillium</i> sp.	3	Apartado 4.2
<i>Monocillium</i> sp.	1	Apartado 4.2
<i>Pleurostomophora</i> sp.	1	Apartado 4.2
<i>Acremonium</i> sp.*	5	Apartado 4.3
Total	44	

*No incluidos en el estudio de *Acremonium* porque llegaron a nuestro laboratorio posterior a la publicación del artículo.

Para el estudio MLST de *S. aurantiacum* y *S. prolificans* se seleccionaron 12 aislados (Tabla 4) basándose en la diversidad geográfica y procedencia de la muestra, todo ello con la finalidad de obtener una población heterogénea y aumentar las probabilidades de obtener una mayor cantidad de alelos.

Tabla 4. Características de los aislados incluidos en el estudio MLST

Especie	Nº original	Origen geográfico	Fuente de aislamiento	Año de aislamiento
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	IHEM 15458	Giens, Francia	Espuito humano	ND
	IHEM 15579	Angers, Francia	Espuito humano	ND
	FMR 8630	Santiago de Compostela, España	Espuito humano	2004
	UTHSC 05-361	San Antonio, USA	LBA ^a	ND
	FMR 8983	Zaragoza, España	Espuito humano	ND
	FMR 8984	Zaragoza, España	Espuito humano	ND
	WM06.385	Sydney, Australia	LBA ^a	2001
	WM06.386	Sydney, Australia	LBA ^a	2001
	WM06.390	Perth, Australia	Piel	2001
	WM06.482	Sydney, Australia	Pulmón	2004
	WM06.495	Sydney, Australia	Seno maxilar	2004
	WM06.496	Sydney, Australia	Seno maxilar	2004
<i>Scedosporium prolificans</i>	FMR 6641	Barcelona, España	Espuito humano	2004
	FMR 6647	Barcelona, España	Espuito humano	ND
	FMR 6655	Barcelona, España	Hemocultivo	ND
	FMR 6720	Madrid, España	Sala de operaciones	1999
	FMR 6721	Barcelona, España	Suelo de jardín	ND
	UTHSC95-1734	California, USA	Drenaje nasal	ND
	WM06.399	Melbourne, Australia	Sangre	2001
	WM06.434	Sydney, Australia	Sangre	2003
	WM06.502	Sydney, Australia	Senos sigmoideos	2004
	WM06.503	Sydney, Australia	Senos sigmoideos	2004
WM06.525	Perth, Australia	Sangre	2003	
WM06.526	Perth, Australia	Piel	2003	

FMR, Colección de la *Facultat de Medicina* de Reus; IHEM, *Biomedical Fungi and Yeasts Collection*, Bélgica; UTHSC, *Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center*, USA; WM, *Molecular Mycology Research Laboratory, Westmead Hospital*, Australia; ^aLBA: Lavado broncoalveolar; ND, No disponible.

3.1.2. Activación de muestras de suelo, aislamiento y obtención de cultivos puros

La activación de tierras se realizó exclusivamente para el estudio de *Paecilomyces lilacinus* con la finalidad de incrementar el número de aislados identificados morfológicamente como tal y posteriormente detectar posibles nuevas especies a partir del análisis de sus secuencias. Las muestras utilizadas para tal finalidad fueron recolectadas en diferentes campañas micológicas llevadas a cabo por el personal de la *Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut* de Reus. Estas muestras eran recogidas utilizando espátulas estériles e introducidas en bolsas de polietileno estériles. Dichas muestras se conservaban en cámara frigorífica a 4°C hasta su procesamiento.

El procesamiento consistía en suspender un gramo de tierra en 10 mL de agua estéril, se homogenizaba manualmente por agitación y transcurridos 10 min en reposo se tomaba 1 mL del sobrenadante y se depositaba en dos placas que contenían el medio selectivo agar Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol (DRBC) (Oxoid, Reino Unido) con benomilo a una concentración final de 10 µg/mL. Las placas se incubaban a 25 ± 2°C y se examinaban semanalmente mediante el empleo de un microscopio estereoscópico, hasta un máximo de 4 semanas para detectar los aislamientos de interés. Las colonias que presentaban la morfología característica de *P. lilacinus*, se examinaban microscópicamente y tras confirmar la identificación morfológica se procedía a su aislamiento en cultivo puro en agar harina de avena (OA).

Además del método anteriormente descrito se utilizó la técnica del anzuelo de queratina “*ToKaVa hair baiting method*” descrita por Vanbreuseghem (1952). Esta técnica consistía en depositar aproximadamente 20–30 g de suelo en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro, quedando un grosor de muestra de aproximadamente un centímetro. Posteriormente, se añadía agua destilada estéril para humedecer la muestra y finalmente ésta se cubría con crin de caballo como fuente de queratina, la cual había sido cortada previamente (aproximadamente 1 cm de longitud) y autoclavado dos veces, en días alternos. Las placas se incubaban a 25 ± 2°C, hasta un periodo máximo de un mes. Para evitar su desecación se adicionaba periódicamente agua estéril. Las muestras eran examinadas regularmente mediante un microscopio estereoscópico para detectar crecimiento fúngico. Para el aislamiento de las cepas de interés se procedía del mismo modo que la técnica anterior.

3.1.3. Conservación de los aislados

Todos los aislados estudiados durante la presente tesis se conservaron en la colección de la *Facultat de Medicina* de Reus (FMR), a partir de 3 técnicas: aceite mineral, agua y liofilizado. Brevemente dichas técnicas consisten en:

- **Aceite mineral:** los cultivos puros de los aislados se sembraron en tubos de vidrio con OA, agar patata zanahoria (PCA) o agar patata dextrosa (PDA) inclinado en “pico de

flauta”. Una vez crecido y de ser posible esporulados, la colonia se cubría totalmente con aceite mineral estéril hasta 1 cm por encima de la lengüeta de crecimiento.

- **Agua:** las cepas se sembraron en placas de Petri con los medios de cultivo antes indicados. Una vez crecidas las colonias, éstas se cortaban con ayuda de un bisturí estéril en cubos de agar de unos 10 mm de lado. Éstos se introducían de forma aséptica en viales de cristal con agua destilada estéril y se cerraban herméticamente con tapón de caucho sintético.

- **Liofilización:** los aislados se sembraban en placas de OA o PCA y se incubaban entre 7–14 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta su esporulación. Posteriormente, con ayuda de una asa de siembra, las colonias se mezclaban con 3 mL de *skim milk* (Difco, Estados Unidos) al 10%, un crioprotector que previamente se había esterilizado a 115°C durante 15 min. Se dispensaba 1 mL de la mezcla en viales de vidrio estéril de 3 mL y se colocaba en el liofilizador (Advantage 2.0 Series; Virtis Company Gardiner, Estados Unidos). La sublimación se conseguía cuando el condensador llegaba a la temperatura de -45°C , se hacía el vacío de 200 mTorr, seguidamente se programaba el siguiente ciclo de liofilización: -30°C (240 min), -10°C (240 min), $+10^\circ\text{C}$ (300 min), y $+30^\circ\text{C}$ (300 min). Una vez finalizado el proceso, se sellaban los viales en condiciones de vacío. El éxito del proceso de liofilización se determinaba comprobando la viabilidad del cultivo de una de las muestras elegida al azar.

Los viales obtenidos en cada una de las técnicas arriba explicadas, se almacenaban a temperatura ambiente debidamente protegidos de la luz.

Algunas cepas también fueron herborizadas. Para tal finalidad, se procedía a la desecación de las colonias fúngicas creciendo en el medio que mostraba un crecimiento óptimo, con ayuda de una estufa a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez deshidratadas se almacenaban en sobres de papel encerado. Tanto los holotipos como los cultivos vivos de las cepas de interés se depositaban en colecciones internacionales de cultivos, preferentemente en el IMI (*International Mycological Institute*) de Gran Bretaña y el CBS de Holanda.

3.2. Caracterización fenotípica de los aislados

Todos los aislados, tanto clínicos como ambientales, incluidos en la presente tesis fueron previamente identificados siguiendo los criterios morfológicos establecidos para cada género. La caracterización fenotípica consistió principalmente en un estudio macro y microscópico de las cepas creciendo en diversos medios de cultivo. Los medios de cultivo utilizados fueron: PDA (Difco, Estados Unidos), PCA (Difco, Estados Unidos), agar extracto malta (MEA; Difco, Estados Unidos), y agar czapek (CZA; Difco, Estados Unidos), los cuales se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante. El OA se preparó utilizando 30 g harina de avena, 20 g de agar (Difco, Estados Unidos) y 1000 mL de agua de grifo. La harina de avena se mezclaba con 500 mL de agua de grifo en un recipiente apropiado, se calentaba hasta la

ebullición y se dejaba hervir durante 1 h. Posteriormente, se filtraba el caldo mediante una gasa, desechando el residuo sólido, y se adicionaban 18 g de agar previamente disuelto en agua y se enrasaba hasta completar 1000 mL. El medio se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaban en autoclave durante 20 min a 121°C.

Sólo en los casos en que la identificación lo requería o cuando se caracterizaba una nueva especie para la ciencia, se determinaban las tasas de crecimiento, así como las temperaturas mínimas, óptimas y máximas de crecimiento del hongo en estudio. Las temperaturas de crecimiento se determinaban inoculando los aislados en el centro de la placa de Petri de 90 mm de diámetro con PDA e incubando desde 5–40°C a intervalos de 5°C.

En algunos casos los aislados se inoculaban en agar agua (15 g de agar y 1000 mL) con material vegetal para estimular esporulación o inducir al desarrollo del teleomorfo. El procedimiento era el siguiente: en el agar agua se colocaban fragmentos de madera, hojas de palmera y papel de filtro, los cuales habían sido sometidos a regímenes alternos de esterilización con intervalos de 24 h durante 6 días, y sobre dichos sustratos se depositaban fragmentos de la colonia del hongo en estudio. Estas placas se incubaban a 22–25°C en régimen de luz/oscuridad durante semanas o meses.

3.2.1. Estudio macroscópico

La caracterización macroscópica de los aislados se realizaba principalmente sobre PCA, PDA y OA, incubando a 25°C y examinando las colonias a los 7 y/o 14 días, aunque en algunos casos las observaciones se extendieron hasta los 6 meses. Las características que se anotaban eran las siguientes:

- Diámetro de la colonia.
- Color del anverso y reverso, confrontado con el catálogo de colores de Kornerup y Wanscher (1984).
- Textura (algodonosa, granulosa, aterciopelada, pulverulenta, etc.).
- Topografía (cerebriforme, elevada, lisa, plana, radiada, rugosa, etc.).
- Prominencia (plana, convexa, umbonada, umbilicada, etc.).
- Bordes (enteros, fimbriados, lobulados, plumosos, etc.).
- Zonas de crecimiento: bandas, sectores, círculos concéntricos, etc.
- Pigmento difusible (ausencia/presencia y color).
- Gotas de exudado (ausencia/presencia y color).
- Presencia de cuerpos fructíferos (ascoma y/o conidiomas).

3.2.2. Estudio microscópico

La mayoría de las cepas fueron identificadas y caracterizadas mediante el estudio de las estructuras anamórficas, aunque en algunos casos también se examinaron las

formas teleomórficas. Además de determinar la morfología de las hifas vegetativas (color, forma y diámetro), se examinaron las siguientes características de los **anamorfos**:

- Conidióforos: presencia/ausencia, tipo, color, tamaño, forma.
- Células conidiógenas: tipo, color, tamaño, forma.
- Conidios: tipo, color, tamaño, forma, disposición.
- Clamidosporas: presencia/ausencia, color, forma, tamaño, disposición, y ornamentación.
- Conidomas: tipo, color, tamaño y forma.

En cuanto al **teleomorfo**:

- Ascomas: tipo, color, tamaño y forma.
 - Pelos (setas) peridiales: presencia/ausencia, color, tamaño, forma y ornamentación.
 - Peridio: grosor, número de capas y textura.
 - Células peridiales: color, forma, tamaño y ornamentación.
 - Estructuras estériles del hamatecio: color, forma septación de paráfisis, perífisis, etc.
- Ascocitos: tipo, color, tamaño y forma.
 - Tipo de pared (evanescente o persistente).
 - Estructuras apicales: presencia/ausencia, afinidad por determinados colorantes (amiloides, no amiloides o dextrinoides).
 - Estípites: presencia/ausencia.
- Ascosporas: número, color, tamaño, forma, ornamentación y septación.
 - Disposición dentro de los ascos.
 - Poros o líneas germinales: presencia/ausencia, posición, tamaño.
 - Capa o vaina mucilaginosa: presencia/ausencia, posición, forma.
 - Apéndices mucilaginosos: presencia/ausencia, disposición, tamaño y forma.

3.2.2.1. Preparaciones microscópicas y líquidos de montaje

Para la observación microscópica de los hongos se utilizaron las técnicas que se detallan a continuación:

- **Montaje directo:** todos los aislados se examinaron mediante preparaciones microscópicas realizadas directamente a partir de la colonia creciendo en los diferentes medios de cultivos. Para ello, se recogía una pequeña porción de la colonia, con ayuda de una aguja hipodérmica, y se depositaba sobre un portaobjeto al que previamente se le había depositado una gota de líquido de montaje, seguidamente se cubría con un cubreobjeto y se sellaba con laca de uñas para evitar desecación de la preparación.

- **Microcultivo:** en una placa de Petri que contenía el medio de cultivo adecuado para el crecimiento del hongo, se cortaban bloques de 1 cm², los cuales se trasladaban asépticamente y se depositaban sobre la superficie del mismo agar. Posteriormente, se inoculaban las cuatro aristas superiores de los bloques y cada uno se cubrían con un cubreobjeto estéril. Cuando se observaba desarrollo y esporulación del hongo, se separaba cuidadosamente los cubreobjetos del bloque de agar y se colocaban sobre portaobjetos al cual se le había depositado previamente unas gotas de líquido de montaje.

Los líquidos de montaje utilizados para realizar las preparaciones microscópicas fueron el ácido láctico al 85% (Panreac, España) y el azul de lactofenol (Panreac, España).

3.2.2.2. Técnicas de microscopía

Todas las cepas fueron examinadas a partir de un microscopio de campo claro Olympus CH2. Las microfotografías fueron obtenidas con un microscopio Zeiss Axio-Imager M1, usando objetivos de campo claro, contraste de fase o contraste interferencial Nomarski, al cual iba acoplada una cámara digital Olympus DP10. Las imágenes fueron procesadas en el programa *Analysis* (Soft Imaging System GMBH, Alemania).

Cuando se creía de interés, las cepas se examinaban mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron procesadas siguiendo el método descrito en Figueras y Guarro (1988), el cual incluye las siguientes fases:

Fijación: después de seleccionar el área de interés con ayuda de un microscopio estereoscópica, la colonia se cortaba con un bisturí estéril y los fragmentos resultantes se sumergían en 2-glutaraldehído 2% v/v en tampón fosfato de concentración 0.1 M y pH 7.3–7.4, dentro de viales de cristal. Para aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el fijador, se agregaban unas gotas de Tween 80. Los viales se colocaban dentro de un desecador y se sometían a la acción del vacío generado por una bomba acoplada durante 1 h. Posteriormente, las muestras se separaban del fijador por decantación cuidadosa y se lavaban durante 15 min con solución de tampón fosfato 0.1 M. Seguidamente, se llevaba a cabo una fijación secundaria mediante una solución de tetraóxido de osmio (O₄O_s) 1% p/v en solución de tampón fosfato 0.1 M.

Deshidratación: las muestras se deshidrataban progresivamente mediante concentraciones crecientes de etanol en agua, para ello se utilizaban las concentraciones y tiempo de exposición que se detallan a continuación: solución 30% v/v por 15 min, solución 50% v/v por 15 min, solución 70% v/v por 15 min, solución 80% v/v por 15 min, solución 90% v/v por 15 min, solución 96% v/v por 15 min y solución 100% v/v por 60 min (renovando el alcohol absoluto cada 20 min). El siguiente paso consistió en la sustitución secuencial del etanol por acetato de amilo, empleando soluciones de concentración crecientes de este último en etanol absoluto de la

siguiente forma: 1:3 v/v por 15 min, 1:2 v/v por 15 min, 1:1 v/v por 15 min, 2:1 v/v por 15 min, 3:1 v/v por 15 min, 4:1 v/v por 15 min, y acetato de amilo puro por 60 min.

Secado: para secar las muestras se utilizó la técnica del punto crítico, previa sustitución del agua de la muestra por CO₂. Esta técnica se basa en la coexistencia de los diferentes estados de la materia cuando se alcanza unas presiones y temperaturas críticas. En este punto crítico (72.9 atm y 31.1°C) las densidades del líquido y el gas se igualan, y por tanto, los límites entre estas dos fases desaparecen. Debido a que los valores del punto crítico del agua son muy altos (217.7 atm y 374°C), este tipo de secado en agua es inviable, y, por tanto, se reemplaza este contenido acuoso por CO₂.

Montaje y metalización: las muestras secas se pegaron a una lámina porta-muestras de aluminio mediante plata coloidal o pegamento de secado rápido. Los bordes de la muestra se cubrieron con plata coloidal para favorecer la conductividad. Las muestras así acondicionadas se introdujeron en un metalizador *Polaron Sputter Coater*, se sometieron a una atmósfera de gas argón y, siguiendo la técnica de *sputtering*, se cubrieron con una capa de oro de 100-200 µm de espesor.

Observación y fotografía de las muestras: las muestras fueron examinadas con un microscopio Jeol JSM-6400 del servicio de Microscopía Electrónica del *Servei de Recursos Científics i Tècnics de la Universitat Rovira i Virgili*. Las microfotografías se obtenían digitalizadas en los formatos .tif o .jpg.

3.3. Caracterización molecular de los aislados

Para el estudio molecular, los aislados se sembraban en medio de extracto de levadura y sacarosa (medio YES; 2% de extracto de levadura, 15% de sacarosa, 2% agar y 1 L de agua) y se incubaban por 3–5 días a 25 ± 2°C. Posteriormente se procedía a la extracción del ADN.

3.3.1. Extracción de ADN

El ADN se extraía directamente de las colonias mediante el equipo *PrepMan Ultra* (Applied Biosystems, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante:

- 1.- Se añadía 100 µL del reactivo *PrepMan Ultra* en un tubo cónico de 1.5 mL (*eppendorf*) y se introducía un trozo de colonia (1 mm²) crecida en el medio YES.
- 2.- Se homogeneizaba con ayuda de un vortex y se colocaba a 100°C durante 15 min.
- 3.- Se centrifugaba durante 7 min a 13.000 rpm a temperatura ambiente.
- 4.- Se extraía 70 µL del sobrenadante (ADN) y se colocaba en otro *eppendorf* de 1.5 mL.

El ADN se cuantificaba y valoraba su pureza mediante el espectrofotómetro *GeneQuant Pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido).

3.3.2. Amplificación de los genes

Durante el desarrollo de la presente tesis se amplificaron una gran cantidad de genes, especialmente para el sistema MLST. Para todos los genes se utilizaba la misma reacción de PCR. Un volumen final de 25 μ l que contenía 20 a 60 ng de ADN genómico, 10 mM Tris-HCl (Ph 8.3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ (10 X tampón Perkin-Elmer II plus solución MgCl₂ sistema molecular Roche, Estados Unidos), 100 μ M de cada dNTP (Applied Biosystems, Reino Unido), 1 μ M de cada cebador y 1.5 U ADN ampliTaQ polimerasa (Roche, Estados Unidos).

El programa de amplificación para la mayoría de los genes fue el siguiente: pre-desnaturalización a 94°C, 5 min; 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C, 30 s; hibridación (en función a los cebadores); extensión a 72°C, 1 min; extensión final a 72°C, 7 min.

Para *EF-1 α* se utilizó el programa de amplificación propuesto por Sung *et al.* (2007b): pre-desnaturalización a 94°C, 2 min; 4 ciclos de: 94°C, 30 s; 47°C, 1 min; 72°C, 2 min; 35 ciclos de: 94°C, 30 s; 47°C, 1 min; 72°C, 2 min; extensión final a 72°C, 3 min.

Para el sistema MLST de las especies *S. aurantiacum* se analizaron los siguientes 10 genes: dominios D1-D2, *ACT*, *atp6*, *BT2*, *CAL*, *EF1- α* , *mtSSU*, *rpb2*, *SOD2*, y *TUB*.

Para el sistema MLST de *S. prolificans* se ensayaron un total de 26 genes, los cuales se detallan a continuación: dominios D1-D2, *ACT*, *ANXC4*, *atp6*, *BGT1*, *BT2*, *CAL*, *CAT1*, *CHS*, *EF1- α* , *FKS*, *GPD1*, *IGS*, *LIP*, *MPI1*, *mtSSU*, *rpb1*, *rpb2*, *SOD2*, *SODB*, *TOP2*, *TrpC*, *TUB*, *UGP1*, *URA3* y *ZRF2*.

Para el estudio de los aislados de *Acremonium* se amplificaron las regiones del ITS1e ITS2 con el gen 5.8S del ADNr.

Los dominios D1-D2 se seleccionaron para el estudio de las especies de *Phialemonium*, *Lecythophora* y géneros relacionados, posteriormente se realizó un análisis multilocus que incluyó: dominios D1-D2, *ITS*, *ACT* y *TUB*.

Por último, para el estudio de *Paecilomyces lilacinus* se utilizaron las regiones del ITS1 e ITS2 con el gen 5.8S del ADNr para realizar las identificaciones moleculares y seguidamente se realizó un análisis multilocus que incluía 5 *loci*: dominios D1-D2, *ITS*, *EF1- α* , *rpb1* y *rpb2*.

La Tabla 5 muestra los *loci* utilizados en la presente tesis, su tamaño, los cebadores, la temperatura de hibridación y la referencia de cada uno de ellos.

Tabla 5. Detalles de los cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes incluidos en los estudios moleculares de la presente tesis.

Locus	Gen	Tamaño (pb)*	Cebador <i>forward</i> (5' →) ^a	Cebadores <i>reverse</i> (5' →) ^a	T (°C)	Referencia
Dominios D1-D2	28S del ADNr	560	NL1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA	NL4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG	51	O'Donell <i>et al.</i> , 1998
<i>ACT</i>	Actina	841	Act-1 TGGGACGATATGGAIAAIATCTGG CA	Act-4R TCITCGTATTCTTGCTTIGAIATCCACAT	55	Hoffmann <i>et al.</i> , 2007
<i>ANXC4</i>	Anexina	729	ANXC4-F GCGAGATAGCAACACTTCAGT	ANXC4-R GGATACTGTTGCCCTAGATTTG	52	Bain <i>et al.</i> 2007
<i>atp6</i>	ATPasa mitocondrial subunidad 6	654	ATP6-C1A AGAWCAATTYGAARTRAGAG	ATP6-C2A AAAYACTTGWGCTTGKATWAAIGC	55	Castlebury <i>et al.</i> , 2004
<i>BGT1</i>	Beta-1,3-glucanosil transferasa	811	BGT1-F GATCGGTTGCCAGTCTTTGA	BGT1-R AATGGACGCAGAATGAAACT	55	Bain <i>et al.</i> , 2007
<i>BT2</i>	β-tubulina	531	BT2-F GG(CT)AACCA(AG)AT(ATC)GGTGC(CT)GC(CT)	BT2-R CTC(AG)GTGTAGTGACCCTTGGC	60	Gilgado <i>et al.</i> , 2005
<i>CAL</i>	Calmodulina	683	CL1 GARTWCAAGGAGGCCTTCTC	CL2A TTTTTGCATCATGAGTTGGAC	52	Gilgado <i>et al.</i> , 2005
<i>CAT1</i>	Catalasa	754	CAT1-F AGCTCAACCGTCGTGAT	CAT1-R TGCCATGCCCAGACATA	50	Bain <i>et al.</i> , 2007
<i>CHS</i>	Quitina sintasa	299	CHS-79F TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	CHS-354R TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	60	Carbone y Kohn, 1999
<i>EF1-α</i>	Factor de elongación 1α	493	EFAF1 ATCGAGACCGGTATCATC	EFAR1 ACGGTTTGACGCATGTC	50	O'Donell <i>et al.</i> , 1998
<i>EF1-α</i>	Factor de elongación 1α	824	983F GCYCCYGGHCA YCGTGAYTTYAT	2218R ATGACACCRACRGCACRGTYTG	47 ^b	Sung <i>et al.</i> , 2007 ^b ^c
<i>FKS</i>	1, 3 β-glucano síntasa	645	FKR-F GTTCCACCTCCTTGTCAACTTC	FKS-R AGGGGTCCACAGTGACGA	52	En este estudio ^b

Tabla 5. Detalles de los cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes incluidos en los estudios moleculares de la presente tesis (cont.)

Locus	Gen	Tamaño (pb)*	Cebador <i>forward</i> (5' →) ^a	Cebadores <i>reverse</i> (5' →) ^a	T (°C)	Referencia
<i>GPD1</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1	550	GPD1F TBGARAAGGCBBGTBTGG	GPD1R GCDATNGTRTTNCCYTGCCA	55	En este estudio ^b
<i>IGS</i>	Región espaciadora intergénica	400	IGS12a AGTCTGTGGATTAGTGGCCG	NS1R GAGACAAGCATATGACTAC	50	Carbone y Kohn, 1999
<i>ITS</i>	Regiones ITS1-ITS2 y 5.8S	503	ITS 5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS 4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	55	White <i>et al.</i> , 1990
<i>LIP</i>	Lipasa	802	LIP-F CGCCTCACTTCTCCTCA	LIP-R TGCGAAATGGCTGACG	58	Bain <i>et al.</i> , 2007
<i>MP1</i>	Manoproteína antigénica de la pared celular	450	MP1F CAAGCCCTCCAGAAAGGTATCCA	MP1R CTTTGTGGAGACCAATTCGCTG A	58	Lasker, 2006
mtSSU	Subunidad pequeña mitocondrial del ADNr	524	MS1 CAGTCAAGAATATTAGTCAATG	MS2 GCGGATTATCGAATTAATAAC	50	White <i>et al.</i> , 1990
<i>rpb1</i>	RNA polimerasa I subunidad B	662	gRPB1-A GA(G/T)TGTCC(T/G)GG(A/T)CATTTTGG	fRPB1-C(R) C(A/C/G/T)GC(A/T/G)AT(A/C/G/T) TC (A/G) TT (A/G) TCCAT (A/G)	50	Matheny <i>et al.</i> , 2002
<i>rpb2</i>	RNA polimerasa II subunidad B	1094	RPB2-5F GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C) GG	RPB2-7R CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G) CCCAT	55	Liu <i>et al.</i> , 1999
<i>SOD2</i>	Manganeso superóxido dismutasa	468	SOD2F1 CGATAAACACCACCAGAC	SOD2R2 CGTCAATACCCATGAGAG	52	En este estudio ^b
<i>SODB</i>	Superóxido dismutasa	673	SODB-F GCTCCAAGAGCTGCTAC	SODB-R AAGCGCTTCTCCACAGC	55	Bain <i>et al.</i> , 2007

Tabla 5. Detalles de los cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes incluidos en los estudios moleculares de la presente tesis (cont.)

Locus	Gen	Tamaño (pb)*	Cebador <i>forward</i> (5' →)^a	Cebadores <i>reverse</i> (5' →)^a	T (°C)	Referencia
<i>TOP2</i>	Topoisomerasa II	450	TOP2F ATGACVGCNTAYCADCA	TOP2R TTGAARTCYTGNGTCCA	60	En este estudio ^b
<i>TrpC</i>	Síntesis de triptófano	662	trpC1 GACGGGAAATAGGCTTCC	trpC3 CGCCTTGGTGGGATGGTG	60	Geiser <i>et al.</i> , 1998
<i>TUB</i>	β-tubulina	454	TUB2F CCCTCTTACGGCGACCTGAAC	TUB2R ACCAGTATACCAATGCAAGAAAG	55	Cruse <i>et al.</i> , 2002
<i>UGP1</i>	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa	616	UGP1F GGBACSTCSATGGGYTG	UGP1R CCAGATRTTGTTGGTGTGAA	57	En este estudio ^b
<i>URA3</i>	Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa	602	URA3F CAYATYGAYCTCWCBGAYYT	URA3R GGHGTYTGRTAYTYGNCC	53	En este estudio ^b
<i>ZRF2</i>	Transportador de zinc	639	ZRF2-F CTCATCCAAGCTTGTTCC	ZRF2-R GTACCGCATCACCATCAA	55	Bain <i>et al.</i> , 2007

* Tamaño en pares de bases (pb) secuenciado o esperado; ^a Cebador, dirección 5' → 3'; ^b cebadores diseñados para el estudio MLST de *S. prolificans*; ^c cebadores utilizados para el estudio molecular de *P. lilacinus*

3.3.3. Comprobación y purificación del producto amplificado

Los productos de PCR de todos los genes amplificados se analizaban mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (*agarose MP*; Boehringer-Mannheim, Alemania). Para la comprobación del tamaño de los amplificados se añadía, en el primer y último pocillo de cada gel, el marcador de peso molecular 100 pb *Ladder* (Invitrogen, Holanda). Asimismo, el producto de PCR se purificaba con el equipo comercial *Illustra GFX TM PCR DNA* (General Electric Healthcare, Reino Unido), siguiendo el siguiente protocolo descrito por el fabricante:

- 1.- Se preparaba una columna de GFX para cada purificación.
- 2.- Se colocaba 500 μ L del *capture buffer* tipo 3 por cada 100 μ L de producto de PCR disponible. El color de la mezcla resultante debería ser amarillo o naranja pálido.
- 3.- Se añadía la mezcla anterior a la columna GFX, la cual se encontraba dentro de un tubo colector.
- 4.- Se centrifugaba 1 min a 13.000 rpm.
- 5.- Se eliminaba el líquido que contiene el tubo colector y se colocaba dicha columna dentro del mismo.
- 6.- Se añadía 500 μ l de *wash buffer* tipo 1 a la columna.
- 7.- Se centrifugaba 2 min a 13.000 rpm.
- 8.- Se desechaba el tubo colector y se transfería la columna GFX a un tubo *eppendorf* de 1.5 mL.
- 9.- Se añadía 30 μ l del *elution buffer* directamente sobre la superficie de la matriz de la columna GFX.
- 10.- Se centrifugaba 2 min a 13.000 rpm.
- 11.- Se recuperaba el ADN purificado.

Las muestras purificadas se almacenaban a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.3.4. Secuenciación de los productos de la PCR

Para la realización de la secuenciación se utilizaron los mismos cebadores empleados para la amplificación (Tabla 6). En esta reacción se utilizaron dos tubos *eppendorf* por amplificado, uno para cada cebador, de forma que al final del proceso se obtuvo dos cadenas de ADN secuenciadas para cada muestra. Los productos de PCR fueron secuenciados siguiendo el protocolo descrito para el equipo comercial del *Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Holanda). Las condiciones para la PCR fueron: pre-desnaturalización a 94°C , 5 min; seguida de 25 ciclos de 96°C , 10 s (desnaturalización); 50°C , 5 s (hibridación); 60°C , 4 min (extensión). El producto de esta reacción fue precipitado con etanol y analizado en el secuenciador capilar automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Holanda) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

3.3.5. Obtención de la secuencia consenso e identificación molecular de los aislados

Para la obtención de las secuencias consenso a partir de las dos secuencias complementarias, se empleó el programa Seqman (Lasergene, Estados Unidos). Las secuencias consenso se compararon con aquellas disponibles en el GenBank mediante el uso de la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la finalidad de corroborar las identificaciones molecularmente de los aislados incluidos en los respectivos estudios. En algunos casos esta herramienta resultó ser insuficiente debido a la ausencia o falta de fiabilidad de las secuencias depositadas y, por lo tanto, su uso se limitó para determinar los géneros, familias u órdenes más cercanos al aislado problema. Bajo estas circunstancias, la identificación molecular se realizó comparando la secuencia nucleotídica del aislado con aquellas procedentes de cepas tipos y/o de referencia con la finalidad de establecer porcentaje de similitud entre ellas. Para este fin se utilizó el programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997)

3.3.6. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

Las secuencias generadas para cada gen se alinearon utilizando el programa informático de alineamiento múltiple Clustal X, version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). Los alineamientos se corrigieron visualmente mediante el procesador de textos Microsoft Word. En algunos casos, especialmente en aquellos en los cuales se incluyeron secuencias pertenecientes a especies alejadas filogenéticamente, se observaron que los alineamientos resultantes del Clustal X contenían posiciones pobremente alineadas y regiones divergentes. Bajo estas circunstancias se aplicó el programa Gblock, para eliminar dichas posiciones ambiguas, al mismo tiempo que se minimizaba la pérdida de sitios informativos. Con la aplicación de este programa se obtenían, alineamientos uniformes, sin necesidad de una posterior corrección manual (Castresana, 2000).

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

Todas las secuencias generadas en la presente tesis se depositaron en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) a través del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) online (www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html).

3.3.8. Análisis filogenético

Para la realización de los árboles filogenéticos se utilizó el método de distancias del *Neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), el cual se inició a partir de las secuencias alineadas utilizando el programa informático MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), seleccionando el modelo de Kimura-2 parámetros y el *test de bootstrap* con 1000 repeticiones para comprobar la fiabilidad estadística de las diferentes ramas generadas.

En algunos casos, especialmente cuando se requería la realización de árboles a partir del análisis conjunto de varios genes, se utilizó el método de máxima parsimonia a través del programa

PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) en su versión 4.0b10 (Swofford, 2001). Para ello, se realizó una búsqueda heurística de 100 repeticiones con adición aleatoria de taxones (*random sequence addition*) y con intercambio de ramas (*branch-swapping*) de tipo TBR (*tree bisection reconnection*); se dejó a opción *Multrees* por defecto (PAUP* guarda todos los árboles mínimos que encuentra durante el intercambio de ramas) y se colapsaron las ramas con longitud máxima igual a cero. Los *gaps* se trataron como datos ausentes y la medida de confianza o fiabilidad de los grupos obtenidos se valoró mediante un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. Se realizó el análisis para obtener el árbol más parsimonioso (MPT), y además se obtuvieron el índice de consistencia (CI), el índice de homoplasia (HI) y el índice de retención (RI). En el caso de generación de árboles de máxima parsimonia uniendo la información de varios genes, se realizó previamente una prueba de partición de homogeneidad (PHT) para estimar la presencia de incongruencia, si dicho valor era $P \geq 0.05$ los genes podían ser unidos para un análisis combinado.

3.3.9. Asignación de número a los alelos encontrados en el estudio MLST

Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de genes obtenidos a partir de los 12 aislados de *S. prolificans* y *S. aurantiacum* fueron alineados con el programa Clustal X y posteriormente comparados en el programa Genedoc (Nicholas *et al.*, 1997). Los alelos idénticos entre si se les asignó el mismo número, mientras que los alelos distintos se les identificó con números distintos y secuenciales.

3.4. Estudio de compatibilidad sexual

Este estudio se realizó con la finalidad de investigar el fenómeno de heterotalismo en *P. lilacinus*. Para ello se sembraron todos los aislados incluidos en el estudio de *P. lilacinus* en OA durante 14 días a 25°C. Posteriormente, se cruzaron las cepas en todas las posibles combinaciones, incluyendo el enfrentamiento de una cepa consigo misma. Para ello, los aislados se sembraron por parejas, uno al frente de otro trazando una línea de inoculación, de tal manera que al crecer las colonias se unieran en la zona central de la placa. Los medios seleccionados para este ensayo fueron CZA y OA (por duplicado), las cuales se incubaron a 25°C. Las placas se examinaron, con ayuda de un microscopio estereoscópico, cada semana hasta los seis meses de incubación.

RESULTADOS

4.1. Métodos moleculares destinados a la tipificación de *Scedosporium* spp.

4.1.1. Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches.

Harun A, **Perdomo H**, Gilgado F, Chen S, Cano J, Guarro J, Meyer W.

Medical Mycology 2009, 47: 406–414.

Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches

AZIAN HARUN*†, HAYBRIG PERDOMO‡, FELIX GILGADO*†, SHARON C. A. CHEN*†,
JOSEP CANO‡, JOSEP GUARRO‡ & WIELAND MEYER*†

*Molecular Mycology Research Laboratory, University of Sydney, Western Clinical School at Westmead Hospital, Westmead Millennium Institute, Sydney, Australia, †Centre for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Hospital, Westmead, Australia, and ‡Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Scedosporium species are increasingly encountered opportunistic fungal pathogens not only in immunocompromised patients but are also significant primary pathogens in immunocompetent individuals. The environmental reservoir of these fungi is uncertain and the epidemiology and mode of transmission are not well-defined. Conventional phenotypic methods are of limited use for epidemiological purposes since they are insensitive and inadequately discriminatory. Molecular techniques not only enable accurate phylogenetic delineation of species but also provide the means for rapid, reliable genotyping of strains for epidemiological and population genetic studies. This review discusses the methods that have been applied for genotyping of these increasingly important pathogens.

Keywords *Scedosporium*, genotyping, RAPD, RFLP, PCR fingerprinting, MLST

Introduction

Infections caused by *Scedosporium* species are increasingly encountered in seriously ill and immunocompromised patients [1,2]. Traditionally, the genus *Scedosporium* comprised two species of clinical interest: *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) and *Scedosporium prolificans* (teleomorph unknown), which is phylogenetically distant from *Scedosporium apiospermum* [3]. Recently, multilocus phylogenetic studies have shown that *S. apiospermum*/*P. boydii* is a complex of at least eight phylogenetic species and that *P. boydii* and *S. apiospermum* are sufficiently distinct to be considered as two separate species [3,4]. The most commonly encountered species of this complex among clinical isolates are *P. boydii*, *S. apiospermum* and the newly-described *Scedosporium aurantiacum* [3,5]. Given the morbidity and poor clinical

outcomes associated with *Scedosporium* infections, and that invasive scedosporiosis is often refractory to treatment, early preventive and/or therapeutic strategies are of paramount importance [2]. The successful implementation of such strategies requires good understanding of the epidemiology and mode of transmission of infection.

Over the years, many molecular techniques have been applied to genotype *Scedosporium* isolates with the objectives of discriminating between strains and to identify possible sources of *Scedosporium* infection. Methods include: multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) [6], random amplification of polymorphic DNA (RAPD) [6–9], PCR fingerprinting [5,8,10]/inter-simple-sequence-repeat PCR (ISSR-PCR) [11], intergenic spacer region PCR (IGS-PCR) [12], restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis [5,10,13], and amplified fragment-length polymorphism (AFLP) analysis [5]. In addition to these methods, more recent research has focused on the development of a robust multilocus Sequence Typing (MLST) system to provide a reliable and reproducible method of strain differentiation (see below).

This review aims to describe the molecular tools that have been used, or are under development for the genotyping of *Scedosporium* species.

Received 16 June 2008; Final revision received 3 September 2008; Accepted 27 September 2008

Correspondence: Wieland Meyer, Molecular Mycology Research Laboratory, CIDM, ICPMR, Level 3, Room 3114A, Westmead Hospital, Darcy Road, Westmead, NSW 2145, Australia. Tel: +61 2 9845 6895; fax: +61 2 9891 5317; E-mail: w.meyer@usyd.edu.au

Molecular typing methods

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)

MLEE is a technique that evaluates the polymorphisms of selected housekeeping fungal enzymes. In this method, the enzymes of interest are extracted from the fungal cells, electrophoretically separated on a gel and then visualized by specific enzyme-staining procedures. Most of these enzymes display a limited number of isotypes. Isotypes that are present are mainly a result of homologous amino acid substitutions which are transferred from parental strains, thus enabling the establishment of phylogenetic relatedness by comparing adequate numbers of selected enzymes [14]. If a panel of carefully selected enzymes is used, the information derived will enable the detection of microevolution within strains [15]. Typing of several fungi including *Candida* and *Aspergillus* by MLEE has been reported [14,16–18].

Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis

The technique of RAPD analysis is based on the amplification of random DNA fragments using several arbitrary, short primers [19]. This procedure allows the primers to bind randomly along the template DNA; thus no knowledge of the DNA sequence for the target gene is required. The primers detect polymorphisms which represent genetic markers enabling construction of genetic maps [19]. RAPD has been found to be useful in genotyping of several fungi including *Candida* spp. and *Aspergillus fumigatus* [16,20,21].

PCR fingerprinting/inter-simple-sequence-repeat PCR (ISSR-PCR)

PCR fingerprinting is based on the amplification of DNA sequences, which are flanked by hypervariable repeat units. The technique uses a single primer specific to microsatellite or minisatellite DNA repeats, which were originally designed as hybridization probes used in DNA fingerprinting [22]. Following PCR amplification, the amplified interrepeat DNA sequences are separated by agarose gel electrophoresis. The banding patterns can be analysed visually or by using commercially available software programs. The primers used in PCR fingerprinting include the minisatellite-specific core sequence of the wild-type phage M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'), and the microsatellite specific primers (GTG)₅ and (GACA)₄ [22]. The application of PCR fingerprinting using these primers has been demonstrated in numerous studies of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus* species

complex (*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*), where fingerprint patterns were highly reproducible and able to detect sufficient genetic variability to differentiate among individual strains [22–24]. In addition this approach has allowed the accurate species identification and strain typing of a large number of fungal species including *Candida* spp. [25], *Aspergillus* spp. [26] and *Penicillium marneffeii* [27].

ISSR-PCR is a method similar to PCR fingerprinting. It also involves amplification of DNA regions located between closely adjacent microsatellites to produce a unique fingerprint. The ISSR-PCR method has been used for population genetic, epidemiological and ecological studies of several fungi [28].

Intergenic spacer region PCR (IGS-PCR)

The IGS is the most variable part of the rDNA complex and has also been applied as a target for fungal strain typing [12,29]. The procedure includes the amplification of the IGS region, followed by agarose gel electrophoresis of the amplicons. Using a low annealing temperature multiple banding patterns are generated [29]. Although multiple banding patterns usually infer inherent genetic variability, these may also be the result of random amplification due to the low annealing temperatures being used.

Restriction fragment-length polymorphism (RFLP)

RFLP is utilized for the identification of species by comparing DNA restriction patterns. The method is simple to use and a large number of restriction enzymes are commercially available. Digestion of template DNA with these enzymes results in a set of fragments of predetermined and welldefined length. These restriction fragments are then separated according to their length by agarose gel electrophoresis. As the distance between the locations cut by restriction enzymes varies between individual isolates, the fragment lengths also vary, creating polymorphisms. The PCR-RFLP technique has been well established and used for molecular typing of many fungi [30–35]. For instance, PCR-RFLP of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA gene cluster has been demonstrated to be useful in assessing the diversity of fungal species among soil fungi [30]. ITS-RFLP has also been used to differentiate between closely related species such as *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* [35] whilst genetic characterization of *Cryptococcus neoformans* [33] and *Cryptococcus gattii* [34] has been successfully conducted by RFLP of the *URA5* gene.

Amplified fragment-length polymorphism (AFLP) analysis

AFLP analysis is a highly discriminatory method to differentiate microorganisms at intra-species level. In AFLP analysis, fragments are amplified from random localizations throughout the genome of an organism in a highly reproducible manner [36]. The AFLP technique involves digestion of the DNA template with restriction enzymes and ligation of specific adapters to selected restriction sites. Typically, this is followed by two consecutive PCR reactions, which are performed on the restricted template, using specifically designed primers that allow only a subset of the restriction fragments to be amplified. The products are then separated by polyacrylamide gel electrophoresis and the analysis of the banding patterns can be performed using a number of different software programs. This technique has been successfully applied for molecular epidemiological studies of fungal pathogens such as *Candida* spp. [37] and *Aspergillus fumigatus* and to investigate the mode of reproduction in natural populations of *C. gattii* [38].

Multilocus sequence typing (MLST)

Multilocus sequence typing (MLST) is a method to characterize organisms using partial sequence analysis of a defined set of 7–10 housekeeping genes [39–41]. For each locus studied, different genetic sequences present within a species are assigned as distinct alleles. The combination of the identified alleles at each of the loci defines the allelic profile or sequence type for each isolate. The data generated can be used to determine whether the fungal isolates are clonal or have undergone recombination. As MLST is a sequence based technique, inter-laboratory differences can be minimized by standardization of primers and PCR protocols, resulting in unambiguous, reproducible results that can be compared and made publicly available via electronic networking. MLST has been successfully used to characterize bacterial pathogens including *Neisseria meningitidis*, where it has demonstrated a high degree of discrimination [41]. The method has also been useful for the characterization of a number of fungal pathogens including *Candida albicans* [42], *Candida tropicalis* [43], *Candida glabrata* [44], *Cryptococcus neoformans* [45], and *Fusarium oxysporum* [46].

Application of molecular methods to type *Scedosporium* isolates

MLEE

Earlier studies have investigated the use of MLEE as a typing tool for *Scedosporium apiospermum* strains. One

study employed 14 different enzymes to reveal a high degree of polymorphism with 27 polymorphic loci within this species [6]. Strain differentiation was successfully achieved by combining the data obtained for different enzyme patterns. Polymorphisms were most frequently seen in profiles representing the superoxide dismutase, carboxyl esterase and malate dehydrogenase enzymes [6].

RAPD

RAPD has been performed by a number of authors to differentiate between *Scedosporium* isolates. San Millan *et al.* studied 17 *Scedosporium prolificans* isolates using a panel of 12 primers [7]. These authors studied the discriminatory ability of each primer as well as that of combining patterns of each primer into a single RAPD profile. Results obtained by visual inspection of the gels were compared to those generated by computer analysis using the program GelCompar ver. 4 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Both approaches enabled the discrimination of all isolates. The combination of RAPD patterns of three primers (UBC 701, AB1.08 and AB1.11 or UBC 701, AB1.08 and UBC 707) allowed for the discrimination of all isolates. Multiple isolates originating from the same patient generated identical profiles [7]. Similar findings were observed in a study by Ruiz-Diez *et al.*, where a combination of three primers (GC70, GC80, M13) was also noted to enable adequate discrimination between *S. prolificans* isolates recovered from four immunocompromised patients [8].

RAPD analysis has also been used to investigate the genetic diversity among epidemiologically unrelated strains of *S. apiospermum* and its former teleomorph, *Pseudallescheria boydii*, from different areas in Europe [6]. In this study, 20 primers were used and none of them individually allowed for the discrimination of all studied strains. Three primers, GC70, UBC-701 and UBC-703, gave the most discriminating results [6]. The same primer set was also used in a study of *S. apiospermum* isolates from cystic fibrosis patients in France [9], where 129 sequential and multiple isolates of *S. apiospermum* from nine patients were analyzed. In this report, the combined results obtained by this primer set identified 16 genotypes among the studied *S. apiospermum* isolates. There was no predominant genotype amongst the patients and there was no clustering of patterns according to the geographic origin of the isolates [9].

PCR fingerprinting/ISSR-PCR

Ruiz-Diez *et al.* performed PCR fingerprinting on four *S. prolificans* isolates implicated in a nosocomial

outbreak together with 10 other epidemiologically unrelated strains [8]. Using the primer M13, these authors found different banding patterns among the isolates implicated in the case cluster. The isolates from distinct geographic localities also demonstrated different patterns [8].

This technique has also been applied to investigate the molecular variability of *P. boydii*. In one study, highly heterogeneous profiles within 25 *P. boydii* isolates were observed [10]. Strains from the same patients were noted to be identical. Five *S. prolificans* strains were included in this analysis. With exception of one isolate, these *S. prolificans* isolates were found to have identical banding pattern.

Most recently, PCR fingerprinting was undertaken to examine the genetic variation among 146 *Scedosporium* isolates from Australia [5]. Notable findings from this survey include the separation of *Scedosporium* isolates into three major clusters which in turn, corresponded to the three major species, i.e., *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* and *S. prolificans*. The results also showed considerable genetic polymorphisms within each species [5] with *S. apiospermum* demonstrating the highest intra-species variation, followed by *S. prolificans* and then *S. aurantiacum* [5]. The technique has also been applied to discriminate between additional novel species of *Scedosporium* following their description. Fig. 1 shows the resulting banding patterns seen with *S. prolificans* and the other species in the *Pseudallescheria* species complex.

Sole *et al.* employed ISSR-PCR to examine the genetic variation among 84 clinical and environmental *S. prolificans* isolates [11]. In their study, 35 unique patterns were observed, which were stable and reproducible [11]. Isolates from the United States were found to be genetically distant from the ones obtained from Spain and Australia.

IGS-PCR

IGS-PCR was used by Williamson *et al.* to examine the variability in *Scedosporium* spp. Twenty distinct banding patterns were noted among the 52 *S. apiospermum* isolates recovered from sputum of patients with cystic fibrosis and bronchiectasis [12].

RFLP analysis

The use of RFLP for genotyping of *Scedosporium* spp. has also been reported [5,10,13]. In a study of the molecular variability of *P. boydii*, Rainer *et al.* performed a 18S rDNA amplification, followed by digestion with the restriction endonucleases *Hae*III, *Hinf*I, *Dde*I, *Rsa*I, *Taq*I, *Msp*I, and *Hha*I [10]. This group

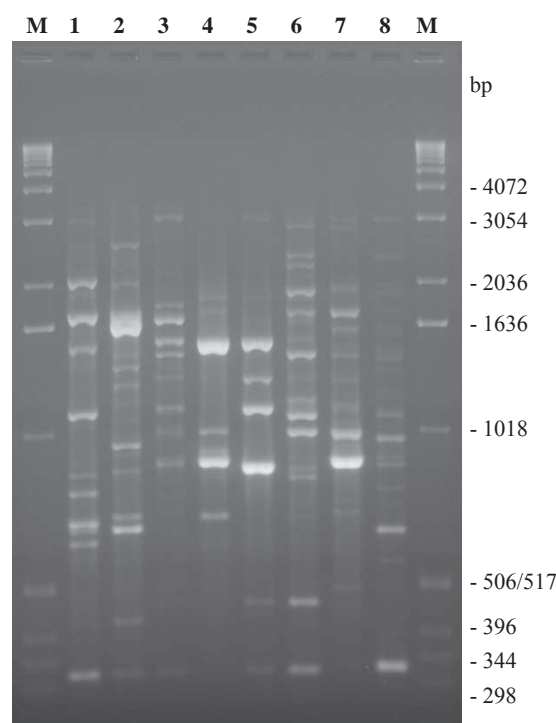


Fig. 1 PCR fingerprinting profiles of different species of the *Pseudallescheria* species complex and *Scedosporium prolificans* obtained with the microsatellite specific primer M13 as previously published [22]. Lane 1, *Scedosporium aurantiacum* (FMR 8630, type culture, clinical, ankle ulcer, Santiago de Compostela, Spain); lane 2, *Scedosporium dehoogii* (FMR 6921, type culture, environmental, garden soil, Barcelona, Spain); lane 3, *Scedosporium apiospermum* (FMR 8619, type culture, clinical, keratitis, Sao Paulo, Brazil), lane 4, *Pseudallescheria boydii* (FMR 4167, clinical, otitis, Valladolid, Spain); lane 5, *Pseudallescheria angusta* (FMR 8541, environmental, soil, Buenos Aires, Argentina); lane 6, *Pseudallescheria fusioidea* (FMR 8593, type culture, environmental, goat dung, Aligarh, India), lane 7, *P. ellipsoidea* (FMR 8623, clinical, leukemia patient, Barcelona, Spain), lane 8, *Scedosporium prolificans* (FMR 9168, environmental, greenhouse soil, Heverlee, Belgium); lanes M, 1 kb marker (Invitrogen, USA).

found considerable intra-specific variability within *P. boydii*, reflecting the unresolved phylogeny of this species complex [10].

RFLP analysis of the ITS region of the rDNA gene cluster was recently used in a study of Australian *Scedosporium* isolates [5]. In this study, the ITS amplicons of 146 isolates of *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* and *S. prolificans* were double-digested with two restriction endonucleases *Sau*96I and *Hha*I. The resulting banding patterns revealed a unique pattern for each of the three species. The results enabled the identification of a substantial number of isolates originally identified as "*S. apiospermum*", as the newly described species, *S. aurantiacum* [5]. Fig. 2 demonstrates the differences in the ITS-RFLP patterns

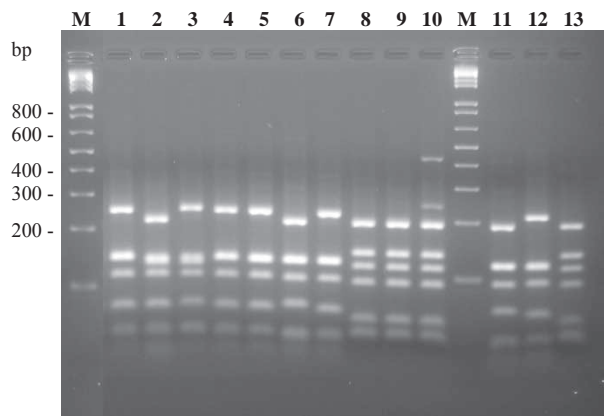


Fig. 2 ITS1/2 RFLP patterns obtained after double digestion with the restriction enzymes *Hha*I and *Sau*96I as described previously [5]. Lane 1: *Scedosporium apiospermum* WM 07.103 (clinical, corneal scraping, Auckland, New Zealand); lane 2: *Scedosporium aurantiacum* WM 07.104 (clinical, ear swab, Auckland, New Zealand); lane 3: *Scedosporium apiospermum* WM 07.105 (clinical, Auckland, New Zealand); lane 4: *Scedosporium apiospermum* WM 07.106 (clinical, bronchial wash, Auckland, New Zealand); lane 5: *Scedosporium apiospermum* WM 07.107 (clinical, wound swab, Auckland, New Zealand); lane 6: *Scedosporium aurantiacum* WM 07.108 (clinical, ear swab, Auckland, New Zealand); lane 7: *Scedosporium apiospermum* WM 07.109 (clinical, tissue, Auckland, New Zealand); lane 8: *Scedosporium prolificans* WM 07.110 (clinical, bronchial wash, Auckland, New Zealand); lane 9: *Scedosporium prolificans* WM 07.111 (clinical, blood, Auckland, New Zealand); lane 10: *Scedosporium prolificans* WM 07.112 (clinical, cyst aspirate, Auckland, New Zealand); lane 11: *Scedosporium aurantiacum* WM 06.385 (clinical, ear swab, Sydney, Australia); lane 12: *Scedosporium apiospermum* WM 06.424 (clinical, bronchial wash, Sydney, Australia); lane 13: *Scedosporium prolificans* WM 06.525 (clinical, blood, Perth, Australia); M: 1 kb plus DNA marker (Invitrogen, USA).

obtained from isolates of *S. prolificans*, *S. apiospermum* and *S. aurantiacum*, confirming the ITS-RFLP patterns described by Delhaes *et al.* [5].

