



**UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI**

**FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA  
DEL GÉNERO *PSEUDALLESCHERIA* Y GÉNEROS  
AFINES**

**Fèlix Gilgado Barbadilla**

**Tesis doctoral**

**2007**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

A mis padres

A Carol

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007





**Informe del director de la tesi doctoral**  
(art 11.3 del reial decret 56/2005 de Postgrau)

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO <i>PSEUDALLESCHERIA</i> Y GÉNEROS AFINES	
Doctorand/a Fèlix Gilgado Barbadilla	
Director(s)/es Josep Guarro Artigas Josep Cano Lira Josepa Gené Díaz	Tutor/a (si s'escau)
Programa de doctorat Nutrició i Metabolisme	
Departament Ciències Mèdiques Bàsiques	Grup de recerca Micologia

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI		
El(s) (co)directors sotasignats emeten el següent informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit		
	SI	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	x	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	x	
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	x	
La metodologia està descrita	x	
Hi consta el procediment	x	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	x	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	x	
La bibliografia està ben reflectida	x	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. 2005. Molecular phylogeny of the <i>Pseudallescheria boydii</i> species complex: proposal of two new species. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . 43:4930-4942		
Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the <i>Pseudallescheria boydii</i> complex. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 50:4211-4213		
Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. 2007. Reclassification of <i>Graphium tectonae</i> as <i>Parascedosporium tectonae</i> gen. nov., comb. nov., <i>Pseudallescheria africana</i> as <i>Petriellopsis africana</i> gen. nov., comb. nov. and <i>Pseudallescheria fimeti</i> as <i>Lophotrichus fimeti</i> comb. nov.		

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 2171–2178.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. 2007. Phenotypic characterization of phylogenetic species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Journal of Clinical Microbiology. (Enviado)

Gilgado F, J. Gené, J. Cano, Guarro J. 2007. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum*. Medical Mycology (En preparació)

Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. 2007. Differences in virulence among the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (En preparació)

Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:

I en conclusió, s'emet l'informe favorable per tal que es pugui portar a terme tràmit de lectura i posterior defensa pública.

Reus, 3 de Setembre de 2007.

Josep Guarro Artigas  
Director de la tesi

Josep Cano Lira  
Codirector

Josepa Gené Díaz  
Codirector

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que han colaborado directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. Es el fruto del trabajo y colaboración con mis compañeros del laboratorio de Micología de la URV. A todos ellos muchísimas gracias!

Al Dr. Josep Guarro por permitirme entrar en su grupo de investigación y por las ganas de aprender y mejorar que me ha transmitido durante todo este proceso.

Al Dr. Josep Cano por introducirme en la biología molecular de hongos y por su apoyo en los buenos y malos momentos de esta tesis.

A la Dra. Josepa Gené por su apoyo y confianza y por el gran esfuerzo que ha realizado en la corrección de esta tesis.

A los Drs. Alberto Stchigel, Francesc Xavier Pastor, Emili Mayayo, Maria José Figueras y Beli Pujol, por su ayuda y buenos consejos durante todos estos años.

A mis compañeras de despacho e investigación, Rita y Mónica, con las que tan buenos momentos he compartido. Os deseo lo mejor y os echaré de menos en la nueva aventura.

A Mar por su gran ayuda en los estudios antifúngicos y de virulencia. Una buena compañera y mejor amiga. A Marçal por los buenos ratos a la hora del café. A Cati y Nuria, excelentes técnicos, sin cuya ayuda necesitaría otros cuatro años para acabar la tesis. Y al resto de compañeros del laboratorio que han compartido conmigo estos años: Mabel, Nuria Argany, Dania, Montse, Lara, Clara, Fredi, Cori, Kendra, Carme, Gisela, Xavi, Antonio, Arantxa, Luis, Carolina, Mery, Hugo,... espero no dejarme a nadie. Y por supuesto a las secretarias del departamento, Montse e Inma, siempre dispuestas a ayudar. Gracias a todos!!

A mis padres, a los que les debo todo. Gracias por vuestro apoyo en todos los momentos de mi vida. A mi hermana, de la que siempre he recibido afecto y buenos consejos. Y a toda mi familia de Sant Boi (a mi abuela, a mis tios y primos), la mejor familia que uno pueda esperar.

A Joan, Pepi y Aina, mi familia en Reus. Gracias por vuestro cariño.

Y mis mayores agradecimientos para Carol. Tú me has aportado todo lo que una persona pueda desear. Eres lo mejor que tengo y tu ayuda en todas las etapas de mi vida son impagables. Millones de gracias!!

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Generalidades sobre el género <i>Pseudallescheria</i> .....	1
1.2. Biología, ecología, importancia clínica y taxonomía de <i>Pseudallescheria boydii</i> .....	4
1.2.1. Biología y ecología .....	4
1.2.2. Importancia clínica .....	5
1.2.3. Taxonomía .....	7
1.2.3.1. Perspectiva histórica .....	7
1.2.3.2. Caracteres fenotípicos.....	8
1.2.3.3. Problemática actual .....	10
1.3. La biología molecular aplicada a la taxonomía de los hongos .....	12
1.3.1. Ventajas e inconvenientes de los estudios moleculares.....	13
1.3.2. Filogenia molecular .....	14
1.3.2.1. Inferencia filogenética .....	16
1.3.2.2. Genes empleados en filogenia de hongos .....	20
1.3.2.2.1. ADN ribosómico.....	20
1.3.2.2.2. Otros genes .....	21
1.3.3. Concepto de especie filogenética .....	24
1.4. Estudios de la sexualidad en hongos .....	27
1.5. Estudios de sensibilidad antifúngica .....	30
1.5.1. Métodos de estudio <i>in vitro</i> de la sensibilidad a los antifúngicos .....	30
1.5.2. Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>P. boydii</i> a los antifúngicos.....	31
1.5.3. Tratamiento de las infecciones por <i>P. boydii</i> .....	32
<b>2. INTERÉS Y OBJETIVOS</b> .....	35

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
3.1. Origen y aislamiento de las cepas .....	41
3.1.1. Cepas clínicas .....	44
3.1.2. Cepas ambientales .....	44
3.1.2.1 Activación de tierras, aislamiento y obtención de cultivos puros .....	45
3.1.3. Cepas de colección y de referencia .....	46
3.2. Medios de cultivo utilizados .....	46
3.3. Conservación de las cepas.....	47
3.4. Técnicas de biología molecular .....	48
3.4.1. Extracción de ADN .....	48
3.4.2. Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ADNr .....	49
3.4.3. Amplificación parcial de dos regiones del gen de la $\beta$ -tubulina .....	49
3.4.4. Amplificación parcial del gen de la calmodulina.....	50
3.4.5. Amplificación parcial del gen 18S del ADNr.....	50
3.4.6. Comprobación y purificación del producto amplificado.....	51
3.4.7. Secuenciación de los productos de la PCR .....	51
3.4.8. Alineamiento de secuencias nucleotídicas .....	52
3.4.9. Depósito y obtención de secuencias de bases de datos internacionales .....	53
3.4.10. Inferencia filogenética .....	53
3.5. Estudios morfológicos .....	54
3.5.1. Estudios culturales .....	54
3.5.2. Estudios microscópicos .....	55
3.5.2.1. Microscopía óptica .....	55
a. Preparación directa .....	55
b. Microcultivo .....	56
3.5.2.2. Microscopía electrónica de barrido.....	56
3.6. Estudios fisiológicos.....	59
3.7. Estudios de sexualidad.....	60
3.7.1. Obtención de cultivos monospóricos .....	60