In another study, RFLP analysis of the IGS region of the rDNA gene cluster was employed to examine intra-specific diversity within the *P. boydii* complex [13]. *Hae*III and *Mbo*I were used to digest the IGS amplicons of 22 strains, resulting in seven and five distinct patterns, respectively. The combination of electrophoretic patterns obtained with both enzymes resulted in a total of eight distinguishable patterns [13].

AFLP analysis

AFLP analysis was applied by Delhaes *et al.* to study the genetic variation of 12 Australian *S. prolificans* isolates recovered from patients involved in two presumptive case clusters [5] and 23 epidemiologically unrelated isolates. Thirty-two AFLP profiles were obtained with identical profiles noted in isolates recovered from the same patient. No clustering of the

isolates was identified. The results of the AFLP analysis had good agreement (100%) with those obtained by M13 PCR fingerprinting performed in the same study [5].

MLST

A MLST system to genotype *Scedosporium* species has not yet been developed. Given the premise of the utility of MLST in the study of genetic variation in other fungi, such a system for *Scedosporium* species is under development. Previous molecular studies have pointed towards the use of several candidate gene loci for MLST analysis [3,13]. Wedde *et al.* utilized partial sequences of the internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) including 5.8S rDNA to study 16 isolates of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species [47], in which a low genetic diversity of the ITS sequences was observed. The ITS region has also been sequenced to study the molecular variability of *P. boydii* [10]. In contrast to the study by Wedde *et al.* [47], this study observed a high variability in the ITS1 and ITS2 regions [10]. Others, using sequences of the ITS regions and partial sequences of the large subunit (LSU) of the rRNA gene, have also observed a considerably high genetic variability among the *P. boydii* cluster, reflecting the unresolved phylogeny of this species complex [48]. *S. prolificans*, demonstrated relatively low intra-specific variability, in agreement with a previous report [10].

Besides the rDNA genes, there are other gene targets that have been used for species delineation and which may also serve as potential markers for molecular typing. Gilgado *et al.* have shown variability in the β -tubulin and calmodulin genes in their phylogenetic study of the *P. boydii* species complex [3]. These loci are good candidate genes to be used in MLST studies as they are known to demonstrate substantial genetic variation. Most recently, Zeng *et al.* have further demonstrated genetic variability within the elongation factor 1 α gene of *P. boydii* and related species [13]. Further studies of all those candidate genes in the context of the development of an MLST typing scheme for *Scedosporium* spp. is warranted.

To evaluate the usefulness of several candidate genes to be used in a MLST typing scheme for *Scedosporium* spp. a preliminary study has been performed. Isolates chosen in this study include genetically closely related and unrelated isolates of the two phylogenetically well characterized species, *S. prolificans* and *S. aurantiacum*. Several gene loci have been examined, which were selected from previous studies or from studies of genetic variation in other filamentous fungi. These

loci include manganese superoxide dismutase (*SOD2*) [49], elongation factor 1 α (*EF1 α*) [13], two loci of β -tubulin (*BT2*, *TUB*) [3,50], calmodulin (*CAL*) [3], ATPase subunit 6 (*ATP6*) [51], ITS region of rDNA complex [52], mitochondrial small rRNA (mt SSU rRNA) [53] and chitin synthase (*CHS*) [54] (Table 1). The *EF1 α* locus, the first β -tubulin locus (*BT2*), the second β -tubulin locus (*TUB*), the *SOD2* locus, the chitin synthase (*CHS*) locus and the calmodulin (*CAL*) locus showed polymorphic nucleotides for both studied species, whereas the ITS, mt SSU rRNA and *ATP6* loci did not show considerable polymorphism in both *Scedosporium* species (Table 1). Based on these early findings, *EF1 α* , *SOD2*, β -tubulin, *CHS* and *CAL* have demonstrated good potential for inclusion in an MLST scheme for *Scedosporium* spp.

Technical issues

All molecular methods used for genotyping fungi have their strengths and limitations. With regard to MLEE, despite its ability to differentiate between strains, this method is not adequately discriminatory for the use as a single tool for strain typing. Since the organism is not being examined directly, variation at the nucleotide level may be missed. Nucleotide substitutions do not necessarily result in alteration in the amino acid composition and subsequent changes in the electrophoretic profile may not be visualized. As a consequence, alleles which appear homologous from a different individual may represent different gene alleles.

Moreover, MLEE is time-consuming and requires evaluation of at least 10 enzymes to give adequate discriminatory results [14,15].

RAPD has been widely used, as it has the advantage of being rapid and simple to use. However, even though it is highly discriminatory, its widespread adaptation into practice is limited by the absence of standardized methodologies, inadequate reproducibility and the requirement for a strict quality control.

Data reported from various studies involving PCR fingerprinting did show that this method enables strains differentiation. However, despite the highly discriminatory ability of this approach, inter-laboratory variation may occur due to varying experimental conditions and the use of different laboratory reagents. Consequently, PCR fingerprinting profiles may not be reproducible when undertaken in different laboratories rendering this technique unsuitable for multi-institutional typing studies.

Inter-laboratory reproducibility is also an issue for the IGS-PCR due to the use of low annealing temperatures.

Similar problems are found with the AFLP analysis. An additional drawback of AFLP is that variation of banding patterns may be artefactual, reflecting the result of incomplete digestion before the specific amplification of the subset of DNA fragments being detected. As a result, performing amplification in duplicate is necessary.

RFLP on the other hand is relatively easy to use and is more reproducible. Nevertheless, this technique is of

Table 1 Preliminary results of MLST typing for *Scedosporium aurantiacum* and *Scedosporium prolificans*, showing number of strains, number of haplotypes obtained and number of polymorphic nucleotides found per locus (authors of this review, personal communication).

Species	# of strains tested/haplotype	Gene locus	# of polymorphic nucleotides
<i>S. aurantiacum</i>	12/4	Manganese superoxide dismutase (<i>SOD2</i>)	21
	12/8	Elongation factor 1 α (<i>EF1α</i>)	22
	12/5	β -tubulin (<i>BT2</i>)	17
	12/7	β -tubulin (<i>TUB</i>)	30
	12/1	Internal transcribed spacer region (<i>ITS</i>)	0
	12/1	ATPase subunit 6 (<i>ATP6</i>)	0
	12/5	Calmodulin (<i>CAL</i>)	3
	12/2	Mitochondrial SSUrRNA (<i>mtSSU</i>)	1
<i>S. prolificans</i>	12/1	Manganese superoxide dismutase (<i>SOD2</i>)	0
	12/3	Elongation factor 1 α (<i>EF1α</i>)	6
	12/1	Internal transcribed spacer region (<i>ITS</i>)	1
	12/3	β -tubulin (<i>BT2</i>)	4
	12/4	β -tubulin (<i>TUB</i>)	15
	12/1	ATPase subunit 6 (<i>ATP6</i>)	0
	12/6	Chitin synthase (<i>CHS</i>)	8
	12/1	Mitochondrial SSU rRNA (<i>mtSSU</i>)	0

Table 2 Comparison of different methods used for genotyping of *Scedosporium* species

Method	Turn around time	Discriminatory power	Inter-laboratory reproducibility	Interpretation	Costs	Reference
MLEE	1–2 weeks	Moderate	Moderate	Easy	Low	[6]
RAPD	1–2 days	High	Poor	Difficult	Low	[6–9]
PCR fingerprinting	1–2 days	High	Poor	Difficult	Low	[5,8,10]
RFLP	2 days	Low	Good	Easy	Moderate	[5,10,13]
AFLP	2–3 days	High	Moderate	Moderate	High	[5]
MLST	1–2 weeks	High	Excellent	Easy	High	[under development]

limited use for studies in which cluster analyses of related isolates is necessary, since it only allows identification to the species level.

Inter-laboratory variation can be eliminated in MLST typing, with the standardization of the PCR condition and sequencing protocols. However, the ability of the MLST analysis to give high strain discrimination relies on the choice of genes or loci selected in each study. Accurate sequence determination and comparison is crucial as a single base difference denotes a different haplotype.

Conclusion and recommendations

Scedosporium species are important emerging fungal pathogens. Despite antifungal therapy, mortality remains high [2]. Given the need to improve outcomes, early interventions including preventative measures are urgently required. Epidemiological investigation of *Scedosporium* infections requires accurate species identification and genotyping. Various molecular techniques have been applied, aiming at accurate and reliable strain typing. These molecular approaches differ in their discriminatory power and hence, their applicability in differentiating between *Scedosporium* strains. A comparison of the major features of the methods is summarized in Table 2.

Molecular techniques such as PCR-RFLP, PCR fingerprinting and sequence based methods not only provide a means of delineation of the phylogeny and species identification [3,4,13,55], but also have a critical role in strain typing, which is crucial to study genetic relatedness of clinical and environmental isolates, to determine the source of infection, and to investigate presumed case clusters of *Scedosporium* infections [5,8,11,12]. The most discriminatory molecular methods for *Scedosporium* strain typing currently available are RAPD [6–9], PCR fingerprinting [5,8,10], ISSR-PCR [11] and AFLP analysis [5]. Based on the reported studies on molecular typing of *Scedosporium* species, it was noted that the degree of genetic variation differs

from one study to another. In one of the studies, a high degree of genetic variability was noted among *S. apiospermum* isolates recovered from cystic fibrosis patients [9], whereas one predominant strain was exhibited in another study [12]. As for *S. prolificans*, genetic variation was reported to be low to absent in two studies [7,8], but relatively high in others [5,11]. These differences in the findings may result from various factors including differences in methods and markers/targets used, non-representative strain selection and limited number of isolates.

Previous studies indicate that genetic polymorphisms within the rDNA gene cluster are valuable markers for species delineation although may not be adequately discriminatory in differentiating between individual strains. In comparison to the rDNA gene cluster other gene targets, such as β -tubulin [3,4], calmodulin [3] and *EF1 α* [13] genes have exhibited considerable genetic variability to open up a promising future for their use in the development of an MLST typing scheme for *Scedosporium* species. The usefulness of these gene loci have been demonstrated in a preliminary study involving selected strains of *S. prolificans* and *S. aurantiacum* isolates.

Acknowledgements

The work was supported by an NH&MRC project grant # 352303 to WM.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol* 2006; **44**: 295–327.
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infection caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**: 157–197.

- 3 Gilgado F, Cano J, Gene J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4930-4942.
- 4 Gilgado F, Cano J, Gene J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 766-771.
- 5 Delhaes L, Harun A, Chen SCA, et al. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 282-290.
- 6 Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, et al. Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *J Med Microbiol* 2001; **50**: 925-932.
- 7 San Millan R, Quindos G, Garaizar J, et al. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2270-2274.
- 8 Ruiz-Diez B, Martin-Diez F, Rodriguez-Tudela JL, Alvarez M, Martinez-Suarez JV. Use of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and PCR fingerprinting for genotyping of a *Scedosporium prolificans* (inflatum) outbreak in four leukaemic patients. *Curr Microbiol* 1997; **35**: 186-190.
- 9 Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, et al. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2108-2114.
- 10 Rainer J, de Hoog GS, Wedde M, Graser Y, Gilges S. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3267-3273.
- 11 Sole M, Cano J, Rodriguez-Tudela L, et al. Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Scedosporium prolificans* by inter-simple-sequence-repeat polymerase chain reaction. *Med Mycol* 2003; **41**: 293-300.
- 12 Williamson E, Speers D, Arthur IH, et al. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 47-50.
- 13 Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, et al. Intraspecific diversity of species of *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol* 2007; **45**: 547-558.
- 14 Gil-Lamagnere C, Roilides E, Hacker J, Muller FMC. Molecular typing for fungi – a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect* 2003; **9**: 172-185.
- 15 Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 332-370.
- 16 Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, et al. Comparison of three typing methods of clinical and environment isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1596-1601.
- 17 Rodriguez E, De Meeus T, Mallie M, et al. Multicentric epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 2559-2568.
- 18 Pujol C, Joly S, Lockhart SR, et al. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2930-2938.
- 19 Williams JGK, Kubelik A, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 6531-6535.
- 20 Boekhout T, Kamp M, Gueho E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med Mycol* 1998; **36**: 365-372.
- 21 King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA, Merz WG. Comparison of four DNA-based methods for delineation of *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1467-1470.
- 22 Meyer W, Maszewska K, Amirmostofian M, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* by PCR fingerprinting and RAPD – A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999; **20**: 1790-1799.
- 23 Meyer W, Castaneda A, Jackson S, et al. Molecular typing of the IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 189-195.
- 24 Viviani MA, Wen H, Roverselli A, et al. Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. *Med Mycol* 1997; **35**: 355-360.
- 25 Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med Mycol* 2001; **39**: 185-193.
- 26 Rath PM. Phenotypic and genotypic characterization of reference strains of the genus *Aspergillus*. *Mycoses* 2001; **44**: 65-72.
- 27 Imwidthaya P, Thipsuvan K, Chairprasert A, et al. *Penicillium marneffii*: types and drug susceptibility. *Mycopathologia* 2001; **149**: 109-115.
- 28 Cano J, Rezusta A, Sole M, et al. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporium canis* strains. *J Dermatol Sci* 2005; **39**: 17-21.
- 29 Radford SA, Johnson E, Leeming JP, et al. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 1294-1299.
- 30 Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycol Res* 2000; **104**: 1027-1032.
- 31 Jackson CJ, Barton R, Evans EGV. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 931-936.
- 32 Dendis M, Horvath R, Michalek J, et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 2003; **9**: 1191-1202.
- 33 Velegraki A, Kiosses V, Kansouzidou A, et al. Prospective use of RFLP analysis on amplified *Cryptococcus neoformans* URA5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. *Med Mycol* 2001; **39**: 409-417.
- 34 MacDougall L, KS Galanis E et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and Detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Inf Dis* 2007; **13**: 42-50.
- 35 Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Jp J Infect Dis* 2005; **58**: 235-237.
- 36 Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 4407-4414.
- 37 Borst A, Theelen B, Reinders E, et al. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1357-1362.
- 38 Halliday CL, Carter D. Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* isolates from Australia. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 703-711.
- 39 Aanensen MA, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: W728-W733.
- 40 Taylor WT, Fischer MT. Fungal multilocus sequence typing – it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003; **6**: 351-356.
- 41 Maiden MCJ, Bygraves J, Feil E, et al. Multilocus sequence typing – a portable approach to the identification of clones within

- populations of pathogenic microorganism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3140–3145.
- 42 Bounoux M-E, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1290–1297.
- 43 Tavanti A, Davidson AD, Johnson E, et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5593–5600.
- 44 Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5709–5717.
- 45 Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 2006; **172**: 2223–2238.
- 46 O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, et al. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5109–5120.
- 47 Wedde M, Muller M, Tintelnot K, de Hoog GS, Stahl U. PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Med Mycol* 1998; **36**: 61–67.
- 48 Rainer J, de Hoog GS. Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microascaceae) containing opportunistic agents on human. *Mycological Res* 2006; **110**: 151–160.
- 49 Fréal E, Noel C, Viscogliosi E, et al. Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: An issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 2005; **45**: 411–422.
- 50 Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 2002; **94**: 814–822.
- 51 Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, an indoor fungus. *Mycol Res* 2004; **108**: 864–872.
- 52 Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990; **172**: 4238–4246.
- 53 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 315–322.
- 54 Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 1999; **91**: 553–556.
- 55 Issakainen J, Jalava J, Eerola E, Campbell CK. Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 389–398.

This paper was first published online on iFirst on 12 December 2008.

4.1.2. Tipificación con MLST de *Scedosporium aurantiacum* y *S. prolificans*

Posterior a la publicación de Harun *et al.* (2009), se procedió a la aplicación del sistema MLST a las 24 cepas, 12 de *S. aurantiacum* y 12 de *S. prolificans* seleccionadas para este estudio preliminar. Si bien es cierto que algunos de estos datos ya se han mencionado en el apartado anterior, consideramos pertinente incluir la totalidad de los mismos en este apartado con la finalidad de tener una visión global de los resultados obtenidos hasta el momento para el estudio MLST de estos hongos. En las Tablas 6 y 7 se detalla el número de alelos obtenido para cada uno de los genes ensayados y para las cepas seleccionadas de las especies motivo de estudio.

Tabla 6. Número de alelos obtenidos con 10 *loci* en 12 cepas de *S. aurantiacum*

Gen	<i>ACT</i>	<i>EF-1α</i>	<i>SOD2</i>	<i>CAL</i>	<i>TUB</i>	<i>rpb2</i>	<i>BT2</i>	<i>DI-D2</i>	<i>mtSSU</i>	<i>atp6</i>
Nº de alelos	8	5	5	6	6	5	5	4	2	1

Estos resultados revelan que el gen *ACT* es el que presenta una mayor variabilidad para tipificar *S. aurantiacum*, contrariamente, al *atp6* que fue el marcador menos eficiente al registrar un único alelo para las 12 cepas ensayadas. En consecuencia, el panel de genes para el esquema MLST esta especie quedó constituido por los siguientes 6 genes: *ACT* (841 pb), *EF-1 α* (737 bp), *SOD2* (495 pb), *CAL* (683 pb), *TUB* (533 pb) y *rpb2* (1094 pb).

En el caso de *S. prolificans* los resultados no han sido tan satisfactorios. De los 26 genes estudiados, diez no amplificaron con los cebadores utilizados: beta-1,3-glucanosil (*BGT1*), calmodulina (*CAL*), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1 (*GPD1*), región espaciadora intergénica (*IGS*), manoproteína antigénica de la pared celular (*MPI*), superóxido dismutasa (*SODB*), topoisomerasa II (*TOP2*), síntesis de triptófano (*TrpC*), orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (*URA3*) y UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (*UGP1*) y 4 no amplificaron la región esperada: lipasa (*LIP*), catalasa (*CAT1*), transportador de zinc (*ZRF2*) y anexina (*ANXC4*). Los 12 genes restantes presentaron los siguientes alelos mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Número de alelos obtenidos con 12 *loci* en 12 cepas *S. prolificans*

Gen	<i>CHS</i>	<i>EF-1α</i>	<i>TUB</i>	<i>BT2</i>	<i>rpb2</i>	<i>D1-D2</i>	<i>atp6</i>	<i>FKS</i>	<i>mtSSU</i>	<i>SOD2</i>	<i>ACT</i>	<i>rpb1</i>
Nº de alelos	6	4	4	3	3	3	1	1	1	1	1	1

Estos resultados revelan que existe una baja variabilidad entre los genes estudiados, hasta el punto que sólo disponemos de 3 genes, *CHS* (299 pb), *EF-1 α* (493 pb) y *TUB* (454 pb), como posibles candidatos para el estudio MLST planteado para *S. prolificans*.

Actualmente, los grupos participantes en este estudio están en la búsqueda de nuevos genes que permitan obtener un mayor número de alelos y, por lo tanto, terminar de conformar el panel de 6–7 genes necesarios para dicha plataforma.

4.2. Estudio morfológico y molecular de *Acremonium* spp. de importancia clínica

4.2.1. Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States.

Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J.

Journal of Clinical Microbiology 2011; 49: 243–256

Spectrum of Clinically Relevant *Acremonium* Species in the United States[∇]

H. Perdomo,¹ D. A. Sutton,² D. García,¹ A. W. Fothergill,² J. Cano,¹ J. Gené,¹ R. C. Summerbell,^{3,4}
M. G. Rinaldi,² and J. Guarro^{1*}

Mycology Unit, Medical School and IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain¹; Fungus Testing Laboratory, University of
Texas Health Science Center, San Antonio, Texas²; Sporometrics, Inc., Toronto, Ontario, Canada³; and
Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada⁴

Received 19 April 2010/Returned for modification 28 June 2010/Accepted 3 November 2010

Some species in the polyphyletic fungal genus *Acremonium* are important opportunist pathogens. Determining the actual spectrum of species and their incidence in the clinical setting, however, has long been hampered because of the difficulties encountered in phenotypic species-level identification. The goal of this study was to re-identify a large number of clinical isolates morphologically and to confirm the identifications by comparing sequences of the internal transcribed spacer region of the rRNA gene of these isolates to those of type or reference strains of well-known *Acremonium* species. Of the 119 isolates referred to a United States reference laboratory under the name *Acremonium*, only 75 were identified morphologically as belonging to that genus. The remainder (44 isolates) were identified as belonging to other morphologically similar genera. The *Acremonium* clinical isolates were related to species of Hypocreales, Sordariales, and of an *incertae sedis* family of ascomycetes, Plectosphaerellaceae. A total of 50 of the 75 *Acremonium* isolates (67%) could be identified by molecular means, the prevalent species being *Acremonium kiliense* (15 isolates), *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum* (11 isolates), *A. implicatum* (7 isolates), *A. persicinum* (7 isolates), and *A. atrogriseum* (4 isolates). One of the most interesting findings of our study was that we identified several species among this large collection of clinical isolates that had not previously been reported from human infections, and we failed to confirm other *Acremonium* species, such as *A. potronii*, *A. recifei*, and *A. strictum*, that had been considered significant. The most common anatomic sites for *Acremonium* isolates were the respiratory tract (41.3%), nails (10.7%), and the eye (9.3%). Antifungal susceptibility testing demonstrated high MICs for all agents tested, except for terbinafine. Since numerous isolates could not be identified, we concluded that the list of opportunistic *Acremonium* species is far from be complete and that a considerable number of additional species will be discovered.

Acremonium is a large polyphyletic fungal genus that comprises approximately 150 species, most of them being saprobes in soil and pathogens of plants, insects, and other fungi. Some species are considered opportunists of humans and other mammals (5, 11, 18). Infections in humans typically develop following traumatic inoculation of the fungus, with keratitis and mycetoma being the most common, although more recently a significant role of *Acremonium* as a cause of onychomycosis has also been reported (13). Locally invasive infections such as osteomyelitis, sinusitis, arthritis, peritonitis, and less frequently central nervous system infections have also been reported. In recent years, the number of infections caused by *Acremonium* have increased considerably; aggressive modern medical techniques and new diseases involving the immune system have become important predisposing factors (4, 5, 11–13, 16, 18). The typical morphological features of *Acremonium* include slow-growing colonies, thin hyphae, and long, narrow, and tapered phialides formed singly; however, conidiophores with simple or verticillate branching may occur in some species. The phialides produce conidia which are small, mostly unicellular, in either slimy heads, chains, or both (5, 6, 8, 18).

Numerous genera of ascomycetes have *Acremonium* or *Acremonium*-like anamorphs. Glenn et al. (10) and more recently Zare et al. (21), using molecular methods, demonstrated that *Acremonium* is polyphyletic, being associated with at least two ascomycetous orders, i.e., Hypocreales and Sordariales, and to the family Plectosphaerellaceae (*incertae sedis*, closely related to Microascales).

The species of *Acremonium* are morphologically very similar to each other and at best can only be distinguished on the basis of subtle differences, making their identification difficult. Therefore, in most of the clinical cases the etiological agent is reported only as an *Acremonium* sp., which drastically reduces the value of the report (11). This is the main reason that the real incidence of the different species of *Acremonium* in the clinical setting is unknown. Re-identification of available clinical isolates of *Acremonium* using modern DNA-based methods is essential for a critical evaluation of the reported cases. However, the major difficulty for the molecular identification of *Acremonium* isolates lies in the absence of reliable reference sequences in public databases for use in comparison.

To assess the incidence of different species of *Acremonium* in human infections, we studied a large set of clinical isolates referred from different regions of the United States to the Fungus Testing Laboratory, a fungal reference laboratory in San Antonio, for identification and/or antifungal susceptibility determination. It is important to note that we lack sufficient clinical information to ascertain whether any of these isolates

* Corresponding author. Mailing address: Mycology Unit, Medical School, Universitat Rovira i Virgili, C/Sant Lorenç 21, 43201 Reus Tarragona, Spain. Phone: 34 977 759359. Fax: 34 977 759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 10 November 2010.

was confirmed as a causal agent of infection. It is, however, likely that a significant proportion of them were causal agents, and the remainder may represent clinical contaminants, the identification of which will be a regular feature of clinical practice in the future. These isolates were identified using traditional morphological criteria (5, 6, 8, 9, 15, 18), and their internal transcribed spacer (ITS) sequences were compared to those available in GenBank and those of type or reference strains sequenced by us. The ITS sequences of authentic strains of the most relevant species of clinical interest generated in the present study have been deposited in GenBank.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates. A total of 119 clinical isolates, presumably belonging to *Acremonium* spp., received by the Fungus Testing Laboratory in the Department of Pathology at the University of Texas Health Science Center at San Antonio for identification or antifungal susceptibility determination, were included in the present study (Table 1). In addition, 29 type strains (living cultures of the specimen used to describe a given species) or reference strains (living cultures of species identified by specialists and deposited in international collections) of *Acremonium* species provided by the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS-KNAW; Utrecht, Netherlands) and the Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (MUCL; Belgium) were also tested. Seven ITS ribosomal DNA (rDNA) sequences of *Acremonium* species retrieved from GenBank were also included in the phylogenetic analyses (Table 1).

Morphological study. All isolates were initially cultured on malt extract agar 2% (MEA; Difco, Laboratories, Detroit, MI), potato dextrose agar (PDA; Difco), and oatmeal agar (OA; 30 g of filtered oat flakes, 20 g of agar, 1 liter of distilled water) media, which are the common culture media used to identify *Acremonium* species. However, since they grew and sporulated better on OA, this medium was used in the morphological study. Cultures were incubated at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), alternating light and darkness (12 h of each) for 7 to 14 days up to 1 month. The identification criteria were mainly based on the works of Gams (8, 9) and De Hoog et al. (5). Microscopic features were examined by making direct wet mounts with 85% lactic acid and lactophenol cotton blue and by slide cultures on OA using light microscopy. Photomicrographs were obtained with a Zeiss Axio-Imager M1 light microscope, using phase contrast and Nomarski differential interference.

Molecular study. Isolates were grown on yeast extract sucrose (YES; yeast extract, 2%; sucrose, 15%; agar, 2%; water, 1 liter) for 3 to 5 days at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and DNA was extracted using a PrepMan Ultra sample preparation reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's protocol. The DNA was quantified using GeneQuant^{pro} (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). The ITS region of the nuclear rDNA was amplified and sequenced with the primer pair ITS5 and ITS4 according to the protocols described by Alvarez et al. (2).

Phylogenetic analysis. Sequences of 112 taxa, including that of *Boletus rubropunctus* (accession no. FJ480433) as an outgroup and those downloaded from GenBank, were analyzed phylogenetically. The sequences generated in the present study have been deposited in GenBank/EMBL databases, and their accession numbers are indicated in Table 1. All sequences were aligned with the CLUSTAL X (version 1.81) computer program (20), followed by manual adjustments with a text editor. Phylogenetic analyses were performed with the software program MEGA 4.0 (19). The neighbor-joining method and the algorithm Kimura two-parameter were used to obtain the distance tree. Gaps were treated as pairwise deletions. Support for internal branches was assessed by a search of 1,000 bootstrapped pseudoreplicates of the data. Due to the high phylogenetic distances between the species tested and the high degree of variability of their ITS sequences, two types of approaches were performed: (i) an analysis of the 5.8S rRNA gene sequences of all of the isolates and (ii) analyses of the entire ITS sequences of the main clades obtained in the first analysis.

Antifungal susceptibility. The *in vitro* activity of amphotericin B (AMB), natamycin (NAT), itraconazole (ITC), posaconazole (PSC), voriconazole (VRC), fluconazole (FLC), anidulafungin (ANID), caspofungin (CAS), micafungin (MICA), 5-fluorocytosine (5FC), and terbinafine (TRB) were determined according to methods outlined in the CLSI document M38-A2 (3). This method includes growing isolates on PDA at 35°C for 1 week prior to setup to ensure sufficient conidial formation. Slants were overlaid with sterile-distilled water, and then the surface was gently scraped to produce a conidial suspension. The tubes were permitted to sit for ~10 min to allow large hyphal clumps to settle.

Inoculum was standardized spectrophotometrically to an optical density at 530 nm (OD_{530}) of 0.09 to 0.13 or 80 to 82% transmittance, diluted in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, and then 100 μl was added to each of the microtiter wells containing antifungal agents for a final inoculum concentration of 1×10^4 to 5×10^4 CFU/ml. The plates were incubated at 35°C for 48 h before reading. The MIC was defined as the lowest concentration that resulted in complete inhibition of growth for AMB, NAT, ITC, PSC, and VRC. The MIC for FLC, 5FC, and TRB was defined as the lowest concentration that resulted in an ca. 50% reduction in growth compared to the drug-free control well. For the candins, ANID, CAS, and MICA, the endpoint was defined as the minimum effective concentration (MEC), which was defined as the lowest concentration at which the appearance of small, compact hyphal growth was observed compared to the growth of healthy hyphae in the drug-free negative control well.

Nucleotide sequence accession numbers. A representative number of the sequences that were newly generated in the study have been submitted to GenBank under accession numbers FN691445 to FN691454 and FN706540 to FN706554.

RESULTS

Using morphological features, 75 of 119 isolates were determined to belong to the genus *Acremonium*. The main characteristics included the production of flat to very thin cottony, whitish, yellowish, pinkish, or greenish colonies of moderate to slow growth; thin hyphae, producing awl-shaped and erect phialides with a septum at the base, formed singly or in very simple branching conidiophores; and conidia that were one celled, hyaline, subhyaline, or pigmented, arranged in slimy heads or in chains. The remaining isolates ($n = 44$) were only identified to the genus level and included *Fusarium* (13 isolates), *Phaeoacremonium* (10 isolates), *Verticillium* (7 isolates), *Phialemonium* (6 isolates), *Lecanicillium* (3 isolates), and one isolate each of *Lecythophora*, *Monocillium*, *Paecilomyces*, *Pleurostomophora*, and a *Sagenomella*-like strain. These latter non-*Acremonium* identifications were confirmed molecularly via a BLAST search of GenBank.

Sequences of the ITS region of the *Acremonium* isolates were compared to those available in GenBank by using a BLAST search. This analysis demonstrated that 67 isolates belonged to the order Hypocreales; four isolates were close to members of the Plectosphaerellaceae, and four others, identified as *A. atrogriseum*, were related to the Sordariales. No morphological features useful for distinguishing members of the respective above-mentioned taxonomic groups were found, except that phialides in the Sordariales are moderately inflated at the base, whereas only a few *Acremonium* species belonging to the Hypocreales and none of the Plectosphaerellaceae has such character.

Phylogenetic analysis of 5.8S rDNA sequences and morphological characterization. Figure 1 shows the neighbor-joining tree inferred from analysis of the 5.8S rRNA gene (169 bp) of a total of 112 sequences belonging to the 75 clinical isolates, 29 types or reference strains, and 7 sequences retrieved from GenBank for species of *Acremonium* that were morphologically similar to some of the clinical isolates tested. Eighteen groups (A to R) were identified among the in-group taxa, although the genetic distances among some of them were considerably high, and most of these groups were not supported by bootstrapping. Clinical isolates were nested in 14 (A to E, G, I to K, M, N, and P to R) of these 18 groups.

Group A received 88% of bootstrap support (bs) and included four clinical isolates morphologically identified as *A. atrogriseum*, including the type (CBS 604.67) and a reference strain (CBS 774.97) of this species. This species was char-

TABLE 1. Clinical isolates, type or reference strains, and sequences of *Acremonium* spp. included in the study

Isolate ^a	Origin ^b	Morphological identification	Molecular identification	GenBank accession no. (ITS) ^c
UTHSC 01-194	Blood, Washington	<i>A. strictum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 01-1246	Eye, Louisiana	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 01-1249	Lung, California	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	FN706545
UTHSC 01-1389	Lung, Utah	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	FN706546
UTHSC 01-1896	Knee, Montana	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	
UTHSC 01-2238	Left eye, Utah	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 02-1892	Sputum, Wisconsin	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 02-1958	Sputum, Texas	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	FN706540
UTHSC 02-2054	Tracheal aspirate, Ohio	<i>A. alternatum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 02-2429	Pleural fluid, Utah	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	
UTHSC 02-2482	BAL, Texas	<i>A. hyalinulum</i>	<i>A. hyalinulum</i>	
UTHSC 02-2564	Leg, Alaska	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 02-2890	Olecrenon bursa, Wisconsin	<i>A. strictum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 03-2	Sinus, California	<i>A. sclerotigenum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 03-986	BAL aplastic anemia, Pennsylvania	<i>A. atrogriseum</i>	<i>A. atrogriseum</i>	
UTHSC 03-1930	BAL, Utah	<i>A. atrogriseum</i>	<i>A. atrogriseum</i>	
UTHSC 03-2933	Bronch wash, Michigan	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	
UTHSC 03-3197	Vitreous fluid, Florida	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 04-60	Left foot mass bx, Wisconsin	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 04-292	Sputum, Colorado	<i>A. alternatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 04-721	Vertebral disc, California	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 04-956	Sinus, Minnesota	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	
UTHSC 04-1034	Right calf tissue, Florida	<i>A. bactrocephalum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 04-1531	Abscess scalp, Texas	<i>A. alternatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 04-2454	Blood, Florida	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	FN691449
UTHSC 04-3176	CSF, Minnesota	<i>A. sclerotigenum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 04-3464	Sputum, Texas	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 05-104	Unknown, California	<i>A. egyptiacum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 05-541	Nonhealing wound leg, Minnesota	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 05-1172	BAL, Florida	<i>A. strictum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 05-1713	Blood, Pennsylvania	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 05-1929	Hip fluid, Louisiana	<i>A. bactrocephalum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 05-2022	Scalp, Texas	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 05-2270	Blood, Utah	<i>A. strictum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 05-2310	Contact lens, Texas	<i>A. strictum</i>	<i>A. zeae</i>	FN691452
UTHSC 05-2451	BAL, Massachusetts	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	
UTHSC 05-3311	BAL, Texas	<i>A. implicatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 06-79	Skin right thigh, Florida	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 06-415	Sputum, Minnesota	<i>A. hyalinulum</i>	<i>A. hyalinulum</i>	
UTHSC 06-482	Right cornea, Virginia	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 06-528	Toe nail, South Carolina	<i>A. hansfordii</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 06-795	Foot, Arkansas	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	
UTHSC 06-874	Sputum, Hawaii	<i>A. furcatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 06-1454	Toe nail, Florida	<i>A. sclerotigenum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 06-1476	Right cornea, Colorado	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	FN691448
UTHSC 06-2147	Nail, Washington	<i>A. atrogriseum</i>	<i>A. atrogriseum</i>	
UTHSC 06-2849	Bronch wash, Pennsylvania	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 06-4335	Sinus, Minnesota	<i>A. griseoviride</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 07-110	Bone, California	<i>A. implicatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 07-550	Blood, Arkansas	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 07-646	Bronch wash, Florida	<i>A. fusidioides</i>	<i>A. fusidioides</i>	
UTHSC 07-1181	Sputum, Hawaii	<i>A. glaucum</i>	<i>A. glaucum</i>	FN691445
UTHSC 07-1974	CSF-seizures, Florida	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 07-2604	Sinus, Minnesota	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	FN691450
UTHSC 07-3260	Bone, Illinois	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	
UTHSC 07-3446	Bronch wash, Texas	<i>A. implicatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 07-3667	Bronch wash, Minnesota	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	
UTHSC 07-3739	Toe nail, Minnesota	<i>A. alternatum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 08-661	Forearm tissue, Minnesota	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 08-844 (1)	BAL, Texas	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	
UTHSC 08-844 (2)	BAL, Texas	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC 08-1028	Nail, Minnesota	<i>A. polychromum</i>	<i>A. polychromum</i>	FN706548
UTHSC 08-1188	BAL, Texas	<i>A. fusidioides</i>	<i>A. fusidioides</i>	FN706543
UTHSC 08-1455	Bronch wash, Texas	<i>A. fusidioides</i>	<i>A. fusidioides</i>	FN706544
UTHSC 08-2284	Toe nail, Utah	<i>A. bactrocephalum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 08-3115	BAL, Illinois	<i>A. acutatum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Isolate ^a	Origin ^b	Morphological identification	Molecular identification	GenBank accession no. (ITS) ^c
UTHSC 08-3180	RUL BAL, Texas	<i>A. implicatum</i>	<i>A. implicatum</i>	FN706541
UTHSC 08-3294	Sputum, California	<i>A. strictum</i>	<i>A. sclerotigenum-A. egyptiacum</i>	
UTHSC 08-3421	Nail-finger, South Carolina	<i>A. persicinum</i>	<i>A. persicinum</i>	
UTHSC 08-3639	BAL, Texas	<i>A. borodinense</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 08-3693	Nails-dermatitis, Missouri	<i>A. pteridii</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 09-384	Eye, California	<i>A. strictum</i>	<i>Acremonium</i> sp.	
UTHSC 09-597	Tissue L4-5, Minnesota	<i>A. atrogriseum</i>	<i>A. atrogriseum</i>	
UTHSC R-3853 (1)	Sputum, California	<i>A. kiliense</i>	<i>A. kiliense</i>	
UTHSC R-3853 (2)	Sputum, California	<i>A. hyalinulum</i>	<i>A. hyalinulum</i>	
CBS 124.42 (T)	Dune sand, France	<i>A. sclerotigenum</i>		FN706552
CBS 136.33 (T)	Toe nail, Argentina	<i>A. spinosum</i>		
CBS 158.61	Maduromycosis, India	<i>A. kiliense</i>		FN691447
CBS 223.70	Plaster, unknown	<i>A. alternatum</i>		U57674*
CBS 270.86	Toe nail, Nancy, France	<i>A. sclerotigenum</i>		FN706551
CBS 281.80	Nail, Netherlands	<i>A. sclerotigenum</i>		FN706549
CBS 310.59 (T)	Coastal sand, France	<i>A. persicinum</i>		FN706554
CBS 346.70 (T)	<i>Triticum aestivum</i> , Germany	<i>A. strictum</i>		FN691453
CBS 379.70F	Skin lesion, Dolphin, Belgium	<i>A. potronii</i>		AY632655*
CBS 406.66	Wall in greenhouse, Germany	<i>A. alternatum</i>		
CBS 407.66	<i>Hypoxylon deustum</i> , Austria	<i>A. alternatum</i>		
CBS 430.66 (T)	Wheat field soil, Germany	<i>A. curvulum</i>		
CBS 485.77	Man, India	<i>A. recifei</i>		
CBS 545.89	Blood culture, Netherlands	<i>A. alternatum</i>		
CBS 560.86	Bamboo living leaf, France	<i>A. hyalinulum</i>		
CBS 604.67 (T)	Noodles, Ukraine	<i>A. atrogriseum</i>		
CBS 654.96	<i>Eucalyptus</i> leaf, Japan	<i>A. strictum</i>		
CBS 749.69 (T)	<i>Ustilago</i> sp., Manitoba, Canada	<i>A. bactrocephalum</i>		
CBS 774.97	Urine, Germany	<i>A. atrogriseum</i>		
CBS 796.69 (T)	Woolen overcoat, Solomon Islands	<i>A. glaucum</i>		FN691454
CBS 800.69 (T)	<i>Zea mays</i> stalk, Nebraska	<i>A. zaeae</i>		FN691451
CBS 840.68 (T)	Antelope dung, Central African Republic	<i>A. fusidioides</i>		FN706542
CBS 881.73	Dracaena, India	<i>A. charticola</i>		AJ621774*
CBS 987.87	<i>Hypogymnia physodes</i> , Luxembourg	<i>A. antarcticum</i>		DQ825970*
CBS 993.69	Skin, Netherlands	<i>A. blochii</i>		
CBS 101148 (T)	Sugarcane field soil, Japan	<i>A. borodinense</i>		
CBS 111360	<i>Fucus serratus</i> , Germany	<i>A. tubakii</i>		AY632654*
CBS 112868 (T)	<i>Fucus serratus</i> , Germany	<i>A. fuci</i>		AY632653*
CBS 113360 (T)	<i>Corucia zebrata</i> , California	<i>A. exuviarum</i>		AY882946*
CBS 114785 (T)	Ground, Egypt	<i>A. egyptiacum</i>		FN706550
MUCL 4112	Soil, Georgia, United States	<i>A. implicatum</i>		FN706553
MUCL 9696 (T)	Mycetoma, Brazil	<i>A. recifei</i>		
MUCL 9724 (T)	Skin, Germany	<i>A. kiliense</i>		FN691446
MUCL 9745 (T)	Sand, France	<i>A. furcatum</i>		
MUCL 9834 (T)	<i>Hevea brasiliensis</i> bark, Indonesia	<i>A. polychromum</i>		
MUCL 30020	Field soil, France	<i>A. hyalinulum</i>		FN706547

^a UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; MUCL, Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgium; (T), type strains.

^b BAL, bronchoalveolar lavage specimen; CSF, cerebrospinal fluid.

^c Accession numbers without an asterisk represent sequences newly generated in this study; *, sequences retrieved from the GenBank database.

acterized by powdery and brownish colonies, flask-shaped phialides, occasionally with an inflated base, and obovoid or ellipsoidal conidia arranged in slimy heads or chains (Fig. 2A to D).

Group B was a morphologically heterogeneous assemblage that included six clinical isolates and the type or reference strains of *A. recifei* (MUCL 9696 and CBS 485.77) and *A. alternatum* (CBS 406.66).

Group C had only a single clinical isolate (UTHSC 04-1531). This isolate showed typical features of *A. alternatum*, except that its conidia were arranged in slimy heads, instead of in chains like those described for that species (8).

Groups D (97% bs) and Q (90% bs) comprised a total of

three clinical isolates which were morphologically identified as *A. hyalinulum*. Both groups included respective reference strains of this species. The fact that two reference strains of *A. hyalinulum* were nested in two very distant groups is of concern, particularly since the type strain of that species is not available.

Group E, the largest group sampled, included 29 clinical isolates and the type or reference strains of *A. kiliense*, *A. bactrocephalum*, *A. implicatum*, *A. strictum*, and *A. zaeae*. The 5.8S sequences were all identical and thus not useful for identifying the group E species, which were otherwise morphologically distinct from each other.

Group G included the type strain of *A. glaucum* (CBS

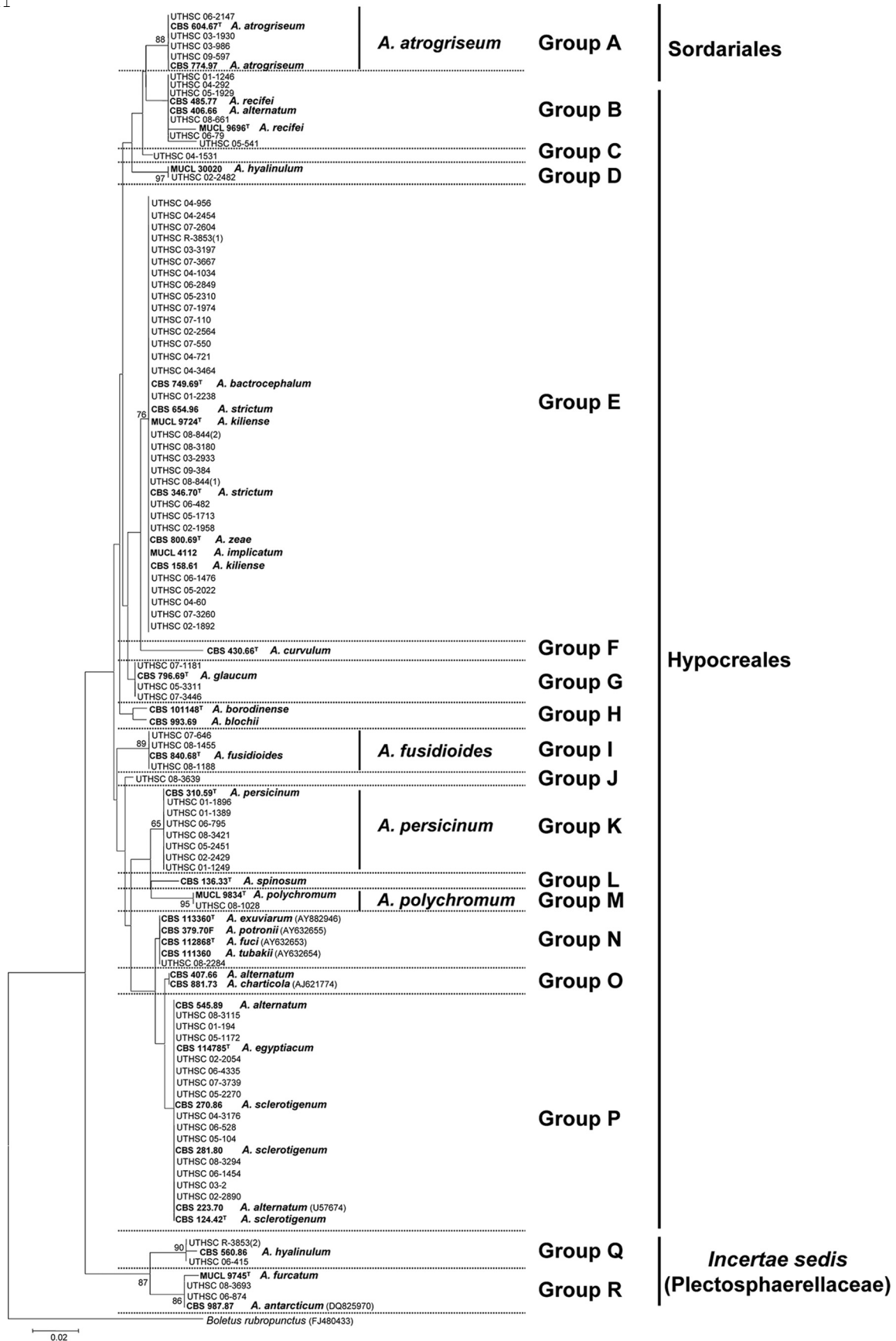


FIG. 1. Neighbor-joining tree inferred from 5.8S rRNA gene sequences of the isolates listed in Table 1. Branch lengths are proportional to the distance. Sequences of the 5.8S rRNA gene obtained from the GenBank database are indicated with the accession number in parentheses. Type and reference strains are indicated in boldface. A superscript "T" indicates a type strain.

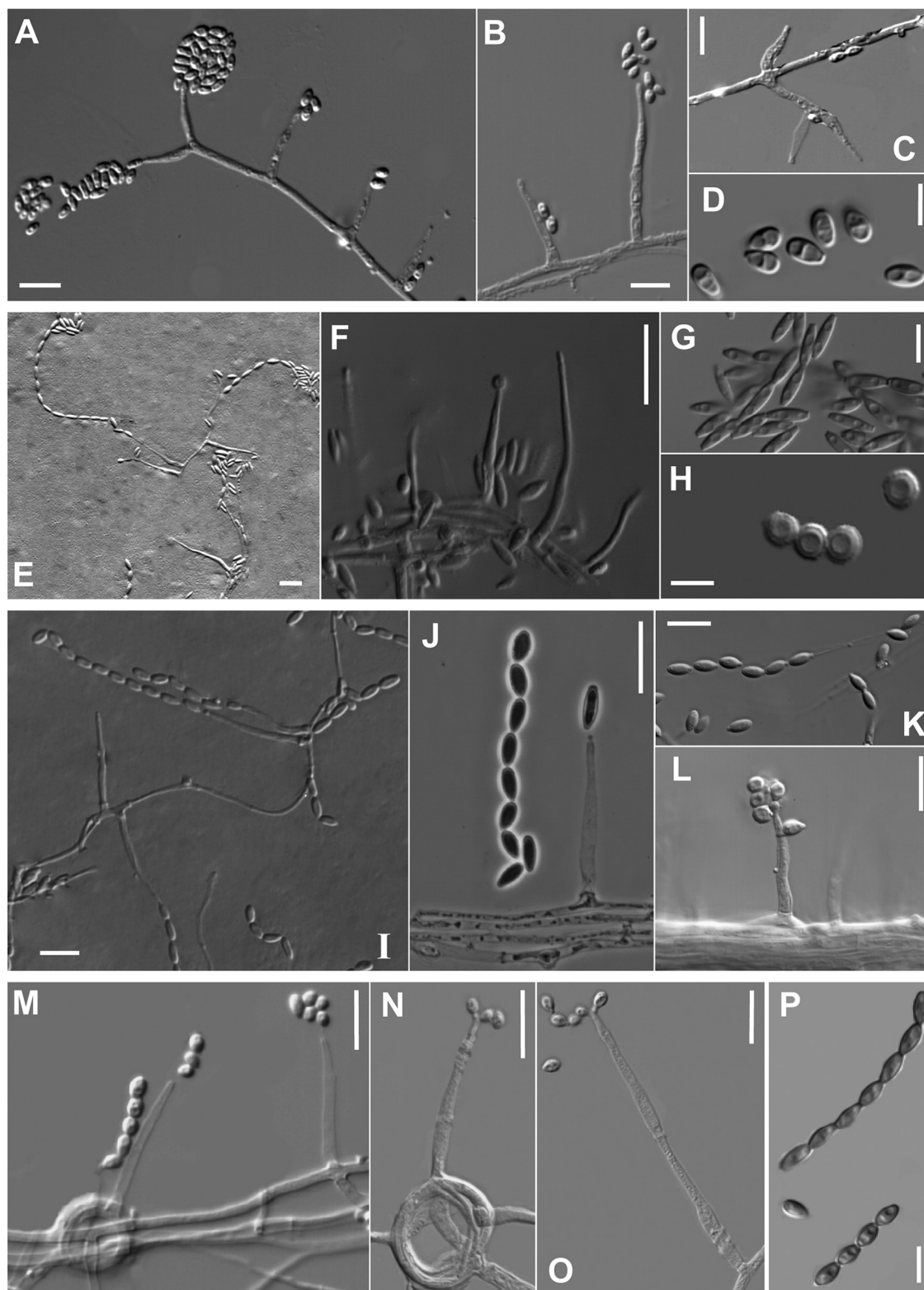


FIG. 2. (A to D) *Acremonium atrogriseum* (CBS 604.67^T); (A to C) flask-shaped phialides and conidia in slimy heads; (D) ellipsoidal or obovoid conidia. (E to H) *Acremonium fusidioides* (CBS 840.68^T); (E and F) phialides and conidia in chains; (G) fusiform and smooth conidia; (H) spherical and warty conidia. (I to L) *Acremonium persicinum* (I to K, CBS 310.59^T; L, UTHSC 06-795); (I and J) phialides and conidia in chains; (K) obovoid conidia; (L) phialide with conidia arranged in slimy heads. (M to P) *Acremonium polychromum* (MUCL 9834^T); (M to O) phialides and conidia in chains; (P) obovate conidia with pointed base. Scale bars: A to C, E, F, I to L, and M to O, 10 μ m; D, G, H, and P, 5 μ m.

796.69) and three clinical isolates (UTHSC 07-1181, UTHSC 05-3311, and UTHSC 07-3446), but only strain UTHSC 07-1181 showed the typical morphological features of the mentioned species (see below).

Group I was statistically well supported (89% bs) and included the type strain of *A. fusidioides* (CBS 840.68) and three morphologically similar clinical isolates (Fig. 2E to H). The most distinctive character of this group was the presence of two types of conidia including: (i) those that were fusiform, smooth-walled and arranged in long dry chains, which were the predominant type, and (ii) those that were spherical, slightly warty, and organized in loose chains.

Group J contained a single isolate (UTHSC 08-3639), which produced two types of conidia: (i) ellipsoidal to ovoid and smooth-walled and (ii) spherical to ovoid and rugose. Although this clinical isolate was genetically distant from *A. borodinense* (15), it was morphologically similar.

Group K comprised seven clinical isolates morphologically identified as *A. persicinum* and the type strain of that species (CBS 310.59). The most remarkable morphological characters of this group were the production of whitish to ochre-brown colonies and smooth or occasionally rugose, obovoid conidia, with a protruding and slightly truncate base, arranged in chains or in masses (Fig. 2I to L).

Group M (95% bs) included the type strain of *A. polychromum* (MUCL 9834) and a clinical isolate (UTHSC 08-1028) identified morphologically as belonging to that species. These two isolates were characterized by olivaceous-brown obovoid conidia that were pointed at the base, and arranged in dry chains (Fig. 2M to P).

Group N contained a clinical isolate (UTHSC 08-2284) and four type or reference strains of *Acremonium* spp. considered anamorphs of the ascomycetous genus *Emericellopsis*: *A. exuviarum* (type strain, CBS 113360), *A. fuci* (type strain, CBS 112868), *A. potronii* (CBS 379.70F), and *A. tubakii* (CBS 110360). These fungi have been shown to form a coherent group, the *Emericellopsis* clade, in a more detailed phylogenetic study (22). The clinical isolate was different morphologically from the other species of the group by its cylindrical conidia with a slightly apiculate base, arranged in slimy heads, and by the absence of chlamydo spores.

Group P contained the second highest number of clinical isolates ($n = 14$). Several type or reference strains of different species of *Acremonium* (i.e., *A. alternatum*, *A. egyptiacum*, and *A. sclerotigenum*) were also nested in this group, but without bootstrap support. It is worth mentioning that reference strains of *A. alternatum* were nested also in groups B and O.

Finally, group R (86% bs) was represented by two clinical isolates, the type strain of *A. furcatum* (MUCL 9745) and a reference sequence of *A. antarcticum* (CBS 987.87). A common feature of these isolates was the presence of schizophialides (i.e., phialides with very short aseptate branches near the apex). Since schizophialides were not described in *A. antarcticum* (14), the identification of the CBS 987.87 is doubtful.

Phylogenetic analysis of ITS1-5.8S-ITS2 sequences and morphological characterization. The first phylogenetic analysis of the ITS region included members of groups A to D. The sequence alignment was 523 bp in length. Groups A (*A. atrogriseum*) and D (*A. hyalinulum*) received high statistical sup-

port (100% bs), whereas the other groups remained poorly supported (data not shown).

Figure 3 shows the phylogenetic tree inferred from the ITS region of 32 clinical isolates and the respective type or reference strains included in groups E, F, and G. The type strain of *A. curvulum* was used as the outgroup. The ITS alignment consisted of 496 bp. Eleven well-supported terminal clades were obtained. Four of these clades contained clinical strains together with type or reference strains of described species of *Acremonium*. These clades corresponded to *A. kiliense* (100% bs), where 15 clinical isolates were included; *A. zeae* (100% bs) and *A. glaucum* (100% bs), each with only one clinical isolate; and *A. implicatum* (98% bs) with 7 clinical isolates. The isolates belonging to *A. kiliense* can be easily identified since on OA they form flat or wrinkled, ropy or slightly cottony, and dirty white to pale orange colonies. The phialides are acicular (Fig. 4A) and produce ellipsoidal to cylindrical conidia in slimy heads (Fig. 4B and C). This species also produces adelophialides (a reduced form of a phialide without a basal septum) (Fig. 4F) and chlamydo spores (Fig. 4D and E), with both structures protruding from vegetative hyphae submerged in growth medium. The most distinctive morphological feature of *A. zeae* is the production of branched conidiophores with phialides, chromophilic at the base, arranged in whorls, and conidia in slimy heads (Fig. 4G to I). *A. glaucum* is characterized by bluish-green colonies and conidia arranged in long chains (Fig. 2J and K). *A. implicatum* is characterized by the production of fusiform conidia with sharply pointed ends disposed in dry chains (Fig. 4L and M). The two latter species do not produce chlamydo spores. The rest of the clades, which contained a total of 8 clinical isolates, corresponded to unidentified or unknown species of *Acremonium*. It is worth mentioning, however, that the strains UTHSC 02-2564, UTHSC 04-3464, UTHS 04-1034, UTHSC 02-1892, and UTHSC 09-384 were morphologically very similar to *A. strictum* and that the strains UTHSC 07-110, UTHSC 05-3311 and UTHSC 07-3446 were morphologically very similar to *A. implicatum*.