3.7.2. Cruzamientos.....	61
3.8. Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos.Técnica de microdilución .....	63
3.8.1. Antifúngicos utilizados .....	63
3.8.2. Preparación de las microplacas de antifúngicos .....	63
3.8.3. Preparación de los inóculos para los estudios <i>in vitro</i> .....	65
3.8.4. Lectura e interpretación de los resultados .....	66
3.9. Comparación de la virulencia de diferentes cepas en un modelo animal .....	66
3.9.1. Animales de experimentación.....	66
3.9.2. Inmunosupresión .....	66
3.9.3. Infección de los animales.....	67
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
4.1. TAXONOMÍA: FILOGENIA, MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA EN <i>PSEUDALLESCHERIA</i> Y HONGOS RELACIONADOS .....	71
4.1.1. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. 2005. Molecular phylogeny of the <i>Pseudallescheria boydii</i> species complex: proposal of two new species. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . 43:4930–4942.....	73
4.1.2. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. 2007. Molecular and phenotypic data support distinct species status for <i>Scedosporium apiospermum</i> and <i>Pseudallescheria boydii</i> and the new species <i>Scedosporium dehoogii</i> . <i>Journal of Clinical             Microbiology</i> . (Sometido) .....	99
4.1.3. Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. 2007. Reclassification of <i>Graphium tectonae</i> as <i>Parascedosporium             tectonae</i> gen. nov., comb. nov., <i>Pseudallescheria africana</i> as <i>Petriellopsis africana</i> gen. nov., comb. nov. and <i>Pseudallescheria fimeti</i> as <i>Lophotrichus fimeti</i> comb. nov. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary             Microbiology</i> . 57: 2171–2178.....	119

4.2. ESTUDIOS DE SEXUALIDAD .....	137
Gilgado F, J. Gené, J. Cano, Guarro J. 2007. Heterothallism in <i>Scedosporium apiospermum</i> . (En preparación) .....	139
4.3. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA .....	151
Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the <i>Pseudallescheria boydii</i> complex. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 50:4211- 4213.....	153
4.4. ESTUDIOS DE VIRULENCIA .....	163
Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. 2007. Differences in virulence among the species of the <i>Pseudallescheria boydii</i> complex. (En preparación).....	165
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>175</b>
5.1. TAXONOMÍA: FILOGENIA, MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA EN <i>PSEUDALLESCHERIA</i> Y HONGOS RELACIONADOS .....	177
5.2. ESTUDIOS DE SEXUALIDAD .....	181
5.3. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA .....	183
5.4. ESTUDIOS DE VIRULENCIA.....	183
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>185</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>189</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>213</b>



<b>A</b>	Adenina
<b>ABC</b>	Albaconazol
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNmt</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>ADNr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
<b>AFLP</b>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de fragmentos de amplificación)
<b>AMB</b>	Anfotericina B
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BCCM/IHEM</b>	<i>Biomedical Fungi and Yeasts Collection</i>
<b>BCCM/MUCL</b>	<i>Agro-Industrial Fungi and Yeasts Collection</i>
<b><sup>bd</sup>H<sub>2</sub>O</b>	Agua bidestilada
<b>BT2</b>	Región de la $\beta$ -tubulina
<b>C</b>	Citosina
<b>CAL</b>	Calmodulina
<b>CBE</b>	Concepto biológico de especie
<b>CBS</b>	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
<b>CFE</b>	Concepto filogenético de especie
<b>CI</b>	<i>Consistency Index</i> (índice de consistencia)
<b>CLSI</b>	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
<b>CME</b>	Concepto morfológico de especie
<b>CMF</b>	Concentración mínima fungicida
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DRBC</b>	Dicloran Rosa-Bengala cloranfenicol agar
<b>EMBL</b>	<i>European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory</i>
<b>EDTA</b>	<i>Di-sodium ethylenediaminetetra-acetate.2H<sub>2</sub>O</i> (Di-sodio etilenediaminetetra-acetato. 2H <sub>2</sub> O)
<b>5FC</b>	Flucitosina