Groups H to M, which included 12 clinical isolates, were also analyzed separately. The ITS alignment was 544 bp in length. The resulting tree showed a similar topology to that of the 5.8S tree. However, some of the groups, i.e., I (*A. fusidioides*), K (*A. persicinum*), and M (*A. polychromum*) received significant support (100% bs) (data not shown).

Figure 5 shows the phylogenetic tree inferred from neighbor-joining analysis of the 15 clinical isolates included in the groups N, O, and P. The ITS alignments consisted of 471 bp. Most of the clinical isolates ($n = 11$) grouped in a main clade (100% bs), together with the types or reference strains of *A. alternatum*, *A. egyptiacum*, and *A. sclerotigenum*. It should be noted that type strains are reliable indicators of the correct placement of taxonomic names, whereas reference strains may be misleading. Of the taxonomic names falling into this group, only *A. egyptiacum* and *A. sclerotigenum* are anchored by data obtained from extant type strains; *A. alternatum* may be misapplied. With the exception of UTHSC 05-104 and UTHSC 05-1172, which produced conidia in chains, the rest of the clinical isolates produced conidia in slimy heads morphologically resembling *A. strictum*. However, many of these isolates produced submerged sclerotia (Fig. 4O) in the OA after 2 to 4 weeks of incubation, a fungal structure absent in *A. strictum*

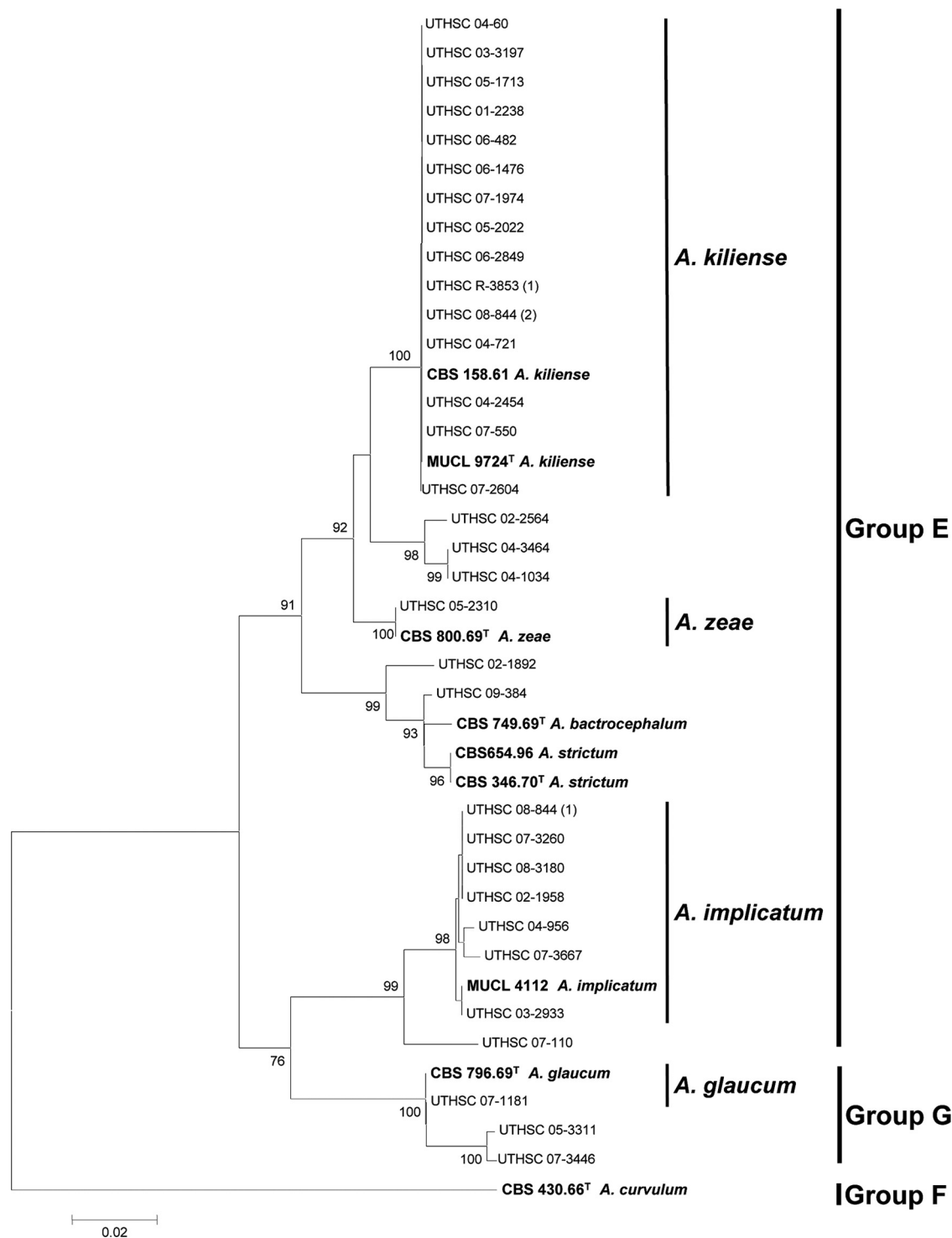


FIG. 3. Neighbor-joining tree constructed with the ribosomal ITS region sequences of the isolates included in the E, F, and G groups shown in Fig. 1. Branch lengths are proportional to distance. Examples of bootstrap support (1,000 replicates) above 70% are indicated on the nodes. Types and reference strains are indicated in boldface. A superscript "T" indicates a type strain.

and characteristic of some but not all isolates of *A. sclerotigenum* and *A. egyptiacum*. The last two species have traditionally been distinguished morphologically by their conidial arrangement, with slimy heads attributed to the former (Fig. 4N and P) and dry chains attributed to the latter (Fig. 4Q). The other

related clinical isolates ($n = 4$) were nested in three different clades, showing no clear relationship with any of the reference strains included in the study. Morphologically, the strain UTHSC 06-528 was similar to *A. hansfordii*, the strain UTHSC 06-4335 was similar to *A. griseoviride*, the strain UTHSC 08-

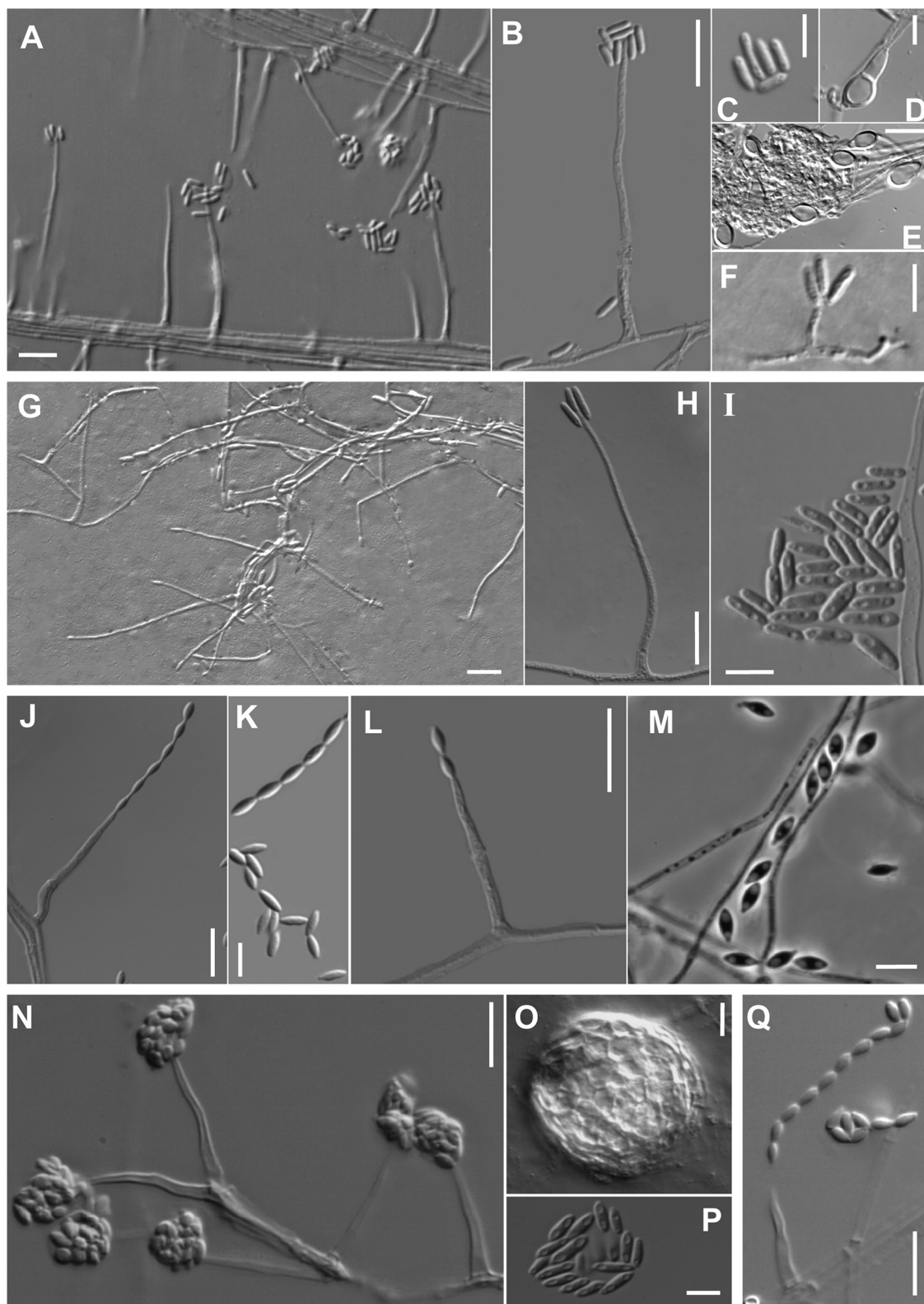


FIG. 4. (A to F) *Acremonium kiliense* (MUCL 9724^T); (A and B) phialides and conidia in slimy heads; (C) ellipsoidal to cylindrical conidia; (D and E) intercalary and terminal chlamydospores; (F) an adelophialide and straight or irregularly curved conidia. (G to I) *Acremonium zeae* (CBS 800.69^T); (G and H) phialides and conidia; (I) cylindrical conidia with rounded ends. (J and K) *Acremonium glaucum* (CBS 796.69^T); (J) phialide producing a conidial chain; (K) fusiform conidia with pointed ends. (L and M) *Acremonium implicatum* (MUCL 4112); (L) phialide-producing conidia; (M) fusiform conidia. (N to P) *Acremonium sclerotigenum* (CBS 124.42^T); (N) phialides and conidia in slimy heads; (O) sclerotium; (P) conidia. (Q) *Acremonium egyptiacum* (CBS 114785^T); phialide and conidial chain. Scale bars: A to E, G, H, J, L to O, and Q, 10 μ m; F, I, K, and P, 5 μ m.

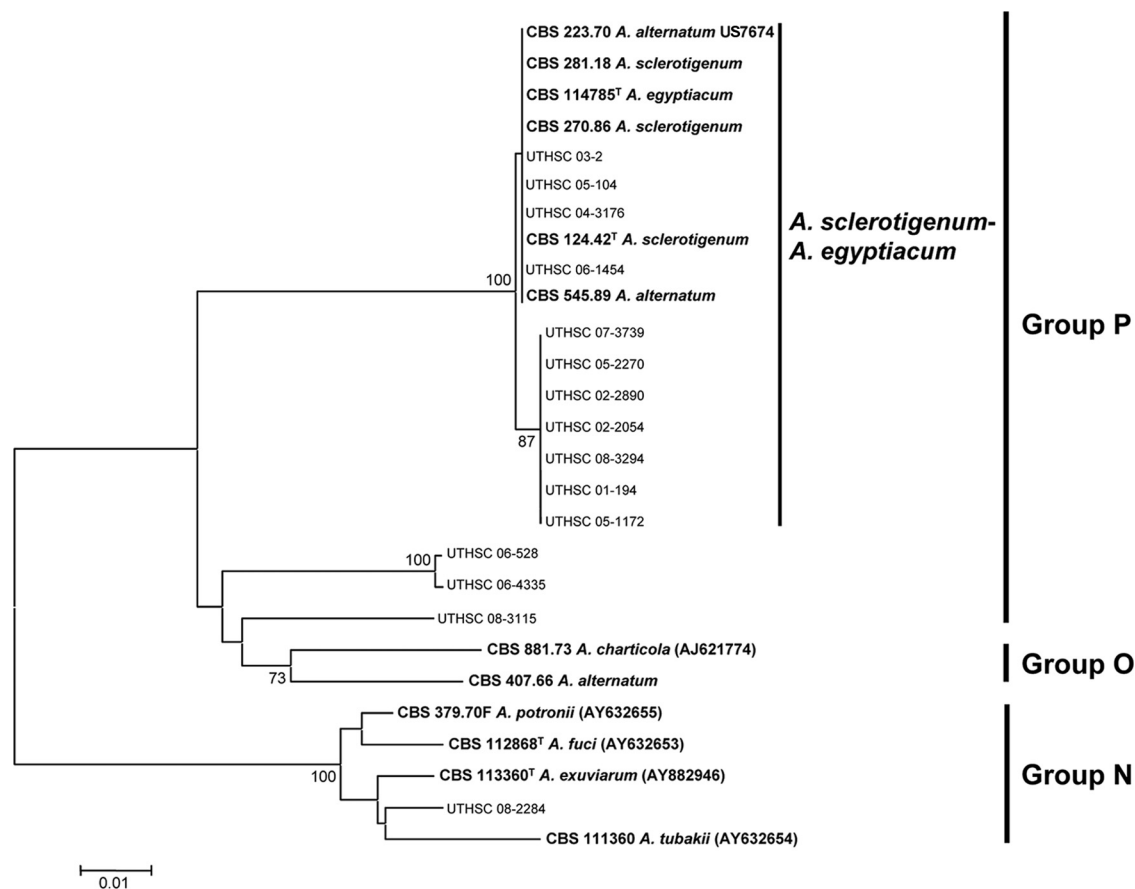


FIG. 5. Neighbor-joining tree constructed with the ribosomal ITS region sequences of the isolates included in the N, O, and P groups shown in Fig. 1. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap values above 70% are indicated on the internodes. GenBank accession numbers are in parentheses. Type and reference strains are indicated in boldface. A superscript “T” indicates a type strain.

3115 was similar to *A. acutatum*, and the strain UTHSC 08-3115 was similar to *A. bactrocephalum*, but none of them was confirmed molecularly.

The correlation between morphological and molecular identification is shown in Table 2. Of the 75 clinical isolates of *Acremonium* identified morphologically, only 50 (67%), representing 9 species, could be confirmed molecularly by comparison with sequences of type strains or reference strains. The species identified were *A. kiliense* (15 isolates), *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum* (11 isolates), *A. implicatum* (7 isolates), *A. persicinum* (7 isolates), *A. atrogriseum* (4 isolates), *A. fusid-ioides* (3 isolates), *A. glaucum* (1 isolate), *A. polychromum* (1 isolate), and *A. zeae* (1 isolate).

Table 3 summarizes some relevant morphological features, based on OA cultures, useful for distinguishing the *Acremonium* species identified confidently in the present study. This table may be helpful in the identification of clinical isolates of *Acremonium* for laboratories that lack molecular facilities.

A listing of the anatomic sites yielding the isolates based upon the information available and cross-referenced by species is provided in Table 4. Again, we emphasize that these data do not necessarily signal confirmed infection.

The results of antifungal susceptibility testing (Table 5) reveal an overall lack of activity for ANID, CAS, MICA, and ITC. All *Acremonium* isolates were resistant to 5FC and FLC,

like most other genera of hyaline molds. Although there is a lack of breakpoint data for non-*Candida* species, the elevated MICs for AMB suggest poor activity of this agent. Endpoints for NAT have not been determined or proposed in the literature, but the MICs obtained ranging from 4 to 16 $\mu\text{g/ml}$ most likely reflect achievable levels when treating topically for fungal keratitis. Although TRB has not been evaluated for potential cutoffs, the lowest MICs for all antifungal agents tested against all *Acremonium* species were obtained with this compound, followed by PSC and VRC.

DISCUSSION

This is the first study that has identified a large panel of clinical isolates of *Acremonium* to the species level using both phenotypic features and DNA sequencing. Although only a limited number of species could be characterized, the identification can be considered reasonably reliable since the sequences were compared to those of type strains, where available, or reference strains identified by specialists (8). Our results agree with Glenn et al. (10), who demonstrated that the genus *Acremonium* is highly polyphyletic comprising phylogenetically distant fungi. Up to now, except for limited groups (21, 22), the taxonomy of *Acremonium* has been almost exclusively based on morphological criteria. However, the present

TABLE 2. Comparison of morphological and molecular identification based on ITS sequences of 75 *Acremonium* clinical isolates

Morphological identification	Molecular identification (no. of strains)										% Correlation (morphological/molecular)	
	<i>Acremonium</i> sp.	<i>A. atrogriseum</i>	<i>A. sclerotigenum</i> - <i>A. egyptiacum</i>	<i>A. fusidioides</i>	<i>A. glaucum</i>	<i>A. implicatum</i>	<i>A. kiliense</i>	<i>A. persicinum</i>	<i>A. polychromum</i>	<i>A. zeae</i>		Total
<i>A. atrogriseum</i>	4										4	100
<i>A. fusidioides</i>				3							3	100
<i>A. glaucum</i>					1						1	100
<i>A. kiliense</i>							15				15	100
<i>A. persicinum</i>								7			7	100
<i>A. polychromum</i>									1		1	100
<i>A. sclerotigenum</i>				3							3	100
<i>A. egyptiacum</i>				1							1	100
<i>A. implicatum</i>	3					7					10	70
<i>A. hyalinulum</i>	3										3	0
<i>A. acutatum</i>	1										1	0
<i>A. alternatum</i>	2		2								4	0
<i>A. bactrocephalum</i>	3										3	0
<i>A. borodinense</i>	1										1	0
<i>A. furcatum</i>	1										1	0
<i>A. griseoviride</i>	1										1	0
<i>A. hansfordii</i>	1										1	0
<i>A. pteridii</i>	1										1	0
<i>A. strictum</i>	8		5							1	14	0
Total	25	4	11	3	1	7	15	7	1	1	75	56

study has demonstrated that certain *Acremonium* species cannot be reliably identified using only phenotypic features. For example, reference strains of *A. alternatum*, the type species of the genus, grouped in more than one clade (Fig. 1). *A. alternatum* is a species of ambiguous typification, and the *Acremonium* database of one of us (R.C.S.) indicates there are at least six different taxa that are contenders to bear this name based on close congruence with dried type material, plus numerous other taxa that are morphologically similar and would be routinely identified under this name. Similarly, reference strains of *A. hyalinulum* were also nested in very distant clades. In contrast, authentic strains of species that were morphologically distinct, e.g., *A. sclerotigenum*, *A. egyptiacum*, and *A. alternatum*, were nested together in a closely homologous, well-supported clade (Fig. 5). Although morphological identification of *Acremonium* species is difficult; credible identification can be done to some extent even for experts using Gams' monograph (8) and a few additional studies (5, 6, 9, 18). In part because there are many undescribed species in *Acremonium*, the only medically important seen species that can be reliably identified morphologically are *A. kiliense*, *A. implicatum*, and *A. persicinum*. Isolates should be sequenced for identification if considered medically significant, and sequence-based identifications should be controlled for possible GenBank error with detailed morphological study.

Since the advent of useful molecular techniques and the availability of nucleotide sequences for clinical isolates, it might be expected that accurate identification of causal agents of *Acremonium* infections could be achieved in clinical laboratories. The present study revealed, however, that molecular identification of clinical isolates of *Acremonium* using a BLAST search of

TABLE 3. Distinctive morphological features, based on oatmeal cultures at 25°C after 7 days in alternating light/darkness of well-characterized *Acremonium* species found in clinical samples

Order	Species	Colonies	Conidia	Other distinctive features
Sordariales	<i>A. atrogriseum</i>	Pale ochre-brown to brownish-black	Obovoid or ellipsoidal, smooth, subhyaline to dark gray, in slimy heads or in chains	Phialides flask-shaped, occasionally with a marked inflated base; sclerotia and chlamydo-spores absent
Hypocreales	<i>A. fusidioides</i>	White to ochraceous-brown, often reddish	Two types: (i) fusiform, smooth, and thin-walled, in long dry chains, more numerous, and (ii) spherical, thick and warty-walled, in loose chains	Sclerotia and chlamydo-spores absent
	<i>A. persicinum</i>	Whitish to ochre brown	Obovoid, with slightly protruding and truncate base, usually smooth, hyaline, slimy heads or in chains	Sclerotia and chlamydo-spores absent
	<i>A. polychromum</i>	Ochre brown	Obovoid, with a pointed base, smooth to rugose, olivaceous-brown, in dry chains	Phialides often with incrustated pigment near the tip; sclerotia and chlamydo-spores absent
	<i>A. kiliense</i>	Dirty white to pale orange	Ellipsoidal to cylindrical, straight or curved, smooth-walled, hyaline, in slimy heads	Chlamydo-spores present after 7 days, globose to ellipsoidal, thick-walled, intercalary, or terminal; adelophialides present; sclerotia absent
	<i>A. zeae</i>	White to pink	Cylindrical with rounded ends, smooth, hyaline, in slimy heads	Conidiophores usually several times branched; sclerotia and chlamydo-spores absent
	<i>A. glaucum</i>	Intense gray-green to bluish-green	Fusiform, smooth-walled, weakly pigmented (grayish-green), in long dry chains	Sclerotia and chlamydo-spores absent
	<i>A. implicatum</i>	Whitish to pinkish	Fusiform with sharply pointed ends, hyaline, in long dry chains	Sclerotia and chlamydo-spores absent
	<i>A. egyptiacum</i> - <i>A. sclerotigenum</i>	Pale ochre to light pink	Obovoid, cylindrical or slightly fusiform, smooth, hyaline, or pale greenish, in chains or mostly collapsing in heads	Submerged sclerotia present after 2 to 4 weeks; chlamydo-spores occasionally produced

TABLE 4. Source and identification of U.S. *Acremonium* clinical isolates examined

Molecular identification	No. (%) of isolates obtained from:																	
	Blood	CSF ^a	Vertebral disc or tissue	Eye, cornea, contact lens, or vitreous fluid	Bone	Body fluid, pleural, or hip	Olecranon bursa	Lung	BAL/tracheal aspirate	Sputum	Sinus	Sutaneous tissue or wound	Leg, knee, or thigh	Foot mass or foot	Scalp or scalp abscess	Nails	Unknown	Total
<i>A. kiliense</i>	3	1	1	4				2	1	1				1	1			15 (20)
<i>A. sclerotigenum</i> - <i>A. egyptiacum</i>	2	1					1	2	1	1					2	1		11 (14.7)
<i>A. implicatum</i>					1			4	1	1								7 (9.3)
<i>A. persicinum</i>						1		1					1	1		1		7 (9.3)
<i>A. atrogriseum</i>			1					2								1		4 (5.4)
<i>A. fusidioides</i>								3										3 (4)
<i>A. glaucum</i>									1									1 (1.3)
<i>A. polychromum</i>																1		1 (1.3)
<i>A. zeae</i>				1														1 (1.3)
<i>Acremonium</i> sp.				2	1	1		5	6	1	3	2			1	3		25 (33.3)
Total	5 (6.6)	2 (2.7)	2 (2.7)	7 (9.3)	2 (2.7)	2 (2.7)	1 (1.3)	2 (2.7)	19 (25.3)	10 (13.3)	4 (5.3)	3 (4.0)	3 (4.0)	2 (2.7)	2 (2.7)	8 (10.7)	1 (1.3)	75 (100)

^a CSF, cerebrospinal fluid.

GenBank sequences is of limited utility due to the scarcity of GenBank sequences that have been verified. Thus, we have shown that sequenced strains identified in two recent clinical reports as *A. strictum* (12, 16) do not belong to this species but instead are related to the *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum* group.

Although cases of hyalohyphomycosis incited by *Acremonium* appear to be relatively rare compared to those caused by other common fungi, this could be a false perception created by the difficulties in the identification of the etiological agents. Older published cases commonly only reported the etiologic agent as *Acremonium* sp. Due to the morphological similarity of these fungi with *Fusarium*, especially when the latter does not produce characteristic macroconidia, it is likely that some cases of infections by *Acremonium* were erroneously reported as a *Fusarium* infection (1, 7, 11, 18). In the last review of *Acremonium* infections, 36 cases of localized or disseminated infections, other than mycetoma or ocular infections, were summarized (11). It is probable, however, that the actual number of *Acremonium* cases may be higher considering that the Fungus Testing Laboratory at San Antonio received at least 75 isolates from clinical samples across the United States over an 8-year period.

One of the most remarkable findings of the present study was that *A. alabamense*, *A. blochii*, *A. curvulum*, *A. potronii*, *A. recifei*, *A. roseogriseum*, *A. spinosum*, and *A. strictum*, which had been previously described as opportunistic species (5, 11, 18), were not represented in the isolates tested here. In a previous study, we indicated that the involvement of *A. strictum* in human infections was uncertain (11). The lack of isolates of *A. recifei* could be due to the fact that this species is mainly known from mycetoma cases, which were not represented in the present study. Also, *A. recifei* is mostly known from the tropics (18), so its absence among these mostly American isolates may be a sampling artifact. Related studies by one of us (R.C.S.) have shown that *A. blochii* and *A. potronii* are names not rooted

by a type strain and that each name has had a wide range of mostly undescribed genetic species attributed to it (data not shown, except for a marine "*A. potronii*" isolate CBS 379.70F). The name *A. potronii*, however, is probably the oldest valid name for the most common genetic species in the *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum* complex, and other attributions of this name are strictly based on overlap between large numbers of morphologically simple *Acremonium* species. A neotype will need to be designated for *A. potronii*, along with detailed justification for the choice before this name becomes taxonomically well grounded.

This survey discovered species such as *A. fusidioides*, *A. glaucum*, *A. implicatum*, *A. persicinum*, *A. polychromum*, and *A. zeae*, which have not been referenced in any clinical reports. None of these species, however, has been formally demonstrated as a causal agent of disease. Isolations may simply indicate body surface contamination or contamination arising during the course of obtaining and processing clinical specimens. An important objective for future studies would be to elucidate the true clinical role of the species reported in the present study.

Another significant finding was the laboratory reporting of an *Acremonium* species in 44 isolates not belonging to this genus. In addition to strains of *Fusarium* being reported as *Acremonium*, several other morphologically similar isolates containing various degrees of melanization, such as *Phialemonium*, *Lecytophora*, *Phaeoacremonium*, and *Pleurostomophora*, were also reported as *Acremonium* species, further supporting the difficulties associated with phenotypic identification of morphologically similar genera.

In our study, the MICs for PSC and VRC were high compared to those found for other hyaline molds such as *Aspergillus fumigatus*, where MICs were 0.006 to 2.0 µg/ml for PSC and 0.12 to 4.0 µg/ml for VRC, and associated epidemiological cutoff values (ECVs) were reported as 1.0 µg/ml for VRC and 0.25 µg/ml for PSC (17). However, these cutoffs are similar to

those of *Fusarium* species for which PSC and VRC are licensed, as there is some clinical benefit.

In conclusion, clinical *Acremonium* isolates are difficult to identify using morphological or molecular methods. However, a first step for facilitating this task has been completed since ITS reference sequences of species which appear to be the most clinically relevant, at least in the United States, have been deposited in GenBank for future reference. Further studies testing more clinical isolates, other species of the genus and the other genetic loci, which are more phylogenetically informative than the ITS, are required to determine the spectrum of well characterized *Acremonium* species involved in human infections. Once this has been done, animal models to evaluate the real pathogenic potential of these species and testing appropriate therapies for their treatment should be developed. For the clinically relevant species examined here, the MICs for all of the antifungal agents commonly used, except for terbinafine, were high.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Netherlands) and the Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain (Belgium) for supplying many of the strains used in the study.

This study was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, grants CGL 2009-08698/BOS and CGL 2008-04226/BOS.

REFERENCES

- Ajello, L., A. A. Padhye, F. W. Chandler, M. R. McGinnis, L. Morganti, and F. Alberici. 1985. *Fusarium moniliforme*, a new mycetoma agent: restudy of European case. *Eur. J. Epidemiol.* 1:5-10.
- Alvarez, E., A. Stchigel, J. Cano, D. Sutton, A. Fothergill, J. Chander, V. Salas, M. Rinaldi, and J. Guarro. 2010. Molecular phylogenetic diversity of the emerging mucoralean fungus *Apophysomyces*: proposal of three new species. *Rev. Iberoam. Micol.* 27:80-89.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Das, S., R. Saha, S. A. Dar, and V. G. Ramachandran. 2010. *Acremonium* species: a review of the etiological agents of emerging hyalohyphomycosis. *Mycopathologia* doi10.1007/s11046-010-9334-1.
- De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands/University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- Domsch, K. H., W. Gams, and T.-H. Anderson. 2007. *Acremonium*, p. 30-38. *In* Compendium of soil fungi, vol. 2. IHW-Verlag, Eching, Germany.
- Fincher, R. M., J. F. Fisher, R. D. Lovell, C. L. Newman, A. Espinel-Ingroff, and H. J. Shadomy. 1991. Infection due to the fungus *Acremonium* (*Cephalosporium*). *Medicine* 70:398-409.
- Gams, W. 1971. *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Gams, W. 1975. *Cephalosporium*-like hyphomycetes: some tropical species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64:389-404.
- Glenn, A. E., C. W. Bacon, R. Price, and R. T. Hanlin. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88:369-383.
- Guarro, J., W. Gams, I. Pujol, and J. Gené. 1997. *Acremonium* species: new emerging opportunists—in vitro antifungal susceptibilities and review. *Clin. Infect. Dis.* 25:1222-1229.
- Guarro, J., A. Palacio, J. Gené, J. Cano, and C. Gómez. 2009. A case of colonization of a prosthetic mitral valve by *Acremonium strictum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 26:146-148.
- Gupta, A., H. Jain, C. Lynde, P. McDonald, E. Cooper, and R. Summerbell. 2000. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter Canadian survey of 15,000 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43:244-248.
- Hawksworth, D. L. 1979. The lichenicolous Hyphomycetes. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 6:183-300.
- Ito, T., I. Okane, A. Nakagiri, and W. Gams. 2000. Two species of *Acremonium* section *Acremonium*: *A. borodinense* sp. nov. and *A. cavaraeanum* rediscovered. *Mycol. Res.* 104:77-80.
- Novicki, T. J., R. Geise, A. P. Limaye, K. Lefe, L. Bui, U. Bui, and B. T. Cookson. 2003. Genetic diversity among clinical isolates of *Acremonium*

TABLE 5. Results of *in vitro* antifungal susceptibility testing

Species (no. of isolates)	Drug concn (µg/ml) ^a																	
	AMB		ITC		PSC		VRC		TRB		NAT		MICA		ANID		CAS	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>A. kilense</i> (15)	4	16	>16	>16	4	>16	2	4	1	2	8	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<i>A. sclerotigenum</i> - <i>A. egyptiacum</i> (11)	4	16	>16	>16	1	>16	2	2	0.125	0.5	8	16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<i>A. implicatum</i> (7)	2	4	>16	>16	2	>16	2	8	0.25	1	4	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<i>A. persicum</i> (7)	2	8	>16	>16	1	8	2	8	0.125	0.25	4	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16
<i>A. atrogriseum</i> (4)	1	2	4	8	1	2	2	2	0.125	0.125	2	4	4	0.125	>16	>16	0.5	>16
<i>A. fusicoides</i> (3)	2	2	1	>16	1	2	2	2	0.125	2	4	4	4	>16	>16	4	4	>16

^a AMB, amphotericin B; ANID, amphotericin; CAS, caspofungin; ITC, itraconazole; MICA, micafungin; NAT, natamycin; PSC, posaconazole; TRB, terbinafine; VRC, voriconazole.

- strictum* determined during an investigation of a fatal mycosis. J. Clin. Microbiol. **41**:2623–2628.
17. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. A. Ghannoum, J. H. Rex, B. D. Alexander, D. Andes, S. D. Brown, A. Espinel-Ingroff, C. L. Fowler, E. M. Johnson, C. C. Knapp, M. R. Moryl, L. Ostrosky-Zeichner, D. J. Sheehan, and T. Walsh.** 2009. Wild type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. J. Clin. Microbiol. **47**:3142–3146.
 18. **Summerbell, R. C.** 2003. *Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia*, and their relatives, p. 237–498. In D. H. Howard (ed.), Pathogenic fungi in humans and animals, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
 19. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. **24**:1596–1599.
 20. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **24**:4876–4882.
 21. **Zare, R., W. Gams, M. Starink-Willemsse, and R. C. Summerbell.** 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. Nova Hedwigia **85**:463–489.
 22. **Zuccaro, A., R. C. Summerbell, W. Gams, H.-J. Schroers, and JI. Mitchell.** 2004. A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. Stud. Mycol. **50**:283–297.

4.3. Caracterización morfológica y molecular de especies de *Phialemonium* y *Lecythophora*

4.3.1. Molecular and phenotypic characterization of *Phialemonium* and *Lecythophora* isolates from clinical samples.

Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J.

Journal of Clinical Microbiology 49: 1209–1216.

Molecular and Phenotypic Characterization of *Phialemonium* and *Lecythophora* Isolates from Clinical Samples[∇]

H. Perdomo,¹ D. A. Sutton,² D. García,¹ A. W. Fothergill,² J. Gené,^{1*} J. Cano,¹
R. C. Summerbell,^{3,4} M. G. Rinaldi,² and J. Guarro¹

Mycology Unit, Medical School and IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain¹; Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas²; and Sporometrics Inc.³ and Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto,⁴ Toronto, Ontario, Canada

Received 30 September 2010/Returned for modification 9 December 2010/Accepted 13 January 2011

Several members of the fungal genera *Phialemonium* and *Lecythophora* are occasional agents of severe human and animal infections. These species are difficult to identify, and relatively little is known about their frequency in the clinical setting. The objective of this study was to characterize morphologically and molecularly, on the basis of the analysis of large-subunit ribosomal DNA sequences, a set of 68 clinical isolates presumed to belong to these genera. A total of 59 isolates were determined to be *Phialemonium* species ($n = 32$) or a related *Cephalotheca* species ($n = 6$) or *Lecythophora* species ($n = 20$) or a related *Coniochaeta* species ($n = 1$). Nine isolates identified to be *Acremonium* spp. or *Phaeoacremonium* spp. were excluded from further study. The most common species were *Phialemonium obovatum* and *Phialemonium curvatum*, followed by *Lecythophora hoffmannii*, *Cephalotheca foveolata*, and *Lecythophora mutabilis*.

A wide range of fungi are able to cause opportunistic infections in immunocompromised patients. Apart from the genera *Aspergillus*, *Scedosporium*, and *Fusarium*, which are the most common filamentous fungal opportunists, many other genera, including *Phialemonium* and *Lecythophora*, are also involved in human infections, often with a fatal outcome (7, 19). *Phialemonium* and *Lecythophora* species are poorly differentiated morphologically, are difficult to identify, and may be confused with poorly sporulating *Fusarium* or *Acremonium* species. With the increasing number of susceptible, immunocompromised hosts, the early recognition of these potentially lethal fungi has become important in providing appropriate patient management (12, 20).

Phialemonium species are widely distributed in the environment, having been isolated from air, soil, industrial water, and sewage (9). Although they show pale colonies *in vitro*, melanin can be demonstrated in their cell wall by Fontana-Masson stain; for this reason, they are considered dematiaceous fungi (11, 33). The majority of *Phialemonium* infections are invasive, affecting both immunocompromised and immunocompetent patients, and the more frequent infections include peritonitis, endocarditis, osteomyelitis, and cutaneous infections of wounds following burns (7, 12, 15, 20, 23).

The genus *Phialemonium* was described by Gams and McGinnis (9) to accommodate filamentous fungi with morphological features between those of *Acremonium* and *Phialophora*. It is characterized by moist colonies with abundant adelophialides (reduced phialides that are not delimited from subtending intercalary hyphal cells by a basal septum) and less common discrete phialides (phialides clearly differentiated

from the subtended hyphae and separated by a basal septum), with neither having conspicuous collarettes and with both producing conidia aggregate in slimy heads. On the basis of the conidial shape and the color of the colonies, three species have been described: *Phialemonium obovatum*, *P. curvatum*, and *P. dimorphosporum* (9). *Phialemonium obovatum* has greenish colonies and obovate conidia, *P. curvatum* typically has white to grayish colonies and allantoid conidia, and *P. dimorphosporum* was described as having grayish colonies with obovate or ellipsoidal conidia (7, 9, 15). Subsequently, *P. dimorphosporum*, on the basis of restriction fragment length polymorphism analysis, was reduced to synonymy with *P. curvatum*; the morphologies ascribed to both species apply to *P. curvatum* (12). Recently, the new species *Cephalotheca foveolata* (family Cephalothecaceae), molecularly and morphologically related to *P. obovatum*, was reported to be the cause of a subcutaneous infection in a patient from South Korea (34).

The genus *Lecythophora* is morphologically similar to *Phialemonium*. It also forms adelophialides, but in *Lecythophora*, these conidiogenous cells show conspicuous collarettes, and the colonies usually are pink-salmon to dark brown, although discrete phialides like those of *Acremonium* may be also present (7, 9, 23, 30). Recently, molecular studies confirmed that the six species included in *Lecythophora* are anamorphs of *Coniochaeta*, an ascomycete genus belonging to the family Coniochaetaceae (Sordariomycetes) (6, 13, 31). Although these fungi are saprobes, some species have also been involved in human disease. *Lecythophora hoffmannii* has been associated with cases of subcutaneous infections, keratitis, sinusitis, peritonitis, and canine osteomyelitis (16, 21). *Lecythophora mutabilis* has been described to be the causative agent of human peritonitis, endocarditis, endophthalmitis, and keratitis, among others (2, 7, 8, 22, 28).

Due to the difficulties in the identification of the members of these two genera, their real incidence in human infections and the management of such infections are poorly known.

* Corresponding author. Mailing address: Mycology Unit, Medical School, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201-Reus-Tarragona, Spain. Phone: 34 977 759359. Fax: 34 977 759322. E-mail: josepa.gene@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 26 January 2011.

TABLE 1. *Phialemonium* and *Lecythophora* clinical isolates and types or reference strains of related species included in the study

Isolate ^a	Species	Origin	GenBank accession no. (D1/D2 rDNA)
UTHSC 01-20 (1)	<i>Lecythophora</i> sp. 1	Leg wound, MA	
UTHSC 01-20 (2)	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Leg wound, MA	FR745935
UTHSC 01-317	<i>Phialemonium obovatum</i>	Graft tissue, WA	FR745951
UTHSC 01-590	<i>Phialemonium obovatum</i>	Toenail, TX	FR691999
UTHSC 01-1399	<i>Phialemonium obovatum</i>	Abscess, MD	FR745945
UTHSC 01-1644	<i>Lecythophora</i> sp. 1	Canine bone marrow aspirate, AL	
UTHSC 01-1664	<i>Lecythophora</i> sp. 4	Arm wound, CA	
UTHSC 02-294	<i>Phialemonium obovatum</i>	Blood, TX	FR745947
UTHSC 02-875	<i>Phialemonium obovatum</i>	Blood, TX	FR745948
UTHSC 02-1109	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Finger cyst fluid, CO	FR691983
UTHSC 02-1327	<i>Coniochaeta prunicola</i>	Canine skin mass, NY	FR691989
UTHSC 02-2050	<i>Phialemonium curvatum</i>	Forearm, FL	FR691978
UTHSC 03-1149	<i>Lecythophora lignicola</i>	Fingernail, PA	FR745938
UTHSC 03-1890	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Canine osteomyelitis, CA	FR745936
UTHSC 03-2258	<i>Phialemonium obovatum</i>	Arm, UT	FR745950
UTHSC 03-2653	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Endocarditis, Singapore	FR745941
UTHSC 03-3574	<i>Phialemonium obovatum</i>	Blood, VA	FR692002
UTHSC 03-3588	<i>Phialemonium obovatum</i>	Bronchial fluid, TX	FR745946
UTHSC 03-3661	<i>Phialemonium</i> sp. 2	Sinus, IL	
UTHSC 04-350	<i>Phialemonium curvatum</i>	Synovial fluid, OH	FR691979
UTHSC 04-616	<i>Phialemonium obovatum</i>	Arm, TX	FR745944
UTHSC 04-956	<i>Phialemonium curvatum</i>	Sinus, MN	FR745926
UTHSC 05-970	<i>Lecythophora mutabilis</i>	Aortic valve, MA	FR691992
UTHSC 05-2527	<i>Phialemonium</i> sp. 1	Peritoneal dialysis catheter, PA	
UTHSC 05-2926	<i>Lecythophora</i> sp. 4	Urine, TX	
UTHSC 05-3214	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Vitreous fluid, OR	FR745934
UTHSC 06-733	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Lymph node, TX	FR745943
UTHSC 06-1277	<i>Phialemonium obovatum</i>	Toenail, FL	FR745952
UTHSC 06-1465	<i>Phialemonium</i> sp. 1	Shin aspirate, SC	
UTHSC 06-1664	<i>Lecythophora mutabilis</i>	Vitreous fluid, MN	FR691991
UTHSC 06-1820	<i>Phialemonium</i> sp. 1	Corneal fluid, FL	
UTHSC 06-2147	<i>Phialemonium curvatum</i>	Nail, WA	FR745928
UTHSC 06-4324	<i>Phialemonium curvatum</i>	Canine pleural fluid, TX	FR691981
UTHSC 07-11	<i>Phialemonium curvatum</i>	CSF, ^b MN	FR745929
UTHSC 07-1284	<i>Phialemonium curvatum</i>	Toenail, SC	FR691980
UTHSC 07-1556	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Bronchial fluid, SC	FR691996
UTHSC 07-1957	<i>Lecythophora</i> sp. 2	Epidural fluid, MO	
UTHSC 07-2087	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Lymph node, TX	FR745942
UTHSC 07-2173	<i>Phialemonium curvatum</i>	Vitreous fluid, NV	FR745930
UTHSC 07-2959	<i>Lecythophora mutabilis</i>	Elbow, AR	FR745940
UTHSC 07-3574	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Eyes, OH	FR691994
UTHSC 07-3736	<i>Phialemonium</i> sp. 1	Left hand, FL	
UTHSC 08-185	<i>Lecythophora mutabilis</i>	Nail, PA	FR745939
UTHSC 08-693	<i>Phialemonium curvatum</i>	CSF, TX	FR745932
UTHSC 08-851	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Eye, MN	FR691984
UTHSC 08-1239	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Canine urine, CA	FR745937
UTHSC 08-2292	<i>Phialemonium curvatum</i>	Blood, UT	FR745925
UTHSC 08-2569	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Bronchial fluid, MI	FR691985
UTHSC 08-2766	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Eye capsule, NC	FR691995
UTHSC 08-3008	<i>Lecythophora mutabilis</i>	Leg, MN	FR691993
UTHSC 08-3010	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Bone, CA	FR745933
UTHSC 08-3486	<i>Phialemonium obovatum</i>	Canine urine, CA	FR692000
UTHSC 08-3696	<i>Phialemonium obovatum</i>	Blood, TX	FR745949
UTHSC 09-597 (2)	<i>Phialemonium obovatum</i>	Tissue, MN	FR692001
UTHSC 09-845	<i>Phialemonium obovatum</i>	Endocarditis, NC	FR691998
UTHSC 09-1440	<i>Lecythophora</i> sp. 3	Respiratory, CA	
UTHSC 09-2358	<i>Phialemonium</i> sp. 1	Aspirate cellulitis, MA	
UTHSC R-3447	<i>Phialemonium curvatum</i>	Eye, Israel	FR745927
UTHSC R-3448	<i>Phialemonium curvatum</i>	Eye, Israel	FR745931
CBS 135.34	<i>Cephalotheca sulfurea</i>	Garden cane, United Kingdom	AB189153 ^c
CBS 140.41	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Water pollution, United Kingdom	AF353600 ^c
CBS 153.42 ^T	<i>Lecythophora decumbens</i>	Fruit, Netherlands	
CBS 157.44 ^T	<i>Lecythophora mutabilis</i>	River water, Germany	FR691990
CBS 205.38 ^T	<i>Lecythophora fasciculata</i>	Butter, Switzerland	FR691988
CBS 206.38 ^T	<i>Lecythophora luteoviridis</i>	Butter, Switzerland	FR691987
CBS 206.73	<i>Lecythophora mutabilis</i>	Aorta and mitral valve, USA	AB261979 ^c

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Isolate ^a	Species	Origin	GenBank accession no. (D1/D2 rDNA)
CBS 245.38 ^T	<i>Lecytophora hoffmannii</i>	Butter, Switzerland	FR691982
CBS 267.33 ^T	<i>Lecytophora lignicola</i>	Sweden	FR691986
CBS 279.76 ^T	<i>Phialemonium obovatum</i>	Systemic infection, USA	FR691997
CBS 457.88	<i>Albertiniella polyporicola</i>	<i>Ganoderma applanatum</i> , Germany	AF096185 ^c
CBS 491.82 ^T	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	Soil, USA	FR691976
CBS 490.82 ^T	<i>Phialemonium curvatum</i>	Skin lesion, USA	FR691977
CBS 508.70 ^T	<i>Cryptendoxyla hypophloia</i>	Wood, Canada	AB191032 ^c
CBS 551.75	<i>Coniochaeta subcorticalis</i>	Wood, Norway	AF353593 ^c
CBS 730.97	<i>Phialemonium obovatum</i>	Peritoneal dialysis fluid, USA	
CBS 109872 ^T	<i>Coniochaeta rhopalochaeta</i>	Wood, Argentina	GQ351561 ^c
CBS 110467	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	Wood, Germany	AF353583 ^c
CBS 120874	<i>Coniochaeta velutina</i>	<i>Prunus salicina</i> , South Africa	GQ154604 ^c
CBS 120875 ^T	<i>Coniochaeta prunicola</i>	<i>Prunus armeniaca</i> , South Africa	GQ1546031 ^c
E. W. 95.605	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	Wood, Germany	AF353584 ^c
HKUCC 2984	<i>Neolinocarpon globosicarpum</i>		DQ810224 ^c
HKUCC 2954	<i>Linocarpon livistonae</i>		DQ810206 ^c
HKUCC2983	<i>Neolinocarpon enshiense</i>		DQ810221 ^c
NBRC 100905 ^T	<i>Cephalotheca foveolata</i>	Subcutaneous infection, South Korea	AB178269 ^c

^a CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; E. W., collection Evi Weber; HKUCC, University of Hong Kong Culture Collection; NBRC, NITE Biological Resource Center, Japan; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio. ^T, type strain. Numbers in parentheses represent isolate identification numbers of clinical samples.

^b CSF, cerebrospinal fluid.

^c Sequences retrieved from GenBank database.

Up to now, studies involving members of these genera isolated from clinical samples have been scarce, and generally, only a few isolates from medical cases have been molecularly or morphologically characterized. To evaluate the potential incidence of the different species of *Phialemonium* and *Lecytophora* in human infections, we have studied a large number of isolates of both genera from clinical samples received in a U.S. fungal reference laboratory during the period from 2001 to 2009. It is important to note that we lack sufficient clinical information to ascertain whether any of these isolates was confirmed to be the causal agent of infection. In order to provide the reliable identification of such isolates, apart from the morphological study, sequences of the D1/D2 domains of the 28S ribosomal DNA (rDNA) were also analyzed. Several molecular studies have demonstrated that this locus is a highly informative phylogenetic marker for these genera and its relatives (1, 6, 31, 34).

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates. A total of 68 clinical isolates, presumably belonging to the genera *Phialemonium* and *Lecytophora*, received in the Fungus Testing Laboratory at the University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSC) for identification and/or antifungal susceptibility determination were included in this study (Table 1). In addition, 10 reference or type strains of different species of these genera, mainly provided by the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Utrecht, Netherlands), were also tested.

Morphological study. Morphological features of the isolates were examined on potato dextrose agar (PDA; Pronadisa, Madrid, Spain), oatmeal agar (OA; 30 g filtered oat flakes, 20 g agar, 1 liter distilled water), and water agar with sterilized plant material (small pieces of wood, filter paper, herbaceous leaves) to enhance the formation of ascospores (fruit bodies of the sexual state, or teleomorph) or conidiomata (fruit bodies of the asexual state, or anamorph). Cultures were incubated at room temperature (25°C ± 2°C) for up to 2 months. The isolates were identified using the criteria given by Damm et al. (6), De Hoog et al. (7), Gams and McGinnis (9), Weber (30), and Yaguchi et al. (34). Microscopic features were examined by making direct wet mounts with 85% lactic acid and lactophenol cotton blue, using light microscopy. Photomicrographs were ob-

tained with a Zeiss Axio-Imager M1 light microscope, using phase contrast and Nomarski differential interference.

Sequencing and analysis. Isolates were grown on yeast extract sucrose (YES; yeast extract, 2%; sucrose, 15%; agar, 2%; water, 1 liter) for 3 to 5 days at 25°C ± 2°C, and DNA was extracted using PrepMan Ultra sample preparation reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's protocol. The DNA was quantified by use of the GeneQuantpro calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). The D1/D2 domains of the 28S rDNA were amplified and sequenced with the primer pair NL1 and NL4, following the protocols described by Cano et al. (4). Sequences of clinical isolates were compared with those of type strains, when available, or reference strains, using the GeneDoc (version 2.6) program (17). A total of 84 sequences, including 15 GenBank sequences of species morphologically similar to some of the clinical isolates previously identified, were analyzed (Table 1). A sequence of *Aureobasidium pullulans* was used as the outgroup. Before this analysis, the sequences were aligned with the ClustalX (version 1.81) computer program (29), followed by manual adjustments with a text editor. The phylogenetic analyses were performed with the software program MEGA, version 4.0 (27). The neighbor-joining method and the Kimura two-parameter algorithm were used to obtain the distance tree. Gaps were treated as pair-wise deletions. Support for internal branches was assessed by a search of 1,000 bootstrapped sets of data.

Antifungal susceptibility. We evaluated the *in vitro* activities of amphotericin B (AMB), anidulafungin (ANID), caspofungin (CAS), fluconazole (FLC), 5-fluorocytosine (5FC), itraconazole (ITC), micafungin (MICA), natamycin (NAT), posaconazole (PSC), terbinafine (TRB), and voriconazole (VRC) against 45 fungal isolates (Table 2) (5). Isolates were grown on PDA slants until they were mature. The inoculum turbidity was standardized spectrophotometrically (530 nm) to yield a final inoculum concentration of 0.4 × 10⁴ to 5 × 10⁴ CFU/ml. Tests were incubated at 35°C, with results being read at both 48- and 72-h endpoints. The MIC and minimum effective concentration (MEC) were defined as described by Perdomo et al. (18).

RESULTS

The 68 clinical isolates were morphologically identified, and their identities were molecularly confirmed to the genus level by a BLAST search. Of these, 32 belonged to *Phialemonium*, 20 to *Lecytophora*, 6 to *Cephalotheca*, 1 to *Coniochaeta*, 5 to *Acremonium*, and 4 to *Phaeoacremonium*. Isolates of the last two genera were excluded from the phylogenetic analysis.

TABLE 2. Results of *in vitro* antifungal susceptibility testing read at 48 and 72 h

Species (no. of isolates)	Drug concn ($\mu\text{g/ml}$) read at 48/72 h ^a									
	AMB		ITC		PSC		VRC		TRB	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Phialemonium curvatum</i> (12)	1/2	2/4	0.5/0.5	8/1	0.06/0.25	1/0.5	0.25/0.5	2/2	0.25/1	1/1
<i>Phialemonium obovatum</i> (14)	16/>16	>16/—	1/1	1/2	0.5/1	1/2	0.25/1	1/2	0.06/0.06	0.125/0.125
<i>Lecytophora hoffmannii</i> (8)	0.5/1	0.5/2	0.25/0.5	1/0.5	0.125/0.25	0.5/1	0.5/1	0.5/1	0.06/0.25	0.25/0.5
<i>Lecytophora mutabilis</i> (5)	0.125/0.25	0.125/0.5	0.125/0.5	0.125/0.5	0.125/0.25	0.125/0.5	0.25/1	0.25/1	0.125/0.5	0.125/0.5
<i>Cephalotheca foveolata</i> (6)	8/16	16/>16	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	2/2	0.06/0.25	0.25/0.5

^a —, no reading.

Figure 1 shows the neighbor-joining tree of the D1/D2 domains of 84 sequences, i.e., 59 belonging to the clinical isolates, 10 to type or reference strains, and 15 sequences retrieved from GenBank. The aligned sequence regions consisted of 452 bp. Three main clades (I to III), each supported by a high bootstrap value (bs), were observed in the phylogenetic tree.

Clade I, divided into two subclades, included members of an uncertain higher taxonomic position (*incertae sedis*). In the first subclade (98% bs), 12 clinical isolates morphologically identified to be *P. curvatum* grouped with the type strains of *P. curvatum* (CBS 490.82) and *P. dimorphosporum* (CBS 491.82), which is considered a synonym. These fungi were characterized by smooth or finely floccose, white colonies becoming brown at maturity on OA, short and cylindrical adelophialides, and less commonly, long, tapering discrete phialides. Inconspicuous collarettes could be observed on both types of phialides (Fig. 2A to C). The conidia were hyaline and cylindrical to curved (Fig. 2D). Chlamydo-spores were not observed. Five of these isolates developed sporodochial conidiomata, which are cushion-shaped structures composed of well-differentiated, straight or flexuous, irregularly branched conidiophores, with stiff-haired setae forming a margin frill and with slimy conidia covering the entire upper surface of the conidioma (Fig. 2E). The second subclade (92% bs) included 5 *Phialemonium* sp. 1 clinical isolates morphologically similar to *P. curvatum*; however, on all culture media tested, they produced blackish, spherical, and closed conidiomata which opened irregularly in the apical part, liberating masses of conidia when they were mature. A BLAST search demonstrated a high degree of similarity of these fungi with the ascomycetes *Linocarpon livistonae* (GenBank accession number DQ810206), *Neolinocarpon enshiense* (GenBank accession number DQ810221), and *Neolinocarpon globosicarpum* (GenBank accession number DQ810224).

Clade II (94% bs) encompassed members of the family Coniochaetaceae, including species of *Coniochaeta* and *Lecytophora* and numerous clinical isolates. Eight clinical isolates and the type strain of *L. hoffmannii* (CBS 245.38) formed a well-supported terminal branch (98% bs). The most distinctive morphological features of these *L. hoffmannii* isolates were the production of slimy, orange to salmon-colored colonies on PDA, short adelophialides with cylindrical collarettes (Fig. 2F), and less frequently, discrete phialides with a wide base and a narrower apical part (ventricose phialides). Some collarettes were formed laterally, directly on the vegetative hyphae (Fig. 2G). The conidia were hyaline and broadly ellipsoidal to cylindrical or allantoid (Fig. 2 H). Two clinical isolates (UTHSC

01-20 [sp. 1] and UTHSC 01-1644) were included in a close terminal branch identified as *Lecytophora* sp. 1. In another terminal branch, isolate UTHSC 03-1149 nested with the type strains of *Lecytophora lignicola* (CBS 267.33) and *Lecytophora luteoviridis* (CBS 206.38). This isolate showed 100% identity with the type strain of *L. lignicola* and was also morphologically very similar in producing discrete ventricose phialides with rather long collarettes (Fig. 2I to K) and lacking chlamydo-spores. Although *L. luteoviridis* also showed a close genetic relationship with *L. lignicola*, it differed from *L. lignicola* by developing globose, oblong or pear-shaped, and hyaline or faintly brown chlamydo-spores in young culture. In another terminal branch (98% bs), isolate UTHSC 02-1327 nested with a sequence of the type strain of the recently described ascomycete *Coniochaeta prunicola* (6). The clinical isolate was confirmed to be this species by development of ascomata on water agar with plant material and by development of similar conidial structures, including discrete ampulliform phialides, often constricted at the basal septum, and hyaline, mainly allantoid conidia.

Five clinical isolates were grouped with the type strain of *L. mutabilis* (CBS 157.44) in another terminal branch (95% bs). The most remarkable morphological feature of this group was the production of flat, moist, dark to olivaceous-brown colonies on OA, due to the presence of abundant chlamydo-spores, which are lateral or terminal, ovoidal to ellipsoidal, thick walled, olivaceous-brown, and never in chains (Fig. 2L to O). The basal subclade of clade II was represented by four clinical isolates (UTHSC 07-1957, UTHSC 09-1440, UTHSC 05-2926, and UTHSC 01-1664), plus sequences of *Coniochaeta rhopalochaeta* and *C. subcorticalis*. These clinical isolates, named *Lecytophora* sp. 2 to 4 in the tree, were morphologically heterogeneous, and their characteristics did not fit with those of any of the known *Lecytophora* species. Common morphological features observed among them were the production of dark colonies on OA and terminal or intercalary, pigmented chlamydo-spores forming short chains and the absence of ascomata.

Clade III (99% bs) included members of the family Cephalothecaceae. Clinical isolate UTHSC 03-3661, identified to be *Phialemonium* sp. 2, grouped with *Cephalotheca sulfurea* (93% bs), the type species of the genus *Cephalotheca*; however, ascomata were not produced in any of the culture media tested. All six clinical isolates which grouped with the type strain of *C. foveolata* in another subclade (99% bs) developed the teleomorph, characterized by blackish cleistothecial ascomata with a cephalothecoid wall (Fig. 2P), 8-spored asci, and ascospores

TABLE 2—Continued

Drug concn (µg/ml) read at 48/72 h ^a											
5-FC		FLC		NAT		MICA		ANID		CAS	
MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MEC ₅₀	MEC ₉₀	MEC ₅₀	MEC ₉₀	MEC ₅₀	MEC ₉₀
>64/—	>64/—	8/8	>64/64	4/4	8/8	0.5/1	>8/—	0.5/1	>16/—	2/>8	>16/>8
>64/—	>64/—	8/16	16/32	4/4	4/4	0.03/0.125	0.125/0.125	0.25/0.25	0.25/0.25	0.25/0.5	0.5/0.5
64/>64	>64/—	8/16	8/16	4/4	4/4	4/>8	>8/—	2/>8	>8/—	2/2	4/>8
2/>64	16/>64	8/16	8/16	4/4	4/4	>8/—	>8/—	2/>8	>8/>8	4/>8	4/>8
>64/—	>64/—	8/16	64/32	4/4	4/4	0.25/0.25	0.5/0.5	0.25/0.25	0.5/0.25	1/1	1/1

that were broadly ellipsoidal to obovate in superficial view and reniform in lateral view with a foveolate wall. The anamorph was characterized by flat, moist, white to yellowish white (later becoming brownish) colonies on OA, with abundant adelophialides and less common discrete phialides, both with a wide base and without collarettes (Fig. 2Q). The conidia were cylindrical and hyaline. These isolates showed globose to ellipsoidal, thick-walled, hyaline, terminal, or intercalary chlamydo-spores (Fig. 2R). The third subclade (98% bs) included *P. obovatum* and 14 clinical isolates with the typical morphological features of the mentioned species. They were characterized by moist to slightly floccose and pale ochraceous to greenish colonies on OA. The adelophialides had a wide base, were more common than discrete phialides, and lacked visible collarettes (Fig. 2S). The conidia were hyaline and obovate with a truncate base (Fig. 2T). Oval, thin-walled, hyaline chlamydo-spores were also present (Fig. 2U). Most of these isolates, in old cultures, developed globose and dark structures which were suggestive of immature ascumata, although they never reached maturity (Fig. 2V).

In vitro antifungal susceptibility data varied between the various genera and species (Table 2). As there are no established guidelines for these genera, interpretive comments are based upon achievable serum concentrations using standard dosing regimens and are extrapolated from *Candida* breakpoints. As expected, all isolates displayed high MICs to 5FC and FLC. *Phialemonium* species and *Cephalotheca foveolata* appeared to be resistant to AMB. Most strains exhibited low MICs to PSC, VRC, and TRB, while only *P. obovatum* and *C. foveolata* demonstrated low MECs for the echinocandin agents MICA, ANID, and CAS. ITC data varied by species, and results for NAT, a topical ophthalmic polyene, are at the lower end of the range (2 to 32 µg/ml) typically seen for filamentous fungi (Fungus Testing Laboratory, unpublished data).

DISCUSSION

Some studies have clearly demonstrated the ability of *Phialemonium* and *Lecythophora* species to cause humans infections. However, the scarcity of case reports could be related to the misidentification of clinical isolates due to the morphological similarities of these fungi with other more common genera in human infections, such as *Fusarium* and *Acremonium*. The fact that 59 clinical isolates mainly belonging to *Phialemonium* and *Lecythophora* were received in a reference clinical center over the last 9 years showed that species of both genera are relatively common in clinical samples. However, the most recently published review of *Phialemonium* infections summa-

rized only 20 cases of localized or disseminated infections that have been reported since 1986, of which 5 were caused by *P. obovatum* and 15 by *P. curvatum* (20). The number of clinical cases reporting infections by *Lecythophora* is even lower. Cases are caused by either *L. hoffmannii* or *L. mutabilis* (2, 7, 8, 16, 21, 22, 28). In our study, the above-mentioned two *Phialemonium* species and two *Lecythophora* species were also the predominant species identified. However, it is noteworthy that 6 isolates were identified to be *C. foveolata*, which is a recently described species involved in a case of human infection (25). Although we could not confirm the role of any of these *C. foveolata* isolates as agents of infection, the number found might reflect the possible clinical relevance of this fungus.

Our results confirmed the synonymy of *P. dimorphosporum* with *P. curvatum* (12) and that the two accepted species of *Phialemonium*, *P. curvatum* and *P. obovatum*, are genetically very distant from each other (34). *Phialemonium obovatum*, the type species of the genus, is more closely related to *C. foveolata* of the family Cephalothecaceae, while *P. curvatum* is molecularly related to some species of *Linocarpon* and *Neolinocarpon*, which are *incertae sedis* genera within Sordariomycetes (3).

A relevant feature not originally described in *P. curvatum* was the formation of sporodochial conidiomata, structures that were present in five clinical isolates. Other authors had already reported the presence of these structures (19, 24, 26, 32). Some isolates of *Phialemonium* (*Phialemonium* sp. 1) presented a relatively low level of similarity (97%) with the sequences of the type strain of *P. curvatum*. First, these isolates were identified to be *P. curvatum* due to the presence of adelophialides and the morphology of their conidia. In culture, they developed sporodochial conidiomata similar to those of *P. curvatum*, but a distinctive feature was the production of black, spherical, and closed conidiomata, so far never described in *Phialemonium*. *Phialemonium* sp. 1 was phylogenetically close to some species of the ascomycetous genera *Linocarpon* and *Neolinocarpon*, which have been associated with *Phialophora*-like anamorphs (3, 14). However, further studies are necessary to establish the real relationship between *Phialemonium* and those genera.

Our study showed the association of *Lecythophora* species with *Coniochaeta*, previously demonstrated by others (6, 10, 31). The two species of *Lecythophora* more common in clinical samples, *L. hoffmannii* and *L. mutabilis*, were strongly statistically supported. Although *L. hoffmannii* had been stated to be the anamorph of *C. ligniaria* (6, 7), our study confirmed the

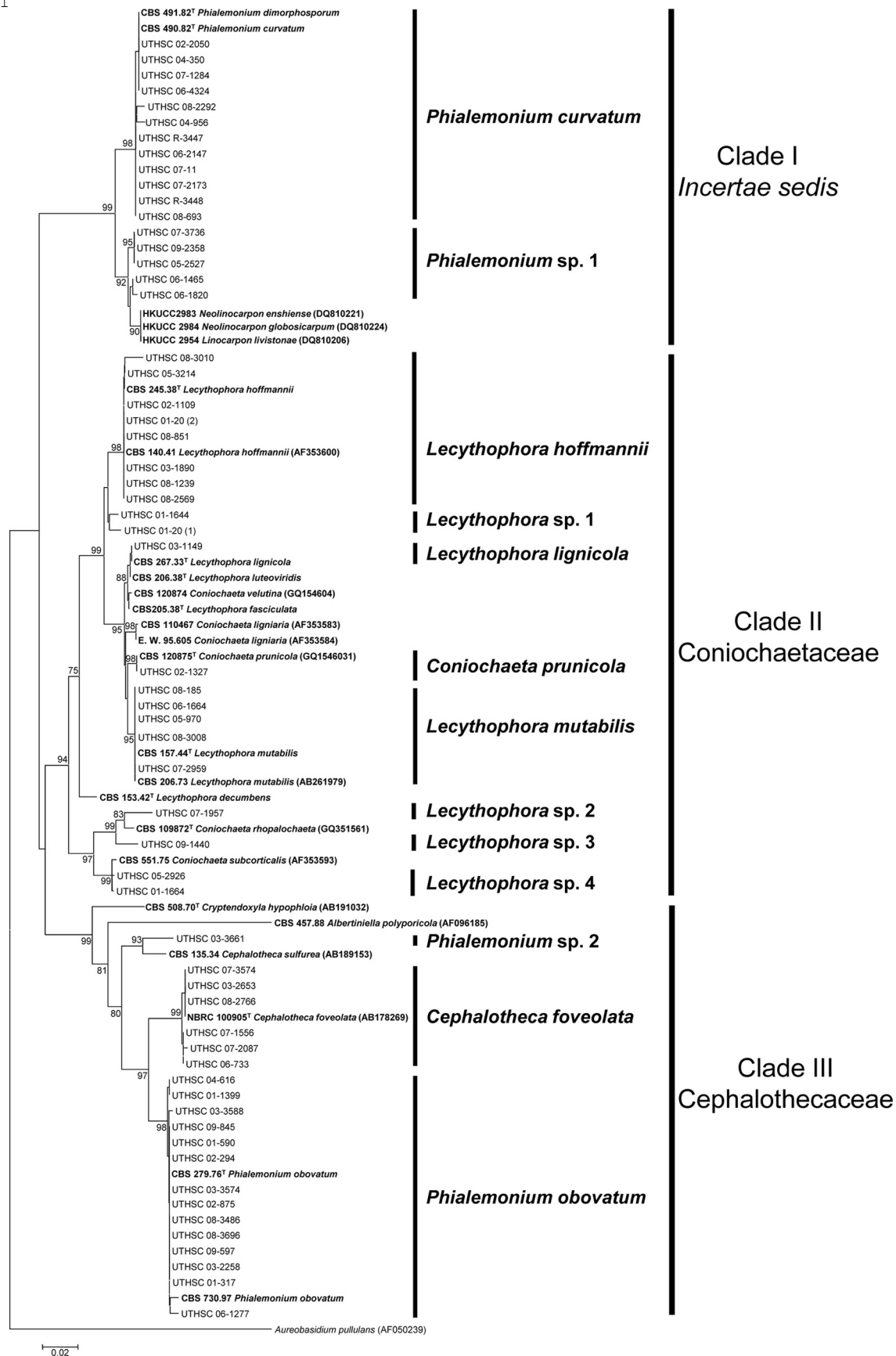


FIG. 1. Neighbor-joining tree among D1/D2 domains of the 28S rDNA sequences of the isolates included in Table 1. Branch lengths are proportional to distance. Sequences not generated in this study and obtained from the GenBank database are indicated in parentheses. Type and reference strains are indicated in boldface.

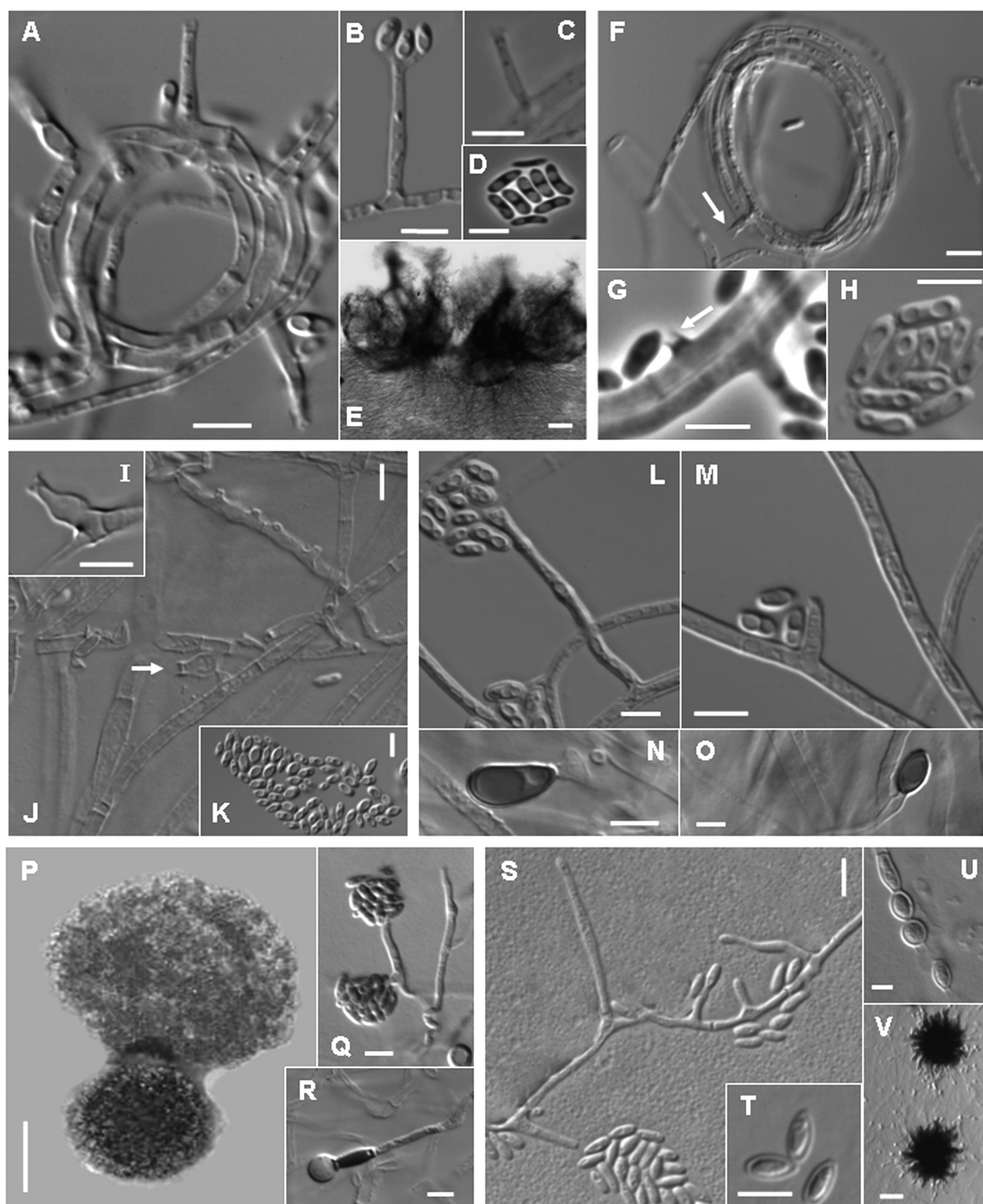


FIG. 2. (A to E) *Phialemonium curvatum* (CBS 490.82^T); (A) adelophialides; (B) conidia; (C) adelophialide with inconspicuous collarette; (D) conidia; (E) sporodochial conidioma. (F to H) *Lecythophora hoffmannii* (CBS 245.38^T); (F) adelophialides with cylindrical collarettes in a hyphal coil; (G) collarette formed directly on the hyphae and conidia; (H) conidia. (I to K) *Lecythophora lignicola* (CBS 267.33^T); (I) ventricose phialide; (J) adelophialide and discrete phialides; (K) conidia. (L to O) *Lecythophora mutabilis* (CBS 157.44^T); (L) phialide; (M) adelophialide; (N and O) chlamydozoospores. (P to R) *Cephalotheca foveolata* (UTHSC 08-2766); (P) ascoma with ascospores; (Q) adelophialide and conidia; (R) chlamydozoospore. (S to V) *Phialemonium obovatum* (CBS 279.76^T); (S) discrete phialides and adelophialides; (T) conidia; (U) chlamydozoospores; (V) immature ascomata. Scale bars, A to D, F to O, and Q to U = 5 μ m; V = 20 μ m; E and P = 100 μ m.

results of Weber et al. (31), who found that these species were different.

In conclusion, our results suggest that infections by *Phialemonium*, *Lecythophora*, and *Cephalotheca* may be underdiagnosed,

since in this study the number of isolates belonging to these genera is considerably higher than that reflected in the literature. In addition, our results confirmed the usefulness of the 28S rDNA gene as a phylogenetic marker for these fungal groups.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Netherlands).

This work was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, grants CGL 2008-04226/BOS and CGL 2009-08698/BOS.

REFERENCES

1. Abliz, P., K. Fukushima, K. Takizawa, and K. Nishimura. 2004. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**:41–49.
2. Ahmad, S., R. J. Johnson, S. Hillier, W. R. Shelton, and M. G. Rinaldi. 1985. Fungal peritonitis caused by *Lecythophora mutabilis*. *J. Clin. Microbiol.* **22**:182–186.
3. Bahl, J. 2006. Molecular evolution of three morphologically similar families in the Xylariomycetidae (Ascomycota, Clypeosphaeriaceae, Hyponectriaceae). Ph.D. thesis. University of Hong Kong, Hong Kong. http://sunzi.lib.hk.hk/hkuto/agreement_form.jsp.
4. Cano, J., J. Guarro, and J. Gené. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2450–2454.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
6. Damm, U., P. H. Fourie, and P. Crous. 2010. *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomonilla* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia* **24**:60–80.
7. De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
8. Drees, M., B. L. Wickes, M. Gupta, and S. Hadley. 2007. *Lecythophora mutabilis* prosthetic valve endocarditis in a diabetic patient. *Med. Mycol.* **45**:463–467.
9. Gams, W., and M. McGinnis. 1983. *Phialemonium*, a new anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia* **75**:977–987.
10. García, D., et al. 2006. Molecular phylogeny of Coniochaetales. *Mycol. Res.* **110**:1271–1289.
11. Gavin, P. J., D. A. Sutton, and B. Z. Katz. 2002. Fatal endocarditis in a neonate caused by the dematiaceous fungus *Phialemonium obovatum*: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2207–2212.
12. Guarro, J., et al. 1999. *Phialemonium* fungemia: two documented nosocomial cases. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2493–2497.
13. Huhndorf, S. M., A. N. Miller, and F. A. Fernandez. 2004. Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia* **96**:368–387.
14. Hyde, K., J. Taylor, and J. Fröhlich. 1998. Fungi from palms. XXXIV. The genus *Neolinocarpon* with five new species and one new combination. *Fungal Diversity* **1**:115–131.
15. King, D., L. Pasarell, D. M. Dixon, M. R. McGinnis, and W. G. Merz. 1993. A phaeohyphomycotic cyst and peritonitis caused by *Phialemonium* species and a reevaluation of its taxonomy. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1804–1810.
16. Marriott, D. J., et al. 1997. *Scytalidium dimidiatum* and *Lecythophora hoffmannii*: unusual causes of fungal infections in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2949–2952.
17. Nicholas, K. B., H. B. Nicholas, Jr., and D. W. I. Deerfield. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet News* **4**:1–4.
18. Perdomo, H., et al. 2010. Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **49**:243–256.
19. Proia, L. A., et al. 2004. *Phialemonium*: an emerging mold pathogen that caused 4 cases of hemodialysis-associated endovascular infection. *Clin. Infect. Dis.* **39**:373–379.
20. Rivero, M., et al. 2009. Infections due to *Phialemonium* species: case report and review. *Med. Mycol.* **47**:766–774.
21. Sakaeyama, S., et al. 2007. *Lecythophora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med. Mycol.* **45**:267–272.
22. Scott, I. U., V. Cruz-Villegas, H. W. Flynn, Jr., and D. Miller. 2004. Delayed-onset, bleb-associated endophthalmitis caused by *Lecythophora mutabilis*. *Am. J. Ophthalmol.* **137**:583–585.
23. Sigler, L. 2003. Miscellaneous opportunistic fungi: *Microascaceae* and other ascomycetes, hyphomycetes, coelomycetes and basidiomycetes, p. 637–676. In D. H. Howard (ed.), *Pathogenic fungi in humans and animals*. Marcel Dekker, New York, NY.
24. Strahilevitz, J., et al. 2005. An outbreak of *Phialemonium* infective endocarditis linked to intracavernous penile injections for the treatment of impotence. *Clin. Infect. Dis.* **40**:781–786.
25. Suh, M. K., et al. 2006. Subcutaneous hyalohyphomycosis due to *Cephalotheca foveolata* in an immunocompetent host. *Br. J. Dermatol.* **154**:1184–1189.
26. Sutton, D. A., et al. 2008. Pulmonary *Phialemonium curvatum* phaeohyphomycosis in a standard poodle dog. *Med. Mycol.* **46**:355–359.
27. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
28. Taniguchi, Y., et al. 2009. Septic shock induced by *Lecythophora mutabilis* in a patient with mitochondrial encephalomyopathy. *J. Med. Microbiol.* **58**:1255–1258.
29. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876–4882.
30. Weber, E. 2002. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex. I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. *Nova Hedwigia* **74**:159–185.
31. Weber, E., C. Görke, and D. Begerow. 2002. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex. II. Molecular studies based on sequences of the large subunit of ribosomal DNA. *Nova Hedwigia* **74**:187–200.
32. Weinberger, M., et al. 2006. Isolated endogenous endophthalmitis due to a sporodochial-forming *Phialemonium curvatum* acquired through intracavernous autoinjections. *Med. Mycol.* **44**:253–259.
33. Wood, C., and B. Russel-Bell. 1983. Characterization of pigmented fungi by melanin staining. *Am. J. Dermatopathol.* **5**:77–81.
34. Yaguchi, T., et al. 2006. A new *Cephalotheca* isolate from Korean patient. *Mycotaxon* **96**:309–322.

4.3.2. Polyphasic study of clinical isolates of the opportunistic fungi *Phialemonium* and *Lecythophora*. Proposal of the new genus *Phialemoniopsis*.

Perdomo H, García D, Gené J, Cano J, Sutton DA, Summerbell R, Guarro J.

Medical Mycology. (En preparación).

Polyphasic study of clinical isolates of the opportunistic fungi *Phialemonium* and *Lecythophora*. Proposal of the new genus *Phialemoniopsis*

Haybrig Perdomo¹, Dania García¹, Josepa Gené¹, Josep Cano¹, Deanna A. Sutton², Richard Summerbell^{3,4} & Josep Guarro^{1*}

¹Mycology Unit, Medical School, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, ²Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA, ³Sporometrics Inc., and ⁴Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

Corresponding author: Josep Guarro, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201-Reus, Tarragona, Spain; phone: +34 977 759359 ; fax: +34 977 759322 ; e-mail: josep.guarro@urv.cat.

Abstract

In previous molecular studies of a wide set of clinical isolates, belonging to the human opportunistic genera *Acremonium*, *Phialemonum* and *Lecytophora*, were investigated and concluded that *Acremonium atrogriseum* was related to *Phialemonium*, *Phialemonium obovatum* and *Phialemonium curvatum* were species genetically very distant, and that different clinical isolates were genetically distinct from the current species of the latter genera. In order to clarify the phylogenetic relationships among these fungi and other related taxa, as well as to describe new species, we perform a polyphasic study based on a detailed morphological study and on the analysis of sequences of four loci: the internal transcribed spacer regions, the D1 and D2 domains of the 28S rRNA, actin and β -tubulin genes. The combination of phenetic and genetic approaches allow us to propose the new genus *Phialemoniopsis* to accommodate the opportunistic fungi *Phialemonium curvatum* and *Sarcopodium oculorum*, and two new species *Phialemoniopsis cornearis* and *Phialemoniopsis pluriloculosa*. The taxonomy of that genus has not been resolved, remaining *insertae sedis* within Sordariomycetes. In addition, the new species *Lecytophora luteo-rubra*, *Lecytophora cateniformis* and *Phialemonium globosum* are described and discussed, and the species *A. atrogriseum* and *Taifanglania inflata* are transferred to the genus *Phialemonium*. According to our results *Lecytophora* and *Phialemonium* are currently monophyletic genera of the families Cephalothecaceae and Coniochaetaceae (Sordariales), respectively. Tables summarizing key morphological features to distinguish the current species of *Lecytophora*, *Phialemonium* and *Phialemoniopsis* are provided.

Key words: *Coniochaeta*, *Lecytophora*, multilocus sequencing, *Phialemoniopsis*, *Phialemonium*, polyphasic study.

Introduction

Phialemonium is an anamorphic genus with species widely distributed and commonly isolated from air, soil, industrial water and sewage (Gams and McGinnis, 1983), but they are also involved in human infections, affecting both immunocompromised and immunocompetent

patients (King *et al.*, 1993; Guarro *et al.*, 1999; De Hoog *et al.*, 2000; Proia *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004; Rivero *et al.*, 2009). *Phialemonium* was described by Gams and McGinnis (1983) to accommodate filamentous fungi with morphological features intermediate between *Acremonium* and *Phialophora*. The species of *Phialemonium* are characterized by moist, flat, never pink colonies and abundant adelophialides (reduced phialides that are not delimited from subtending intercalary hyphal cell by a basal septum), although short discrete phialides without collarette are also present. All the phialides forms unicellular, hyaline conidia aggregated in slimy heads (Gams and McGinnis, 1983). Currently, the genus *Phialemonium* comprises the species *P. obovatum* and *P. curvatum*. *Phialemonium obovatum*, the type species of the genus, is characterized by greenish colonies, discrete phialides often sympodially proliferating and obovate conidia with an apiculate and minutely truncate base (Gams and McGinnis, 1983). *Phialemonium curvatum* is characterized by ochraceous or grayish colonies, not proliferating phialides, and cylindrical to allantoid conidia (Gams and McGinnis, 1983; King *et al.*, 1993; De Hoog *et al.*, 2000). Some authors have described the presence of sporodochium-like conidiomata in *P. curvatum*, character not reported in the original description (Proia *et al.*, 2004, Strahilevitz *et al.*, 2005; Weinberger *et al.*, 2006; Sutton *et al.*, 2008, Perdomo *et al.*, 2011b).

Recently, Yaguchi *et al.* (2006) described the new species *Cephalotheca foveolata* from a patient with a subcutaneous infection, which showed a *Phialemonium*-like anamorph. In the same study, analysis of the LSU rDNA sequences demonstrated a closer relationship between *P. obovatum* and members of the family Cephalothecaceae, being suggested that the anamorphs of *Cephalotheca* and *Albertinella* could belong to *Phialemonium*. However, the placement of *P. curvatum* into Cephalothecaceae was not supported by the sequences analysis. Similar results were found by Perdomo *et al.* (2011b), who demonstrated that the two species currently accepted in *Phialemonium* did not form a monophyletic group. *Phialemonium curvatum* was phylogenetically related to *Linocarpon* and *Neolinocarpon*, two ascomycetous genera which are *incertae sedis* within the Sordariomycetes (Huhndorf and Miller, 2011).

Recent studies have demonstrated that *Acremonium atrogriseum*, characterized by the production of pigmented conidia arranged in chains is phylogenetically related to

Cephalothecaceae (Sordariales) (Perdomo *et al.*, 2011a; Summerbell *et al.*, 2011). This is a rare opportunistic species described as agent of a human systemic infection and repeatedly isolated from different clinical sources (de Hoog *et al.*, 2000, Perdomo *et al.*, 2011a). Other fungi that show some morphological resemblance and genetically related with *Phialemonium* spp. are *Paecilomyces inflatus*, recently transferred to the new genus *Taifanglania*, as *T. inflata* (Liang *et al.*, 2009), and some species of *Sarcopodium* and *Volutella*, such as *S. oculorum* and *V. cinerescens*. The latter two species were described as agents of ocular infections (De Hoog *et al.*, 2000; Guarro *et al.* 2002, Weinberger *et al.* 2006).

Lecythophora spp., reported as anamorphs of *Coniochaeta* (Coniochatales, Sordariomycetes) (Gams and McGinnis, 1983), are morphologically similar to *Phialemonium* too. They develop pink-salmon to dark brown colonies and adelophialides with collarettes, although discrete phialides like those of *Acremonium* may be also present (De Hoog *et al.*, 2000; Weber, 2002). *Lecythophora* is a cosmopolitan genus, comprises six species: *L. lignicola* (type species), *L. decumbens*, *L. fasciculata*, *L. hoffmannii*, *L. luteoviridis*, and *L. mutabilis*. The morphological characters used to differentiate these species are the presence of chlamydo spores in *L. mutabilis* and *L. luteoviridis*, which are ovoidal to ellipsoidal and singly in the former, and globose to oblong or pear-shaped and singly or in short chain in the latter; and the colour of the colonies, which are orange to salmon in *L. hoffmannii*, brown in *L. fasciculata* or olivaceous-brown in *L. decumbens*. *Lecythophora* spp. have been isolated from wood, water, food (Weber, 2002), and also they are known human pathogens, especially *L. hoffmannii* and *L. mutabilis*, which have been isolated from keratitis, subcutaneous abscesses, peritonitis, endocarditis and septic shock (De Hoog *et al.*, 2000; Sakaeyama *et al.*, 2007; Drees *et al.*, 2007; Taniguchi *et al.*, 2009). Besides *Phialemonium*, other genera with morphologically similar species to those of *Lecythophora* are *Cadophora*, *Collophora*, *Hormonema*, *Margarinomyces*, *Phaeoacremonium* or *Phialophora*, but they belong to other ascomycete orders (Seifert *et al.*, 2011).

In a recent molecular study of a wide panel of clinical isolates of *Phialemonium* and *Lecythophora* species, analyzing the D1 and D2 domains of the 28S rRNA gene sequences, some isolates could not be properly identified at species level, being considered as possible

cryptic species (Perdomo *et al.*, 2011b). In order to clarify the phylogenetic relationships among these fungi and other related or morphologically similar taxa, as well as to describe new species, in the present study we performed a multilocus sequence analysis of the internal transcribed spacer regions, the D1 and D2 domains of the 28S rRNA, actin and β -tubulin genes and an accurate morphological characterization of the isolates.

Materials and methods

Isolates and morphology

A total of 24 clinical isolates from the Fungus Testing Laboratory at the University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSC) were included in the present study. Twenty-two were identified in Perdomo *et al.* (2011a, b) as *Acremonium atrogriseum* (n=1), *Cephalotheca foveolata* (n=4), *Phialemonium curvatum* (n=5), *Phialemonium obovatum* (n=4), *Phialemonium* sp. 1 (n=5), *Phialemonium* sp. 2 (n=1) and *Lecythophora* sp. 1 (n=2), and the other two clinical isolates were recently received as *Volutella* sp. (UTHSC 04–7 and UTHSC 09–3589). In addition, type or reference strains of *Phialemonium* and *Lecythophora* spp., and species of other genera morphologically similar, such as *Sarcopodium oculorum*, *S. circinatum*, *Volutella ciliata*, *Cephalotheca sulfurea*, and *Taiifanglania inflata* were also including in the study. Further information of all these isolates is detailed in Table 1.

For the morphological characterization, the isolates were examined on oatmeal agar (OA; 30 g filtered oat flakes, 20 g agar, 1L tap water), potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) and potato carrot agar (PCA; potatoes, 20 g; carrot, 20 g; agar, 20 g; distilled water, 1 L). Water agar with sterilized plant material (small pieces of wood, filter paper and herbaceous leaves) was also used to enhance the formation of ascomata (fruit bodies of the sexual states or teleomorph) or conidiomata (fruit bodies of the asexual states or anamorph). Cultures were incubated at room temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) in the dark, up to six months. Growth rates of the isolates were determined on PDA plates at 15, 25, 30, 35, 37, 40 and 42°C for 14 days in darkness. In descriptions color colony codes in parenthesis refer to Kornerup and Wanscher (1978). The microscopic features were determined by making wet

mounts with lactic acid, which were then examined under a light microscope (Olympus CH-2). Photomicrographs were obtained with a Zeiss AXIO Imager M1 light microscope (Göttingen, Germany) and a Jeol JSM-6400 scanning electron microscope (Tokyo, Japan).

Molecular study

DNA was extracted according to Perdomo *et al.* (2011a). Detailed protocols for the amplification of the internal transcribed spacer region (ITS), the D1-D2 domains of the 28S rRNA gene, actin (ACT) and β -tubulin (TUB) sequences were described in Cano *et al.* (2002), Voigt and Wöstemeyer (2000), and Gilgado *et al.* (2005). PCR products were purified according to the manufacturer's instructions using a commercial kit (Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification, General Electric Healthcare, Buckinghamshire, UK). Sequencing reactions were carried out with the PCR primers using a *Taq* DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Gouda, the Netherlands) according to the manufacturer's recommendations, and the resulting products were analyzed on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). DNA sequences were aligned with the program Clustal X 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) and were optimized visually.

The genetic relationships of the fungi tested in this study were first determined through the analysis of D1-D2 domains sequences. Then, we performed a multilocus sequence analysis of the D1-D2 domains, ITS region, and fragments of the ACT and TUB genes of those clades that considered of interest for propose of this study.

For the D1-D2 analysis, the neighbor-joining (NJ) method was performed using MEGA 4.1 package (Tamura *et al.*, 2007) and the algorithm Kimura 2-parameter was used to obtain the distance tree. Gaps were treated as pair-wise deletion. Support for internal branches was assessed by a search of 1000 bootstrapped sets of data. In addition to the sequences of the clinical isolates and those of type and reference strains generated in this study, several sequences of other related taxa were retrieved from the GenBank for comparison. The tree was constructed using a sequence of *Collophora rubra* (GQ154606) as outgroup.

In the multilocus study, most-parsimonious tree (MPT) analyses of the combined dataset of the loci above mentioned were performed with PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002). One hundred heuristic searches were conducted with random sequence addition and tree bisection reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches and saving all minimal-length trees (MulTrees) on different data sets. The gaps were treated as missing data and support for internal branches was assessed using a heuristic parsimony search of 1000 bootstrapped data sets. The combined data set was tested for incongruence with the partition homogeneity test (PHT) as implemented in PAUP*. Tree length, consistency index (CI), retention index (RI) and the rescaled homoplasy index (HI) values were also calculated. In those analyses *Lecythophora lignicola* (CBS 267.33) or *Phialemonium obovatum* (CBS 279.76) were used as outgroup.

The sequences generated in this study were deposited in the GenBank database under the accession numbers listed in Table 1.

Results

Phylogenetic analyses

Figure 1 shows the phylogenetic tree inferred from the analysis of the D1-D2 sequences of the 24 clinical isolates and of some other fungi morphologically or genetically related. The aligned sequence regions consisted of 469 bp. Four main clades (I to IV), with a high bootstrap support (bs), were observed in the phylogenetic tree. They corresponded to different orders of the Sordariomycetes, i.e. *incertae sedis* (clade I, 100% bs), Coniochaetales (clade II, 85% bs), Hypocreales (clade III, 74% bs) and Sordariales (clade IV, 89% bs). Clade I was integrated by 12 clinical isolates, the type and reference strains of *P. curvatum*, one reference strain of *Volutella cinerescens* (CBS 832.71), the type and a reference strain of *Sarcopodium oculorum* (IHEM 19077 and FMR 7190) and the GenBank sequences of the ascomycetes *Linocarpon livistonae*, *Neolinocarpon globosicarpum*, and *Neolinocarpon enshiense*. Since the type species of the genus *Phialemonium* (*P. obovatum*) was very distant and included in the order Sordariales (clade IV), the clade I may represent an anamorph genus different from

Phialemonium, and also different from *Sarcopodium* or *Volutella* since reference strains of the type species of such genera (*S. circinatum* and *V. ciliata*) were placed in the order Hypocreales. Clade II contained all type and reference strains of the currently accepted species of *Lecythophora*, members of the teleomorph genus *Coniochaeta* and the clinical isolates (UTHSC 01–20 (1) and UTHSC 01–1644) identified in Perdomo *et al.* (2011b) as *Lecythophora* sp. 1. Clade III grouped the reference strains of *Sarcopodium circinatum* and *Volutella ciliata*. Finally, the clade IV included members of the family Cephalothecaceae related to *Phialemonium obovatum*; i.e. type strains and clinical isolates of *Acremonium atrogriseum* and *Cephaloteca foveata*, type strain of *Albertiella polyporicola*, *Cryptendoxyla hypophoia* and *Paecilomyces inflatus*, reference strains of *Taifanglania inflata* and *Cephalotheca sulfurea*, in addition to the clinical isolated (UTHSC 03–3661), related to the later three fungi, and identified in Perdomo *et al.* (2011b) as *Phialemonium* sp. 2.

In order to confirm the phylogenetic relationships shown in the D1-D2 domains tree and determine the boundaries of some of the genera included in this study, we performed separated multilocus analysis of the most representative members of clades I, II and IV (Fig. 1).

Figure 2 shows the phylogenetic tree inferred from the analysis of the sequences of the strains included in the clade I. A total of two MPT were produced from a heuristic search using the combined dataset of 2,135 characters from the four loci tested, using *Lecythophora lignicola* as outgroup. Clustering was similar to that observed in the particular trees of the different genes analyzed (data not shown). Analyses of the combined partitions support the recognition of four well supported terminal clades similar to those previously observed in Fig. 1, each of which representing a different phylogenetic species. The first one (100% bs) was composed by the type and reference strains of *Sarcopodium oculorum* (IHEM 19077^T and FMR 7190) and three additional isolates. The ranges of sequences similarity of the isolates grouped within this clade were 99.3–100% for D1-D2, 99.2–99.7% for ITS, 98.2–100% for ACT, and 99.8–100% for the TUB. The second and the third clades were composed of two clinical isolates each one (100% and 96% bs, respectively). Finally, the last one (100% bs) included the type and reference strains of *P. curvatum* and the strain CBS 832.71 of *Volutella cinerescens*. Sequences

similarities within this clade ranged from 99.4 to 100% for D1-D2, from 99.2 to 100% for ITS, from 99.2 to 100% for ACT, and from 99.5 to 100% for the TUB.

The combined multilocus analysis of clade II included 8 strains of *Lecythophora* spp. and *P. obovatum* as outgroup (Fig. 3). The maximum parsimony analysis of the dataset (2,173 bp) produced one MPT. In the ingroup of that tree, eight terminal branches were shown, each constituted by a single strain. Six corresponded to known species of this genus, and the other two, UTHSC 01-20(1) and UTHSC 01-1644, which were identified as *Lecythophora* sp. 1 in Perdomo *et al.* (2011b), represented two unknown species related to *L. hoffmannii*.

Finally, Fig. 4 shows the result of the multilocus sequence analysis of members of clade IV with *Lecythophora lignicola* as outgroup. The phylogenetic analysis of the data set (2,175 bp) yielded one MPT. Four main highly supported clades (100%) were shown. The first one was composed by two sister clades, in one (100% bs) were included the type strain and different isolates of *P. obovatum*, and the second sister clade (100% bs) include the type strain and four clinical isolates of *C. foveolata*. The second clade grouped the type strains of *Acremonium atrogriseum* and three isolates previously identified as such species, all from clinical origin. The similarities among the sequences of the members of this group ranged from 99.8 to 100% for D1-D2, 98.6 to 100% for ITS, 98.5 to 99.9% for ACT, and 98.8 to 100% for the TUB. The third clade was divided into three terminal branches; the first one grouped a reference strain of *Taifanglania inflata* and the type strain of *Paecilomyces inflatus*. The range sequences similarity was 98.9-100% for all the loci studied, which demonstrated that both species are conspecific. The second branch included only the clinical isolate UTHSC 03-3661, and finally the third branch was constituted by a reference strain of *C. sulfurea*, the type species of the genus *Cephalotheca*.

Morphological study

The morphological study of the 24 clinical isolates and numerous type and reference strains of *Phialemonium*, *Lecythophora* and related taxa, allowed characterizing phenotypically the different clades shown in the trees inferred from the phylogenetic analysis.

The isolates of clade I were morphologically distinguished from the members of the other clades by cylindrical, straight to slightly flexuose, hyaline to brown conidiogenous cell (phialides and adelophialides), both with collarettes, formed directly on undifferentiated hyphae and in several isolates, borne in sporodochium-like or/and pycnidium-like conidiomata. Transitional forms of kinds of conidiomata were also present in some cases. Four morphological groups could be differentiated, which corresponded to the four main phylogenetic groups observed in the multilocus analysis of the Fig. 2. One of them included the three clinical isolates identified as *Phialemonium* sp. 1 (Perdomo *et al.* 2011b) and the type and a reference strains of *Sarcopodium oculorum*, all of them forming sporodochium-like and pycnidium-like conidiomata. The latter structures were characterized by a wall with two types of textura, *intricata* and *epidermoidea*, and by the formation of ellipsoidal to slightly allantoid conidia. Other two morphological groups encompassed two isolates each. One group was represented by the isolates UTHSC 06–1465 and UTHSC 06–1820, which formed pycnidium-like conidiomata with a wall of *textura intricata* and obovoid conidia. The other group included the isolates UTHSC 04–7 y UTHSC 09–3589 and showed a multilocular conidiomata, with wall of *textura epidermoidea* and ellipsoidal conidia. The last morphological group included the isolates morphologically identified as *P. curvatum*; three of them were characterized by the presence of typical sporodochium-like conidiomata (UTHSC 06–4324, UTHSC R–3447 and UTHSC R–3448), structure that was also observed in the cospecific isolate CBS 832.71, previously identified as *Volutella cinerescens*. Since the conjunction of the features showed by the members of clade I are very different from those showed by the type species of *Phialemonium* and these differences were strongly supported by the molecular study, we considered that this clade represented a new genus which is proposed below.

The isolates included in the clade II showed the typical morphological features of *Lecythophora*. However, two of them, UTHSC 01–20 (1) and UTHSC 01–1644, had characteristics that differentiated each of them from the other described species of *Lecythophora*. The former strain developed a diffusible orange pigment and discrete phialides and adelophialides with a swollen base, and the latter produced the formation of darkly

pigmented chlamydospores arranged in chains. Based on these strains we proposed two new species of *Lecythophora*.

All the members of the clade IV developed discrete phialides or adelophialides with cylindrical or slightly swollen basal part and usually without visible collarettes, characters typical of the genus *Phialemonium*, which distinguish them from the other taxa included in this study. We recognized six morphological groups, which corresponded with those groups showed in the respective multilocus analysis (Fig. 4). The isolates of the first group, identified as *P. ovobatum*, developed obovate conidia with a truncate base and oval chlamydospores. The second one, which corresponded to *C. foveolata* isolates, showed cylindrical conidia, globose to ellipsoidal chlamydospores and the characteristic teleomorph. These two first groups showed conidia arranged in slimy heads. The third group, previously identified as *Acremonium atrogriseum*, showed flask-shaped phialides or adelophialides, occasionally with a marked inflated base and slightly pigmented, obovoid conidia with a weakly apiculate base and arranged in slimy heads or chains. A fourth group included the strains of *Taifanglania inflata* and *Paecilomyces inflatus*, which showed phialides with a swollen basal part, tapering into a long neck and citriform conidia. The fifth group integrated by a single clinical isolate (UTHSC 03-3661), formed phialides similar to those previously described, but it developed globose conidia. Finally, the reference strain of *C. sulfurea* (CBS 135.34) developed an anamorph with flask-shaped phialides and ovate conidia. The conidia of the latter three groups showed connectives on both ends, forming long and persistent conidial chains, character not described for *Phialemonium*.

Taxonomy

Phialemoniopsis H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, gen. nov.

Coloniae moderatim crescentes, cum mycelio aereo sparse vell nullo, albae, brunneae vel griseae. Hyphis hyalinae vel brunneis. Conidiophora simplicia vel brevi ramosa, solitaria vel aggregata in synnemata, conidiomata sporochialia vel conidiomata pycnidialia. Cellulae conidiogae enteroblaticae, monopialidicae, terminales, laterales vel intercalares, cum vel

sine septum basale, cum collarettis, hyalina vel brunnea. Conidia unicellularia, ellipsoidea, obovoidea vel allantoida, hyalina, in capitulis mucidis aggregata. Conidiomata sporodochialia superficialia, solitaria, plerumquam cum setae ad margin, hyalina, subhyalina vel atrobrunnea. Conidiomata pycnidialia, superficialia vel semiimmersa, solitaria vel aggregate, unilocularia vel multilocularia, globosa, subglobosa, ellipsoidea, pariete ex textura intricata vel epidermoidea. Chlamydosporae absunt vel adsunt. Teleomorphosis ignota.

Species typical. *Phialemoniopsis ocularis* (Gené & Guarro) H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, comb. nov.

Colonies growing moderately with sparse aerial mycelium or lacking, white to brown or grayish colored. Vegetative hyphae hyaline to brown and smooth- to rough-walled. Sporulation from conidiophores growing solitary on aerial mycelium or grouped to form synnema-like, sporodochium-like or picnidium-like conidiomata growing on the substratum. Conidiophores simple, often reduced to a single conidiogenous cell, or few branched, hyaline or pale brown. Conidiogenous cells enteroblastic, monophialidic, discrete, terminal or lateral, cylindrical to flask-shaped, straight to slightly flexuose, or intercalary with a cylindrical lateral projection (adelophialides), with collarettes, hyaline, subhyaline or brown with age. Conidia 1-celled, ellipsoidal, allantoid to obovoid, and slightly apiculate at the base, hyaline to subhyaline, smooth-walled, aggregated in slimy heads. Sporodochium-like conidiomata superficial, solitary, applanate, pulvinate or cupulate, subhyaline to dark brown. Pycnidium-like conidiomata superficial or semi-immersed, solitary or aggregated, uni- or multilocular, globose, subglobose, ellipsoidal or piriform, surrounded by a thin wall of several layers; wall of textura intricata, epidermoidea or both, with an irregular dehiscence (lacking apical preformed opening or ostiole), often appearing cupulate when mature. Setae usually present, forming a frill at the margin of open conidiomata or interspersed with conidiophores, simple or slightly branched, septate, straight to slight flexuose, hyaline, subhyaline to brown. Chlamydo spores are absent or present. Teleomorph unknown.

Phialemoniopsis cornearis H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, sp. nov.

= *Phialemonium* sp. 1 sensu Perdomo *et al.* (2011b). Fig . 5A–V.

Coloniae in OA ad 25°C post 14 d 30 mm diam, velutinae vel plana griseo fuscae conversus aetate nigra. Hyphis hyalinae vel brunneis. Conidiophora solytaria, plerumquam phialide reducta. Phialides 10–30 x 1–2 µm, cum collarettis, hyalinae vel brunneae. Conidia unicellularia, ellipsoideae, leviter allantoidea, 4–7 x 1–2 µm, guttulata, hyalina, in capitulis mucidis aggregata. Conidiomata sporodochialia solitaria, cupulata vel pulvinata, up to 350 µm diam. Conidiomata pycnidialia superficialia, solitaria, unilocularia, globosa vel subglobosa, 300–650 x 200–450 µm, paries 3–4 µm lata, cum textura intricate, atrobrunneae vel nigra. Cellulae conidiogenae phialidicae, cylindricae vel subcylindricae, 9–25 x 1–1.5 µm, hyalinae, cum collarettis conspicua. Conidia unicellularia, obovoidea vel ellipsoidea, 2–3 x 1–1.5 µm, leviter apiculata basi, hyalina, laevia, in capitulis mucidis aggregata. Chlamydo sporae adsunt, singulae vel breviter catenulatae, globosae, ellipsoidea vel pyriformes, 5–9 x 4–5 µm, brunneae, crassitunicatae. Teleomorphosis ignota.

Colonies on OA at 25°C attained a diameter of 30 mm after 14 days, velvety to flat, with whitish, soft cottony aerial mycelium and olive brown (4F3) submerged hyphae; reverse colourless to dark brown with age. Colonies on PDA at 25°C with diameter of 19 mm after 14 days, radially folded and fasciculate, initially white to brownish grey (4E2), becoming olive brown (4E4), becoming black with age; reverse colourless becoming olive brown. The fungus did not grow at 37°C; the optimal growth was at 25°C. Vegetative hyphae initially hyaline, smooth-walled, becoming brown and verruculose-walled, 2–4 µm wide. Sporulation was from conidiophores growing solitary on the aerial mycelium, or aggregated in sporodochium-like and pycnidium-like conidiomata. Conidiophores from aerial mycelium mostly short, erect, often reduced to a single phialide, or few branched, 10–30 x 1–2 µm. Phialides and adelophialides straight to slightly flexuose, cylindrical, 2–24 x 1–2 µm, with conspicuous collarette, initially hyaline to subhyaline becoming brown, smooth-walled. Conidia 1-celled, ellipsoidal to slight allantoid, 4–7 x 1–2 µm, slightly apiculate at the base, biguttulate, hyaline, smooth-walled, in slimy heads. Sporodochium-like conidiomata superficial, solitary, applanate, cupulate or

pulvinate, up to 350 μm in diam., hyaline to brown, setose. Setae forming a frill at the margin of the conidiomata, or interspersed with the conidiophores, usually unbranched, cylindrical, up to 70 μm long, 1–2 μm wide, hyaline to subhyaline, smooth and slightly thick-walled. Pycnidium-like conidiomata superficial, solitary, unilocular, globose to subglobose, 300–650 x 200–450 μm ; wall 3–4 μm thick, with textura intricata, dark brown to black. These structures open irregularly, often appearing cupulate when mature and surrounded by brown hyphae. Conidiophores associated to conidiomata often irregularly branched, with branches bearing a terminal group of 3–5 phialides. Phialides cylindrical or subcylindrical, 9–25 x 1–1.5 μm , with a barely visible collarette, hyaline, smooth-walled. Conidia 1-celled, obovoid or ellipsoidal, slightly apiculate at the base, 2–3 x 1–1.5 μm , 1-guttulate, smooth-walled, hyaline, pale-yellow in slimy masses. Chlamydo spores were present on undifferentiated hyphae, terminal or lateral, solitary or in short chains, globose, oval to pyriform, 5–9 x 4–5 μm , initially hyaline and thin-walled, becoming brown, thick- and rough-walled.

Material examined. FMR 10701 (Holotype) from corneal fluid, USA. (ex-type culture: UTHSC 06–1820); UTHSC 09–3589 (Table 1).

Etymology. The epithet *cornearis* refers to the origin of the type strains.

P. cornearis is similar to *P. ocularis* and *P. pluriloculosa* in the presence of sporodochium- and pycnidium-like conidiomata and chlamydo spores. However, the pycnidium-like conidioma of *P. cornearis* shows a wall of texture intricata and it usually produces obovoid conidia.

***Phialemoniopsis curvata* (W. Gams & W. B. Cooke) H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, comb. nov.**

Basionym: *Phialemonium curvatum* W. Gams & W. B. Cooke, in Gams & McGinnis (1983).

Colony on OA at 25°C attained a diameter of 45–50 mm after 14 days, smooth or finely floccose, at first white becoming brown to grayish. On PDA at 25°C attained a diameter of 46–48 mm after 14 days, cream coloured with small areas light brown. Vegetative hyphae hyaline to light brown, 1–2 μm wide, smooth- to slightly rough-walled. Sporulation was on

undifferentiated hyphae from the aerial mycelium or from sporodichium-like conidiomata in some isolates (CBS 832.71, UTHSC R-3447, UTHSC R-3448). Adelophialides abundant, as short cylindrical lateral projections, 4–12 x 1–1.5 µm; discrete phialides less common, long, cylindrical, slightly tapering towards the apex, 8–20 x 2–3.5 µm, with barely visible collarettes. Conidia cylindrical or allantoid, 4–6 x 1–2 µm, hyaline, smooth-walled, in slimy heads. Sporodochium-like usually pulvinate, up to 1.5 mm in diam., composed of differentiated, straight or flexuous, irregularly branched conidiophores, with stiff-haired setae forming a margin frill and with slimy conidia covering the entire upper surface of the conidioma. Conidia hyaline, ellipsoidal to ovoidal, smooth-walled, 1–2 x 0.5–1 µm. Chlamydo spores absent.

Material examined. CBS 490.82^T, CBS 491.82, CBS 832.71, UTHSC 04-956, UTHSC 06-4324, UTHSC 08-2292, UTHSC R-3447, UTHSC R-3448 (Table 1).

Phialemoniopsis curvata is mainly distinguished from the other species of the genus by the absence of pycnidium-like conidiomata and of chlamydo spores.

Phialemoniopsis ocularis (Gené & Guarro) H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, comb. nov. Fig. 6A–L.

Basionym: *Sarcopodium oculorum* Gené & Guarro, in Guarro *et al.* (2002).