<b>FLC</b>	Fluconazol
<b>G</b>	Guanina
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>IGS</b>	Espaciador intergénico
<b>ILD</b>	<i>Incongruence length Difference</i>
<b>IMI</b>	<i>International Mycological Institute</i>
<b>ITC</b>	Itraconazol
<b>ITS</b>	Espaciador interno
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KTC</b>	Ketoconazol
<b>L</b>	Litro
<b>LSU</b>	Subunidad larga
<b>M</b>	Molar
<b>MAT</b>	<i>Mating-type</i>
<b>MFG</b>	Micafungina
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NCCLS</b>	<i>National Comitee for Clinical Laboratory Standards</i>
<b>OA</b>	Agar harina de avena
<b>PCA</b>	Agar con infusión de patata y zanahoria
<b>PDA</b>	Agar con infusión de patata y glucosa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PHT</b>	<i>Partition homogeneity test</i>

<b>PSC</b>	Posaconazol
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA)
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
<b>RI</b>	<i>Retention Index</i> (índice de retención)
<b>RKI</b>	<i>Robert Koch Institute</i>
<b>RV</b>	Raymond Vanbreuseghem collection ( <i>Institute of Tropical Medicine</i> )
<b>RVC</b>	Ravuconazol
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SSU</b>	Subunidad corta
<b>T</b>	Timina
<b>TBF</b>	Terbinafina
<b>TBR</b>	<i>Tree bisection reconnection</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TUB</b>	Región de la $\beta$ -tubulina
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonia
<b>UTHSC</b>	<i>Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center</i>
<b>VRC</b>	Voriconazol

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

# 1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## 1.1. Generalidades sobre el género *Pseudallescheria*

*Pseudallescheria* Negr. & I. Fisch. es un género de ascomicetos perteneciente a la familia Microascaceae. Los miembros de este género se caracterizan por ser polimórficos, ya que pueden presentar hasta tres formas morfológicamente diferentes (von Arx y col., 1988; de Hoog y col., 2000); una forma sexual o teleomorfo y dos formas asexuales o anamorfos (sinamorfos). Estas dos formas asexuales se clasifican en los géneros anamórficos *Scedosporium* Sacc. ex Castell. & Chalm. y *Graphium* Corda.

El teleomorfo se caracteriza por la producción de cuerpos fructíferos (ascomas) cerrados (cleistotecios), esféricos, con paredes finas, membranáceas y de textura "epidermoidea" (Shear, 1922). Los ascos suelen ser esféricos, de paredes delgadas, evanescentes y contienen generalmente ocho ascosporas. Dichas ascosporas son usualmente simétricas, elipsoidales o fusiformes.

Uno de los anamorfos, *Scedosporium*, está caracterizado por presentar conidioforos usualmente no ramificados, portadores de células conidiógenas anelídicas, es decir, a medida que producen los conidios, éstos, tras su liberación, dejan una serie de cicatrices anulares en el cuello de las mismas (Dykstra y col., 1989; Hironaga y Watanabe, 1980). Dichas células conidiógenas o anélides pueden crecer incluso directamente de hifas indiferenciadas. Los conidios que producen suelen ser de forma obovoidal y de color marrón.

Por otro lado, *Graphium* se caracteriza por presentar conidióforos ramificados, especialmente en el ápice, que se organizan formando sinemas. El sinema consiste en la unión de varios conidióforos que forman un tronco erguido, de color aceituna-marrón, que termina en una especie de cepillo de células conidiógenas delgadas en cuyo ápice se acumulan los conidios. La conidiogénesis es similar a la de *Scedosporium*, pero las células conidiógenas son más pequeñas y los conidios más estrechos y menos pigmentados (de Hoog y col., 2000). Este sinamorfo no siempre está presente en los cultivos.