Colonies on OA at 25°C attained a diameter of 47-48 mm after 14 days, granulose, smooth toward the periphery, with whitish, soft cottony aerial mycelium and brownish gray submerged hyphae. On PDA at 25°C attained a diameter of 39-40 mm after 14 days, cream-colored to brownish gray, radially folded and granulose due to the abundant production of conidiomata. The fungus grew slowly at 37°C (9-14 mm in diam after 14 days) and did not grow at 40°C. Sporulation was from conidiophores growing solitary on the aerial mycelium, or from sporodochium-like and pycnidium-like conidiomata. Phialides and adelophialides on aerial mycelium were straight to slightly flexuose, cylindrical, 3–19 (–36) x 1–2 µm, with collarettes, initially hyaline to subhyaline becoming brown. Conidia ellipsoidal to slightly allantoid, 3–5 x 1–1.5 µm, slightly appiculate at the base, biguttulate, hyaline, smooth-walled, arranged in slimy heads. Sporodochium-like conidiomata were superficial, applanate to cupulate or pulvinate, up

to 400 μm in diam, with setae forming a frill at the margin of the sporodochium and interspersed with the conidiophores. Pycnidium-like conidiomata superficial, solitary, unilocular, globose to subglobose, 300–500 x 120 x 600 μm , with a wall dark brown to black, 6–7 μm thick, with two types of textura, intricata and epidermoidea. These structures open by irregular rupture, often appearing cup-shape when mature and surrounded by brown hyphae. Conidiophores lining the inner conidiomatal cavity, hyaline, straight, simple or irregularly branched, bearing phialides. Phialides cylindrical, slightly swollen basal part and slightly tapering towards the tip, 5–8 x 1–1.5 μm , hyaline. Conidia 1-celled, ellipsoidal to lightly allantoid, 2–3 x 1–1.5 μm , with a slightly apiculate base, 1-gutulate, hyaline, smooth-walled. Chlamyospores present, intercalary, solitary or chain, globose to pyriform, 5–9 x 3–6 μm , initially hyaline becoming brown, thick- and rough walled.

Material examined. IHEM 19077, FMR 7190, UTHSC 05–2527, UTHSC 07–3736, UTHSC 09–2358 (Table 1).

A detailed description of this species was reported by Guarro *et al.* (2002). However, pycnidium-like conidiomata were not described in the protologue. Therefore, in *P. ocularis*, as in *P. cornearis* and *P. pluriloculosa*, the sporulation is associated to conidiophores from the aerial mycelium and from sporodochium- and pycnidium-like conidiomata. The main distinctive feature of *P. ocularis* is that the pycnidia-like conidiomata have two types of wall, of textura intricata and epidermoidea, and the conidia from such structures are ellipsoidal to lightly allantoid. In addition, it grows at 37°C.

Phialemoniopsis pluriloculosa H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, sp. nov. Fig. 7A–L.

Phialemoniopsis cornearis similis, cellulae conidiogenae monophialidicae cum collarettis, 6–20 x 1–2 μm . Conidia ellipsoideae vel cylindricae, leviter curva, 3–5 x 1–2.5 μm , guttulata, hyalina, in capitulis mucidis aggregata. Conidiomata pycnidialia, solitaria vel group, superficialia vel semi-immersa, multilocularia, globosa vel subglobosa, 150–450 x 150–350 μm , textura epidermoidea, atrobrunneae vel nigra. Cellulae conidiogenae phialidicae, cylindricae vel

sub cylindrae, 6–12 x 1–1.5 μm , hyalinae. Conidia unicellularia, ellipsoideae, leviter curva, 2–3 x 1–1.5 μm , leviter apiculata ad basi, hyalina. Chlamydosporae adsunt, subglobosae, ellisoidea vel pyriformes, 5–9 x 4–6 μm , hyalinae vel brunneae, crassitunicatae. Teleomorphosis ignota.

Colonies on OA 25°C attained a diameter of 54–55 mm after 14 days, velvety and yellowish white (4A2), but they soon become olive brown (4E4) to black; reverse uncoloured to black with age. On PDA at 25°C the colonies attained a diameter of 43 mm in after 14 days, mucous, radially folded, yellowish white (4A2); reverse pale yellow (4A3). The fungus did not grow at 37°C and the optimal colony growth was at 25 °C. Sporulation was from conidiophores growing on the aerial mycelium, and from sporodochium- and pycnidium-like conidiomata. Vegetative hyphae initially hyaline, smooth-walled, that turning to brown, verruculose-walled, 1–2 μm wide. Phialides and adelophialides from the aerial mycelium straight to slightly flexuose, cylindrical, 6–20 x 1–2 μm , with short collarettes, initially hyaline to subhyaline, but turning brown, smooth-walled. Conidia 1-celled, ellipsoidal to cylindrical, some slight curved, 3–5 x 1–2.5 μm , with slightly apiculate base, biguttulate, hyaline, smooth-walled, in slimy heads. Sporodochium-like conidiomata superficial, solitary, pulvinate, up to 450 μm in diam, subhyaline to brown. Setae absent. Pycnidium-like conidiomata superficial or semi-immersed, solitary or confluent, multilocular, globose to subglobose, 150–450 x 150–350 μm , wall 10–15 μm thick, with textura epidermoidea, dark brown to black, opening irregularly, often appearing cupulate with brown marginal hyphae when mature. Conidiophores lining the inner conidiomatal cavity, straight, compact, simple or few branched, hyaline. Phialides cylindrical to subcylindrical, slightly tapering towards the tip, hyaline, 6–12 x 1–1.5 μm . Conidia 1-celled, ellipsoidal, 2–3 x 1–1.5 μm , with a slightly apiculate base, 1-2- guttulate, smooth-walled, hyaline, pale-yellow colored when form slimy masses (4A3). Chlamydo spores present, unicellular, intercalary, usually in chains, subglobose, oval to pyriform, 5–9 x 4–6 μm , hyaline becoming brown, thick- and rough walled.

Material examined. FMR 11070 (Holotype) from toe nail, USA (ex-type culture UTHSC 04–7); UTHSC 09–3589 (Table 1).

Etymology. From the Latin *pluriloculosa*, referring to the multilocular structure.

Phialemoniopsis pluriloculosa differs from the other species of the genus by the presence of pycnidium-like conidiomata multilocular with textura epidermoidea.

The key morphological features to distinguishing the *Phialemoniopsis* species are summarized in Table 2.

Emended description of the genus *Phialemonium* W. Gams & McGinnis

Colonies spreading, flat, velvety, plane, or slightly floccose, white, yellow-gray, ochraceous or dark olivaceous-grey. Vegetative hyphae septate, hyaline, subhyaline to pale olive-brown, 0.5–3 μm wide. Conidiophores short or undifferentiated, simple or occasionally branched. Phialides discrete, often inflated at base, with or without a barely visible collarettes; short cylindrical adelophialides may be present. Conidia hyaline or pigmented, 1-celled, cylindrical, obovate, globose to citriform, mostly smooth-walled or inconspicuously rugose, arranged in slimy heads or in long chains, with or without connectives at both ends. Chlamydospores present or absent. Teleomorphs: *Albertinella* and *Cephalotheca* (Cephalothecaceae, Sordariales).

Type species: *Phialemonium obovatum*.

***Phialemonium atrogriseum* (Panas.) D. García, H. Perdomo, Gené, Cano & Guarro, comb. nov.**
Fig. 8A–G.

Basionym: *Phaeoscopulariopsis atrogrisea* Panas., Mycologia 56: 60, 1964.

\equiv *Acremonium atrogriseum* (Panas.) W. Gams, Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Stuttgart) 89, 1971.

Colony on OA at 25°C attaining diameters of 18–25 mm. after 14 days. They are powdery, at first pale ochraceous becoming olive-brown to brownish-black at maturity, Conidiophores not much differentiated from the vegetative hyphae, often reduced to single lateral phialides, or consisting of whorls of 2–4 phialides on top of lateral supporting cells. Phialides flask-shaped with more or less inflated basal part and a long, tapering neck bearing a

barely visible collarete, 8–20 x 2–3.5 μm (basal width), mostly subhyaline and smooth-walled, but in some isolates they are slightly rough-walled and pale yellowish-brown. Adelophialides may be also present, 7–11 x 1.5–2 μm . Conidia 1-celled, ellipsoidal or obovoid, 3–5 x 2–3 μm , with an apiculate and minutely truncate base, subhyaline to grayish brown, smooth-walled, in long chains. Chlamydo spores absent.

Material examined. CBS 604.67^T, CBS 774.97, CBS 306.85, UTHSC 03–986 (Table 1).

Phialemonium atrogriseum differs from other species of *Phialemonium* forming conidial chains by its slightly pigmented conidia without connectives. Although, *P. atrogriseum* forms similar conidia to those of *P. obovatum*, in the latter they are arranged in slimy heads and has chlamydo spores (Fig. 8H, J), which are absent in *P. atrogriseum*.

Phialemonium globosum D. García, H. Perdomo, Gené, Cano & Guarro, sp. nov.

= *Phialemonium* sp. 2 sensu Perdomo et al. (2011b). Fig. 8O–S.

Coloniae ad 25°C post 14 d 28–30 mm diam, planus, velutinae, albae. Conidiophora inconspicua, plerumque in cellula conidiogena reducta. Phialides simplices, laterales, terminales vel laterales, raro sympodialiter proliferantes, cylindricae, interdum deorsum vel prope médium modice inflatae, cum collari indistincto, (7–) 9–24 (–36) μm longae, 1.5–3 μm latae ad basim, 1–1.5 μm latae at apicem. Conidia unicellularia, globosa vel subglobosa, 4–6 x 3.5–5 μm , hyalina, levia, in catenis longis persistentibus, utrinque connectivo terminata. Chlamydo spora absunt. Teleomorphosis ignota.

Colonies on PDA and OA at 25°C attained a diameter of 28–30 mm after 14 days, flat, velvety to powdery, sometimes fasciculate in the centre, initially white, becoming pale white (4A1). The fungus did not grow at 40°C and the optimal colony growth was at 25°C. Conidiophores not much differentiated from the vegetative hyphae, often reduced to single lateral phialides from the aerial mycelium, or consisting of a lateral supporting hyphal cell with 1–2 phialides on top. Phialides terminal or lateral, sometimes sympodially proliferating from the supporting cell without basal septa, cylindrical or slightly swollen basal part, sometimes slightly

constricted at midpoint, and a long tapering neck, (7–) 9–24 (–36) x 1.5–3 μm near the base, 1–1.5 μm wide at apex, with inconspicuous collarette, hyaline, smooth-walled. Adelophialides scarce, cylindrical, up to 15 x 3 μm wide at the base. Conidia 1-celled, globose to subglobose, 4–6 x 3.5–5 μm , with distinct connectives on both ends, hyaline, smooth-walled, forming persistent chains. Chamydospores and ascomata absent.

Material examined. FMR 10390, from sinus, USA (Holotype), ex-type culture UTHSC 03–3661 (Table 1).

Etymology. The epithet *globosum* refers to the shape of the conidia.

Phialemonium globosum is morphologically similar to the anamorph of *C. sulfurea* and *Phialemonium inflatum* (see below), since all they have phialides with more or less swollen basal part and forming long conidial chains with connectives at both ends. However, these three fungi can be differentiated mainly by the conidial morphology; *P. globosum* has globose conidia, up to 5 μm diam, the anamorph of *C. sulfurea* has ovate conidia, up to 3 μm diam, and *P. inflatum* has citriform conidia and also up to 3 μm diam.

Phialemonium inflatum (Burnside) D. García, H. Perdomo, Gené, Cano & Guarro, comb. nov.
Fig. 8T–X.

Basionym: *Myceliophthora inflata* Burnside, Pap. Mich. Acad. Sci. 8: 82, 1928.

≡ *Paecilomyces inflatus* (Burnside) Carmichael, Can. J. Bot. 40: 1148, 1962.

≡ *Taifanglania inflata* (Burnside) Z.Q. Liang, Y.F. Han & H.L. Chu, Fungal Diversity 34: 72, 2009.

Colony on OA at 25°C attaining diameter of 30 mm after 14 days, velvety to granular, white (4A1) to pale yellow (4A3). Conidiophores not much differentiated, mostly consisting of single phialides borne irregularly on aerial hyphae or occasionally two or three phialides borne on top of a short branch. Phialides lateral or terminal, flask-shaped, with a swollen basal part and tapering abruptly into a long neck, 7–15 (–19) x (1.5–) 2–3 μm , hyaline, smooth-walled. Conidia 1-celled, citriform, 4–5 x 2 (–3) μm , with distinct connectives at both ends, hyaline,

smooth- to slightly rough-walled, and arranged in chains. Adelophialides and chlamydozoospores absent. Ascomata not observed.

Material examined. CBS 259.39^T and NBRC 31965 (Table 1).

Key morphological features, based on OA cultures, useful for distinguishing the *Phialemonium* species included in the present study are summarized in the Table 3.

Lecythophora cateniformis H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, sp. nov.

= *Lecythophora* sp. 1 sensu Perdomo et al. (2011b). Fig 9H–P.

Coloniae in OA ad 25 °C post 14 d 41 mm diam, moderatim crescentes, velutinae, brunneo-griseis ad centrum, alba ad margines; reversum brunneo-griseis. Hyphae vegetativae hyalinae, leves, septatis 1–2 µm lata. Adelophialides copiosae, cum collarettis, 1.5-3 µm longa. Conidia obovoidea vel ellipsoidea, 3–4 (–6) x 2–3 (–4) µm, 1-guttulata, hyalina, aggregata in capitulis mucidis. Chlamydozoosporae solitaria vel catenis brevis, subglobosa, ellipsoidea vel pyriformia, 4–7 (–9) x 4–5 (–6) µm, pallide brunnea ad brunnea, laeves. Teleomorphosis ignota.

Colonies on OA at 25°C attained a diameter of 41 mm after 14 days, velvety to not folded, brownish grey at the centre and white at the periphery; reverse brownish grey (8F2). On PDA at 25°C, the colonies attained a diameter of 35 mm after 14 days, velvety to flat, moist, orange-white (6A2); reverse pale yellow (4A3). The optimal colony growth was at 25°C. The fungus did not grow at 40°C. Vegetative hyphae 1–2 µm wide, hyaline or subhyaline, smooth-walled. Adelophialides predominant, consisting of lateral collarettes, up to 1.5 µm long, growing directly on the undifferentiated hyphae, or as cylindrical lateral projections, up to 3 µm long. Conidia 1-celled, obovoidal to ellipsoidal, 3–4 (–6) x 2–3 (–4) µm, with slightly protruding and truncate base, 1-guttulate, hyaline, smooth-walled, aggregated in heads. Chlamydozoospores solitary or in short chains, subglobose, oval to pyriform, 4–7(–9) x 4–5(–6) µm, pale brown to brown, smooth and slightly thick-walled. Teleomorph was absent.

Material examined. FMR 10743, from canine bone marrow aspirate, USA. (Holotype), ex-type cultures UTHSC 01–1644 (Table 1).

Etymology. The epithet *cateniformis* refers to the chains of chlamydozoospores.

Lecythophora cateniformis is similar to *L. luteoviridis*, but the latter species produces hyaline or faintly brown chlamydospores and its conidia are ellipsoidal to cylindrical.

Lecythophora luteo-rubra H. Perdomo, D. García, Gené, Cano & Guarro, sp. nov.

= *Lecythophora* sp. 1 sensu Perdomo et al. (2011b). Fig 9A–G.

Coloniae in OA ad 25 °C post 14 d 32 mm diam, moderatim crescentes, plana vel floccosae, aurantiaca. Pigmentis aurantiaca vel brunneo red in culturis formantis. Hyphae vegetativae septatis, hyalinus, leves, 2–4 µm lata. Phialides discretas copiosas, terminales et laterals, cylindricae, inflatae ad basis vel ampulliformes, 5–10 x 1–3 µm, cum collarettis. Adelophialides parvas. Conidia ellipsoideae vel cylindrica, 3–6 (–7) x 1–2 µm, hyalina, guttulata, in capitulis mucidis aggregata. Chlamydosporae absunt. Teleomorphosis ignota.

Colonies on OA at 25°C attained a diameter of 32 mm after 14 days, flat to light fasciculate, orange (6B8); reverse orange (6A7). Colonies on PDA at 25°C attained a diameter of 25 mm after 14 days, downy, not folded, orange (6B8); reverse orange (6B7). On both media a diffusible pigment orange-red is produced, that becomes brownish-red (10D8) on OA, but it is absent in cultures at 30 °C. Optimal colony growth was at 30 °C. The fungus did not grow at 40°C and. Vegetative hyphae hyaline, 2–4 µm wide. Phialides often present, terminal or lateral, cylindrical or with a broader basal part tapering to the tip or ampulliform, 5–10 x 1–3 µm, with distinct cylindrical collarettes, hyaline, smooth-walled, Adelophialides less abundant, some reduced to lateral collarettes, 1–1.5 x 1 µm, formed directly on undifferentiated, hyphae. Conidia 1-celled, ellipsoidal or cylindrical, slightly apiculate at the base, 3–6 (–7) x 1–2 µm, biguttulate, hyaline, smooth-walled, aggregated in heads. Chlamydospores absent. Teleomorph not observed.

Material examined. FMR 10721, from leg wound, USA. (Holotype), ex-type cultures UTHSC 01–20 (1) (Table 1).

Etymology. The epithet *luteo-rubra* refers to the orange-red color of the diffusible pigment.

Lecythophora luteo-rubra shared some morphological similarity with *L. hoffmannii* and the anamorph of *C. lignaria*. However, *L. hoffmannii* does not produce diffusible pigment, and its conidia are smaller and often somewhat curved. The anamorph of *Coniochaeta lignaria* does not produce ampulliform phialides and conidia are often curved. In addition, teleomorph was not observed in the novel species.

Key morphological features useful to distinguish current *Lecythophora* species are summarized in the Table 4.

Discussion

The genus *Phialemonium* was proposed by Gams and McGinnis (1983) to accommodate those species with morphological features intermediate between *Acremonium* and *Phialophora*. Subsequently, Yaguchi *et al.* (2006) and Perdomo *et al.* (2011b) demonstrated that that was polyphyletic, and that its two species, *P. obovatum* and *P. curvatum*, should belong to different genera. Based on combined morphological and new molecular data, this report describes the new anamorphic genus *Phialemoniopsis*, to accommodate *P. curvatum*. Apart from that species, this new genus includes other three members, i. e. *P. cornearis*, *P. pluriloculosa*, proposed here as new, and *P. ocularis*, previously accommodated in *Sarcopodium*. *Phialemoniopsis* can be distinguished from *Phialemonium* by having phialides and adelophialides with collarettes and by the presence of sporodochia-like or pycnidia-like conidiomata, which are absent in *Phialemonium*.

Other anamorphic genera which develop conidiomata similar to those of *Phialemoniopsis* are *Chaetomella* and *Cornucopiella*. It is worth mentioning the these two genera are traditionally placed among coelomycetes. *Chaetomella* shows pycnidial conidiomata oblong, elongate or reniform, rarely globose and produces conidia mainly fusiform or falcate. In addition, molecular data placed the members of *Chaetomella* within the Leotiomycetes (Rossman *et al.*, 2004). The conidiomata of *Cornucopiella* are cylindrical, sessile and non setose and (Sutton, 1980; Seifert, 1985). The taxonomical placement of *Cornucopiella* is still uncertain among ascomycetes. Other coelomycetes clinically relevant than may have some

morphological similarity with *Phialemoniopsis Colletotrichum* and *Phoma*. However, *Colletotrichum* shows acervular conidiomata and its conidia are considerably larger, cylindrical or falcate. The presence in *Phialemoniopsis* of numerous dark pycnidium-like conidiomata producing small, hyaline and aseptate conidia can cause some confusion with the typical conidiomata of *Phoma*, but the latter always show an ostiole and phylogenetically are placed in different orders (Aveskamp *et al.*, 2008; Aveskamp *et al.*, 2009; Gruyter *et al.*, 2009; Gruyter *et al.*, 2010).

Unlike *Phialemoniopsis* that produces different type of conidiomata, *Sarcopodium* and *Volutella*, other hyphomycetous genera morphologically similar, produce only sporodochia conidiomata, which are brown, pinkish or purple, with brown setae in *Sarcopodium* (Sutton, 1981; Domsch *et al.* 2007), and white to pale coloured with hyaline setae around margin in *Volutella* (Maud and Duke, 1928; Gräfenhan *et al.*, 2011). *Collophora (incertae sedis, Leotiomyces)* has also some morphologically resembles with *Phialemonium*, however, it produces white, cream or reddish colonies, and only pycnidia-like conidiomata with textura epidermoidea and chlamydospores are absent (Damm *et al.*, 2010). In *Phaeomoniella (Herpotrichiellaceae, Chaetothyriales)* the conidiomata are pycnidial and their walls are of textura angularis (Crous and Gams, 2000).

In our molecular study, *Phialemoniopsis* was phylogenetically close to some species of the ascomycetous genera *Linocarpon* and *Neolinocarpon (L. livistonae, N. globosicarpum, and N. enshiense)*. However, recently Huhndorf and Miller (2011) demonstrated that these genera related to *Sordariomycetidae*, are clearly polyphyletic, the species related with *Phialemoniopsis* being not associated to any known family. We did not observe teleomorph in any of the *Phialemoniopsis* isolates tested in our study. However, it was been described a *Phialophora-like* anamorph in *Linocarpon*, showing phialides with collarettes similar to those present in *Phialemoniopsis* (Hyde *et al.*, 1998).

The isolate CBS 832.71 deposited as *Volutella cinerescens*, was molecularly and morphologically related to *Phialemonium curvatum* by Proia *et al.* (2004), based on similar morphology and the phylogenetic relationship inferred from ITS sequences. We included this

isolate in our polyphasic study and concluded that belongs to a *Phialemoniopsis curvata*. Moreover, we observed that some isolates of *P. curvata*, jointly with the type and reference strains of this species, not formed sporodochial conidiomata in any of the media tested in this study. We presume that those isolates have degenerated, thereby losing its ability to produce this structures.

Sarcopodium oculorum was described by Guarro *et al.* (2002) from a corneal ulcer in a human patient. This isolate was initially identified as *Phoma* sp., but the development of its peculiar sporodochial conidiomata allowed its identification as a new species of *Sarcopodium*. However, in the present study we observed apart from those conidiomata, others similar to pycnidia. The presence of both type of conidiomata suggests the inclusion of that fungus in *Phialemoniopsis* which was confirmed by the sequences analysis.

Moreover, our study enlarged the circumscription of the genus *Phialemonium*. It revealed a close phylogenetic and morphological relationship among the species of *Phialemonium obovatum*, *Taiflanglania inflata*, *Acremonium atrogriseum* and the isolate UTHSC 03-3661. Liang *et al.* (2009), erected the genus *Taiflanglania* to accommodate some species of *Paecilomyces*, including *Paecilomyces inflatus*. We have studied the type strains of both species and we have concluded that they indeed are conspecific but that their morphological characteristics match with those of *Phialemonium*.

In our study, we have demonstrated that *T. inflata* is closely related with *C. sulfurea* and the isolates UTHSC 03-3661; morphologically, all of them develop discrete phialides with distinguished swollen base, usually lacking collarettes similar to those of *P. obovatum* and anamorphs of *C. sulfurea* and *C. foveolata*, however, they differing from the latter three species by to develop of conidia connected on both ends (Chester, 1935).

Other taxa included in *Phialemonium* are *Acremonium atrogriseum*, which have been studied by Summerbell *et al.* (2011) based on LSU and SSU sequence analysis and they demonstrated that *A. atrogriseum* belongs to the Cephalothecaceae, morphological and molecularly related with *P. obovatum*. All those evidences support the inclusion of this species to *Phialemonium*.

Given that the description of the genus *Phialemonium* was redefining in this study, the comparisons with others similar genera are required, such as *Sagenomella* (Trichocomaceae, Eurotiales) and *Phialosimplex* (Trichocomaceae, Eurotiales), however, they can be distinguished by develops of cylindrical to centrally swollen phialides (Sigler *et al.*, 2010), which are absent in those genera. Other genus similar to *Phialemonium* is *Taifanglania* (Chaetomiaceae, Sordariales), which are characterized by has thermotolerant species with phialides mainly arising directly on vegetative hyphae and developed conidia in chains, while *Phialemonium* has only two thermotolerant species: *P. obovatum* and *P. atrogriseum*, the first one developed conidia in slimy heads and the second one has phialides with collarets. Others genera could be morphologically similar to *Phialemonium* are *Monocillium*, *Septofusidium*, and *Thysanophora*, however they are phylogenetically were distant. *Monocillium* spp. are now placed in the family Niessliaceae (Castlebury *et al.*, 2008), *Septofusidium* with Nectriaceae (Luangsa-ard *et al.*, 2004) of the Hypocreales, while *Thysanophora* belong to Eurotiomycetidae, Trichocomaceae, Eurotiales (Iwamoto *et al.*, 2002).

Finally, the other groups of fungi included in this study were *Lecythophora* spp., which are occasional agents of several human and animal infections. The six accepted species of *Lecythophora*, only two *L. hoffmannii* and *L. mutabilis* had been involved in clinical. The isolates UTHSC 01–20 (1) and UTHSC 01–1644 are described herein as the new species *L. luteo-rubra* and *L. cateniformis*, respectively. Although, those new species were isolated from clinical samples we could not confirm the role of any of those as agents of infection. However, it is important to consider for future reports.

The new genus proposed here, *Phialemoniopsis*, may also have potential to cause infection, while this genus comprising some species that have been known to cause infection in humans such as: *P. ocularis* and *P. curvata*. Although the new species *P. cornearis* and *P. pluriloculosa* have been isolated from clinical sample, we do not have enough information to demonstrate the true role of these fungi as a causal agent of disease.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología grants CGL 2008-04226/BOS and CGL 2009-08698/BOS. We thank Catalina Nuñez for technical assistance.

REFERENCE

1. Aveskamp MM, De Gruyter J, Crous PW. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity* 2008; **31**: 1–18.
2. Aveskamp MM, Verkley GJM, De Gruyter J, Murace MA, Perelló A, Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Crous PW. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 2009; **101**: 363–382.
3. Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycol Res* 2004; **108**: 864–872.
4. Cano J, Sagués M, Barrio E, Vidal P, Castañeda RF, Gené J, Guarro J. Molecular taxonomy of *Aphanoascus* and description of two new species from soil. *Stud Mycol* 2002; **47**: 153–164.
5. Chesters CGC. Studies on British Pyrenomycetes. The life histories of three species of *Cephalotheca* Fuck. *Trans Br mycol* 1935; **19**: 261–279.
6. Crous PW, Gams W. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of *Petri* grapevine decline and esca. *Phytopathol Mediterr* 2000; **39**: 112–118.
7. Damm U, Fourie PH, Crous PW. *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus trees*. *Persoonia* 2010; **24**: 60–80.
8. De Gruyter J, Aveskamp MM, Woudenberg JHC, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycol Res* 2009; **113**: 508–519.

9. De Gruyter J, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia* 2010; **102**: 1066–1081.
10. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands 2000.
11. Domsch KH, Gams W, Anderson T. *Compendium of soil fungi*, 2nd ed. IHW-Verlag, Eching, Germany 2007.
12. Drees M, Wickes BL, Gupta M, Hadley S. *Lecytophora mutabilis* prosthetic valve endocarditis in a diabetic patient. *Med Mycol* 2007; **45**: 463–467.
13. Gams W, McGinnis M. *Phialemonium*, a new anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia* 1983; **75**: 977–987.
14. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4930–4942.
15. Gräfenhan T, Schroers H-J, Nirenberg HI, Seifert KA. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Stud Mycol* 2011; **68**: 79–13.
16. Guarro J, Höfling-Lima A, Gené J, De Freitas D, Godoy P, Zorat-Yu M, Zaror L, Fischman O. Corneal ulcer caused by the new fungal species *Sarcopodium oculorum*. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3071–3075.
17. Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J, Cano J, Barreiro MDC, Aguilar C. *Phialemonium* fungemia: two documented nosocomial cases. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 2493–2497.
18. Huhndorf SM, Miller AN. A molecular re-appraisal of taxa in the Sordariomycetidae and a new species of *Rimaconus* from New Zealand. *Stud Mycol* 2011; **68**: 203–210.
19. Hyde K, Taylor JE, Fröhlich J. Fungi from palms. XXXIV. The genus *Neolinocarpon* with five new species and one new combination. *Fungal Diversity* 1998; **1**: 115–131.
20. Iwamoto S, Tokumasu S, Suyama Y, Kakishima M. Molecular phylogeny of four selected species of the strictly anamorphic genus *Thysanophora* using nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* 2002; **43**: 169–180.

21. King D, Pasarell L, Dixon DM, McGinnis MR, Merz WG. A phaeohyphomycotic cyst and peritonitis caused by *Phialemonium* species and a reevaluation of its taxonomy. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1804–1810.
22. Kornerup A, Wanscher JH. *Methuen Handbook of Colour*, 3rd edn. Methuen. London, 1978.
23. Liang ZQ, Han YF, Chu HL, Fox RTV. Studies on the genus *Paecilomyces* in China V. *Taifanglania* gen. nov. for some monophialidic species. *Fungal Diversity* 2009; **34**: 69–77.
24. Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Samson RA. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia* 2004; **96**: 773–780.
25. Maud M, Duke BSc. The genera *Vermicularia* Fr. And *Colletotrichum* cda. *Trans Brit Mycol Soc* 1928; **13**: 156–184.
26. Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J. Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *J Clin Microbiol* 2011a; **49**: 243–256.
27. Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Gené J, Cano J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J. Molecular and phenotypic characterization of *Phialemonium* and *Lecythophora* isolates from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2011b; **49**: 1209–1216.
28. Proia LA, Hayden MK, Kammeyer P, Ortiz J, Sutton DA, Clark T, Schroers H-J, Summerbell RC. *Phialemonium*: an emerging mold pathogen that caused 4 cases of hemodialysis-associated endovascular infection. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 373–379.
29. Rivero M, Hidalgo A, Alastruey-Izquierdo A, Cía M, Torroba L, Rodríguez-Tudela JL. Infections due to *Phialemonium* species: case report and review. *Med Mycol* 2009; **47**: 766–774.
30. Rossman AY, Aime MC, Farr DF, Castlebury LA, Peterson KR, Leahy R. The coelomycetous genera *Chaetomella* and *Pilidium* represent a newly discovered lineage of linoperculate discomycetes. *Mycol Progr* 2004; **3**: 275–290.

31. Sakaeyama S, Sano A, Murata Y, Kamei K, Nishimura K, Hatai K. *Lecythophora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med Mycol* 2007; **45**: 267–272.
32. Scott IU, Cruz-Villegas V, Jr. Flynn HW, Miller D. Delayed-onset, bleb-associated endophthalmitis caused by *Lecythophora mutabilis*. *Am J Ophthalmol* 2004; **137**: 583–585.
33. Seifert K. Notes on several apocryphal genera of synnematal hyphomycetes. *Trans Br mycol Soc* 1985; **85**: 123–133.
34. Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
35. Sigler L, Sutton DA, Connie FC, Summerbell RC, Noel RK, Iwen PC. *Phialosimplex*, a new anamorphic genus associated with infections in dogs and having phylogenetic affinity to the Trichocomaceae. *Med Mycol* 2010; **48**: 334–345.
36. Strahilevitz J, Rahav G, Schroers H-J, Summerbell RC, Amitai Z, Goldschmied-Reouven A, Rubinstein E, Schwammenthal Y, Feinberg MS, Siegman-Igra Y, Bash E, Polacheck I, Zelazny A, Howard SJ, Cibotaro P, Shovman O, Keller N. An Outbreak of *Phialemonium* infective endocarditis linked to intracavernous penile injections for the treatment of impotence. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 781–786.
37. Summerbell RC, Gueidan C, Schroers H-J, De Hoog GS, Starink M, Rosete A, Guarro J, Scott JA. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Stud Mycol* 2011; **68**: 139–162.
38. Sutton BC. The *Coelomycetes* (CAB, IMI) Kew Surrey, United Kingdom; 1980.
39. Sutton BC. *Sarcopodium* and its synonyms. *Trans Brit Mycol Soc* 1981; **76**: 97–102.
40. Sutton DA, Wickes BL, Thompson EH, Rinaldi MG, Roland RM, Libal MC, Russel K, Gordon S. Pulmonary *Phialemonium curvatum* phaeohyphomycosis in a *Standard Poodle* dog. *Med Mycol* 2008; **46**: 355–359.
41. Swofford DL. *PAUP**; *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, v 4.0. Sunderland, MA: Sinauer 2002.

42. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; **24**:1596–1599.
43. Taniguchi Y, Taketan T, Moriyama H, Moriki S, Nishimura K, Sato E, Notsu Y, Higuchi T, Sugitani Y, Yasuda K, Nagai A, Yamaguchi S, Shibata H, Masuda J. Septic shock induced by *Lecythophora mutabilis* in a patient with mitochondrial encephalomyopathy. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 1255–1258.
44. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; **24**: 4876–4882.
45. Voigt K, Wöstemeyer J. Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. *Microbiol Res* 2000; **155**: 179–195.
46. Weber E. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex. I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. *Nova Hedwigia* 2002; **74**: 159–185.
47. Weinberger M, Mahrshak I, Keller N, Goldscmied-Reuven A, Amariglio N, Kramer M, Tobar A, Samras Z, Pitlik SD, Rinaldi MG, Thompson E, Sutton DA. Isolated endogenous endophthalmitis due to a sporodochial-forming *Phialemonium curvatum* acquired through intracavernous autoinjections. *Med Mycol* 2006; **44**: 253–259.
48. Yaguchi T, Sano A, Yarita K, Suh MK, Nishimura K, Udagawa S. A new *Cephalotheca* isolate from Korean patient. *Mycotaxon* 2006; **96**: 309–322.

Fig. 1. Neighbor-joining tree among D1-D2 domains of the 28S rDNA sequences of the isolates included in the Table 1. Branch lengths are proportional to distance. Sequences not generated in this study and obtained from the GenBank database are indicated in parentheses. Type strains of the different species are indicated in boldface and with ^T.

Fig. 2. One of the two most parsimonious trees inferred from heuristic search of a combined alignment of the domains D1-D2, ITS, ACT and TUB of the isolates included in the clade I shown in the Fig. 1. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. *Lecythophora lignicola* (CBS 267.33) was chosen as outgroup. GenBank accession numbers for sequences included in this analysis are listed in Table 1. ^T Type strain.

Fig. 3. One of the two most parsimonious trees inferred from heuristic search of a combined alignment of the domains D1-D2, ITS, ACT and TUB of the isolates included in the clade II shown in the Fig. 1. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. *Phialemonium obovatum* (CBS 279.76) was chosen as outgroup. GenBank accession numbers for sequences included in this analysis are listed in Table 1. The new species are indicated in boldface. ^T Type strain.

Fig. 4. The most parsimonious tree inferred from heuristic search of a combined alignment of the domains D1-D2, ITS, ACT and TUB of the isolates included in the clade IV shown in the Fig. 1. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. *Lecythophora lignicola* (CBS 267.33) was chosen as outgroup. GenBank accession numbers for sequences included in this analysis are listed in Table 1. ^T Type strain.

FIG. 5. *Phialemoniopsis cornearis* UTHSC 06–1820^T. (A) Colony surface on OA after 14 days of incubation at 25°C. (B) Colony surface on OA after 6 months of incubation at 25°C with conidiomata. (C) A conidiophore from aerial mycelium. (D-L) Phialides, adelophialides (arrows) and conidia from aerial mycelium. (M) A chlamydospore. (N, O) Sporodochium-like conidiomata. (P) Conidiophores conidia lining the inner wall of sporodochium-like conidiomata. (K, R) Detail of branched conidiophores and conidia from sporodochium-like conidiomata (S, T) Pycnidium-like conidiomata with wall of *textura intricata*. (U, V) Detail of branched conidiophores from pycnidium-like conidiomata and conidia. Scale bars: C–I, M, Q= 10µm; J–L, R, V= 5µm; N, O, S= 100 µm; T= 50 µm; P= 20 µm

FIG. 6. *Phialemoniopsis ocularis* UTHSC 04–7^T. (A, C-E) Phialides, adelophialides and conidia from aerial mycelia. (B, L) Chlamydospores. (F) Conidiophores and conidia lining the inner wall of a sporodochium-like conidioma. (G) Detail of the wall of a pycnidium-like

conidioma. (H, I) Pycnidium-like conidiomata. (J, K) Conidiophores from a pycnidium-like conidiomata and conidia. . Scale bars: A, B, D-F= 10µm; C, J, K, L= 5µm; H, I= 50 µm

FIG. 7. *Phialemoniopsis pluriloculosa* UTHSC 04-7^T. (A) Colony surface on OA after 14 days of incubation at 25°C. (B) Colony surface on OA after 6 months of incubation at 25°C with dark pigmented conidiomata (arrow). (C) Chlamydo spores. (D-F) Phialides, adelophialides (arrow), and conidia from the aerial mycelium. (G, H, J) Multilocular pycnidium-like conidiomata. (I) Conidiophores lining the inner wall of a sporodochium-like conidiomata. (K, L) Conidiophores and conidia from a pycnidium-like conidiomata. Scale bars: G, H, J= 100 µm; C, D, I, K= 10µm; E, F, L= 5µm

FIG. 8. (A-G) *Phialemonium atrogriseum* CBS 604.67^T. (A, B) Colony surface and reverse on OA after 14 days of incubation at 25°C. (C-G) Phialides, some with a visible collarete (arrow), and conidia. (H-J) *Phialemonium obovatum* CBS 279.76^T. (H) Colony surface on PDA after 14 days of incubation at 25°C. (I) Chlamydo spores. (J) Phialides and conidia. (K-N) *Cephalotheca foveolata* anamorph NBRC 1000905^T. (K, L) Colony surface and reverse on PDA after 14 days of incubation at 25°C. (M,N) Phialides, conidia and chlamydo spores. (O-S) *Phialemonium globosum* UTHSC 03-3661^T. (O) Colony surface on OA after 14 days of incubation at 25°C. (P-S) phialides and conidia in chain. (T-X) *Phialemonium inflatum* CBS 259.39^T. (T) Colony surface on OA after 14 days of incubation at 25°C. (U) Conidiophore and conidia. (V) Conidia in chains. (W, X) Phialide and conidia (SEM). Scale bars: C, I, M, P, Q, U= 10µm; D-G, J, N, R -S, V, W= 5µm

FIG. 9. (A-F) *Lecytophora luteo-rubra* UTHSC 01-20 (1)^T. (A, B) Colony surface and reverse on PDA after 14 days of incubation at 25°C. (C) Colony surface and diffusible pigment on PDA after 2 months of incubation at 25°C. (D) Phialides and conidia in slimy heads. (E, F) Phialides without basal septum. (G) Conidia. (H-P) *Lecytophora cateniformis* UTHSC 01-1644^T. (H, I) Colony surface on PDA and OA, respectively, after 14 days of incubation at 25°C. (J, K) Phialides without basal septum. (L, M) Conidia. (N, O, P) Chlamydo spores. Scale bars: D-F, N-P= 10µm; G, J-M= 5µm

TABLE 1. *Phialemonium* and *Lecythophora* clinical isolates and type or reference strains of related species included in the study

Isolate (Original identification)	Origin	Current Species	GenBank accession #			
			D1/D2 rDNA	ACT	ITS	TUB
UTHSC 01-1399 (<i>Phialemonium obovatum</i>)	Abscess, USA	<i>Phialemonium obovatum</i>	FQ790405	FQ790442	FQ790503	FQ790563
UTHSC 01-1644 (<i>Lecythophora</i> sp. 1)	Canine bone marrow, USA	<i>Lecythophora cateniformis</i>	FQ790406	FQ790443	FQ790504	FQ790564
UTHSC 01-20 (1) (<i>Lecythophora</i> sp. 1)	Leg wound, USA	<i>Lecythophora luteo-rubra</i>	FQ790407	FQ790444	FQ790505	FQ790565
UTHSC 01-317 (<i>Phialemonium obovatum</i>)	Graft tissue, USA	<i>Phialemonium obovatum</i>	FQ790408	FQ790445	FQ790506	FQ790566
UTHSC 03-2258 (<i>Phialemonium obovatum</i>)	Arm, USA	<i>Phialemonium obovatum</i>	FQ790409	FQ790446	FQ790507	FQ790567
UTHSC 03-2653 (<i>Cephalotheca foveolata</i>)	Endocarditis, Singapore	<i>Cephalotheca foveolata</i>	FQ790410	FQ790447	FQ790508	FQ790568
UTHSC 03-3661 (<i>Phialemonium</i> sp. 2)	Sinus, USA	<i>Phialemonium globosum</i>	FQ790411	FQ790448	FQ790509	FQ790569
UTHSC 03-986 (<i>Acremonium atrogriseum</i>)	BAL, USA	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	FR691979	FQ790449	FQ790510	FQ790570
UTHSC 04-616 (<i>Phialemonium obovatum</i>)	Arm, USA	<i>Phialemonium obovatum</i>	FQ790412	FQ790450	FQ790511	FQ790571
UTHSC 04-7 (<i>Volutella</i> sp.)	Toe nail, USA	<i>Phialemoniopsis pluriloculosa</i>	FQ790413	FQ790451	FQ790512	FQ790572
UTHSC 04-956 (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Sinus, USA	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FQ790414	FQ790452	FQ790513	FQ790573
UTHSC 05-2527 (<i>Phialemonium</i> sp. 1)	Peritoneal dialysis catheter, USA	<i>Phialemoniopsis ocularis</i>	FQ790415	FQ790453	FQ790514	FQ790574
UTHSC 06-1465 (<i>Phialemonium</i> sp. 1)	Shin aspirate, USA	<i>Phialemoniopsis cornearis</i>	FQ790416	FQ790454	FQ790515	FQ790575
UTHSC 06-1820 (<i>Phialemonium</i> sp. 1)	Corneal fluid, USA	<i>Phialemoniopsis cornearis</i>	FQ790417	FQ790455	FQ790516	FQ790576
UTHSC 06-4324 (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Canine pleural fluid, USA	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FR691981	FQ790456	FQ790517	FQ790577
UTHSC 06-733 (<i>Cephalotheca foveolata</i>)	Lymph node Bx, USA	<i>Cephalotheca foveolata</i>	FQ790418	FQ790457	FQ790518	FQ790578
UTHSC 07-1556 (<i>Cephalotheca foveolata</i>)	Bronchial, USA	<i>Cephalotheca foveolata</i>	FR691996	FQ790458	FQ790519	FQ790579
UTHSC 07-3736 (<i>Phialemonium</i> sp. 1)	Left hand, USA	<i>Phialemoniopsis ocularis</i>	FQ790419	FQ790459	FQ790520	FQ790580
UTHSC 08-2292 (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Blood, USA	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FQ790420	FQ790460	FQ790521	FQ790581
UTHSC 08-2766 (<i>Cephalotheca foveolata</i>)	Eye capsule, USA	<i>Cephalotheca foveolata</i>	FR691995	FQ790461	FQ790522	FQ790582
UTHSC 09-2358 (<i>Phialemonium</i> sp. 1)	Aspirate cellulitis, USA	<i>Phialemoniopsis ocularis</i>	FQ790421	FQ790462	FQ790523	FQ790583
UTHSC 09-3589 (<i>Volutella</i> sp.)	Synovial fluid, USA	<i>Phialemoniopsis pluriloculosa</i>	FQ790422	FQ790463	FQ790524	FQ790584
UTHSC R-3447 (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Eye, Israel	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FQ790423	FQ790464	FQ790525	FQ790585
UTHSC R-3448 (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Eye, Israel	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FQ790424	FQ790465	FQ790526	FQ790586
CBS 135.34	Garden cane, United Kingdom	<i>Cephalotheca sulfurea</i>	FQ790425	FQ790466	FQ790527	FQ790587
CBS 153.42 ^T	Fruit, the Netherlands	<i>Lecythophora decumbens</i>	FQ790426	FQ790467	FQ790528	FQ790588
CBS 157.44 ^T	River water, Germany	<i>Lecythophora mutabilis</i>	FR691990	FQ790468	FQ790529	FQ790588

TABLE 1 (cont.)

Isolate (Original identification)	Origin	Current Species	GenBank accession #			
			D1/D2 rDNA	ACT	ITS	TUB
CBS 205.38 ^T	Butter, Switzerland	<i>Lecythophora fasciculata</i>	FR691988	FQ790469	FQ790530	FQ790590
CBS 206.38 ^T	Butter, Switzerland	<i>Lecythophora luteoviridis</i>	FR691987	FQ790470	FQ790531	FQ790591
CBS 245.38 ^T	Butter, Switzerland	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	FR691982	FQ790471	FQ790532	FQ790592
CBS 259.39 ^T (<i>Paecilomyces inflatus</i>)	<i>Apis mellifera</i> , USA	<i>Phialemonium inflatus</i>	FQ790427	FQ790472	FQ790533	FQ790593
CBS 267.33 ^T	Unknown, Sweden	<i>Lecythophora lignicola</i>	FR691986	FQ790473	FQ790534	FQ790594
CBS 279.76 ^T	Systemic infection, USA	<i>Phialemonium obovatum</i>	FR691997	FQ790474	FQ790535	FQ790595
CBS 298.64	Air, the Netherlands	<i>Volutella ciliata</i>	FQ790428	FQ790475	FQ790536	FQ790596
CBS 306.85 (<i>Acremonium atrogriseum</i>)	Lung, USA	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	FQ790429	FQ790476	FQ790537	FQ790597
CBS 360.35	Soil, the Netherlands	<i>Volutella ciliata</i>	FQ790430	FQ790477	FQ790538	FQ790598
CBS 376.81	Dead stem, the Netherlands	<i>Sarcopodium circinatum</i>	FQ790431	FQ790478	FQ790539	FQ790599
CBS 408.80	Dead stem, the Netherlands	<i>Sarcopodium circinatum</i>	FQ790432	FQ790479	FQ790540	FQ790600
CBS 457.88	<i>Ganoderma applanatum</i> , Germany	<i>Albertiniella polyporicola</i>	AF096185*	FQ790480	FQ790541	FQ790601
CBS 490.82 ^T (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Skin lesion, USA	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FR691977	FQ790481	FQ790542	FQ790602
CBS 491.82 ^T (<i>Phialemonium dimorphosporum</i>)	Soil, USA	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FR691976	FQ790482	FQ790543	FQ790603
CBS 508.70 ^T	Wood, Canada	<i>Cryptendoxyla hypophloia</i>	AB191032*	FQ790483	FQ790544	FQ790604
CBS 551.75	Wood, Norway	<i>Coniochaeta subcorticalis</i>	AF353593*	FQ790484	FQ790545	FQ790605
CBS 604.67 ^T (<i>Acremonium atrogriseum</i>)	Noodles, Ukraine	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	FQ790433	FQ790485	FQ790546	FQ790606
CBS 730.97	Peritoneal dialysis fluid, USA	<i>Phialemonium obovatum</i>	FQ790434	FQ790486	FQ790547	FQ790607
CBS 774.97 (<i>Acremonium atrogriseum</i>)	Urine, Germany	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	FQ790435	FQ790487	FQ790548	FQ790608
CBS 832.71 (<i>Volutella cinerescens</i>)	Keratomycosis, Unknown	<i>Phialemoniopsis curvata</i>	FQ790436	FQ790488	FQ790549	FQ790609
CBS 109872	Wood, Argentina	<i>Coniochaeta rhopalochaeta</i>	GQ351561*	FQ790489	FQ790550	FQ790610
CBS 110467	Wood, Germany	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	AF353583*	FQ790490	FQ790551	FQ790611
CBS 120873 ^T	Wood, South Africa	<i>Collophora rubra</i>	GQ154606*	FQ790491	FQ790552	FQ790612
CBS 120875	<i>Prunus armeniaca</i> , South Africa	<i>Coniochaeta prunicola</i>	GQ154602*	FQ790492	FQ790553	FQ790613
E. W. 93.262	Wood, Germany	<i>Coniochaeta velutina</i>	AF353594*	FQ790493	FQ790554	FQ790614
E. W. 95.605	Wood, Germany	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	AF353584*	FQ790494	FQ790555	FQ790615
FMR 7190 (<i>Sarcopodium oculorum</i>)	Keratomycosis, Brazil	<i>Phialemoniopsis ocularis</i>	FQ790437	FQ790495	FQ790556	FQ790616
FMR 8227	Nematode eggs, Spain	<i>Volutella ciliata</i>	FQ790438	FQ790496	FQ790557	FQ790617

TABLE 1 (cont.)

Isolate (Original identification)	Origin	Current Species	GenBank accession #			
			D1/D2 rDNA	ACT	ITS	TUB
HKUCC 2984	Unknown	<i>Neolinocarpon globosicarpum</i>	DQ810224*	FQ790497	FQ790558	FQ790618
HKUCC 2954	Unknown	<i>Linocarpon livistonae</i>	DQ810206*	FQ790498	FQ790559	FQ790619
HKUCC 2983	Unknown	<i>Neolinocarpon enshiense</i>	DQ810221*	FQ790499	FQ790560	FQ790620
IHEM 19077 ^T (<i>Sarcopodium oculorum</i>)	Keratomycosis, Brazil	<i>Phialemoniopsis ocularis</i>	FQ790439	FQ790500	FQ790561	FQ790621
NBRC 100905 ^T	Subcutaneous infection, Korea	<i>Cephalotheca foveolata</i>	FQ790440	FQ790501	FQ790562	FQ790622
NBRC 31965 (<i>Taifanglania inflata</i>)	Cabbage field soil, Unknown	<i>Phialemonium inflatus</i>	FQ790441	FQ790502	FQ790563	FQ790623

^TType strains; * sequences retrieved from GenBank database; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; FMR, FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; HKUCC, University of Hong Kong Culture Collection; IHEM, Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussels, Belgium; NBRC, NITE Biological Resource Center, Japan; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA.

Table 2. Distinctive morphological features of *Phialemoniopsis* species, based on OA cultures at 25°C after 14 days.

Species	Colonies	Sporodochium-like conidiomata	Pycnidium-like conidiomata	Other distinctive features
<i>P. cornearis</i>	Whitish to olive brown	Solitary, superficial, hyaline. Conidia hyaline, obovoid to ellipsoidal	Solitary, superficial, globose to subglobose, dark brown to black, unilocular, textura intricata. Conidia hyaline, obovoid, slightly apiculate at the base	Chlamydo spores present
<i>P. curvata</i>	White, brown to grayish	Solitary, superficial, hyaline to subhyaline. Conidia hyaline, ellipsoidal to ovoidal	Absent	Chlamydo spores absent
<i>P. ocularis</i>	Whitish to brownish gray	Solitary, superficial, hyaline to subhyaline. Conidia subhyaline, ellipsoid, navicular or slightly allantoid	Solitary, superficial, globose to subglobose, dark brown to black, unilocular, textura intricata and epidermoidea. Conidia hyaline, ellipsoidal to lightly allantoid, slightly apiculate at the base	Chlamydo spores present
<i>P. pluriloculosa</i>	Yellowish white, olive brown to black	Solitary, superficial, multilocular, subhyaline to brown. Conidia hyaline, ellipsoidal	Solitary or in groups, superficial or semi-immersed, globose to subglobose, dark brown to black, multilocular, textura epidermoidea. Conidia hyaline, ellipsoidal, slightly apiculate at the base	Chlamydo spores present

Table 3. Distinctive morphological features of *Phialemonium* species, based on OA cultures at 25°C after 14 days.

Species	Colonies	Conidia	Other distinctive features
<i>P. atrogriseum</i>	Pale ochre-brown to brownish-black	Subhyaline to dark grey, obovoid with an apiculate and minutely truncate base, in slimy heads and in chains without connectives	Sometimes, phialides with a short pale collarete. Ascomata and chlamydozoospores absent
<i>P. globosum</i>	White	Hyaline, globose to subglobose, connective on both ends, in chains	Chlamydozoospores and ascomata absent
<i>P. inflatus</i>	White to pale yellow	Hyaline, citriform, connective on both ends, in chains	Chlamydozoospores and ascomata absent
<i>P. obovatum</i>	Pale ochraceous to greenish	Hyaline, obovate with a truncate base, in slimy heads	Chlamydozoospores hyaline, oval and thin-walled. Some isolates develop globose and dark structures suggestive of immature ascomata
<i>Phialemonium</i> anamorph of <i>Cephalotheca foveolata</i>	White to brownish	Hyaline, cylindrical, in slimy heads	Chlamydozoospores hyaline, ellipsoidal, thick-walled. Ascomata present, covered with sulfurous to glabrous hyphae; ascospores elliptic-ovate, smooth-walled
<i>Phialemonium</i> anamorph of <i>Cephalotheca sulfurea</i>	White to pale yellow	Hyaline, ovate, connective on both ends, in chains	Chlamydozoospores absent. Ascomata present, covered with light yellow to brown hyphal hairs; ascospores broadly reniform, foveolate-walled

Table 4. Distinctive morphological features of *Lecythophora* species, based on OA cultures at 25°C after 14 days.

Species	Colonies	Conidia	Chlamydo spores	Other distinctive features
<i>L. cateniformis</i>	Brownish grey	Obovoid to ellipsoidal, with a protruding and slightly truncate base	Pale brown to brown, subglobose, oval to pyriform, solitary or in short chains	Adelophialides are predominating
<i>L. decumbens</i>	Olivaceous to brown	Ellipsoidal to cylindrical, often somewhat curved	Absent	Presence of conidia swollen up to 13 x 3–4.5 µm
<i>L. fasciculata</i>	Grey-brown to black	Ovoid to ellipsoidal, often somewhat curved	Absent	Adelophialides are predominating
<i>L. hoffmannii</i>	Orange to salmon	Ellipsoidal to cylindrical, often somewhat curved	Absent	More common short adelophialides than ventricose phialides
<i>L. luteo-rubra</i>	Orange	Ellipsoidal to cylindrical, slightly apiculate at the base	Absent	Colonies producing a diffusible pigment orange-red to brownish-red
<i>L. luteoviridis</i>	Olivaceous to brown	Ellipsoidal to cylindrical, often somewhat curved	Hyaline or faintly brown, globose to oblong or pear-shaped, singly or short chains	Darkening of the colonies due to development of pigmented chlamydo spores
<i>L. lignicola</i>	Brown	Ovoid to ellipsoidal	Absent	Discrete ventricose phialides abundant
<i>L. mutabilis</i>	Brown	Ellipsoidal, rarely curved	Olivaceous-brown, ovoidal to ellipsoidal, more rarely globose, singly	Discrete ventricose phialides abundant

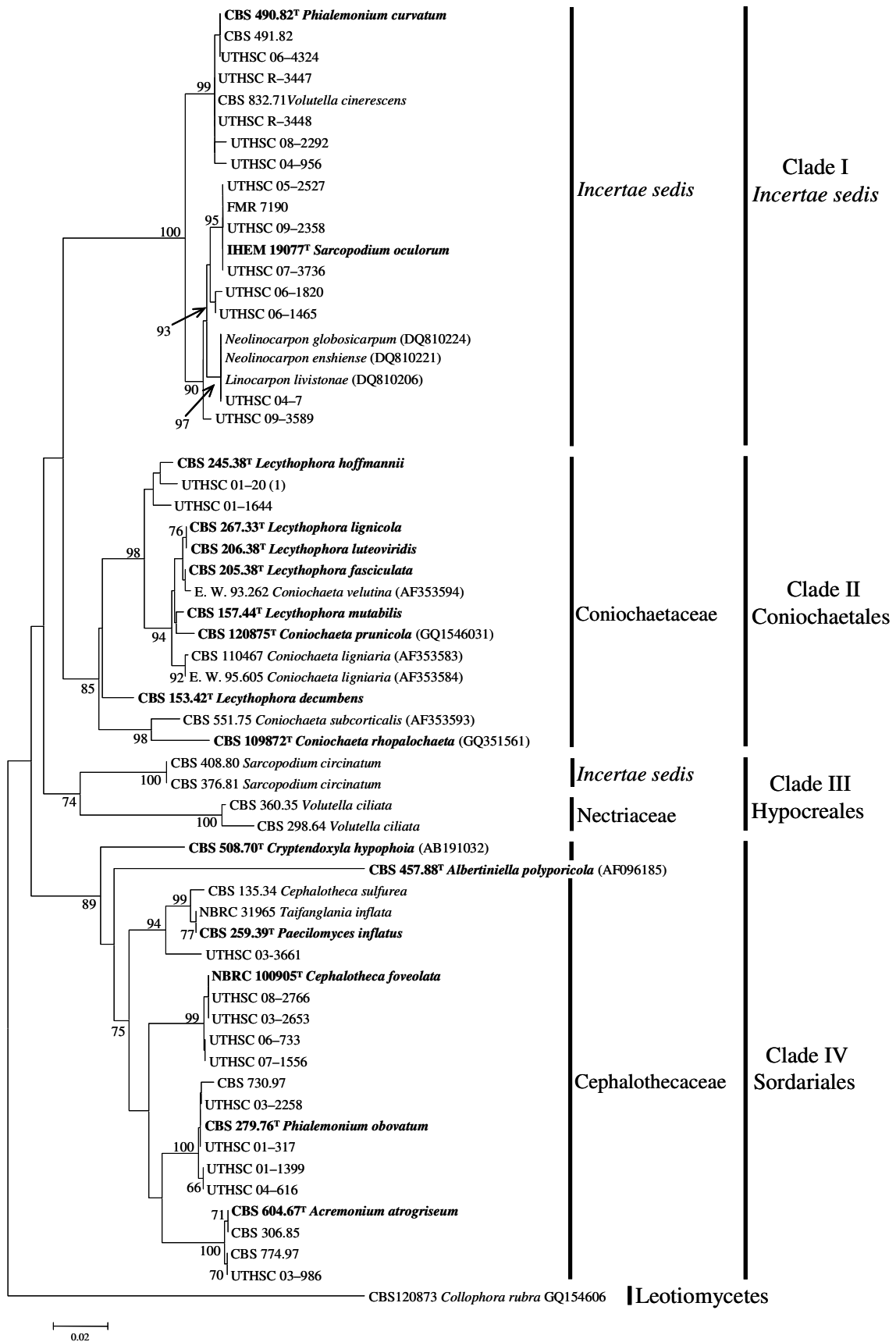


Fig. 1

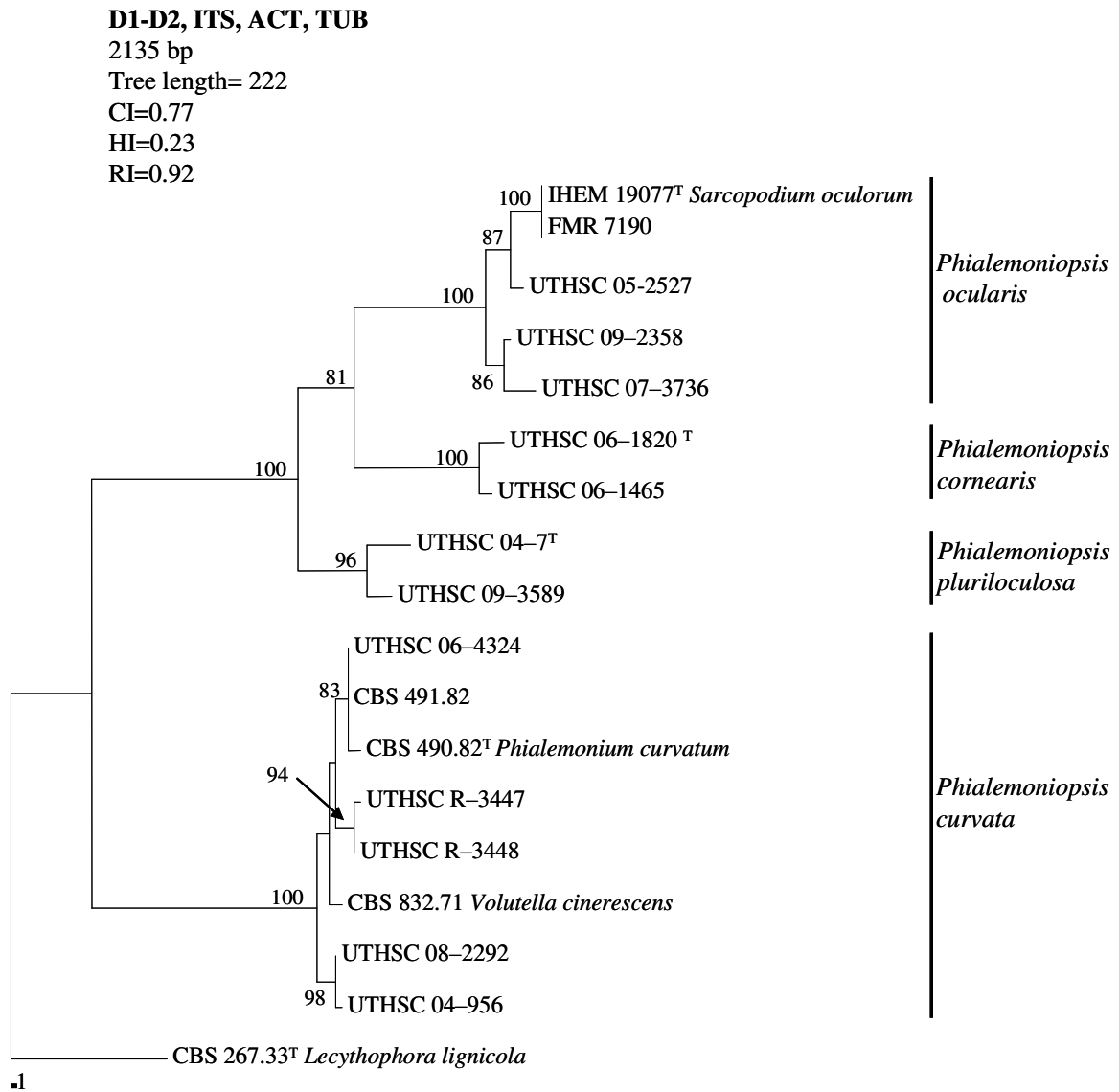


Fig. 2

D1-D2, ITS, ACT, TUB

2173 bp

Tree length= 514

CI=0.65

HI=0.35

RI=0.55

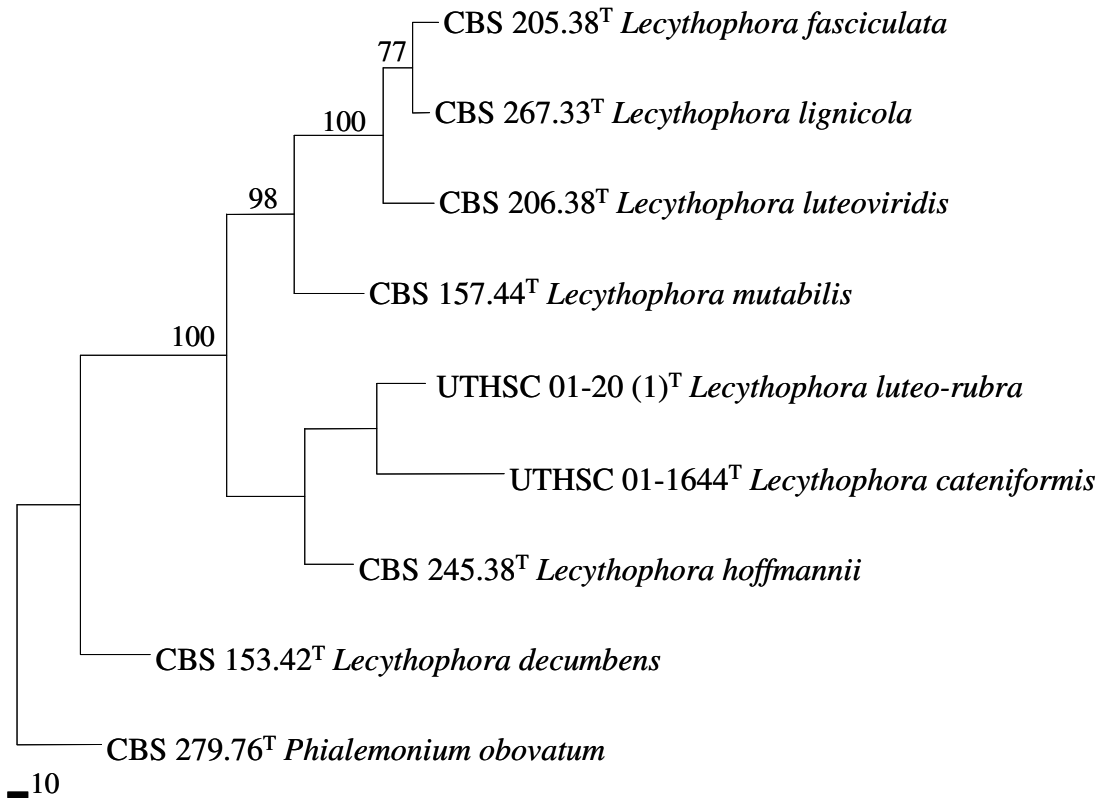


Fig. 3

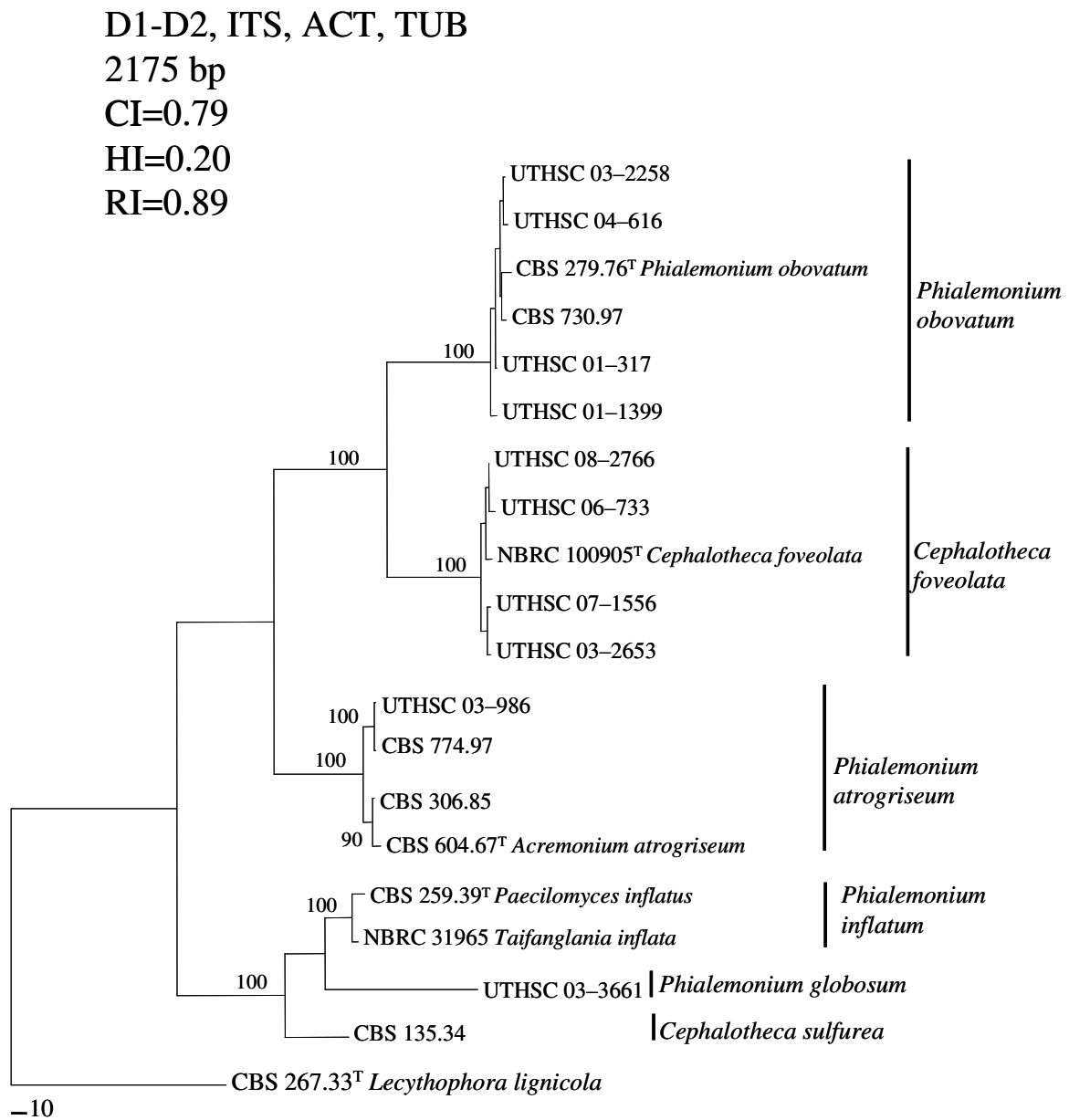


Fig. 4

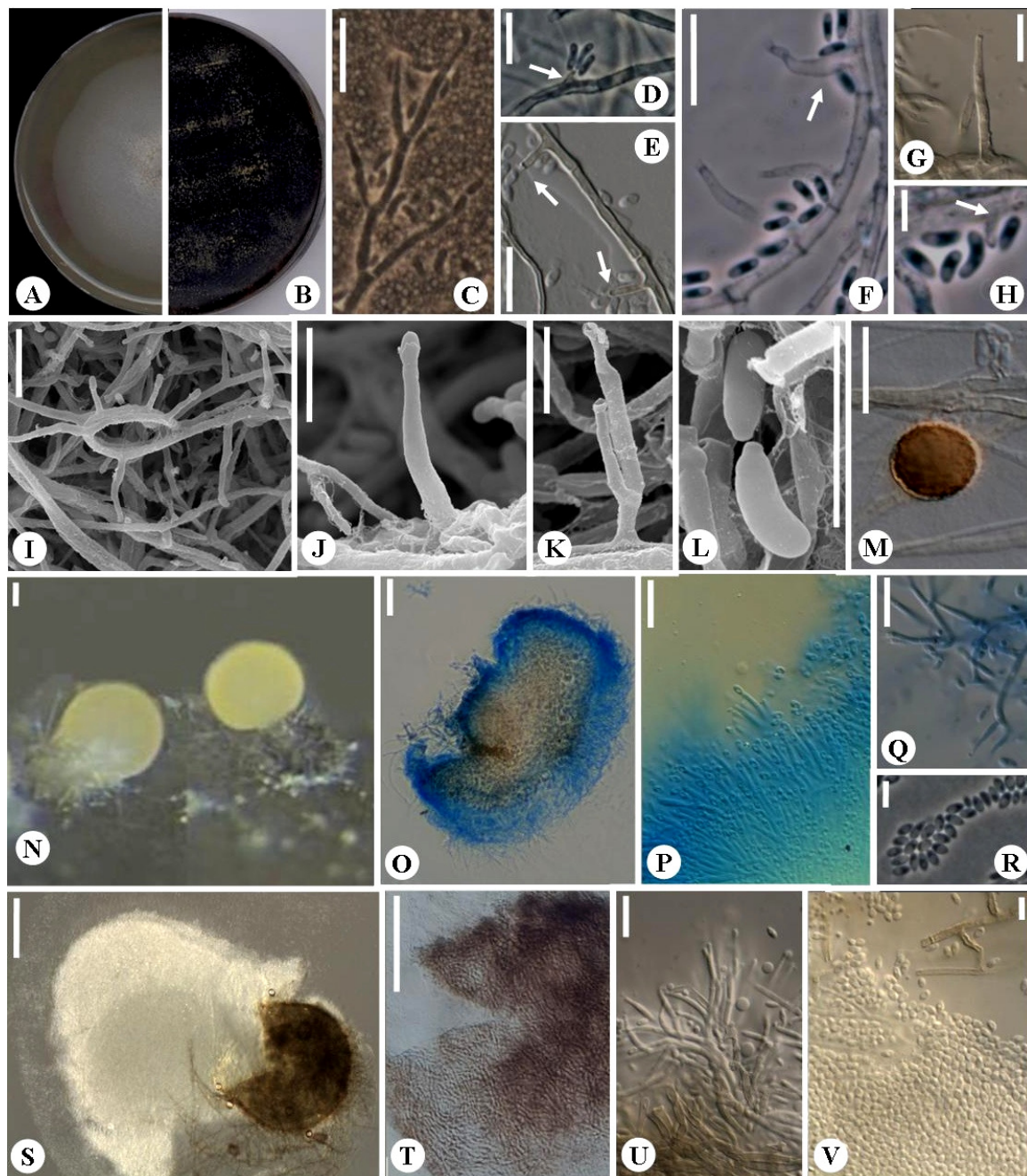


Fig. 5

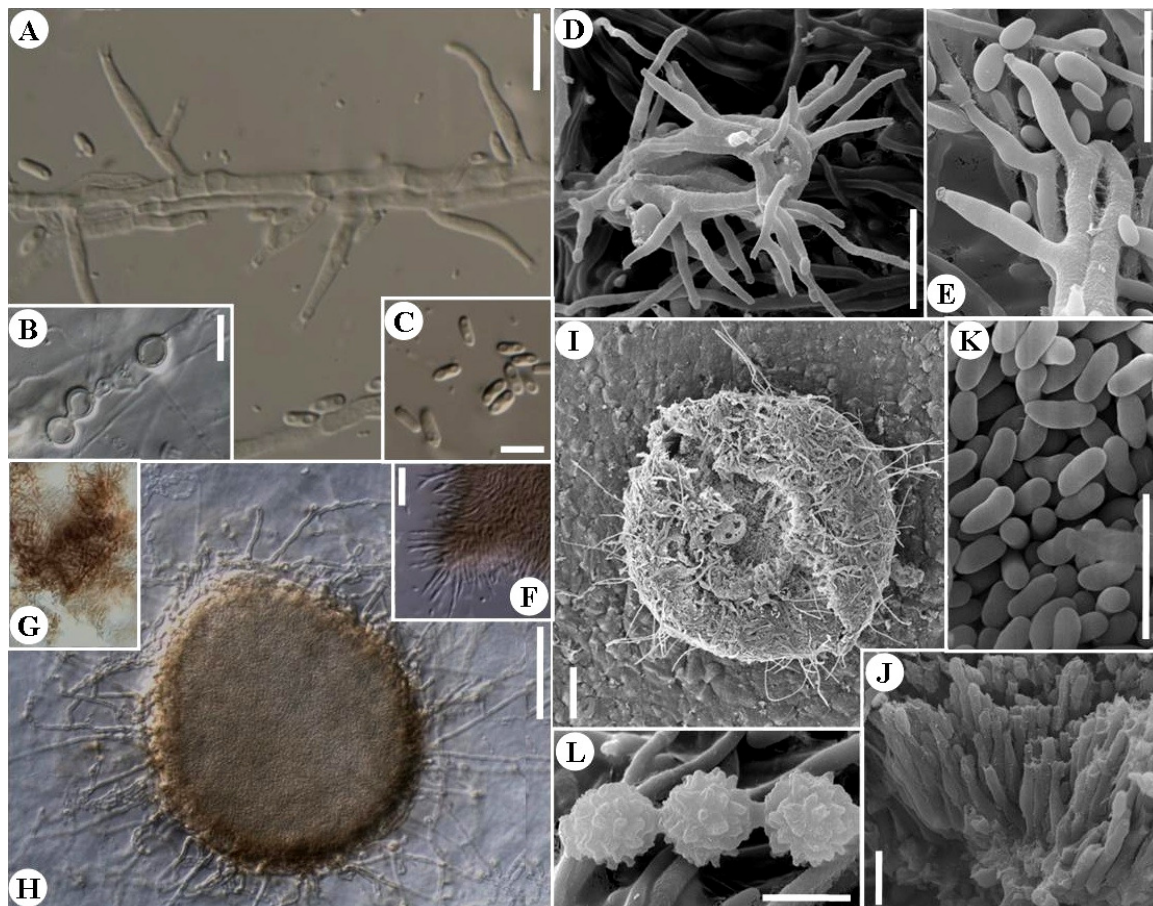


Fig. 6

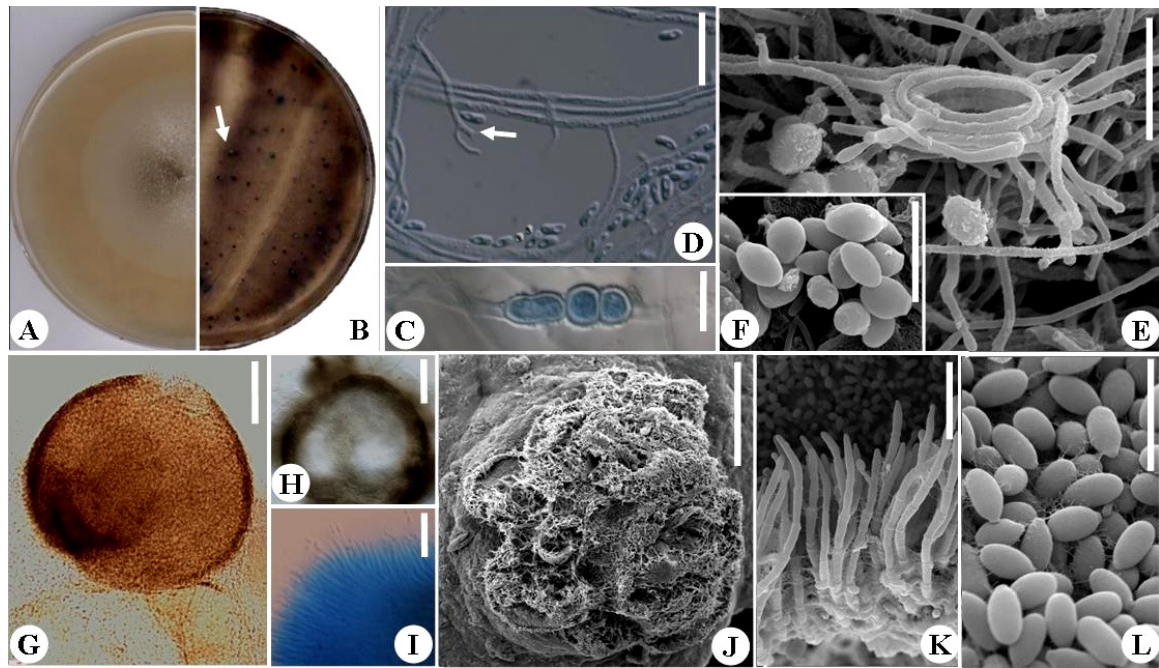


Fig. 7

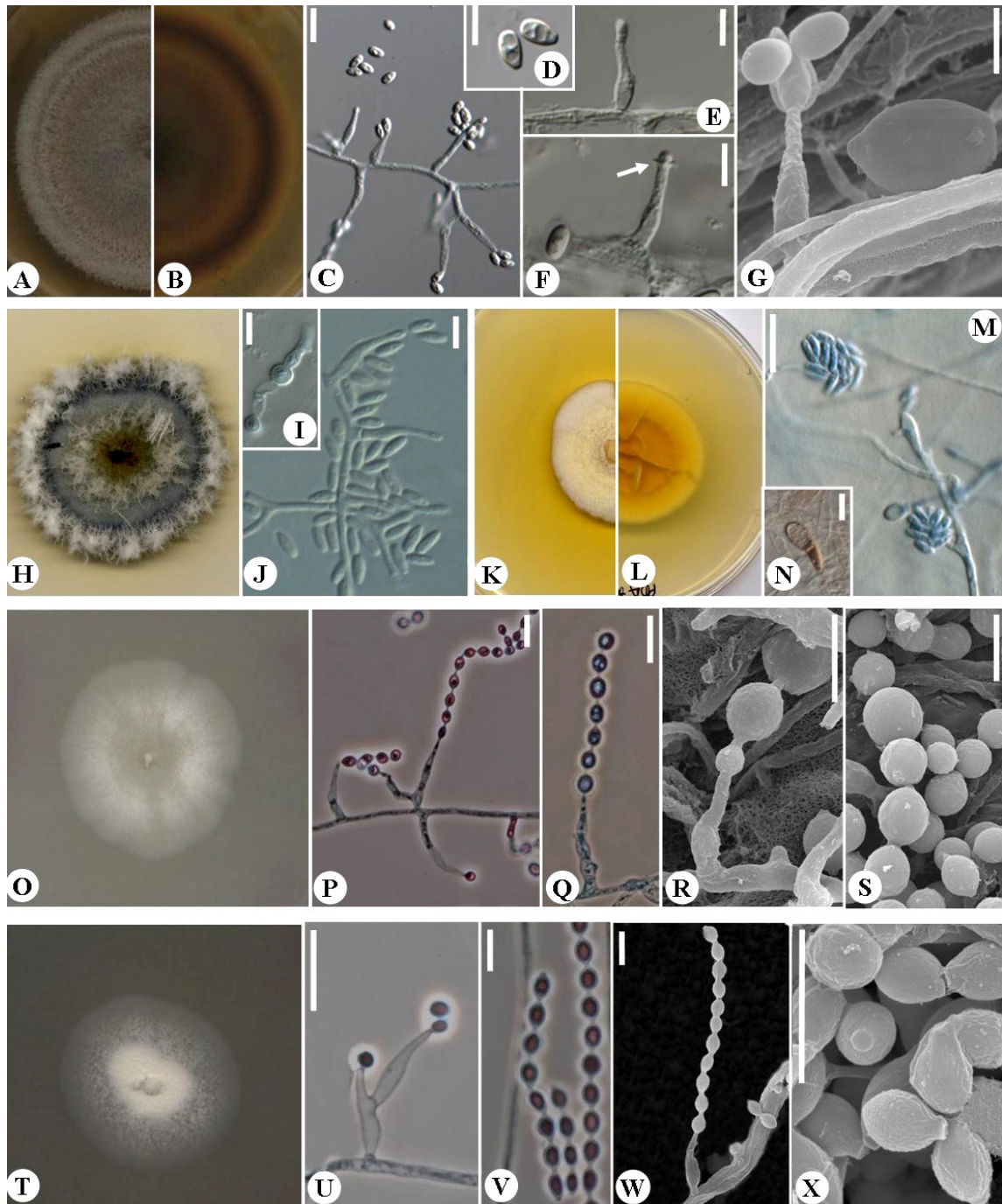


Fig. 8

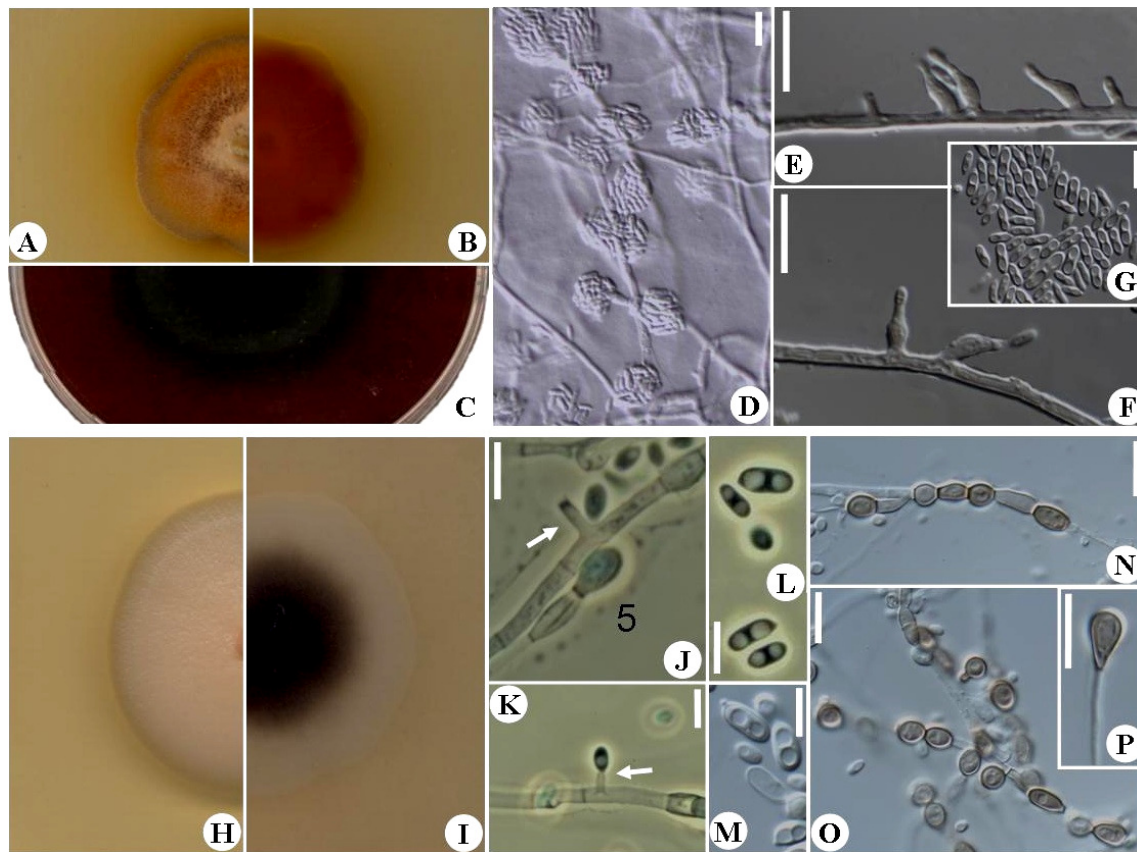


Fig. 9

4.4. Diversidad genética de aislados de *Paecilomyces lilacinus*

4.4.1. Polyphasic analysis of *Paecilomyces lilacinus* isolates from different origins and proposal of the new species *Paecilomyces lavendulus*.

Perdomo H, Cano J, Gené J, García D, Hernández M, Guarro J.

Mycologia. (Enviado, en fase de revisión).

Short title: Polyphasic analysis of *Paecilomyces lilacinus* isolates

Polyphasic analysis of *Paecilomyces lilacinus* isolates from different origins and proposal of the new species *Paecilomyces lavendulus*

Haybrig Perdomo

Josep Cano¹

Josepa Gené

García Dania

Margarita Hernández

Josep Guarro

Mycology Unit, Medical School, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, C/ Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain.

¹Corresponding author, e-mail: josep.cano@urv.cat., tel.: + 34 977759350, fax: +34 977759322.

Abstract: *Paecilomyces* is a polyphyletic anamorphic genus with numerous species, *Paecilomyces lilacinus* being one of the most studied species due to its biotechnological properties and its ability to cause human infections. Since contradictory data have been reported on the intraspecific genetic variability of *P. lilacinus*, we have carried out a polyphasic study of a set of clinical and environmental isolates of this species, and others that are morphologically or molecularly related, including *Paecilomyces nostocoides*. Detailed morphological examination and a multilocus sequence analysis of five different loci, including the ribosomal internal transcribed spacer, the domains D1 and D2 of the 28S rDNA, the elongation factor 1-alpha, and the largest and the second largest subunits of RNA polymerase II (*rpb1* and *rpb2*), showed that *P. lilacinus* formed a well-supported phylogenetic clade and that *P. nostocoides* is a synonym. The new species *Paecilomyces lavendulus*, showing vinaceous colonies similar to those of *P. lilacinus*, is proposed. It is characterized by the lack of growth at 35 C, the production of a yellow diffusible pigment and by subglobose or limoniform conidia.

Key words: Anamorphic fungi, multilocus study, *Paecilomyces lavendulus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces nostocoides*.

INTRODUCTION

The anamorphic genus *Paecilomyces* Bainier comprises numerous species characterized by irregular verticillate conidiophores, phialidic conidiogenous cells, with a cylindrical or swollen base and tapering into a rather long and slender neck, and by the production of catenate conidia. Samson (1974) divided the genus into two sections, *Paecilomyces*, which comprises thermophilic species, and *Isarioidea*, which includes mesophilic, mostly nematogenous species. In recent years, molecular studies have demonstrated that *Paecilomyces* is clearly polyphyletic, with species belonging to the subclasses Sordariomycetidae or Eurotiomycetidae (Obornik et al. 2001, Luangsa-ard et al. 2004). The section *Paecilomyces* seems to be monophyletic, grouping anamorphs of Eurotiales, while the section *Isarioidea* does not represent a natural grouping (Luangsa-ard et al. 2004, Luangsa-ard et al. 2005).

Due to its nematicidal ability, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is one of the most studied species of the genus, used in the control of greenhouse insects and mite pests (Fiedler and Sosnowska 2007). This fungus causes opportunistic diseases in humans, mainly oculomycosis, cutaneous and subcutaneous infections, although other types of infections have also occasionally been reported (Pastor and Guarro 2006, Lott et al. 2007, Van Schooneveld et al. 2007, Wessolossky et al. 2008, Ounissi et al. 2009). This species, included in the section *Isarioidea* (Samson 1974), is characterized by vinaceous colonies; conidiophores erect, thick and rough-walled, and with verticillate branches; phialides with a swollen basal part tapering into a long distinct neck; and conidia ellipsoidal to fusiform, smooth-walled to slightly roughened, arranged in long chains. *Paecilomyces nostocoides* M.T. Dunn is a morphologically and genetically similar species which shares with *P. lilacinus* the production of purplish colonies and an *Acremonium*-like synanamorph, but in *P. nostocoides* two types of catenate conidia were described: ellipsoidal to fusiform small conidia which predominate, and large but scarce globose to subglobose conidia (Dunn 1983, Okada et al. 1995, Yokoyama et al. 2004, 2006, Zongqi et al. 2007). Several molecular studies have placed *P. lilacinus* and other *Paecilomyces* species with pink or purple colonies, such as *P. carneus* (Duché & R. Heim) A.H.S. Br. & G. Sm, *P. cinnamomeus* (Petch) Samson & W. Gams (anamorph of

Conoideocrella luteorostrata (Zimm.) D. Johnson, G.H. Sung, Hywel-Jones & Spatafora), *P. marquandii* (Masse) S. Hughes and *P. purpureus* Z.Q. Liang & Y.F. Han, in the family Clavicipitaceae of the Hypocreales (Luangsa-ard et al. 2004, Zongqi et al. 2007), while more recently, based on multilocus sequences analysis, *P. lilacinus* has been placed in the family Ophiocordycipitaceae (Sung et al. 2007a). Other recent studies have shown some phylogenetic relationship of *P. lilacinus* with *Haptocillium* spp. W. Gams & Zare, *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk (Sung et al. 2007a, Johnson et al. 2009), *Isaria takamizusanensis* Kobayasi (Luangsa-ard et al. 2005, Johnson et al. 2009) and *Nomuraea atypicola* (Yasuda) Samson (Sung et al. 2007a).

Some contradictory data have been reported about the intraspecific genetic variability of *P. lilacinus*. Using biochemical tests and arbitrary PCR primers, Tigano-Milani et al. (1995 a,b) demonstrated that some strains isolated from nematodes, insects and soil formed a well-supported monophyletic group. By contrast, Inglis and Tigano-Milani (2006), in a phylogenetic analysis of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS) of some isolates belonging to several entomogenous species of *Paecilomyces*, showed that some isolates of *P. lilacinus* formed a subgroup genetically distant from the other isolates of that species, which suggests the possible existence of cryptic species.

The aim of our study was to determine the phenotypic and genetic variability of a set of well characterized clinical and environmental isolates of *P. lilacinus* and to assess the phylogenetic relationship between *P. lilacinus* and other related taxa by using a multilocus sequences analysis.

MATERIALS AND METHODS

Isolates and GenBank sequences. — A total of 34 isolates from different origins and sources, including type and reference strains of *P. lilacinus* and *P. nostocoides*, were morphologically examined and sequenced in this study. In addition, 32 ITS sequences retrieved from the GenBank, corresponding to type or reference strains of species morphologically related to *P. lilacinus*, were included in the phylogenetic analysis (Table I).

Phenotypic study. — The fungal isolates were grown on potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.), malt extract agar (MEA; 10 g of malt extract, 20 g of agar, and 1

L of distilled water), Czapek agar (CZA; Difco, Becton Dickinson, France), potato carrot agar (PCA; 20 g potatoes, 20 g carrot, 20 g agar, and 1 L tap water) and oatmeal agar (OA; 30 g filtered oat flakes, 20 g agar, 1 L tap water) incubated at 25 C in darkness. In colony description color notations in parenthesis are from Kornerup and Wanscher (1978). Colony growth rates were studied on CZA and MEA plates in duplicate, at 15, 25, 30, 35, 37, 40 and 42 C, and the diameters (in mm) were measured after seven and fourteen days. Microscopic features were determined from slide cultures made on MEA after 14 days of incubation at 25 C. Coverslips were mounted in lactic acid and examined under a light microscope (Olympus CH2). All isolates were morphologically identified following traditional criteria (Samson 1974, Dunn 1983, Okada et al. 1995). Photomicrographs were obtained with a Zeiss AXIO Imager M1 light microscope (Göttingen, Germany) and electron micrographs with a Jeol JSM-6400 scanning electron microscope (Tokyo, Japan).

Molecular study.— DNA was extracted according to Perdomo et al. (2011). The ITS, the D1-D2 of the 28S rDNA (D1-D2), and fragments of the elongation factor 1-alpha (*EF-1 α*) and the largest and second largest subunits of RNA polymerase II gene (*rpb1* and *rpb2*) were amplified and sequenced following previously described protocols (ITS and D1-D2, Cano et al. 2002, *EF-1 α* , *rpb1* and *rpb2*, Sung et al. 2007b). PCR products were purified with an Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric Healthcare, Buckinghamshire, UK) and stored at -20 C until they were used in sequencing. PCR products were sequenced using the same primers as those for amplification and following the Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit protocol (Applied Biosystems, Gouda, the Netherlands). Consensus sequences were obtained with the Autoassembler (PerkinElmer-Applied Biosystems) and Seqman software (Lasergene, Madison, Wis.). The sequences were aligned using Clustal X (version 1.8) computer program (Thompson et al. 1997).

The phylogenetic relationships of the 34 isolates tested in this study with related taxa (Luangsa-ard et al. 2005, Sung et al. 2007a, Johnson et al. 2009) were first determined through the analysis of ITS sequences. Then we performed a multilocus sequences analysis to confirm the results obtained in the ITS tree. For the ITS analysis, we used Gblocks software with

relaxing selection parameters (Castresana, 2000) to realign positions as necessary. Neighbor-joining analyses of these sequences were carried out with the software program MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007) and the algorithm Kimura 2-parameter was used to obtain the distance tree. Gaps were treated as pair-wise deletion. Support for internal branches was assessed by a search of 1000 bootstrapped sets of data. A sequence of *Phialemonium obovatum* W. Gams & McGinnis was used as outgroup.

Most-parsimonious tree (MPT) analyses of the combined data set, including ITS, D1-D2, *EF-1 α* , *rpb1* and *rpb2*, were made by using PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2001). One hundred heuristic searches were conducted with random sequence addition and tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches and saving all minimal-length trees (MulTrees). The multilocus sequence analysis comprised 23 of the 34 isolates, which included the isolates CBS 128677 and CBS 128678, the type and reference strains of *P. lilacinus* and *P. nostocoides* and several isolates of *P. lilacinus*. The later isolates were randomly selected among those tested in the first analysis since we did not observe any significant differences in their ITS sequences. Sequences of the type strains of *Haptocillium balanoides* (Drechsler) Zare & W. Gams, *H. sinense* (K.Q. Zhang, L. Cao & Z.Q. Liang) Zare & W. Gams and *H. zeosporum* (Drechsler) Zare & W. Gams retrieved from GenBank were chosen as outgroup. Support for internal branches was assessed using a heuristic parsimony search of 1000 bootstrapped data sets. The combined data set was tested for incongruence with the partition homogeneity test (PHT), as implemented in PAUP*. Gaps were treated as missing data.

Nucleotide sequence accession numbers.— The newly reported sequences generated in this study were deposited in the GenBank database under the accession numbers listed in Table I.

Mating tests.— All the isolates were grown on OA plates at 25 C in the dark for 14 days, and then paired in all possible combinations, including self-crosses, on CZA and OA. Each isolate was streaked onto one half of the plate opposite to the streak of another isolate, allowing for a central zone of contact as the isolates grew. Plates were incubated at 25 C and examined macroscopically each week for up to 6 months. All tests were carried out in duplicate.

RESULTS

In the morphological study, we identified all the isolates tested as *P. lilacinus* with the exception of three of them; the isolate FMR 10380 showed the typical features of *P. nostocoides* and the other two isolates, CBS 128677 and CBS 128678, were phenotypically different from the accepted species of *Paecilomyces*. These two latter isolates were characterized mainly by lack of growth at 35 C, the formation of a yellow diffusible pigment in the reverse of the colonies and by the production of subglobose with slight apiculate base or limoniform conidia.

Phylogenetic analyses.— The initial ITS multiple alignment included 545 bp, and after Gblocks analysis, it covered 75% of the original length (409 bp). The phylogenetic tree inferred from neighbor-joining analysis of the ITS sequences revealed that the 34 isolates of *P. lilacinus* and *P. nostocoides*, including types and reference strains, were grouped in a terminal highly supported clade (99% bootstrap support (bs)), genetically distant from the species of *Isaria*, *Haptocillium* and other species of *Paecilomyces* included in the study (Fig 1). This clade was split into two highly supported sister clades, one including all isolates identified morphologically as *P. lilacinus* and *P. nostocoides* with no significant differences between the sequences of the types of both species, and the second one comprising the isolates CBS 128677 and CBS 128678.

A BLAST sequence identity queries (Altschul et al. 1997) comparing *EF-1 α* and *rpb1* genes sequences fragments of the isolates CBS 128677 and CBS 128678 with those of *Isaria takamizusanensis* (NHJ 3582) and *Nomurea atypicola* (CBS 744.73), two genetically related taxa with *P. lilacinus* (Luangsa-ard et al. 2005, Sung et al. 2007a, Johnson et al. 2009), revealed similarities ≤ 95.5 in all the cases.

In the multilocus sequences analysis, with the primers used we were able to amplify and sequence 560 - 585 bp, 435 - 584 bp, 903 - 1034bp, 610 - 694 and 522 - 583 bp of the ITS, D1-D2, *EF-1 α* , *rpb1* and *rpb2* loci, respectively. Of the 2759 bp used in this analysis, 315 were parsimony-informative characters, the lowest number was 27 for D1-D2 and the highest one was 138 for the *rpb1*. The partition homogeneity test demonstrated that the five loci sequence data sets were congruent ($P=0.05$) and could therefore be combined. Two maximum parsimony

trees (MPT) were obtained from the heuristic search. The trees had a consistency index (CI) of 0.87, a retention index (RI) of 0.85 and a homoplasy index (HI) of 0.13 (Fig. 2). Clustering was similar to that observed in the particular trees of the different genes analyzed (data not shown). Again here the isolates morphologically identified as *P. lilacinus* and *P. nostocoides* and the types and reference strains of the respective species were grouped together, and the isolates CBS 128677 and CBS 128678 were in a separate clade (100% bs).

The intraspecific variability of the isolates grouped within the *P. lilacinus* clade showed identity ranges of 99.8–100% for D1-D2, 99–100% for ITS, 99.6–100% for *EF-1 α* , and 100% for the *rpb1* and *rpb2*. The variability between the sequences of the isolates CBS 128677 and CBS 128678 and the type strain of *P. lilacinus* were 99.1% genetically similar for D1-D2, 95.4% and 95.2% respectively for ITS, 96.7% and 97.1 for *EF-1 α* , 85.3% and 85.1 for the *rpb1*, and 94.3% for the *rpb2*.

Mating test.— There was no sexual state observed after 6 months of incubation in any of the mating tests performed.

TAXONOMY

On the basis of the phylogenetic analysis and the phenotypic study, we concluded that CBS 128677 and CBS 128678 represent a species of *Paecilomyces* different from the other described in the genus, which is proposed here as new.

Paecilomyces lavendulus H. Perdomo, Gené, Cano & Guarro sp. nov. FIGS. 3, 4

Mycobank no. MB 561126

Etymology. From the Latin *lavendulus*, referring to the color of the colony.

Coloniae in agaro cum decocto malturorum (MEA) ad 70–75 mm diam. 14 diebus 25 C, pulverulentae, lavendulae. Pigmentis flavidus in culturis formantis. Hyphae vegetativae hyalinus, leves, septatis 1–2 μ m lata. Conidiophora usque ad 400 μ m longa, erecta, laevia vel minute verrucosa, plerumque verticillatim ramosa, cum 3–6 phialides. Phialides cylindricae vel inflatae ad basis, 7–12 (–15) x 2–3 μ m, cum attenuato collo usque ad 5 μ m longo. Conidia catenulata, unicellularia, subglobosa, leviter apiculata ad basis, vel limoniformis 2–3 x 2–2.5 μ m, laevia, subhyalina vel vinacea in cumulo. Synanamorphum *Acremonium*-like cum

conidiophora simplicia vel leviter ramosa, ad 35 μm longa. Phialides lageniformis vel cylindricae, 9–22 x 1.5–2 μm . Conidia in capitulum mucosum, subglobosa, ellipsoidea vel cylindrica, 2–3 (–5) x 1–2 μm , laevia, hyalina. Chlamydosporae absentes. Teleomorphosis ignota.

Colonies at 25 C on MEA attained a diameter of 70–75 mm after 14 days of incubation, consisting of a dense basal felt of numerous conidiophores giving a powdery texture, pale vinaceous (9B2), with sparse aerial mycelium, and producing a light yellow diffusible pigment. Colony features on OA, PCA and PDA were very similar to those observed on MEA, except that on PDA they were radially folded toward the periphery. Colonies on CZA were floccose, with a pale vinaceous color (9A2), uncolored reverse and absence of diffusible pigment. The optimum growth temperature was 25 C and the minimum was 15 C. At 30 C the growth was very scarce, and absent at 35 C.

Vegetative hyphae were hyaline, smooth-walled, 1–2 μm wide. Conidiophores growing from the superficial mycelium were up to 400 μm long, consisting of a stipe bearing verticillate branches with terminal whorls of 3 to 6 phialides; stipe erect, septate, brownish-yellow to pale purple-brown, rough-walled, profusely verrucose and up to 5 μm wide near the base. Conidiophores growing from the aerial mycelium were up to 60 μm long, irregularly branched, with 1–3 phialides per branch, septate, hyaline and smooth-walled. Phialides were 7–12 (–15) x 2–3 μm , with a short cylindrical, ellipsoidal or swollen basal portion tapering into a distinct neck up to 5 μm long. Conidia were in long dry chains, unicellular, subglobose with apiculate base or limoniform, 2–3 x 2–2.5 μm , smooth-walled, mostly subhyaline, pinkish-purple in mass; intercalary globose conidia, 3.5–4.5 x 3–4 μm , were observed in the isolate CBS 128678. An *Acremonium*-like synanamorph was observed growing from the superficial and submerged mycelium in all the media tested. Conidiophores were simple, usually reduced to a phialide, or slightly branched, up to 35 μm long, sometimes reduced to pegs of intercalary cells. Phialides were lageniform or cylindrical, 9–22 x 1.5–2 μm . Conidia were in slimy heads, subglobose, ellipsoidal or cylindrical, 2–3 (–5) x 1–2 μm , smooth-walled, hyaline; on CZA and PDA conidia were up to 12 μm long. Chlamydospores and teleomorph were not observed.

Holotype. VENEZUELA. CARACAS: from soil, 2008, *C. Hartung & S. Mata-Essayag* (IMI 500328, ex-type cultures CBS 128677 and FMR 10376).

Other specimen examined: SPAIN. REUS. from a bronchial wash, 2009, *Isabel Pujol* (CBS 128678, IMI 500329, and FMR 10452).

DISCUSSION

Based on both morphological and molecular data, we have proposed and described the new species *Paecilomyces lavendulus*. This species, like *P. lilacinus*, produces vinaceous colonies and two types of phialidic conidiation, one typical of *Paecilomyces* producing conidial chains, and the other is an *Acremonium*-like synanamorph producing conidia in slimy heads. However, *P. lavendulus* differs from *P. lilacinus* by having slightly longer phialides, subglobose with apiculate base or limoniform catenate conidia, by the production of a light-yellow diffusible pigment and by the absence of growth at 35 C. This new species is based on two isolates from very different sources and geographical origins, showing a high sequences similarity (99.9%) for all the genes studied. It is likely that the isolate CBS 940.73, studied by Samson (1974), belongs to this species too. We have not examined that isolate, but the morphological features described for it match those of *P. lavendulus*. In addition, the GenBank ITS sequence of that isolate (AY624190) shows a similarity of 99.2% with those of *P. lavendulus*. We have also noticed that some ITS sequences deposited in the GenBank (HQ832987, EU553286, HM770963, GU827505, HQ832983, and HQ832986) by different authors (Vaughan et al. 2011, Inglis and Tigano-Milani 2006), corresponding to strains isolated from soil, beetle larvae and speleothem surface, could also belong to *P. lavendulus*.

Our data demonstrated a low intraspecific genetic variation in *P. lilacinus* and that, in spite of the presence of two types of conidia in *P. nostocoides*, such species and *P. lilacinus* are conspecific. The similarity of the ITS sequences of the two species had already been reported previously by Van Schooneveld et al. (2007).

As mentioned above, some authors have molecularly related *Isaria takamizusanensis* and *Nomuraea atypicola* with *P. lilacinus* (Luangsa-ard et al. 2004, Sung et al. 2007a, Johnson et al. 2009); however, the *EF-1 α* , and *rpb1* sequences of those species deposited in GenBank are

very different from those of *P. lavendulus*. All those species have purple to vinaceous colonies, but *I. takamizusanensis* (Kobayasi, 1941) differs from *P. lavendulus* by having smaller conidiophores (65–110 µm long) and larger conidia (2.5–4 x 1.4–1.8 µm). *Nomuraea atypicola* is easily differentiated from *P. lavendulus* by its phialides with very short or absent necks. From the phylogenetic trees shown in this study, *Haptocillium* spp. were the closest taxa to *P. lilacinus* and *P. lavendulus*. However, *Haptocillium* spp. never have purple or vinaceous colonies, instead they are whitish to cream, their conidia are arranged in slimy heads or in short chains and the phialides have a thick-walled collarette (Zare and Gams 2001, Glockling and Holbrook 2005). According to our results, *P. lavendulus* belongs, together with *Haptocillium* spp and *P. lilacinus*, to the family Ophiocordycipitaceae (Sung et al. 2007a). The other species of *Paecilomyces* with purple to pink colonies are placed in the Clavicipitaceae (Sung et al. 2007a, Johnson et al. 2009), very far from *P. lilacinus* and *P. lavendulus*. Domsch et al. (2007) proposed the invalidly published genus *Paecillium* to include *P. lilacinus*. Our molecular data also suggest the proposal of a new genus which should also include *P. lavendulus*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (The Netherlands) and Japan Collection of Microorganisms (Japan) for supplying many of the strains used in the study. In addition, we are grateful to D.A. Sutton, Hugo Madrid, Isabel Pujol, Patricio Godoy, Claudia Hartung, and Sofia Mata-Essayag for providing some isolates and soil samples. This project was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, grants CGL 2008-04226/BOS and CGL 2009-08698/BOS.

LITERATURE CITED

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.

Cano J, Sagués M, Barrio E, Vidal P, Castañeda, RF, Gené J, Guarro J. 2002. Molecular taxonomy of *Aphanoascus* and description of two new species from soil. *Stud Mycol* 47: 153–164.

Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17: 540–552.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 2007. Compendium of soil fungi. 2nd ed. Eching: IHW Verlag. 322–323 p.

Dunn M. 1983. *Paecilomyces nostocoides*, a new hyphomycete isolated from cysts of *Heterodea zaeae*. *Mycologia* 75: 179–182.

Fiedler Z, Sosnowska D. 2007. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *BioControl* 52: 547–558.

Glockling L, Holbrook GP. 2005. Endoparasites of soil nematodes and rotifers II. The genus *Haptocillium*. *Mycologist* 19: 2–9.

Inglis P, Tigano-Milani M. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genet Mol Biol* 29: 132–136.

Johnson D, Sung G-H, Hywel-Jones NL, Luangsa-ard JJ, Bischoff JF, Kepler RM, Spatafora, JW. 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycol Res* 113: 279–289.

Kobayasi Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. Sci Rep Tokyo Bunrika Daig, Sect B 5: 53–260.

Kornerup A, Wanscher JH. 1978. Methuen handbook of colour. 3rd ed. London: Eyre Methuen. 252 p.

Lott ME, Sheehan DJ, Davis LS. 2007. *Paecilomyces lilacinus* infection with a sporotrichoid pattern in a renal transplant patient. J Drugs Dermatol 6: 436–439.

Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Manoch L, Samson R. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. Mycol Res 109: 581–589.

Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Samson R. 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. Mycologia 96: 773–780.

Oborník M, Jirku M, Dolezel D. 2001. Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic? Can J Microbiol 47: 813–819.

Okada G, Sakai N, Yamagishi, M. 1995. *Acremonium*-like submerged conidiation in *Paecilomyces nostocoides* and *P. lilacinus*. Mycoscience 36: 345–351.

Ounissi M, Abderrahim E, Trabelsi S, Khaled S, Bezzine H, Ben Hamida F, Hedri H, Ben Abdallah T, Ben Maïz H, Kheder A. 2009. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* after kidney transplantation. Transplant Proc 41: 2917–2919.

Pastor FJ, Guarro J. 2006. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. Clin Microbiol Infect 12: 948–960.

- Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J. 2011. Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *J Clin Microbiol* 49: 243–256.
- Samsom R. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud Mycol* 6: 1–119.
- Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shreshtha B, Spatafora JW. 2007a. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57: 5–59.
- Sung G-H, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW. 2007b. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Mol Phylogenet Evol* 44: 1204–1223.
- Swofford DL. 2002. PAUP*; Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), v 4.0. Sunderland, MA: Sinauer.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 1997. *Nucleic Acids Res* 24: 4876–4882.
- Tigano-Milani MS, Carneiro RG, Defaria MR, Frazao HS, McCoy CW. 1995b. Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *P. lilacinus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Tylenchidae). *Biol Control* 5: 378–382.

Tigano-Milani MS, Samson R, Martins I, Sobral B. 1995a. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology* 141: 239–245.

Van Schooneveld T, Freifeld A, Lesiak B, Sutton DA, Iwen PC. 2007. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 10: 117–122.

Vaughan MJ, Maier RM, Prior BM. 2011. Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *IJS* 40: 65–77.

Wessolossky M, Haran, JP, Bagchi K. 2008. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 3: 354–357.

Yokoyama E, Arakawa M, Yamagishi K, Hara A. 2006. Phylogenetic and structural analyses of themating-type loci in Clavicipitaceae. *FEMS Microbiol Lett* 264: 182–191.

Yokohama E, Yamagishi K, Hara A. 2004. Development of a PCR-based mating-type assay for Clavicipitaceae. *FEMS Microbiol Lett* 237: 205–212.

Zare R, Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* sect. prostata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen nova. *Nova Hedwigia* 73: 1–50.

Zongqi L, Yanfeng H, Jiandong L, Xiao Z. 2007. *Paecilomyces purpureus* sp. nov., a new entomogenous fungal species from China. *Mycotaxon* 101: 271–278.

Table I. Species, source code and sequences of the isolates included in the study

Species	Isolates	Source	GenBank accession no.				
			ITS	D1D2	EF-1 α	rpb1	rpb2
<i>Haptocillium balanoides</i>	CBS 250.82 ^T	Nematode, Canada	AJ292414*	AF339539*	DQ522342*	DQ522388*	DQ522442*
<i>Haptocillium campanulatum</i>	CBS 101240 ^T	Nematode excretions, England	AJ292416*				
<i>Haptocillium sinense</i>	CBS 282.90	Nematode, Rolde, Netherlands	AJ292415*				
	CBS 567.95 ^T	Nematode, China	AJ292417*	AF339545*	DQ522343*	DQ522389*	DQ522443*
<i>Haptocillium sphaerosporum</i>	CBS 522.80 ^T	<i>Ditylenchus triformis</i> , Münster, Germany	AJ 292413*				
<i>Haptocillium zeosporum</i>	CBS 335.80 ^T	Nematode from soil, Iraq	AJ292419*	AF339540*	EF469062*	EF469091*	EF469109*
<i>Isaria amoenerosea</i>	CBS 107.73 ^T	Pupa of coleoptera, Ghana	AY624168*				
<i>Isaria cateniannulata</i>	CBS 152.83	Coleoptera, Guishon, China,	AY624172*				
<i>Isaria cateniobliqua</i>	CBS 153.83	<i>Adoxophyes privatana</i> , Guishon, China	AY624173*				
<i>Isaria coleopterorum</i>	CBS 110.73	Pupa of coleoptera, Ghana	AY624177*				
<i>Isaria farinosa</i>	CBS 240.32	Pupa of lepidoptera, Netherlands	AY624178*				
	CBS 262.58 ^T	Garden soil, Middlesex, England	AY624179*				
<i>Isaria fumosorosea</i>	CBS 107.10	Unknown, France	AY624184*				
	CBS 244.31 ^T	Butter, Cork, Ireland	AY624182*				
	CBS 375.70	Food, Japan	AY624183*				
<i>Isaria ghanensis</i>	CBS 105.73 ^T	Pupa of lepidoptera, Ghana	AY624185*				
<i>Isaria javanica</i>	CBS 134.22 ^T	<i>Stephanoderis hampei</i> , Java, Indonesia	AY624186*				
	CBS 994.73	<i>Lepidopterous cocoon</i> , Tafo, Ghana	AY624187*				
<i>Isaria tenuipes</i>	CBS 997.73	Larva of lepidoptera, Netherlands	AY624195*				
<i>Paecilomyces carneus</i>	CBS 239.32 ^T	Dune sand, Coteaux de Vauville, France	AY624171*				
	CBS 399.59	Soil, Georgia, USA	AY624170*				
<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	CBS 398.86	<i>Syzygium jambos</i> , Soroa, Cuba	AY624174*				
<i>Paecilomyces gunnii</i>	G845-19 ^a	Yunnan, China	AJ309343*				
	G97011 ^a	Yunnan, China	AJ309339*				
<i>Paecilomyces hawkesii</i>	B96010 ^a	Larvae of <i>Oxycanus</i> , Jiangxi, China	AJ309342*				
<i>Paecilomyces lavendulus</i>	CBS 128677 ^T	Soil, Caracas, Venezuela	FR734106	FR775489	FR775516	FR775512	FR775538
	CBS 128678	Bronchial wash, Reus, Spain	FR734107	FR775490	FR775517	FR775513	FR775539

TABLE I. (cont.)

Species	Isolates	Source	GenBank accession no.				
			ITS	D1D2	<i>EF-1α</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	CBS 284.36 ^T	Soil, New York, USA	FR734101	FR775484	FR734156	FR775507	FR775533
	CBS 431.87	Meloidogyne eggs, Philippines	AY624188*	EF468844*	EF468791*	EF468897*	EF468940*
	FMR 7231	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR734085	FR775468	FR734140	FR775491	FR775518
	FMR 8244	Nematode eggs, Amposta, Spain	FR832488				
	FMR 8249	Nematode eggs, Amposta, Spain	FR832489				
	FMR 8250	Nematode eggs, Amposta, Spain	FR734086	FR775469	FR734141	FR775492	FR775519
	FMR 8251	Nematode, Amposta, Spain	FR734087	FR775470	FR734142	FR775493	FR775520
	FMR 8253	Nematode, Amposta, Spain	FR734088	FR775471	FR734143	FR775494	FR775521
	FMR 8254	Nematode eggs, Amposta, Spain	FR832490				
	FMR 8255	Nematode eggs, Amposta, Spain	FR832491				
	FMR 8648	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR734089	FR775472	FR734144	FR775495	FR775522
	FMR 8650	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR832492				
	FMR 8651	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR832493				
	FMR 8652	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR734090	FR775473	FR734145	FR775496	FR775523
	FMR 8654	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR832494				
	FMR 8656	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR832495				
	FMR 8657	Keratitis, Sao Paulo, Brazil	FR832496				
	FMR 8747	Vitreous humor, Sao Paulo, Brazil	FR734091	FR775474	FR734146	FR775497	FR775524
	FMR 10040	Soil, Iraq	FR734092	FR775475	FR734147	FR775498	FR775525
	FMR 10041	Soil, Cuba	FR734093	FR775476	FR734148	FR775499	FR775526
	FMR 10068	Soil, Nsukka, Nigeria	FR734094	FR775477	FR734149	FR775500	FR775527
	FMR 10069	Soil, La Palma, Spain	FR734095	FR775478	FR734150	FR775501	FR775528
	FMR 10096	Soil, La Palma, Spain	FR734096	FR775479	FR734151	FR775502	FR775529
	FMR 10276	Soil, Nsukka, Nigeria	FR832497				
	FMR 10277	Soil, Nsukka, Nigeria	FR832498				
	FMR 10374	Soil, Cueva del Guacharo, Venezuela	FR734097	FR775480	FR734152	FR775503	FR775530
	FMR 10380	Soil, Reus, Spain	FR734102	FR775485	FR734157	FR775508	FR775534

TABLE I. (cont.)

Species	Isolates	Source	GenBank accession no.				
			ITS	D1D2	EF-1 α	rpb1	rpb2
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	JCM 8437 (^T <i>P. nostocoides</i>)	<i>Heterodera zaeae</i> , Kent County, USA	FR734103	FR775486	FR734158	FR775509	FR775535
	JCM 8438 (received as <i>P. nostocoides</i>)	<i>Heterodera zaeae</i> , Kent County, USA	FR734105	FR775488	FR775515	FR775511	FR775537
	JCM 8372 (received as <i>P. nostocoides</i>)	Litter, Sado Island, Japan	FR734104	FR775487	FR775514	FR775510	FR775536
	UTHSC 08-3504	Unknown, Utah, USA	FR734098	FR775481	FR734153	FR775504	FR775531
	UTHSC 95-1315	Scalp, USA	FR734099	FR775482	FR734154	FR775505	FR775532
	UTHSC 95-736	Sputum, USA	FR734100	FR775483	FR734155	FR775506	
<i>Paecilomyces marquandii</i>	CBS 182.27 ^T	Soil, Iowa, USA	AY624193*	EF468845*	EF468793*	EF468899*	EF468942*
<i>Paecilomyces niphedodes</i>	CBS 229.73 ^T	Wood, Netherlands	AY624191*				
	CBS 364.76	Soil, Gran Canaria, Spain	AY624192*				
<i>Paecilomyces penicillatus</i>	CBS 448.69	Decaying <i>Agaricus bisporus</i> , Belgium	AY624194*				
<i>Paecilomyces purpureus</i>	GZUIFR-GZSL-5 ^a	Larva of lepidoptera, Guiyang, China	EF640809*				
<i>Paecilomyces viridis</i>	CBS 348.65 ^T	<i>Chamaeleo lateralis</i> , Madagascar	AY624197*				
<i>Phialemonium obovatum</i>	CBS 279.76 ^T	Systemic infection, USA	AB278187*				

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; FMR, Culture Collection, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; JCM, Japan Collection of Microorganisms, Hirosawa, Wako, Saitama, Japan; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA; ^a Institute of Fungus Resources, Guizhou University. * Sequences retrieved from GenBank database. ^T Type strain.

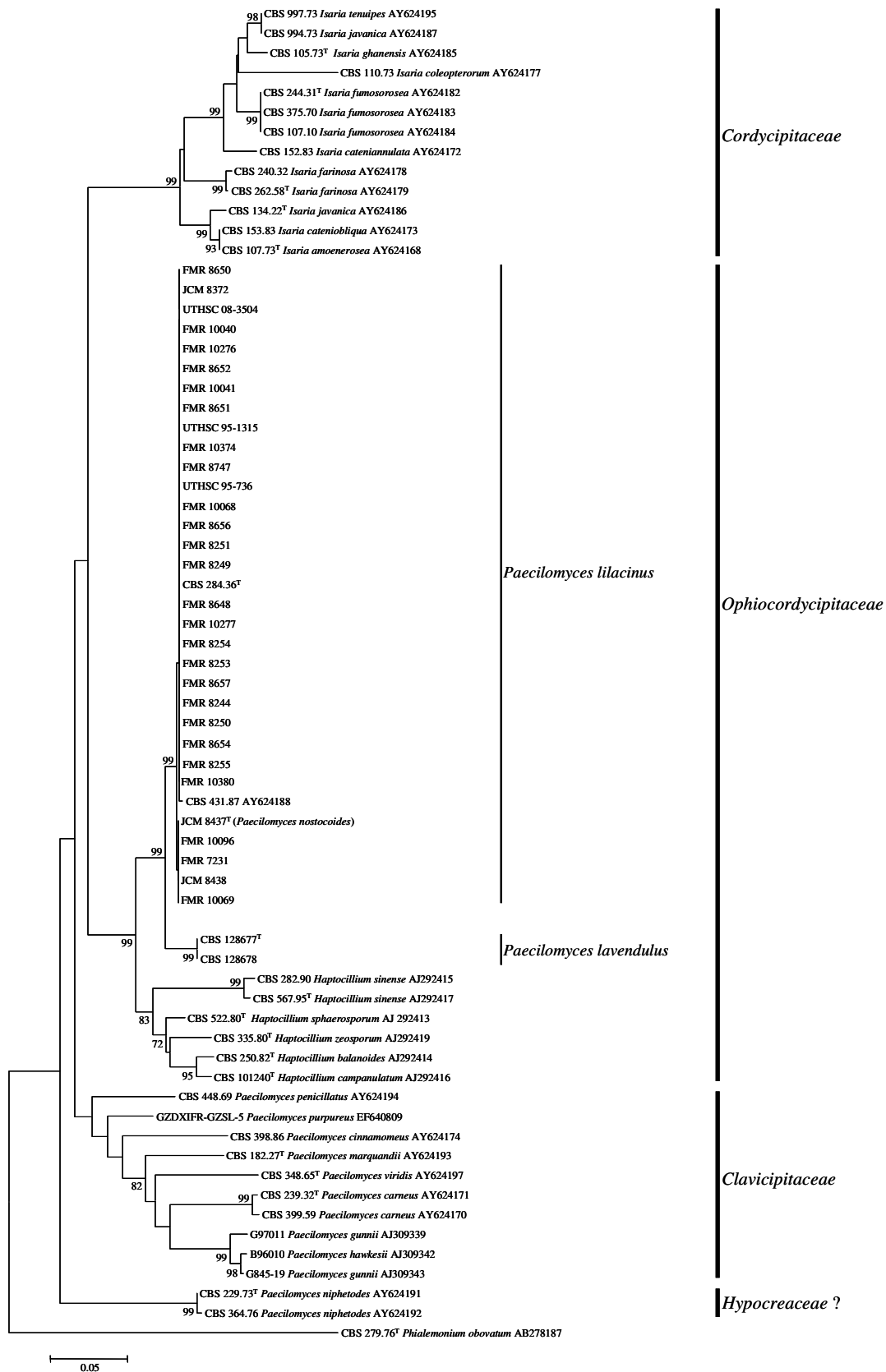


FIG. 1. Neighbor-joining tree inferred from the ribosomal ITS region sequences of the isolates included in the Table I. Branch lengths are proportional to distance. Bootstrap support above 70% are indicated at the nodes. The type strain of *Phialemonium obovatum* (CBS 279.76) was used as outgroup. Sequences retrieved from the GenBank are indicated by their accession numbers. ^T Type strain.

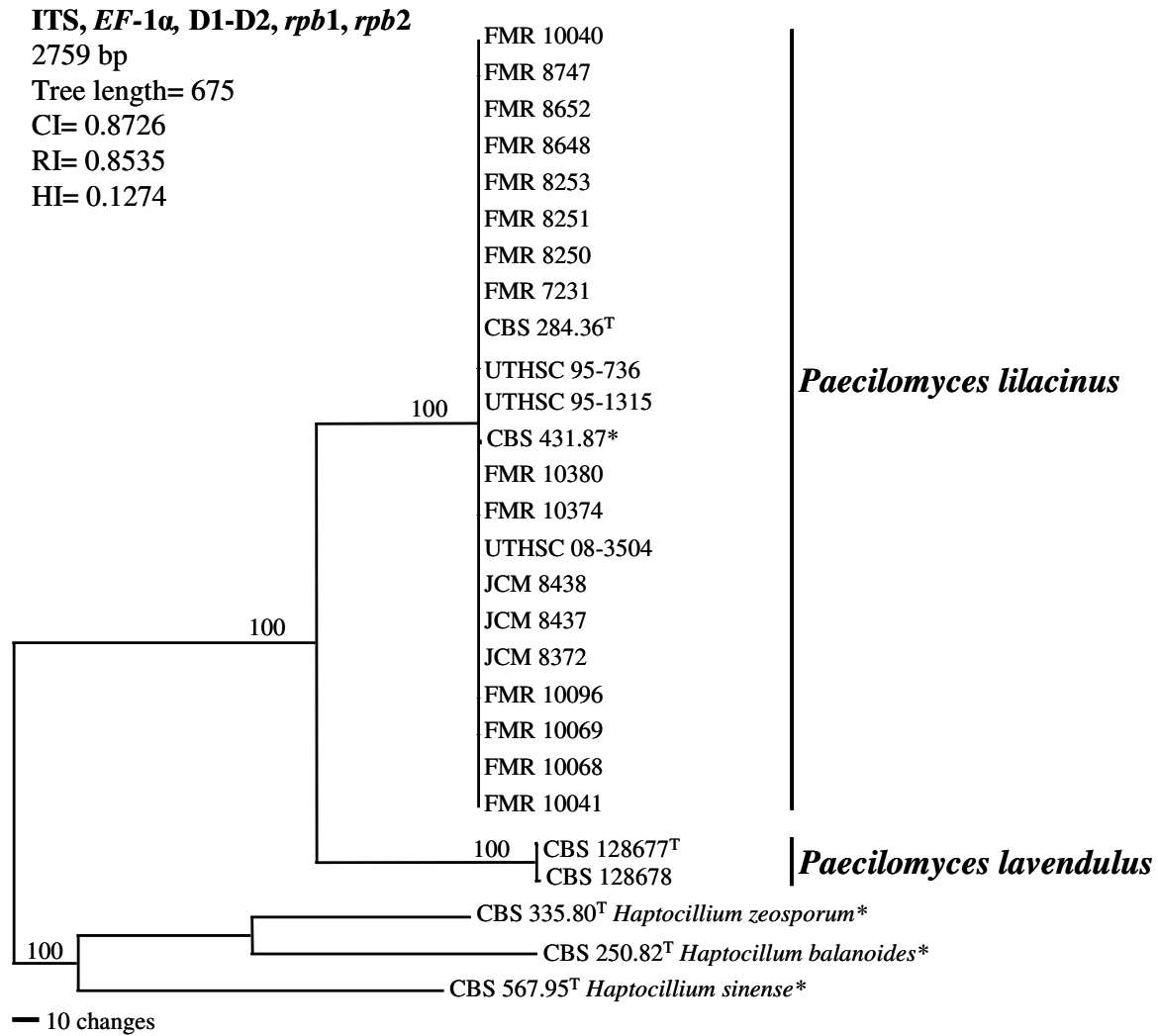


FIG. 2. One of the two most parsimonious trees inferred from heuristic search based on analysis produced from the combined data set. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. Sequences of *Haptocillium zeosporum*, *H. balanoides*, and *H. sinense* were chosen as outgroup. GenBank accession numbers for sequences included in this analysis are listed in Table I. ^T Type strain, * sequences retrieved from GenBank.

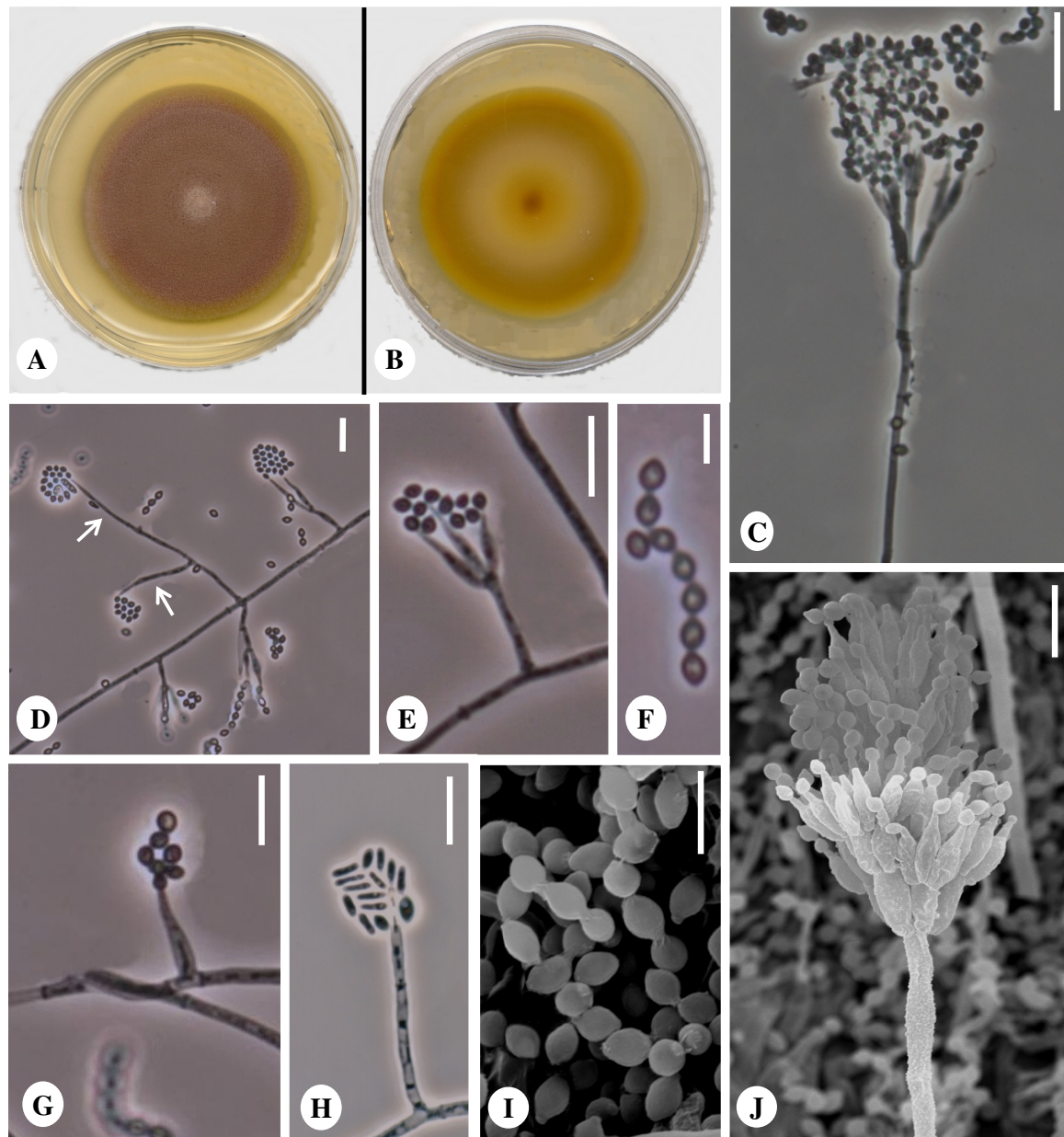


FIG. 3. *Paecilomyces lavendulus* CBS 128677. (A, B) Colony surface and reverse on MEA after 14 days of incubation at 25°C. (C, J) Long conidiophores. (D) Short conidiophores of *Paecilomyces* and those of the *Acremonium*-like synanamorph (arrows) borne from the same hypha. (E) Short conidiophore. (F, I) Catenate conidia. (G) Solitary phialide producing catenate conidia. (H) Solitary phialide of the *Acremonium*-like synanamorph. Scale bars: C= 20µm; D, E, G,H,J= 10 µm; F,I= 5 µm.

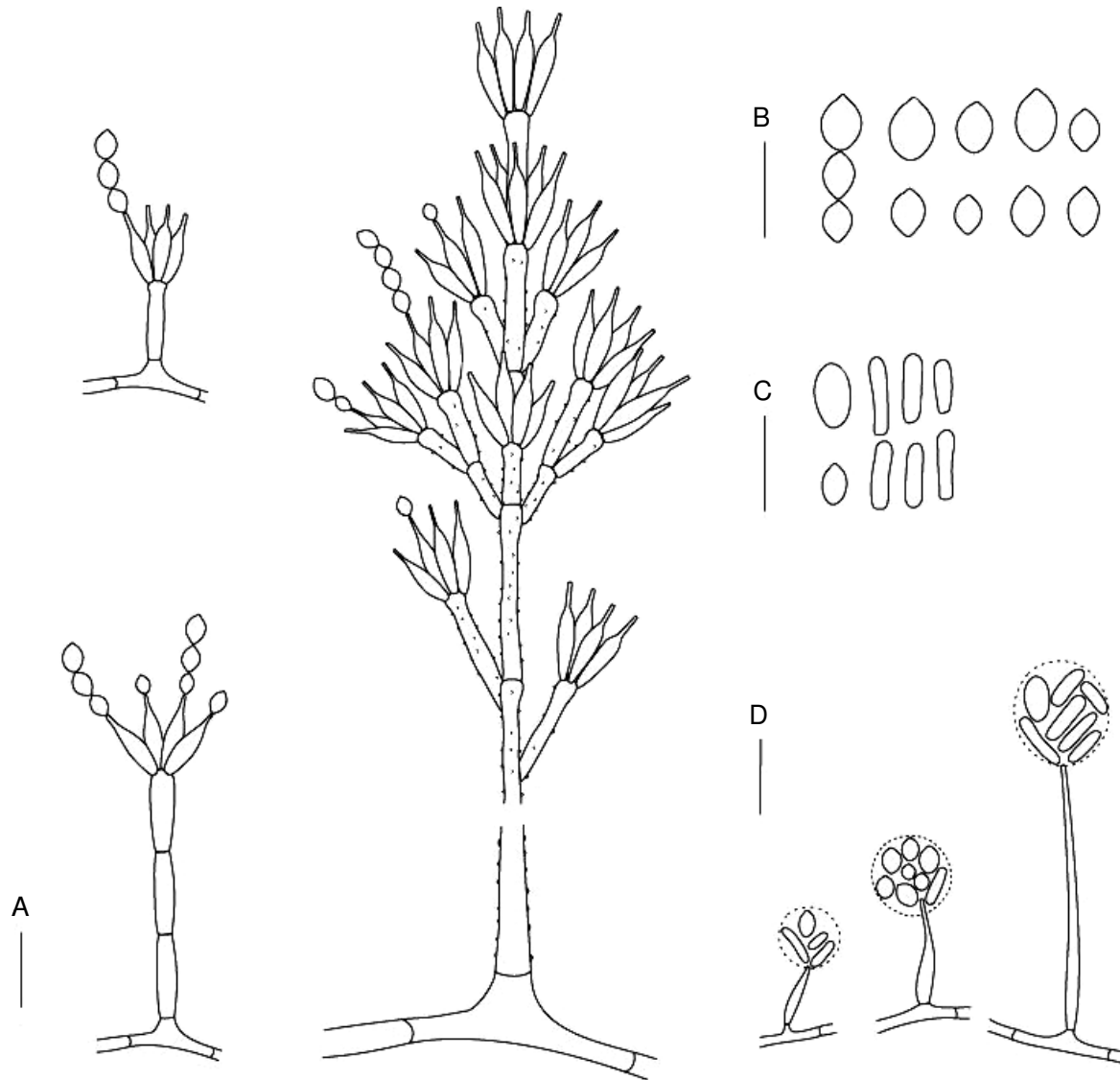


FIG. 4. *Paecilomyces lavendulus* CBS 128677. (A, B) Short and long branched conidiophores, and conidia. (B, D) Conidiophores and conidia of the *Acremonium*-like synanamorph. Scale bars: A, D= 10 μ m; B, C= 5 μ m.

DISCUSIÓN GENERAL

5.1. Métodos moleculares destinados a la tipificación de *Scedosporium* spp.

En los últimos años se ha registrado un considerable incremento en el número de infecciones fúngicas en el hombre causadas por especies oportunistas, habiendo adquirido una especial importancia las escedosporiosis, infecciones causadas por especies del género anamórfico *Scedosporium*. Tal es el caso de *S. aurantiacum* y *S. prolificans*, dos especies de importancia epidemiológica para España y Australia, ya que, tal y como se ha mencionado anteriormente (apartado 1.4.1.2.), son hongos altamente resistentes a los tratamientos antifúngicos convencionales (Cortez *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2010b), por lo que la tasa de mortalidad por casos de escedosporiosis es muy elevada en dichos países.

La importancia epidemiológica que presentan estas dos especies ha justificado su inclusión en estudios de tipificación con la finalidad de determinar cuales son las posibles fuentes de infección, el modo de transmisión y la relación de los diferentes alelos con una determinada región geográfica, tipo de infección y/o localización de la misma y grado de sensibilidad a los diferentes antifúngicos. Actualmente, se disponen de algunos trabajos que tratan de dilucidar algunos aspectos; por ejemplo se conoce que las especies motivo de estudio son más frecuentes en áreas industriales y zonas urbanas, que en aquellas áreas con ausencia de actividad humana (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010a). Además, se ha demostrado experimentalmente que la virulencia potencial de *S. aurantiacum* es similar a la de *S. prolificans* e incluso que dicha virulencia puede ser cepa-específica, aunque no se ha encontrado asociación entre virulencia y el contexto clínico (enfermedad invasiva o colonización) (Harun *et al.*, 2010b).

A pesar de estos datos, son muchas las incógnitas que quedan por resolver sobre la epidemiología de estos hongos. Por esa razón, la *Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut* conjuntamente con el *Molecular Mycology Research Laboratory, The University of Sydney Western*, se plantearon como objetivo común revisar las principales métodos moleculares destinadas a la tipificación de especies de *Scedosporium*, concretamente *S. aurantiacum* y *S. prolificans*, con el fin de seleccionar la metodología más adecuada, es decir, aquella que proporcione un mayor poder discriminatorio entre cepas de una misma especie, y que sea reproducible entre laboratorios.

Para ello, se analizó toda la literatura referente a la tipificación de las especies de *Scedosporium* y se establecieron ventajas y desventajas. Este análisis bibliográfico reveló que los métodos que han demostrado tener un mayor poder de discriminación para la tipificación de estas especies son: el RAPD (San Millan *et al.*, 1997; Ruiz-Diez *et al.* 1997; Zouhair *et al.*, 2001; Defontaine *et al.*, 2002), la huella genética o PCR *fingerprinting* (Ruiz-Diez *et al.* 1997; Rainer *et al.*, 2000; Delhaes *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2010b), el ISSR-PCR (Solé *et al.*, 2003) y el AFLP (Delhaes *et al.*, 2008). No obstante, al contrastar el grado de variabilidad genética

obtenido en estos estudios observamos discordancias, incluso contradicciones al usar metodologías diferentes. Mediante la PCR *fingerprinting* de los minisatélites M13 de *S. prolificans*, Delhaes *et al.* (2008) encontraron elevados porcentajes de variabilidad intraespecífica (45%), mientras que San Millan *et al.* (1997) y Ruiz-Diez *et al.* (1997), mediante RAPD, encontraron que la variabilidad entre los aislados de esta especie era baja. Estos resultados discordantes podrían ser debidos, además de las diferentes metodologías empleadas, al uso de distintos marcadores y, principalmente a que el análisis se efectuó a partir de un número reducido y no representativo de cepas. Además de lo expuesto, se debe mencionar que estos métodos presentan diversas desventajas, entre las cuales podemos mencionar la baja reproducibilidad inter-laboratorio y la elevada dificultad en su estandarización, lo cual impide comparar resultados e intercambiar datos entre los laboratorios (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003).

Con la finalidad de realizar un análisis epidemiológico global de las especies *S. aurantiacum* y *S. prolificans*, es necesario superar los problemas de reproducibilidad entre laboratorios inherentes a las técnicas de tipificación antes mencionadas. El sistema de tipificado mediante MLST, basado en el análisis de secuencias (400-500 pb) de 5 a 10 genes, generalmente *housekeeping*, ha demostrado ser altamente reproducible y discriminatorio para una serie de hongos patógenos humanos como *Aspergillus fumigatus* (Bain *et al.*, 2007), *Candida albicans* (Bougnoux *et al.*, 2003), *Candida glabrata* (Dodgson *et al.*, 2003), *Candida krusei* (Jacobsen *et al.*, 2007), *Candida tropicalis* (Tavanti *et al.*, 2005), *Coccidioides immitis* (Koufopanou *et al.*, 1997), *Cryptococcus neoformans* var. *gatii* (Halliday *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Litvintseva *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2009), *Fusarium solani* (Debourgogne *et al.*, 2010) e *Histoplasma capsulatum* (Kasuga *et al.*, 1999). Otra ventaja del MLST es el uso de secuencias del ADN, debido a que estas se determinan con una tecnología automatizada, sin necesidad de interpretaciones subjetivas de datos, los resultados generados pueden ser archivados y distribuidos electrónicamente facilitando la comparación de los mismos entre laboratorios, y ello permite realizar fácilmente estudios poblacionales (Bougnoux *et al.*, 2002; Dodgson *et al.*, 2003; Taylor y Fisher, 2003; Maiden, 2006; Gil-Lamaignere *et al.*, 2003). Debido a las desventajas presentadas por los métodos antes mencionados y teniendo en cuenta la experiencia de otros grupos de investigación con otras especies fúngicas, consideramos que el MLST podría ser el método de elección definitivo para la caracterización de los aislados de las especies *S. aurantiacum* y *S. prolificans*. Para comprobar la viabilidad del MLST en dichas especies, se seleccionaron 12 cepas de *S. aurantiacum* y 12 de *S. prolificans* (ver apartado 3.1.1., Tabla 4), aisladas de diversos sustratos y procedentes de diversas áreas geográficas (Australia, España, Francia y los Estados Unidos), los cuales representaban además los diferentes perfiles de cepas (cepas idénticas, estrechamente relacionadas y no relacionadas) obtenidos a partir de análisis previos (PCR *fingerprinting* y AFLP). Para la selección de los genes a ensayar, se analizaron los

trabajos de filogenia y variabilidad genética disponibles para las especies de *Scedosporium* motivo de estudio (Williamson *et al.*, 2001; Gilgado *et al.*, 2005; Rainer y De Hoog, 2006; Tintelnot *et al.*, 2009), además de aquellos utilizados en esquemas MLST para otros hongos filamentosos, tales como *Aspergillus* spp. (Bain *et al.*, 2007), *Fusarium* spp. (O'Donnell *et al.*, 2009), *Penicillium marneffeii* (Lasker, 2006), incluso se analizaron genes utilizados en MLST de especies de *Candida* (Dodgson *et al.*, 2003; Tavanti *et al.*, 2005; Jacobsen *et al.*, 2007).

En base a los análisis anteriormente mencionados, se seleccionaron un total de 10 genes para *S. aurantiacum* y 26 genes para *S. prolificans*, con la finalidad de evaluar el número de nucleótidos polimórficos simples (SNPs) presente en cada uno de dichos genes y para cada una de las cepas seleccionadas. Los resultados han revelado que de los 10 genes ensayados, sólo seis (*ACT*, *EF-1 α* , *SOD2*, *CAL*, *TUB* y *rpb2*) presentaron suficiente variabilidad para integrar el panel final de genes del estudio MLST de *S. aurantiacum* (ver apartado 4.1.1., Tabla 6). En el caso de *S. prolificans* se ensayaron un mayor número de genes, dado que encontramos pequeñas cantidades de SNPs en los primeros 10 genes seleccionados (ver apartado 4.1.1., Tabla 6), hasta el punto que sólo disponemos de tres genes (*CHS*, *EF-1 α* y *TUB*), como posibles candidato para integrar el panel final de genes en el estudio MLST de este hongo. Esta baja variabilidad observada en los genes estudiados de *S. prolificans* coincide con Tintelnot *et al.* (2009), quienes analizaron molecularmente el *18S*, *ITS* y *28S* del DNAr, además del *EF-1 α* y *CHS* de 35 aislados clínicos procedentes de Alemania, Australia, Bélgica, España, Estados Unidos y Reino Unido. Estos autores no encontraron variabilidad en los tres primeros genes mencionados, mientras que en *EF-1 α* y *CHS* encontraron dos y un genotipo diferentes, respectivamente.

En resumen, podemos decir que la primera fase en el diseño de una estrategia de tipificación mediante MLST para *S. aurantiacum*, se ha culminado satisfactoriamente, ya que actualmente disponemos de 6 genes con alto poder discriminatorio para las cepas de esta especie. Los siguientes pasos en la consolidación de este esquema, consistirán en la amplificación y secuenciación de los genes seleccionados para el grupo total de aislados previamente escogidos. Posteriormente, identificaríamos las secuencias tipos (ST) obtenidas. Estas ST serán publicadas en bases de datos como PubMLST, para que otros laboratorios puedan comparar sus secuencias con aquellas generadas en este estudio, y a su vez depositar las secuencias de las cepas que presenten ST distintas a las disponibles. Además, se intentará correlacionar las ST generadas en este estudio con el grado de virulencia o la sensibilidad frente a los antifúngicos de las cepas respectivas.

Y por último cabe destacar que la presente tesis ha contribuido en determinar 3 de los 6 ó 7 genes que constituirán el panel final de genes para el estudio MLST de *S. prolificans*, aunque todavía se deben estudiar más *loci* con la finalidad de encontrar marcadores que proporcionen la variabilidad necesaria para poder realizar estudios de tipificación de esta especie.

5.2. Estudio morfológico y molecular de *Acremonium* spp. de importancia clínica

El género *Acremonium* comprende aproximadamente 150 especies, de las cuales sólo unas pocas han sido involucradas hasta la fecha en infecciones humanas (ver Tabla 1, apartado 1.4.2.). Las revisiones realizadas por Fincher *et al.* (1991), Guarro *et al.* (1997), Summerbell (2003) y Das *et al.* (2010) señalan a *A. kiliense* y *A. strictum* como las especies más frecuentes en clínica. En menor número, *A. alabamense* Morgan-Jones, *A. atrogriseum* (Panas.) W. Gams, *A. blochii* (Matr.) W. Gams, *A. potronii* Vuill., *A. recifei* (Leão & Lôbo) W. Gams y *A. roseogriseum* (S.B. Saksena) W. Gams también se han descrito como causantes de micosis. No obstante, un gran porcentaje de los casos publicados limitan la identificación del agente causal sólo a nivel de género.

Los estudios existentes acerca de la identificación molecular y taxonómica de las especies de este género son escasos e incluyen pocos aislados clínicos (Glenn *et al.*, 1996; Novicki *et al.*, 2003). Además, el elevado número de casos publicados de *Acremonium* sin una identificación específica pone de manifiesto la escasa información existente sobre la incidencia en clínica de las especies de dicho género. Éstas fueron por tanto las razones principales por las cuales escogimos a este género de hongos patógenos como tema principal de nuestra tesis. El problema más importante para desarrollar dicho estudio fue reunir un número importante de aislados clínicos ya fueran de un mismo territorio o de diversas zonas geográficas. En este sentido tuvimos la oportunidad de colaborar con el *Fungus Testing Laboratory* de la Universidad de Texas de los Estados Unidos (UTHSC), laboratorio que había reunido en el período 2002–2010 un total de 119 aislados clínicos procedentes de diferentes hospitales del país. Dichos aislados habían sido previamente identificados como *Acremonium* spp., atendiendo principalmente a criterios morfológicos. Algunos fueron identificados por los propios laboratorios remitentes, mientras que otros por el mismo personal del UTHSC. Todos esos aislados fueron remitidos a nuestro laboratorio para confirmar su identificación y, a su vez, intentar correlacionar los resultados de la identificación morfológica frente a la identificación molecular de los mismos.

Nuestro estudio morfológico reveló que del total de aislados examinados, sólo 75 pertenecían a *Acremonium*. El resto de aislados (44) fueron identificados como cepas de *Fusarium*, *Phaeoacremonium*, *Verticillium*, *Phialemonium*, entre otros géneros. La identificación errónea por parte de los laboratorios remitentes se explica fácilmente por la escasa diferenciación morfológica que hay entre los miembros de dichos géneros. Estos hongos muestran estructuras asexuales muy simples, las cuales suelen ser monofiálides cilíndricas con un septo basal, y la producción de conidios en cabezas mucosas o cadenas (Seifert *et al.*, 2011). A su vez, la identificación morfológica a nivel de especie de los aislados clínicos de *Acremonium* resultó ser una labor tediosa y compleja de realizar debido principalmente a que las

diferencias entre especies suelen ser muy sutiles e incluso pueden presentar una morfología variable según las condiciones de las propias cepas. Un problema añadido fue el hecho de que la única monografía que recoge las descripciones de la mayoría de las especies de *Acremonium* está en alemán (Gams, 1971), y las especies descritas después de la citada publicación se encuentran dispersas en numerosos artículos, algunos de ellos en revistas de difícil localización.

Para la consecución de uno de los objetivos principales de la presente tesis, y que consistía en conocer el espectro real de las especies de *Acremonium* de interés clínico y sus relaciones filogenéticas, se procedió a la secuenciación de las regiones ITS y del gen 5.8S del ADNr de los 75 aislados clínicos. Un aspecto fundamental para la correcta identificación de dichos aislados fue su comparación, tanto morfológica como molecular, con cepas tipo o de referencia, las cuales se obtuvieron a partir de colecciones de cultivo internacionales.

Nuestro estudio corroboró, aunque con un mayor número de cepas y de diferentes orígenes, los resultados obtenidos en estudios anteriores realizados por Glenn *et al.* (1996) y Zare *et al.* (2007). Dichos autores demostraron que *Acremonium* es un género polifilético, cuyas especies se distribuyen entre los órdenes Sordariales, Hypocreales, Clavicipitales y en la familia Plectosphaerellaceae (*incertae sedis*). Nuestros aislados siguen el mismo patrón de distribución: 67 en Hypocreales, 4 en Sordariales y 4 en Plectosphaeraceae. Sin embargo, cabe destacar que no pudimos reconocer caracteres morfológicos distintivos para cada uno de los tres grandes grupos obtenidos. Nuestro estudio nos permitió además relacionar *A. atrogriseum* con los Sordariales, lo que nos ha servido de base para el desarrollo de posteriores estudios incluidos también en la presente tesis.

Un aspecto importante de este trabajo fue el haber identificado el 67% de los aislados estudiados, un porcentaje de identificación considerablemente elevado si lo comparamos con la literatura consultada (Fincher *et al.*, 1991; Guarro *et al.*, 1997; Summerbell, 2003; Das *et al.*, 2010), siendo por tanto el uso y comparación de secuencias nucleotídicas una poderosa herramienta para la identificación de este tipo de hongos. Sin embargo, por otro lado nuestro estudio molecular reveló que para este género el BLAST es una herramienta limitada ya que existen pocas secuencias de *Acremonium* fiables depositadas en bases de datos públicas como la del GenBank; algunas incluso corresponden a especies mal identificadas, lo cual ha llevado a identificar erróneamente cepas de casos clínicos publicados como el de Novicki *et al.* (2003) y el de Guarro *et al.* (2009). Dichos autores identificaron molecularmente los aislados de ambos casos como *A. strictum*, pero la comparación de sus secuencias con las generadas en nuestro estudio reveló que en realidad pertenecían al complejo *A. sclerotigenum* -*A. egyptiacum* (Perdomo *et al.*, 2011a). Una de las tareas más destacadas de nuestro estudio fue el depósito en el GenBank de secuencias confiables obtenidas de cepas tipo o de referencia o de aislados de *Acremonium* bien identificados. Éstas cuales servirán de referencia para la identificación o

confirmación molecular de aislados, tanto clínicos como ambientales, pertenecientes a un buen número de especies de este género.

Contrariamente a lo que se había indicado hasta el momento (Fincher *et al.*, 1991; Guarro *et al.*, 1997; Summerbell, 2003; Das *et al.*, 2010), nuestro estudio demuestra que existe una gran diversidad de especies de *Acremonium* asociadas a muestras clínicas, incluso especies que como *A. implicatum* (J.C. Gilman & E.V. Abbott) W. Gams, *A. persicinum* (Nicot) W. Gams, *A. fusidioides* (Nicot) W. Gams, *A. glaucum* W. Gams o *A. polychromum* (J.F.H. Beyma) W. Gams nunca antes habían sido identificadas en clínica. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con precaución ya que no disponemos de datos suficientes que permitan demostrar el papel real de dichas cepas en las infecciones de donde se aislaron. La especie identificada con mayor frecuencia entre nuestras cepas fue *A. kiliense* y ninguna de ellas se identificó como *A. strictum*, lo que pone en entredicho el papel de esta especie en clínica, tal y como ya habían indicado anteriormente otros autores (Guarro *et al.*, 1997; De Hoog *et al.*, 2000). Sin embargo, cabe destacar que la morfología de esta última especie es muy confusa. En nuestro estudio morfológico identificamos a 14 aislados como *A. strictum*, no obstante, la secuencia de ninguno de ellos coincidió con la de la especie tipo, la mayoría se incluyeron en el complejo *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum*, e incluso algunas se quedaron sin identificar. Estos resultados nos indican que todavía queda mucho que hacer para resolver la taxonomía de *Acremonium* y de muchas de sus especies. En este sentido, recientemente Summerbell *et al.* (2011), en un trabajo posterior a nuestro artículo, han dilucidado algunas de las incógnitas que surgieron durante el desarrollo de nuestra investigación. Dichos autores, a través del análisis de 200 secuencias pertenecientes a diferentes especies de *Acremonium* y géneros relacionados, han redefinido la especie tipo del género, designando la cepa CBS 407.66 como epítipo de *A. alternatum*, la cual está filogenéticamente relacionada con el grupo *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum*, y a su vez han transferido diversas especies de *Acremonium* a otros géneros, algunos de ellos sinonimizados por Gams (1971) en su monografía sobre el género. Los cambios taxonómicos se concretan en el reconocimiento de:

- *Gliomastix* Guég.: *G. murorum* (Corda) S. Hughes, *G. masseei* (Sacc.) Matsush., *G. polychroma* (J.F.H. Beyma) Matsush. (identificado en nuestro estudio como *A. polychromum*), *G. roseogrisea* (S.B. Saksena) Summerbell y *G. tumulicola* (Kiyuna, An, Kigawa & Sugiy.) Summerbell.
- *Sarocladium* W. Gams & D. Hawksw.: *S. oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw., *S. bacillisporum* (Onions & Barron) Summerbell, *S. bactrocephalum* (W. Gams) Summerbell, *S. ochraceum* (Onions & Barron) Summerbell, *S. strictum* (W. Gams) Summerbell, *S. glaucum* (W. Gams) Summerbell, *S. kiliense* (Grütz) Summerbell, *S. zae* (W. Gams & D.R. Sumner) Summerbell

(identificado en nuestro estudio como *A. glaucum*, *A. kiliense* y *A. zeae*, respectivamente).

- *Trichothecium* Link: *T. roseum* (Pers.) Link, *T. crotocinigenum* (Scholarz) Summerbell, Seifert, & Schroers, *T. indicum* (Arx, Mukerji & N. Singh) Summerbell, Seifert, & Schroers, *T. ovallisporum* (Seifert & Rehner) Seifert & Rehner y *T. sympodiale* Summerbell, Seifert, & Schroers.

A pesar de este avance sobre la taxonomía de *Acremonium*, todavía es mucho el trabajo que queda por hacer, como la determinación de caracteres morfológicos que permitan identificar correctamente muchas de las especies de este género o la propuesta de otros géneros especialmente de todas aquellas especies que se encuentran filogenéticamente alejadas de la especie tipo (*A. alternatum*), o incluso la caracterización de nuevas especies, objetivos a desarrollar en futuras investigaciones de nuestro grupo.

5.3. Caracterización morfológica y molecular de especies de *Phialemonium*, *Lecythophora* y hongos relacionados

En el transcurso del trabajo sobre la caracterización de aislados clínicos de *Acremonium* recibidos del laboratorio de San Antonio (Perdomo *et al.*, 2011a) pudimos constatar la dificultad existente en distinguir cepas pertenecientes a otros géneros morfológicamente similares a *Acremonium*, como son: *Phialemonium* y *Lecythophora*, ambos géneros también de importancia médica. En este sentido por tanto, nuestro siguiente propósito fue centrarnos en el estudio de cepas de origen clínico pertenecientes a *Phialemonium* y *Lecythophora* con el objeto de identificar, caracterizar e incluso intentar dilucidar la taxonomía de ambos géneros dado el creciente impacto en clínica de algunas de sus especies.

Para este estudio recibimos del UTHSC 68 aislados clínicos presuntivamente identificados como pertenecientes a ambos géneros. Sin embargo, nuestras identificaciones morfológicas revelaron que 32 aislados pertenecían al género *Phialemonium*, 20 a *Lecythophora*, 6 a *Cephalotheca*, 1 a *Coniochaeta*, 5 a *Acremonium* y 4 a *Phaeoacremonium*, poniendo de nuevo de manifiesto las dificultades que tienen los microbiólogos clínicos en distinguir todos estos géneros. En relación a la identificación de especies, tanto morfológica como molecular a partir del análisis de los dominios D1-D2 del ADNr, obtuvimos que *Phialemonium obovatum* (n=14) era la especie más frecuentemente identificada entre los aislados clínicos, seguido de *P. curvatum* (n=12), *Lecythophora hoffmannii* (n=8), *L. mutabilis* (n=5) y *C. foveolata* (n=6), aunque cabe destacar que 12 de ellos (6 de *Phialemonium* y 6 de *Lecythophora*) no pudieron ser identificados a nivel específico dado que presentaban características morfológicas distintas a las descritas para las especies conocidas de ambos géneros. Estas cifras nos indican, tal y como era de esperar según datos bibliográficos, que en

clínica *Phialemonium* es más prevalente que *Lecythophora*. Sin embargo, a diferencia de lo indicado por Rivero *et al.* (2009) en su revisión sobre infecciones por *Phialemonium*, nuestros datos indican que *P. obovatum* es mucho más frecuente de lo que está registrado en clínica y que, a pesar de que no podemos relacionar directamente las cepas estudiadas con infecciones, muchos de los especímenes clínicos de donde se aislaron procedían de micosis sistémicas. Por lo que podemos sospechar que esta especie está infravalorada en clínica y que muy bien podría tratarse de un patógeno emergente, sin embargo sólo la correcta identificación y publicación de los futuros casos clínicos podrán demostrarlo.

Además de los resultados mencionados, nuestro análisis molecular permitió corroborar que *P. curvatum* y *P. dimorphosporum* son la misma especie, tal y como Guarro *et al.* (1999b) habían señalado hace ya unos años. Nuestro estudio también confirmó los resultados de Yaguchi *et al.* (2006), quienes sugirieron que *P. curvatum* se encontraba filogenéticamente separada de la especie tipo del género, *P. obovatum*. Al incluir un número importante de aislados clínicos, conjuntamente con cepas tipos y/o de referencia, pudimos constatar que *Phialemonium* era polifilético; mientras que *P. obovatum* se relacionó con la familia Cephalothecaceae (Sordariales) (Yaguchi *et al.*, 2006), *P. curvatum* se agrupó con especies de géneros teleomórficos (*Linocarpon* y *Neolinocarpon*) *incertae sedis*, tanto a nivel de familia como de orden. Este interesante hallazgo nos sugirió que *P. curvatum* podía considerarse un género distinto a *Phialemonium*. Sin embargo, estos datos sólo representaban resultados preliminares ya que era necesario un estudio más extenso, tanto morfológico como molecular, para tratar de confirmar la hipótesis planteada. Otro dato interesante a destacar fue el encontrar cinco aislados genéticamente relacionados con *P. curvatum* y uno relacionado con *P. obovatum*, que presentaban algunos caracteres morfológicos distintos a los de las especies de *Phialemonium* indicadas, tales como presencia de conidiomas o largas cadenas de conidios globosos, y que podrían representar nuevas especies para la ciencia.

De nuestro estudio no sólo se deja constancia de la relación anamorfo-teleomorfo entre *Phialemonium* y *Cephalotheca*, tal y como ya habían indicado Yaguchi *et al.* (2006), sino también de la prevalencia de *C. foveolata* como posible agente de infecciones micóticas. Cabe recordar que ésta es una especie que se describió como nueva en el 2006 a partir de una cepa aislada de una lesión subcutánea y en nuestro estudio se ha identificado un total de 6 aislados, en este caso procedentes de endocraditis, nódulos linfáticos, fluido bronquial y de lesiones oculares.

Referente a los aislados clínicos de *Lecythophora*, pudimos constatar por un lado la relación de este género anamórfico con el teleomorfo *Coniochaeta*, asociación ya demostrada anteriormente por otros autores (Weber *et al.*, 2002; Huhndorf *et al.*, 2004; Damm *et al.* 2010), y por otro, que las especies más frecuentemente identificadas entre dichos aislados correspondían a *L. hoffmannii* y *L. mutabilis*, las mismas que hasta la fecha se han publicado

como de mayor importancia en clínica (Pierach *et al.*, 1973; Ahmad *et al.* 1985; Marriott *et al.*, 1997; Padhye *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2004; Drees *et al.*, 2007; Taniguchi *et al.* 2009) (ver apartado 1.4.4.2). Cabe destacar que además identificamos una cepa, procedente de una lesión de perro, como *Coniochaeta prunicola*, una especie recientemente descrita por Damm *et al.* (2010), con *Lecythophora* como anamorfo, a partir de necrosis en madera de *Prunus* spp. (Damm *et al.*, 2010). Si bien, la implicación de la cepa en el caso clínico no se pudo probar, sin duda es otra especie que deberíamos tener en cuenta a la hora de identificar las especies de *Lecythophora* involucradas en procesos infecciosos. Pero el abanico de especies de *Lecythophora* identificadas en este estudio no termina aquí; como se indicó anteriormente (Perdomo *et al.*, 2011b), un total de 6 aislados se identificaron como *Lecythophora* sp. 1–4 y que, al igual que en *Phialemonium*, son potenciales nuevas especies que requieren un estudio más extenso para poder ser descritas como tal.

A consecuencia del interés taxonómico surgido de los resultados obtenidos en este primer trabajo, nos propusimos dilucidar la taxonomía del género *Phialemonium* y, en la medida de lo posible, caracterizar las posibles nuevas especies previamente detectadas en *Phialemonium* y *Lecythophora*, mediante un estudio polifásico que incluyera un análisis multilocus (dominios D1-D2, ITS, ACT, y TUB) y un exhaustivo estudio fenotípico de dichas cepas, así como de cepas tipo o de referencia de especies relacionadas o morfológicamente similares. En este sentido, decidimos incluir para este estudio, además de todas las especies aceptadas en ambos géneros, a *Acremonium atrogriseum* pues en el estudio que llevamos a cabo sobre *Acremonium* habíamos detectado que estaba relacionado con *P. obovatum*, hecho confirmado por Summerbell *et al.* (2011) quienes la incluyeron en la familia Cephalothecaceae; a *Paecilomyces inflatus*, recientemente sinonimizada como *Taifanglania inflata* (Burnside) Z.Q. Liang, Y.F. Han & H.L. Chu (Liang *et al.*, 2009) y relacionada molecularmente con los Sordariales por Luangsa-ard *et al.* (2004); y por último a *Sarcopodium oculorum* Gené & Guarro. La inclusión de esta última especie se fundamentó en las semejanzas morfológicas de *S. oculorum* con algunas cepas identificadas como *Phialemonium* sp 1.

El estudio polifásico nos ha permitido caracterizar el nuevo género *Phialemoniopsis*, en el cual se han incluido a *P. ocularis* (= *Sarcopodium oculorum*) como especie tipo, además de *P. curvatum* (= *Phialemonium curvatum*) y dos nuevas especies, *P. cornearis* y *P. lacunosa*. Este nuevo género se diferencia de *Phialemonium* por desarrollar fiálides y adelofiálides con collaretes y diferentes tipos de conidios: unos similares a sinemas, otros a esporodoquios y otros similares a picnidios, que se abren irregularmente dejando la masa de conidios sobre su superficie, además de desarrollar formas intermedias de los conidios mencionados. El conjunto de todas estas estructuras han sido también descritas en otros géneros tales como *Chaetomella* Fuckel y *Cornucopiella* Höhn (Sutton, 1980). Sin embargo, la textura de la pared de los conidios en ambos géneros (textura angularis y porrecta, respectivamente) los

diferencia claramente de los conidios observados en *Phialemoniopsis*. Las especies de este nuevo género se diferencian entre sí por la textura de la pared del conidioma picnidial y por la morfología de los conidios. *Phialemoniopsis cornearis* desarrolla conidios picnidiales con paredes de textura intrincata y conidios obovoides, los de *P. plurilocunosa* son multiloculares, paredes con textura epidermoidea y conidios elipsoidales y en *P. ocularis* observamos conidios con dos tipos de textura, intrincata y epidermoidea, y conidios elipsoidales o ligeramente alantoideos. A diferencia con estas especies, *P. curvata* desarrolla sólo conidios tipo esporoquial.

Si bien este estudio nos ha permitido delimitar claramente el nuevo género así como todas sus especies, todavía quedan algunas dudas por resolver, como la relación anamorfo-teleomorfo entre *Phialemoniopsis* y algunas especies *Linocarpon* y *Neolinocarpon*, concretamente *L. livistonae* (Henn.) K.D. Hyde, *N. globosicarpum* K.D. Hyde y *N. enshiense* K.D. Hyde (Hyde *et al.*, 1998), incluso queda por dilucidar la posición taxonómica (familia y orden) en que se encuentra este nuevo género. Actualmente los datos disponibles sobre este grupo de hongos son escasos y ambiguos. Recientemente, Huhndorf y Millar (2011) han estudiado un amplio número de especies de *Linocarpon* y demostraron que dicho género es polifilético. Precisamente las especies de *Linocarpon* relacionadas con *Phialemoniopsis* son *incertae sedis* entre los Sordariomycetes, lejos además de la especie tipo del género, *L. pandani* Syd. & P. Syd, lo que muy bien nos sugiere que dichas especies podrían constituir otro género de ascomicetes. No obstante, es necesaria la realización de un estudio más extenso con muchas más cepas para esclarecer la taxonomía y las relaciones filogenéticas de todos estos hongos.

Otro importante resultado de la presente tesis ha sido demostrar que *A. atrogriseum* y *Taifanglania inflata* se encuentran filogenéticamente relacionados con *Phialemonium*, y que morfológicamente presentan algunas características en común con *P. obovatum*, lo que nos ha permitido transferirlos a dicho género, como *Phialemonium atrogriseum* y *Phialemonium inflatus*. Además, con este estudio hemos confirmado que el aislado FMR 10390 previamente identificado como *Phialemonium* sp. 2 (Perdomo *et al.* 2011b), es diferente al resto de las especies del género, por lo que se ha propuesto con el nombre de *P. globosum*. Estos resultados nos han conducido a enmendar la descripción del género *Phialemonium*, cuyas características morfológicas más destacadas son la presencia de fiálides y adelofialides de base inflada, con o sin collarete, y conidios que pueden disponerse en cabezas mucosas o en largas cadenas persistentes debido a la presencia de conexiones entre los mismos. En géneros como *Sagenomella* W. Gams, la presencia de cadenas persistentes con conexiones es un criterio taxonómico de peso que caracteriza al género (Gams, 1978). Sin embargo, de acuerdo con los resultados moleculares obtenidos en nuestro estudio, no parece tener el mismo valor para *Phialemonium*. Para poder demostrar el verdadero valor taxonómico de dicho carácter, se deberían comparar molecularmente no sólo especies de *Sagenomella*, sino también de otros

géneros anamórficos con esta característica y que nunca han sido estudiados a este nivel como *Monocillium* S. B. Saksena, *Septofusidium* W. Gams, *Thysanophora* W.B. Kendr. o incluso algunas especies de *Paecilomyces* (Seifert *et al.*, 2011)

Finalmente, en este estudio polifásico hemos podido demostrar que de las 4 posibles nuevas especies de *Lecythophora* sp. detectadas en el trabajo anterior (Perdomo *et al.*, 2011b), sólo dos cepas, las identificadas como *Lecythophora* sp. 1, han podido ser caracterizadas y propuestas como nuevas, *L. luteo-rubra* y *L. cateniformis*. A pesar que el género *Lecythophora* está bien delimitado y es relativamente fácil distinguir sus especies, debido a que los caracteres morfológicos que presentaban las cepas identificadas como *Lecythophora* sp. 2-4 no eran suficientemente discriminatorios respecto a los del resto de especies del género y al hecho de que sólo disponíamos de un aislado para cada una de ellas, consideramos oportuno no realizar la propuesta de nuevos taxones hasta conseguir más datos con el estudio de nuevos aislados.

5.4. Diversidad genética de aislados de *Paecilomyces lilacinus*

Paecilomyces lilacinus es una especie de importancia en clínica involucrada, tal y como se ha indicado en la introducción, en una gran diversidad de micosis en humanos y animales (Summerbel, 2003; Pastor y Guarro, 2006). Esta especie se caracteriza por presentar colonias de tonos rosa a vináceos, con conidióforos portadores de fiálides de base hinchada que se adelgazan hacia el ápice formando un cuello delgado y largo, las cuales producen conidios de elipsoidales a fusiforme dispuestos en largas cadenas. Dicha especie, a su vez, desarrolla un sinanamorfo similar a *Acremonium*, caracterizado por fiálides cilíndricas que producen conidios agregados en cabezas mucosas. Otra especie morfológicamente similar y genéticamente relacionada con *P. lilacinus* es *P. nostocoides*, la cual se diferencia por formar dos tipos de conidios en una misma cadena, unos de elipsoidales a fusiformes y otros de globosos a subglobosos de mayor tamaño. Estos hongos se ubican en la familia Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) y se encuentran alejados filogenéticamente de otras especies de *Paecilomyces* que forman colonias de color rosa a púrpura (Luangsa-ard *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2007). No obstante, aparecen molecularmente relacionados con especies de otros géneros, como *Cordyceps gunnii*, *Haptocillium balanoides* (Drechsler) Zare & W. Gams, *H. sinense* (K.Q. Zhang, L. Cao & Z.Q. Liang) Zare & W. Gams y *H. zeosporum* (Drechsler) Zare & W. Gams, *Isaria takamizusanensis* Kobayasi y *Nomuraea atypicola* (Luangsa-ard *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2009).

Hasta la fecha se creía que *P. lilacinus* era una especie bien delimitada, pero en la literatura existían datos contradictorios; mientras que en algunos trabajos se describía que era una especie con una elevada variabilidad genética (Tigano-Milani *et al.*, 1995b; Inglis y Tigano-Milani, 2006), sugiriendo la existencia de especies crípticas, en Tigano-Milani *et al.* (1995a) se

indicaba todo lo contrario. El pequeño número de aislados estudiados en todos ellos y los resultados contradictorios obtenidos en los mismos, nos motivó a iniciar un estudio fenotípico y molecular de 34 aislados (tanto clínicos como ambientales) procedentes de diferentes zonas geográficas, presumiblemente identificados como *P. lilacinus* y *P. nostocoides*, con la finalidad de determinar la variabilidad intraespecífica de dichas especies y las relaciones filogenéticas entre ellas y otras especies morfológicamente similares. Para ello, se secuenciaron y analizaron las regiones del ITS de todos esos aislados y de las cepas tipo y de referencia de ambas especies. En base a los resultados de este primer análisis se seleccionaron una serie de aislados, representativos de cada uno de los grupos formados a los cuales se les aplicó un análisis multilocus de cinco genes (ITS, D1-D2, *EF-1 α* , *rpb1* y *rpb2*), con el objeto de poder confirmar las diferencias genéticas observadas en la región ITS.

En el análisis de los ITS los aislados quedaron agrupados en dos clados, el primero correspondía a aquellos identificados como *P. lilacinus* y *P. nostocoides*, mientras que el otro grupo correspondía a dos aislados que mostraban caracteres diferentes al resto de *Paecilomyces*. Cabe destacar que ambos clados se relacionaban filogenéticamente con especies del género *Haptocillium* dentro de la familia Ophiocordycipitaceae (Sung *et al.*, 2007a). Asimismo, el análisis multilocus de los cinco genes nos permitió confirmar que *P. lilacinus* y *P. nostocoides* son la misma especie, y que por tanto la presencia de dos tipos de conidios no representaban un carácter taxonómico distintivo de especie, tal y como ya se había apuntado en trabajos previos (Van Schooneveld *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2006). Sin embargo, caracteres morfológicos como la ausencia de crecimiento a 35°C, la formación de un pigmento difusible color amarillo y la producción de conidios de limoniformes a subglobosos con una base ligeramente apiculada, nos han permitido diferenciar las dos cepas del segundo clado y proponer la nueva especie *P. lavendulus*.

Paecilomyces lilacinus y *P. lavendulus* quedarían por tanto incluidos en la familia Ophiocordycipitaceae, no obstante su relación con especies cercanas todavía es incierta. En este sentido, diversos estudios han relacionado *Nomuraea atypicola* e *Isaria takamizusanensis* con *P. lilacinus* (Luangsa-ard *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2007; Jonson *et al.*, 2009). Sin embargo, será difícil llegar a alguna conclusión pues dichas especies carecen de cepa tipo, incluso en el caso de *I. takamizusanensis* no existen cepas disponibles en las diversas colecciones internacionales. Esperemos en un futuro próximo poder reunir cepas de especies relacionadas con *P. lilacinus* y *P. lavendulus* y, siguiendo la propuesta de Domsch *et al.* (2007), proponer como válido el género *Paecillium*, al menos para las dos especies de *Paecilomyces* estudiadas en la presente tesis.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio comparativo sobre diferentes métodos para la tipificación molecular de *Scedosporium prolificans* y *Scedosporium aurantiacum*, se extraen las siguientes conclusiones:

1. El sistema basado en la secuenciación multilocus (MLST) se presenta como la mejor metodología debido a su capacidad de discriminación y reproducibilidad.
2. Los genes que codifican para el factor de elongación 1α , la actina, la tubulina, la calmodulina, el ARN polimerasa II sub-unidad B y el manganeso superóxido dismutasa han mostrado ser altamente eficaces para la tipificación de *S. aurantiacum*, por lo tanto, se han seleccionado para conformar el panel final que definirá el sistema MLST para este hongo.
3. Se han obtenido pocos alelos entre los fragmentos de genes ensayados para *S. prolificans*. Sólo se dispone de la quitina sintasa, el factor de elongación 1α y la tubulina, como posibles candidatos para el sistema MLST para este hongo.

Se ha establecido el espectro de las especies de *Acremonium* asociadas a muestras clínicas procedentes de diferentes hospitales de los Estados Unidos, correlacionando los resultados obtenidos mediante técnicas morfológicas y moleculares. De dicho estudio se concluye que:

1. De los 115 aislados clínicos analizados, 75 se han identificado como *Acremonium*, el resto de los aislados se comprobó que pertenecían a otros géneros.
2. Las especies predominantes han sido: *Acremonium kiliense*, cepas del complejo *A. sclerotigenum*-*A. egyptiacum*, *A. implicatum*, *A. persicinum* y *A. atrogriseum*.
3. Es de destacar la identificación de un número significativo de aislados clínicos, pertenecientes a especies nunca antes diagnosticadas como responsables de infecciones, como *A. fusidioides*, *A. glaucum*, *A. implicatum*, *A. persicinum*, *A. polychromum* y *A. zae*.
4. El estudio molecular confirma que los aislados clínicos identificados como *Acremonium* están distribuidos entre los Hypocreales, Sordariales y la familia Plectosphaerellaceae (*incertae sedis*), siendo *A. atrogriseum* la única especie identificada que se relaciona con los Sordariales.

Se ha establecido mediante un estudio polifásico el espectro de especies de *Phialemonium* y *Lecythophora* asociados a muestras clínicas procedentes de diferentes hospitales de los Estados Unidos. De dichos estudios se extraen las siguientes conclusiones:

1. De los 68 aislados clínicos estudiados, 32 se han identificado como pertenecientes al género *Phialemonium*, 20 a *Lecythophora*, 6 a *Cephalotheca foveolata* y 1 a *Coniochaeta prunicola*; los nueve aislados restantes pertenecen a géneros diferentes.
2. Las especies más frecuentemente identificadas entre los aislados clínicos estudiados han sido, por orden decreciente: *Phialemonium obovatum*, *Phialemonium curvatum*, *Lecythophora hoffmannii*, *Cephalotheca foveolata* y *Lecythophora mutabilis*.
3. La región D1-D2 del 28S ADNr nos ha permitido corroborar que el género *Phialemonium* es polifilético, que *Phialemonium curvatum* y *P. dimorphosporum* representan la misma especie y que algunos clados de *Phialemonium* y de *Lecythophora* constituyen linajes que pueden representar nuevos taxones para la ciencia.
4. La combinación de un estudio multilocus, basado en el análisis de cuatro *loci* (regiones D1-D2 del 28S, ITS, actina, y tubulina), con el estudio fenotípico de las cepas clínicas nos ha permitido realizar las siguientes propuestas taxonómicas:
 - 4.1. Proponer el nuevo género *Phialemoniopsis*.
 - 4.2. Transferir *Sarcopodium oculorum* y *Phialemonium curvatum* al género *Phialemoniopsis*, y *Acremonium atrogriseum* y *Taifanglania inflata* al género *Phialemonium*.
 - 4.3. Proponer las siguientes nuevas especies: *Phialemoniopsis cornearis*, *Phialemoniopsis pluriloculosa*, *Phialemonium globosum*, *Lecythophora luteo-rubra* y *Lecythophora cateniformis*.

El estudio polifásico aplicado a cepas de *Paecilomyces lilacinus* y especies relacionadas nos han permitido:

1. Confirmar que *Paecilomyces lilacinus* y *Paecilomyces nostocoides* representan la misma especie.
2. Proponer a *Paecilomyces lavendulus* como una nueva especie para la ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad S, Johnson JR, Hillier S, Shelton WR, Rinaldi MG.** 1985. Fungal peritonitis caused by *Lecythophora mutabilis*. J. Clin. Microbiol. 22: 182–186.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M.** 1996. Introductory Mycology. 4th ed. Wiley J and Sons, Inc., New York.
- Anadolu R, Hilmioglu S, Oskay T, Boyvat A, Peksari Y, Gurgey E.** 2001. Indolent *Acremonium strictum* infection in an immunocompetent patient. Int. J. Dermatol. 40: 451–453.
- Armengol J, Sales R, García-Jiménez J.** 1999. Evolución de los daños causados por *Acremonium cucurbitacearum* en raíz de melón en sus primeros estados de desarrollo. Bol. San. Veg. Plagas 25: 265–277.
- Atkins S, Clark IM.** 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. J. Appl. Genet. 45: 3–15.
- Bain J, Tavanti A, Davidson A, Jacobsen M, Shaw D, Gow N, Odds F.** 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 45: 1469–1477.
- Bainier G.** 1907. Mycothèque de l'école de pharmacie XI. *Paecilomyces*, genre nouveau de mucédinées. Bull. Soc. Mycol. Fr. 23: 26–27.
- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti A, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegaki A, Wickes BL.** 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? J. Clin. Microbiol. 47: 877–884.
- Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaguchi T, Varga J, Samson RA.** 2007. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Stud. Mycol. 59: 39–46.
- Basualdo JA, Ciarmela ML, Sarmiento PL, Minvielle MC.** 2000. Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. Parasitol. Res. 86: 854–859.
- Bougnoux M, Morand S, d'Enfert C.** 2002. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 40: 1290–1297.

- Bougnoux M, Tavanti A, Bouchier C, Gow N, Magnier A, Davidson A, Maiden M, d'Enfert C, Odds F.** 2003. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5265–5266.
- Bowman BH, Taylor JW, Brownlee AG, Lee J, White TJ.** 1992. Molecular evolution of the fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* 9: 285–296.
- Brown A, Smith G.** 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 40: 17–89.
- Butler DK, Metzenberg RL.** 1989. Premeiotic change of nucleolus organizer site in *Neurospora*. *Genetics* 122: 783–791.
- Campos Muñiz C, Cuadra T, Rodríguez G, Fernández F.** 2007. Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49: 88–98.
- Carbone I, Kohn L.** 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Casadevall A, Pirofski L.** 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184: 337–344.
- Castellani A, Chalmers AJ.** 1919. *Manual of tropical medicine.* Williams, Wood, and Co., New York.
- Castlebury L, Rossman A, Sung G, Hyten A, Spatafora J.** 2004. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycol. Res.* 108: 864–872.
- Castresana J.** 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540–552.
- Ciarmela ML, Sanchez P, Alvarez HM, Minvielle MC, Basualdo JA.** 2005. Effect of *Paecilomyces lilacinus* on the viability of oncospheres of *Taenia hydatigena*. *Vet. Parasitol.* 131: 61–64.
- Clemons KV, Stevens DA.** 2000. Treatment of orogastrintestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon gamma. *Med. Mycol.* 38: 213–219.

- Conant NF.** 1937. The occurrence of a human pathogenic fungus as a saprophyte in nature. *Mycologia* 29: 597–598.
- Cortez K, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J.** 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 157–197.
- Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor J.** 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94: 814–822.
- Dalton P, Munckhof W, Walters DW.** 2006. *Scedosporium prolificans*: an uncommon cause of septic arthritis. *ANZ J. Surg.* 76: 661–663.
- Damm U, Fourie PH, Crous PW.** 2010. *Coniochaeta (Lecythophora), Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necrosis of *Prunus* trees. *Persoonia* 24: 60–80.
- Damm U, Mostert L, Crous P, Fourie PH.** 2008. Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia* 20: 87–102.
- Das S, Saha R, Dar SA, Ramachandran VG.** 2010. *Acremonium* species: a review of the etiological agents of emerging hyalohyphomycosis. *Mycopathologia* 170: 361–75.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ.** 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands and University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-Audonneau N, De Hoog S, Machouart M.** 2010. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates. *J. Microbiol. Methods.* 82: 319–323.
- Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP.** 2002. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2108–2114.
- Delhaes L, Harun A, Chen S, Nguyen Q, Slavin M, Heath C, Maszewska K, Halliday C, Robert V, Sorrell T, Meyer W.** 2008. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 282–290.

- DeSalle R, Wray C, Absher R.** 1994. Computational problems in molecular systematics. En: Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Ed. B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner, y R. Desalle, Basell: Birkhüdsler Verlag Basel.
- Dion W, Dukes TW.** 1979. Bovine mycotic abortion caused by *Acremonium kiliense*. Sabouraudia 17: 355–361.
- Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ.** 2003. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J. Clin. Microbiol. 41: 5709–5717.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH.** 2007. Compendium of soil fungi, vol. 2. IHW-Verlag, Eching, Germany.
- Dong L, Yang J, Zhang K.** 2007. Cloning and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the facultative pathogen *Paecilomyces lilacinus*. J. Appl. Microbiol. 103: 2476–2488.
- Dong L, Zhang K.** 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant and Soil 288: 31–45.
- Drees M, Wickes BL, Gupta M, Hadley S.** 2007. *Lecythophora mutabilis* prosthetic valve endocarditis in a diabetic patient. Med. Mycol. 45: 463–467.
- Dunn M.** 1983. *Paecilomyces nostocoides*, a new hyphomycete isolated from cysts of *Heterodea zaeae*. Mycologia 75: 179–182.
- Emmons CW.** 1944. *Allescheria boydii* and *Monosporium apiospermum*. Mycologia 36: 188–193.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AC, Bult C.** 1995. Constructing a significance test for incongruence. Syst. Biol. 44: 570–572.
- Feil E, Li B, Aanensen D, Hanage W, Spratt B.** 2004. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 186: 1518–1530.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791.

- Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J.** 2008. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected-patients. *FEMS Yeast Res.* 8: 930–938.
- Figueras MJ, Guarro J.** 1988. A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* 80: 298–306.
- Fincher RE, Fisher JF, Lovell RD, Newman CL, Espinel-Ingroff A, Shadomy HJ.** 1991. Infection due to the fungus *Acremonium (Cephalosporium)*. *Medicine* 70: 398–409.
- Fridkin S, Jarvis W.** 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 499–511.
- Gams W.** 1971. *Cephalosporium*-artige schimmelpilze (hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Gams W.** 1975. *Cephalosporium*-like hyphomycetes: some tropical species. *Trans. Br. mycol. Soc.* 64: 389–404.
- Gams W.** 1978. Connected and disconnected chains of phialoconidia and *Sagenomella* gen. nov. segregated from *Acremonium*. *Persoonia* 10: 97–112.
- Gams W, Hodge T, Samson R, Korf R, Seifert K.** 2005. Proposal to conserve the name *Isaria* (anamorphic fungi) with a conserved type. *Taxon* 54: 537.
- Gams W, McGinnis M.** 1983. *Phialemonium*, a new anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia* 75: 977–987.
- García D.** 2005. Taxonomía de los hongos ascomicetos del suelo. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili.
- Gavin PJ, Sutton DA, Katz BZ.** 2002. Fatal endocarditis caused by the dematiaceous fungus *Phialemonium obovatum*: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2207–2212.
- Geiser D, Pitt J, Taylor J.** 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 388–393.

- Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4930–4942.
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J.** 2008. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 766–771.
- Gilgado F, Gene J, Cano J, Guarro J.** 2010. Heterothalism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med. Mycol.* 48: 122–128.
- Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J.** 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 4211–4213.
- Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Muller FM.** 2003. Molecular typing for fungi – a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 172–185.
- Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT.** 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88: 369–383.
- Guarro J, Gams W, Pujol I, Gené J.** 1997. *Acremonium* species: new emerging opportunists—in vitro antifungal susceptibilities and review. *Clin. Infect. Dis.* 25: 1222–1229.
- Guarro J, Gené J, Stchigel A.** 1999a. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 12: 454–500.
- Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J, Cano J, Barreiro MDC, Aguilar C.** 1999b. *Phialemonium* fungemia: two documented nosocomial cases. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2493–2497.
- Guarro J, Palacios A, Gené J, Cano J, González C.** 2009. A case of colonization of a prosthetic mitral valve by *Acremonium strictum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 26: 146–148.

- Gueho E, De Hoog GS.** 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J. Mycol. Med.* 1: 3–9.
- Halliday C, Carter D.** 2003. Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. *J. Clin. Microbiol.* 41: 703–711.
- Harrison CJ, Langdale JA.** 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.* 45: 561–572.
- Harun A, Gilgado F, Chen S, Meyer W.** 2009a. Environmental isolation of *Scedosporium* species from the greater Sydney region: a link to the emergence of infections in Australia? *Microbiology Australia* 30: 98–101.
- Harun A, Gilgado F, Chen S, Meyer W.** 2010a. Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 48: S70–S76.
- Harun A, Perdomo H, Gilgado F, Chen S, Cano J, Guarro J, Meyer W.** 2009b. Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. *Med. Mycol.* 47: 406–414.
- Harun A, Serena C, Gilgado F, Chen S, Meyer W.** 2010b. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med. Mycol.* 48: S45–S51.
- Hibbett D, Binder M, Bischoff J, Blackwell M, Cannon F, Eriksson O, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin D, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadilowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N.** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycol. Res.* 111: 509–547.

- Hillis DM, Bull JJ.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42: 182–192.
- Hiratsuka Y, Chakravarty P.** 1999. Role of *Phialemonium curvatum* as a potential biological control agent against a blue stain fungus on aspen. *Eur. J. For. Path.* 29: 305–310.
- Hoffmann K, Discher S and Voigt K.** 2007. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladaceae* fam. nov. *Mycol. Res.* 111: 1169–1183.
- Holder M, Lewis P.** 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat. Rev. Genet.* 4: 275–284.
- Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Reiffert M.** 2010. Detection of hyphomycetes in the upper respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01897.x.
- Hughes, SJ.** 1958. Revisiónes hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Can. J. Bot.* 36: 727–836.
- Huhndorf SM, Miller AN.** 2011. A molecular re-appraisal of taxa in the Sordariomycetidae and a new species of *Rimaconus* from New Zealand. *Stud. Mycol.* 68: 203–210.
- Huhndorf SM, Miller AN, Fernandez FA.** 2004. Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia* 96: 368–387.
- Hyde K, Taylor J, Fröhlich J.** 1998. Fungi from palms. XXXIV. The genus *Neolinocarpon* with five new species and one new combination. *Fungal Diversity* 1: 115–131.
- Inglis P, Tigano-Milani M.** 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genet. Mol. Biol.* 29: 132–136.
- Isaia MC, Gams W, Cerruti Sola S.** 2000. Isolation of *Acremonium sclerotigenum* from an ostrich's egg. *Avian Pathol.* 29: 233–235.
- Jacobsen M, Gow N, Maiden M, Shaw D, Odds F.** 2007. Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 45: 317–323.

- Jahn TL.** 1949. How to know the Protozoa. William C. Bown ed. Dubaque, Iowa.
- Johnson D, Sung G, Hywel-Jones N, Luangsa-Ard J, Bischoff J, Kepler R, Spatafora, J.** 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycol Res.* 113: 279–289.
- Kaltseis J, Rainer J, De Hoog G.** 2009. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med. Mycol.* 47: 398–405.
- Kasuga T, Taylor W, White T.** 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 37: 653–663.
- Kendrick B.** 1992. The fifth kingdom. 2nd ed. Focus Information Group, Massachusetts.
- King D, Pasarell L, Dixon DM, McGinnis MR, Merz WG.** 1993. A phaeohyphomycotic cyst and peritonitis caused by *Phialemonium* species and a reevaluation of its taxonomy. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1804–1810.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA.** 2008. Dictionary of Fungi, 10th ed. CABI Publishing, United Kingdom.
- Klaassen CHW.** 2009. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med. Mycol.* 47: S27–S33.
- Knudtson W, Kirkbride C.** 1999. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 181–185.
- Kornerup A, Wanscher JH.** 1984. Methuen Handbook of Colour, 3rd edn. Erye Methuen. London.
- Koufopanou V, Burt A, Taylor J.** 1997. Concordance of genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5478–5482.
- Lasker B.** 2006. Nucleotide sequence-based analysis for determining the molecular epidemiology of *Penicillium marneffei*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3145–3153.

- Liang ZQ, Han YF, Chu HL, Fox RTV.** Studies on the genus *Paecilomyces* in China V. *Taifanglania* gen. nov. for some monophialidic species. *Fungal Diversity* 2009; **34**: 69–77.
- Lin H, Chien C, Huang J.** 2004. Pathogenicity and host range of *Acremonium lactucae* sp. nov., the causal agent of leaf brown spot of lettuce. *Plant Pathology Bulletin* 13: 91–96.
- Litvintseva A, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell T.** 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including an unique population in Botswana. *Genetics* 172: 2223–2238.
- Liu Y, Whelen S, Hall B.** 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1799–1808.
- Luangsa-ard J, Hywel-Jones N, Manoch L, Samson R.** 2005. On the relationship of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* 109: 581–589.
- Luangsa-ard J, Hywel-Jones N, Samson R.** 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia* 96: 773–780.
- Maiden M.** 2006. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 561–588.
- Malloch D.** 1970. New concepts in the Microascaceae illustrated by two new species. *Mycologia* 62: 727–739.
- Malloch D, Salkin IA.** 1984. A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. *Mycotaxon* 21: 247–255.
- Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos M, Guarro J.** 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3251–3256.
- Marriott DJ, Wong KH, Aznar E, Harkness JL, Cooper DA, Muir D.** 1997. *Scytalidium dimidiatum* and *Lecythophora hoffmannii*: unusual causes of fungal infections in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2949–2452.
- Matheny P, Liu Y, Ammirati J, Hall B.** 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms. *Am. J. Bot.* 89: 688–698.

- Melin E, Nannfeldt JA.** 1934. Researches into the Blueing of ground wood-pulp. Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift. 32: 397–616.
- Metzenberg RL, Glass NL.** 1990. Mating and mating strategies in *Neurospora*. Bioessays 12: 53–59.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J.** 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med. Mycol. 12: 1–14.
- Moreau C, Moreau M.** 1949. Quelques Ascomyètes du Congo recueillis par MM. Roger Heim et A. Bachy. Revue de Mycologie, Suppl. colonial 14: 55 – 66.
- Morgan-Jones G, Gams W.** 1982. Notes on hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloe typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. Mycotaxon 15: 311–318.
- Nagy E, Kredics L, Antal Z, Papp T.** 2004. Molecular diagnosis, epidemiology and taxonomy of emerging medically important filamentous fungi. Rev. Med. Microbiol. 15: 153–162.
- Nicholas KB, Nicholas Jr HB, Deerfield II DW.** 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. EMBNET news 4: 1–4.
- Novicki TJ, Geise R, Limaye AP, Lafe K., L. Bui, U. Bui, and B. T. Cookson.** 2003. Genetic diversity among clinical isolates of *Acremonium strictum* determined during an investigation of a fatal mycosis. J. Clin. Microbiol. 41: 2623–2628.
- O'Donnell K, Cigelnik E.** 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol. Phylo. Evol. 7:103–116.
- O'Donnell K, Kistler C, Cigelnik E, Ploetz RC.** 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. PNAS. 95: 2044–2049.
- O'Donnell K, Sutton D, Rinaldi M, Gueidan C, Crous P, Geiser D.** 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members

- of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47: 3851–3861.
- Okada G, Sakai N, Yamagishi M.** 1995. *Acremonium*-like conidiation in *Paecilomyces nostocoides* and *P. lilacinus*. *Mycoscience* 36: 345–351.
- Okada G, Tubaki K.** 1986. Conidiomatal structures of the stilbellaceous and allied fungi. *Sydowia* 39: 148–159.
- Okamura D, Mori Y, Hashimoto T, Hori K.** 2010. Effects of microbial degradation of biofoulants on microfiltration membrane performance in a membrane bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* 44: 8644–8648.
- Oshero A, Schwammenthal E, Kuperstein R, Strahilevitz J, Feinberg M.** 2006. *Phialemonium curvatum* prosthetic valve endocarditis with an unusual echocardiographic presentation. *Echocardiography* 23: 503–505.
- Padhye A, Hall L, Glenn R.** 2002. Deep-seated trichosporonosis in an immunocompetent patient: A case report of uterine trichosporonosis-correction. *Clin. Infect. Dis.* 35: 107–108.
- Park J, Hargreaves JR.** 2004. Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 271–276.
- Pastor FJ, Guarro J.** 2006. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 948–960.
- Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J.** 2011a. Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 49: 243–256.
- Perdomo H, Sutton DA, García D, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Summerbell RC, Rinaldi MG, Guarro J.** 2011b. Molecular and phenotypic characterization of *Phialemonium* and *Lecythophora* isolates from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 49: 1209–1216.
- Pierach CA, Gulmen G, Dhar GJ, Kiser JC.** 1973. Letter: *Phialophora mutabilis* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* 79: 900–901.

- Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara J.** 2008. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - a review. *Med. Mycol.* 47: 387–397.
- Pöggeler S, Kück U.** 2000. Comparative analysis of the mating-type loci from *Neurospora crassa* and *Sordaria macrospora*: identification of novel transcribed ORFs. *Mol. Gen. Genet.* 263: 292–301.
- Proia LA, Hayden MK, Kammeyer P, Ortiz J, Sutton DA, Clark T, Schroers HJ, Summerbell RC.** 2004. *Phialemonium*: an emerging mold pathogen that caused 4 cases of hemodialysis-associated endovascular infection. *Clin. Infect. Dis.* 39: 373–379.
- Rainer J, De Hoog GS.** 2006. Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microascaceae) containing opportunistic agents on humans. *Mycol. Res.* 110: 151–160.
- Rainer J, De Hoog GS, Wedde M, Graser Y, Gilges S.** 2000. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3267–3273.
- Rao C, Pachucki C, Cali S, Santhiraj M, Krankoski K, Noble-Wang J, Leehey D, Popli S, Brandt M, Lindsley M, Fridkin S, Arduino M.** 2009. Contaminated product water as the source of *Phialemonium curvatum* bloodstream infection among patients undergoing hemodialysis. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 30: 840–847.
- Revankar S, Sutton D.** 2010. Melanized fungi in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 884–928.
- Richardson M, Lass-Flörl C.** 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect. Suppl.* 4: 5–24.
- Rivero M, Hidalgo A, Alastruey-Izquierdo A, Cía M, Torroba L, Rodríguez-Tudela JL.** 2009. Infections due to *Phialemonium* species: case report and review. *Med. Mycol.* 47: 766–774.
- Robles J, Koreen L, Park S, Perlin D.** 2004. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2480–2488.

- Rodriguez-Ares T, De Rojas Silva V, Pereiro Ferreiros M, Perez Becerra E, Capeans C, Sanchez M.** 2000. *Acremonium* keratitis in a patient with herpetic neurotrophic corneal disease. *Acta Ophthalmol. Scand.* 78: 107–109.
- Ruiz-Diez B, Martin-Diez F, Rodriguez-Tudela JL, Alvarez M, Martinez-Suarez JV.** 1997. Use of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and PCR fingerprinting for genotyping of a *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) outbreak in four leukaemic patients. *Curr. Microbiol.* 35: 186–190.
- Saccardo PA.** 1911. *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*. Borntragen (Leipzig).
- Saitou N, Imanishi T.** 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6: 514–525.
- Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Sakaeyama S, Sano A, Murata Y, Kamei K, Nishimura K, Hatai K.** 2007. *Lecythophora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med. Mycol.* 45: 267–272.
- Salemi M, Vandamme AM.** 2003. *The phylogenetic Handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Samson R.** 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud. Mycol.* N° 6. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrech, The Netherlands.
- San Millán R, Quindós G, Garaizar J, Salesa R, Guarro J, Portón J.** 1997. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2270–2274.
- Schol-Schwartz MB.** 1970. Revision of the genus *Phialophora* (Moniliales). *Persoonia* 6: 59–94.
- Scott IU, Cruz-Villegas V, Flynn HW, Miller D.** 2004. Delayed-onset, bleb-associated endophthalmitis caused by *Lecythophora mutabilis*. *Am. J. Ophthalmol.* 137: 583–585.

- Seiferk K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B.** 2011. The genera of Hyphomycetes. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Sexton A, Howlett B.** 2006. Parallels between fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryot. Cell.* 5: 1941–1949.
- Shear CL.** 1922. Life history of an undescribed ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. *Mycologia* 14: 239–243.
- Solé M, Cano J, Rodríguez-Tudela J, Sutton D, Perrie R, Gene J, Rodríguez V, Guarro J.** 2003. Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Scedosporium prolificans* by inter-simple-sequence-repeat polymerase chain reaction. *Med. Mycol.* 41: 293–300.
- Sosa ER, Landsberg JH, Kiryu Y, Stephenson CM, Cody TT, Dukeman AK, Wolfe HP, Vandersea MW, Litaker RW.** 2007. Pathogenicity studies with the fungi *Aphanomyces invadans*, *Achlya bisexualis*, and *Phialemonium dimorphosporum*: induction of skin ulcers in striped mullet. *J Aquat Anim Health.* 19: 41–8.
- Sutton BC.** 1980. *The Coelomycetes* (CAB, IMI) Kew Surrey, United Kingdom.
- Strahilevitz J, Rahav G, Schroers HJ, Summerbell RC, Amitai Z, Goldschmied-Reouven A, Rubinstein E, Schwammenthal Y, Feinberg MS, Siegman-Igra Y, Bash E, Polacheck I, Zelazny A, Howard SJ, Cibotaro P, Shovman O, Keller N.** 2005. An outbreak of *Phialemonium* infective endocarditis linked to intracavernous penile injections for the treatment of impotence. *Clin. Infect. Dis.* 40: 781–786.
- Summerbell R.** 2003. Ascomycetes: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix*, *Piedraia* and their relatives. En: Howard, DH (ed.). *Pathogenic fungi in humans and animals*, 2nd ed. Dekker, New York.
- Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, De Hoog GS, Starink M, Arocha Rosete Y, Guarro J, Scott JA.** 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Stud. Mycol.* 68: 139–162.
- Sung G, Hywel-Jones N, Sung J, Luangsa-ard J, Shrestha B, Spatafora J.** 2007a. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59.

- Sung G, Sung J, Hywel-Jones N, Spatafora J.** 2007b. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 1204–1223.
- Swofford DL.** 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Swofford DL, Olsen GJ.** 1990. Phylogeny reconstruction. En: *Molecular Systematics*. Ed. D.M. Hillis y C. Moritz. Sinauer associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Tan T, Ogden A, Tillman J, Demmler G, Rinaldi M.** 1992. *Paecilomyces lilacinus* catheter-related fungemia in an immunocompromised pediatric patient. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2479–2483.
- Taniguchi Y, Taketani T, Moriyama H, Moriki S, Nishimura K, Sato E, Notsu Y, Higuchi T, Sugitani Y, Yasuda K, Nagai A, Yamaguchi S, Masuda J.** 2009. Septic shock induced by *Lecythophora mutabilis* in a patient with mitochondrial encephalomyopathy. *J. Med. Microbiol.* 58: 1255–1258.
- Tavanti A, Davidson A, Johnson E, Maiden M, Shaw D, Gow N, Odds F.** 2005. Multilocus sequence typing for differentiation of strain of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5593–5600.
- Taylor J, Fisher M.** 2003. Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Microbiology* 6: 351–356.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 4876–4882.
- Tigano-Milani MS, Carneiro RG, Defaria MR, Frazao HS, McCoy CW.** 1995a. Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *P. lilacinus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Tylenchidae). *Biol. Control.* 5: 378–382.

- Tigano-Milani MS, Samson R, Martins I, Sobral B.** 1995b. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology* 141: 239–245.
- Tintelnot K, Just-Nübling G, Horr  R, Graf B, Sobottka I, Seibold M, Haas A, Kaben U, De Hoog S.** 2009. A review of German *Scedosporium prolificans* cases from 1993 to 2007. *Med. Mycol.* 47: 351–358.
- Ulloa M, Hanlin R.** 2006. Nuevo diccionario ilustrado de Micología. The American Phytopathological Society, Minnesota.
- Van Beyma FH.** 1937. Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn (Holland). IV. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Abteilung 2 96: 411–432.
- Vanbreuseghem R.** 1952. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 32: 173–178.
- Van Schooneveld T, Freifeld A, Lesiak B, Sutton DA, Iwen PC.** 2007. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis.* 10: 117–122.
- Weber E.** 2002. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex. I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. *Nova Hedwigia* 74: 159–185.
- Weber E, Görke C, Begerow D.** 2002. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex II. Molecular studies based on sequences of the large subunit of ribosomal DNA. *Nova Hedwigia* 74: 187–200.
- Webster J, Weber RWS.** 2009. Introduction to fungi. 3rd ed. Cambridge University press, New York.
- Weinberger M, Mahrshak I, Keller N, Goldscmied-Reuven A, Amariglio N, Kramer M, Tobar A, Samras Z, Pitlik SD, Rinaldi MG, Thompson E, Sutton D.** 2006. Isolated endogenous endophthalmitis due to a sporodochial-forming *Phialemonium curvatum* acquired through intracavernous autoinjections. *Med. Mycol.* 44: 253–259.
- Wengenack N, Binnicker M.** 2009. Fungal molecular diagnostics. *Clin. Chest. Med.* 30: 391–408.

- Westenfeld F, Alston WK, Winn W.** 1996. Complicated soft infection with prepatellar bursitis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host: case report and review. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1559–1562.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications.* Academic press. New York:
- Whittaker RH.** 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163: 150–160.
- Williamson E, Speers D, Arthur I, Harnett G, Ryan G, Inglis T.** 2001. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J. Clin. Microbiol.* 39: 47–50.
- Wood C, Russel-Bell B.** 1983. Characterization of pigmented fungi by melanin staining. *Am. J. Dermatopathol.* 5: 77–81.
- Yaguchi T, Sano A, Yarita K, Suh MK, Nishimura, Udagawa S.** 2006. A new *Cephalotheca* isolate from Korean patient. *Mycotaxon* 96: 309–322.
- Yokoyama E, Arakawa M, Yamagishi K, Hara A.** 2006. Phylogenetic and structural analyses of the mating-type loci in Clavicipitaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* 264: 182–191.
- Yokohama E, Yamagishi K, Hara A.** 2004. Development of a PCR-based mating-type assay for Clavicipitaceae. *FEMS Microbiol. Lett* 237: 205–212.
- Zare R, Gams W, Starink-Willemse M, Summerbell RC.** 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85: 463–489.
- Zayit-Soudry S, Neudorfer M, Barak A, Loewenstein A, Bash E, Siegman-Igra Y.** 2005. Endogenous *Phialemonium curvatum* endophthalmitis. *Am. J. Ophthalmol.* 140: 755–757.
- Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, Cimon B, Symoens F, Halle JN, Deunff J, Bouchara JP.** 2001. Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *J. Med. Microbiol.* 50: 925–932.

TABLA. Aislados y cepas tipo o de referencia incluidas en la presente tesis

Nº aislado/cepa	Origen	Incluida en:
FMR 6641	Espuito humano, Barcelona, España	Apartado 4.1.
FMR 6647	Espuito humano, Barcelona, España	Apartado 4.1.
FMR 6651	Hemocultivo, Barcelona, España	Apartado 4.1.
FMR 6720	Sala de operaciones, Madrid, España	Apartado 4.1.
FMR 6721	Suelo, Barcelona, España	Apartado 4.1.
FMR 7231	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8244	Huevo de nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8249	Huevo de nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8250	Huevo de nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8251	Nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8253	Nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8254	Huevo de nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8255	Huevo de nematodo, Amposta, España	Apartado 4.4.
FMR 8630	Espuito humano, Santiago de Compostela, España	Apartado 4.1.
FMR 8648	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8650	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8651	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8652	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8654	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8656	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8657	Queratitis, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8747	Humor vítreo, Sao Paulo, Brasil	Apartado 4.4.
FMR 8983	Espuito humano, Zaragoza, España	Apartado 4.1.
FMR 8984	Espuito humano, Zaragoza, España	Apartado 4.1.
FMR 10040	Suelo, Desconocido, Iraq	Apartado 4.4.
FMR 10041	Suelo, Desconocido, Cuba	Apartado 4.4.
FMR 10068	Suelo, Nsukka, Nigeria	Apartado 4.4.
FMR 10069	Suelo, La Palma, España	Apartado 4.4.
FMR 10096	Suelo, La Palma, España	Apartado 4.4.
FMR 10276	Suelo, Nsukka, Nigeria	Apartado 4.4.
FMR 10277	Suelo, Nsukka, Nigeria	Apartado 4.4.
FMR 10374	Suelo, Cueva del Guácharo, Venezuela	Apartado 4.4.
FMR 10380	Suelo, Reus, España	Apartado 4.4.
IHEM 15458	Espuito humano, Giens, Francia	Apartado 4.1.
IHEM 15579	Espuito humano, Angers, Francia	Apartado 4.1.
UTHSC 01-1246	Ojo, Louisiana, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 01-1249	Pulmón, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 01-1389	Pulmón, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 01-1399	Absceso, Maryland, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 01-1644	Médula ósea canina, Alabama, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 01-1664	Herida en brazo, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 01-1896	Rodilla, Montana, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 01-194	Sangre, Washington, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 01-20 (1)*	Herida en pierna, Massachusetts, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 01-20 (2)*	Herida en pierna, Massachusetts, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 01-2238	Ojo izquierdo, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 01-317	Injerto de tejido, Washington, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 01-590	Uñas de los pies, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 02-1109	Quiste en dedo, Colorado, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 02-1327	Piel canina, Nueva York, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b

TABLA. Aislados y cepas tipo o de referencia incluidas en la presente tesis (Cont.)

Nº aislado/cepa	Origen	Incluida en:
UTHSC 02-1892	Espuito, Wisconsin	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-1958	Espuito, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-2050	Antebrazo, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 02-2054	Aspirado traqueal, Ohio, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-2429	Fluido traqueal, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-2482	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-2564	Pierna, Alaska, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-2890	Bursitis del olécranon, Wisconsin	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 02-294	Sangre, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 02-875	Sangre, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-1149	Dedo, Pensilvania, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-1890	Osteomielitis canina, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-1930	LBA, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 03-2	Seno, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 03-2258	Brazo, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-2653	Endocarditis, Singapur	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-2933	LBA, Michigan, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 03-3197	Humor vítreo, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 03-3574	Sangre, Virginia, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-3588	Líquido bronquial, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-3661	Seno, Illinois, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 03-986	LBA, Pennsylvania, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-1034	Tejido de pierna derecha, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-1531	Cuero cabelludo, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-2454	Sangre, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-292	Espuito, Colorado, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-3176	LCR, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-3464	Espuito, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-350	Líquido sinovial, Ohio, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 04-60	Pie izquierdo, Wisconsin, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-616	Brazo, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 04-7	Uña del pie, Desconocido, Estados Unidos	Apartado 4.3.2.
UTHSC 04-721	Disco vertebral, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 04-956	Senos, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-104	Desconocido, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-1172	LBA, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-1713	Sangre, Pennsylvania, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-1929	Líquido de la cadera, Louisiana, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-2022	Cuero cabelludo, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-2270	Sangre, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-2310	Ojo, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-2451	LBA, Massachusetts, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-2527	Diálisis peritoneal, Pensilvania, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 05-2926	Orina, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b

TABLA. Aislados y cepas tipo o de referencia incluidas en la presente tesis (Cont.)

Nº aislado/cepa	Origen	Incluida en:
UTHSC 05-3214	Humor vítreo, OR	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 05-3311	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 5-361	LBA, San Antonio, USA	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-541	Herida en pierna, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 05-970	Aorta, Massachusetts, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 06-1277	Uña del pie, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 06-1454	Uña del pie, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-1465	Aspirado pierna, Carolina del Sur, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 06-1476	Cornea derecha, Colorado, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-1664	Humor vítreo, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 06-1820	Cornea, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b.
UTHSC 06-2147	Uña, Washington, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a, b
UTHSC 06-2849	Lavado bronquial, Pennsylvania, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-415	Espudo, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-4324	Líquido pleural canino, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 06-4335	Senos, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-482	Cornea derecha, Virginia, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-528	Uña del pie, Carolina del Sur, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-733	Nodo linfático, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 06-79	Piel de pierna derecha, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-795	Pie, Arkansas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 06-874	Espudo, Hawaii, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-11	LCR, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-110	Hueso, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-1181	Espudo, Hawaii, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-1284	Uña de pie, Carolina del Sur, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-1556	LBA, Carolina del Sur, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-1957	Líquido epidural, Missouri, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-1974	LCR, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-2087	Nódulo linfático, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-2173	Humor vítreo, Nevada, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-2604	Senos, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-2959	Codo, Arkansas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-3260	Hueso, Illinois, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-3446	Lavado bronquial, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-3574	Ojos, Ohio, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 07-3667	Lavado bronquial, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a, b
UTHSC 07-3736	Mano izquierda, USA	Apartado 4.3.2.
UTHSC 07-3739	Uña de pie, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 07-550	Sangre, Arkansas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a

TABLA. Aislados y cepas tipo o de referencia incluidas en la presente tesis (Cont.)

Nº aislado/cepa	Origen	Incluida en:
UTHSC 07-646	Sangre, Florida, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-1028	Uña, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-1188	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-1239	Orina canina, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-1455	Lavado bronquial, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-185	Uña, PA, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-2284	Uña de pie, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-2292	Sangre, Utah, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b.
UTHSC 08-2569	Líquido bronquial, Michigan, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-2766	Cápsula ojo, Carolina del Norte, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-3008	Pierna, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-3010	Hueso, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-3115	LBA, Illinois, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-3180	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-3294	Espuito, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-3421	Uña, Carolina del Sur, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-3486	Orina canina, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-3504	Desconocido, Utah, USA	Apartado 4.4.
UTHSC 08-3639	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-3693	Uña, Missouri, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-3696	Sangre, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-661	Tejido del antebrazo, Minnesota	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-693	LCR, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 08-844 (1)*	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-844 (2)*	LBA, Texas, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 08-851	Ojo, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 09-1440	Respiratorio, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 09-2358	Celulitis, Massachusetts, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 09-3589	Líquido sinovial, Desconocido, Estados Unidos	Apartado 4.3.2.
UTHSC 09-384	Ojo, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC 09-597	Tejido L4-5, Minnesota, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a,b
UTHSC 09-778	Ojo, Desconocido, Estados Unidos	Apartado 4.3.2.
UTHSC 09-845	Endocarditis, Carolina del Norte, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC 95-1315	Cuero cabelludo, Desconocido, Estados Unidos	Apartado 4.4.
UTHSC 95-1734	Drenaje nasal, California, Estados Unidos	Apartado 4.1.
UTHSC 95-736	Espuito, USA	Apartado 4.4.
UTHSC R-3447	Ojo, Israel	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC R-3448	Ojo, Israel	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
UTHSC R-3853 (1)*	Espuito, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
UTHSC R-3853 (2)*	Espuito, California, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
WM 06.385	LBA, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.386	LBA, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.390	Piel, Perth, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.399	Sangre, Melbourne, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.434	Sangre, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.482	Pulmón, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.495	Seno maxilar, Sydney, Australia	Apartado 4.1.

TABLA. Aislados y cepas tipo o de referencia incluidas en la presente tesis (Cont.)

Nº aislado/cepa	Origen	Incluida en:
WM 06.496	Seno maxilar, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.502	Senos sigmoideos, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.503	Senos sigmoideos, Sydney, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.525	Sangre, Perth, Australia	Apartado 4.1.
WM 06.526	Piel, Perth, Australia	Apartado 4.1.
CBS 124.42 ^T (<i>Acremonium sclerotigenum</i>)	Dunas de arena, Francia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 135.34	Jardín de cañas, Reino Unido	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 136.33 ^T (<i>Acremonium spinosum</i>)	Uña de pie, Argentina	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 153.42 ^T (<i>Lecythophora decumbens</i>)	Fruta, Holanda	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 157.44 ^T (<i>Lecythophora mutabilis</i>)	Agua de Río, Alemania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 158.61	Micetoma, India	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 205.38 ^T (<i>Lecythophora fasciculata</i>)	Mantequilla, Suiza	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 206.38 ^T (<i>Lecythophora luteoviridis</i>)	Mantequilla, Suiza	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 206.73	Válvula aórtica y vitral, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 245.38 ^T (<i>Lecythophora hoffmannii</i>)	Mantequilla, Suiza	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 259.39 ^T (<i>Paecilomyces inflatus</i>)	<i>Apis mellifera</i> , Estados Unidos	Apartado 4.3.2.
CBS 267.33 ^T (<i>Lecythophora lignicola</i>)	Desconocido, Suecia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 270.86	Uña de pie, Francia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 279.76 ^T (<i>Phialemonium obovatum</i>)	Infección sistémica, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 281.80	Uña, Holanda	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 284.36 ^T (<i>Paecilomyces lilacinus</i>)	Suelo, Estados Unidos	Apartado 4.4.
CBS 298.64	Aire, Holanda	Apartado 4.3.2.
CBS 306.85	Pulmón, Estados Unidos	Apartado 4.3.2.
CBS 310.59 ^T (<i>Acremonium persicinum</i>)	Arena costera, Francia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 346.70 ^T (<i>Acremonium strictum</i>)	<i>Triticum aestivum</i> , Alemania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 360.35	Suelo, Holanda	Apartado 4.3.2.
CBS 376.81	Tallo muerto, Holanda	Apartado 4.3.2.
CBS 406.66	Muro de efecto invernadero, Alemania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 407.66	<i>Hypoxylon deustum</i> , Austria	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 408.80	Tallo muerto, Holanda	Apartado 4.3.2.
CBS 430.66 ^T (<i>Acremonium curvulum</i>)	Suelo, Alemania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 485.77	Hombre, India	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 490.82 ^T (<i>Phialemonium curvatum</i>)	Lesión de piel, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 491.82 ^T (<i>Phialemonium dimorphosporum</i>)	Suelo, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 545.89	Cultivo de sangre, Holanda	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 560.86	Hoja de bambú, Francia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 604.67 ^T (<i>Acremonium atrogriseum</i>)	Tallarines, Ucrania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 654.96	<i>Eucalyptus</i> , Japón	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 730.97	Diálisis peritoneal, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011b
CBS 749.69 ^T (<i>Acremonium bactrocephalum</i>)	<i>Ustilago</i> sp., Canada	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 774.97	Orina, Alemania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 796.69 ^T (<i>Acremonium glaucum</i>)	Abrigo de lana, Islas Salomón	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 800.69 ^T (<i>Acremonium zeae</i>)	Tallo <i>Zea mays</i> Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 832.71	Queratitis, Desconocido	Apartado 4.3.2.
CBS 840.68 ^T (<i>Acremonium fusidioides</i>)	Estiércol, República Centroafricana	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a

TABLA. Aislados y cepas tipo o de referencia incluidas en la presente tesis (Cont.)

Nº aislado/cepa	Origen	Incluida en:
CBS 993.69	Piel, Holanda	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 101148 ^T (<i>Acremonium borodinense</i>)	Suelo, Japón	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 114785 ^T (<i>Acremonium egyptiacum</i>)	Suelo, Egipto	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
CBS 128677 ^T (<i>Paecilomyces lavendulus</i>)	Suelo, Venezuela	Apartado 4.4.
CBS 128678	Lavado bronquial, España	Apartado 4.4.
FMR 6632 ^T (<i>Sarcopodium oculorum</i>)	Queratitis, Brasil	Apartado 4.3.2.
FMR 7190	Queratitis, Brasil	Apartado 4.3.2.
JCM 8372	Basura, Japón	Apartado 4.4.
JCM 8437 ^T (<i>Paecilomyces nostocoides</i>)	<i>Heterodera zaeae</i> , Estados Unidos	Apartado 4.4.
JCM 8438	<i>Heterodera zaeae</i> , Estados Unidos	Apartado 4.4.
MUCL 4112	Suelo, Estados Unidos	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
MUCL 9696 ^T (<i>Acremonium recifei</i>)	Micetoma, Brasil	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
MUCL 9724 ^T (<i>Acremonium kiliense</i>)	Piel, Alemania	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
MUCL 9745 ^T (<i>Acremonium furcatum</i>)	Arena, Francia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
MUCL 9834 ^T (tipo de <i>A. sclerotigenum</i>)	<i>Hevea brasiliensis</i> bark, Indonesia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
MUCL 30020	Suelo, Francia	Perdomo <i>et al.</i> , 2011a
NBRC 31965	Suelo, Desconocido	Apartado 4.3.2.
NBRC 100905 ^T (<i>Cephalotheca foveolata</i>)	Infección subcutánea, Corea	Apartado 4.3.2.

CBS, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Holanda; FMR, Colección de la *Facultat de Medicina* de Reus; IHEM, *Biomedical Fungi and Yeasts Collection*, Bélgica; JCM, *Japan Collection of Microorganisms*, Japón; MUCL, *Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain*, Bélgica; NBRC, *NITE Biological Resource Center*, Japón; UTHSC, *Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center*, USA; WM, *Molecular Mycology Research Laboratory, Westmead Hospital*, Australia; LBA: Lavado broncoalveolar; ND, No disponible; * Aislados de la misma muestra.