En la familia Microascaceae se incluyen otros géneros que son morfológicamente similares a *Pseudallescheria* (von Arx y col., 1988). Entre los que también presentan anamorfos en *Scedosporium* y *Graphium* está el género *Petriella* Curzi que se distingue principalmente por presentar ascomas ostiolados (peritecios), es decir, con una abertura (ostiolo) de salida de las ascosporas. Von Arx (1973) sugirió que la presencia o ausencia de aberturas en los peritecios podría estar influenciada por las condiciones culturales, hecho que

fue más tarde demostrado por Issakainen y col. (1997, 1999) a partir de sus estudios moleculares basados en los genes 18S y 28S del ADN ribosómico (ADNr). Dichos estudios ponen también de manifiesto que *Petriella* y *Pseudallescheria* son géneros genéticamente bien diferenciados. Otro género morfológicamente similar a *Pseudallescheria* es *Microascus* Zukai. Sin embargo, este último se distingue, además de por presentar peritecios, por que sus anamorfos se clasifican en el género *Scopulariopsis* Bainier, el cual se distingue de *Scedosporium* principalmente por la disposición en cadena de sus conidios (Dykstra y col., 1989). Las relaciones filogenéticas entre estos géneros y otros Microascaceae han sido estudiadas por diversos autores (Okada y col., 1988; Issakainen y col., 1997, 1999).

El género *Pseudallescheria* ha sufrido diversos cambios nomenclaturales así como de ubicación a nivel de familia. Su historia empieza en 1922 con la descripción de la primera especie del género, *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, recibiendo inicialmente el nombre de *Allescheria boydii* Shear (Shear, 1922). En 1970 pasó a formar parte de la familia Microascaceae, pero bajo el nombre de *Petriellidium* Malloch (Malloch, 1970), al cual se le incorporaron más tarde las siguientes especies: *Petriellidium africanum* Arx & G. Franz, *Petriellidium angustum* Malloch & Cain, *Petriellidium ellipsoideum* Arx & Fassat., *Petriellidium fimeti* Arx, Mukerji & N. Singh, *Petriellidium fusoidium* Arx y *Petriellidium desertorum* Arx & Moustafa. Pero no fue hasta 1982 que McGinnis y col. transfieren todas estas especies al género *Pseudallescheria*. Este nombre fue propuesto en el año 1944 por Negroni y Fischer para denominar a un ascomiceto, *Pseudallescheria shearii* Negroni & I. Fisch., que fue aislado de un micetoma humano. McGinnis y col. (1982) determinaron que *Petriellidium boydii* y *Pseudallescheria shearii* era el mismo hongo. Así el género *Pseudallescheria* incluiría finalmente las siguientes especies: *Pseudallescheria africana* (Arx & G. Franz) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Pseudallescheria angusta* (Malloch & Cain) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Pseudallescheria boydii* (especie tipo), *Pseudallescheria desertorum* (Arx & Moustafa) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Pseudallescheria ellipsoidea* (Arx & Fassat.) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Pseudallescheria fimeti* (Arx, Mukerji & N. Singh) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello y *Pseudallescheria fusioidea* (Arx) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello.

Todas estas especies son morfológicamente muy similares. Se distinguen principalmente por el tamaño de sus ascomas y de sus ascosporas (von Arx y col., 1988), diferencias que se resumen en la Tabla 1.



**Tabla 1.** Características morfológicas más relevantes de las especies de *Pseudallescheria* (von Arx y col., 1988).

Especie	Ascoma (diam. en $\mu\text{m}$ )	Ascosporas	
		Tamaño en $\mu\text{m}$	Forma
<i>P. africana</i>	50-90	5.5-7 x 3.5-4.5	ampliamente elipsoidales
<i>P. angusta</i>	100-150	6-7 x 3-3.8	estrechamente elipsoidales
<i>P. boydii</i>	140-200	6-7 x 3.5-4	elipsoidales
<i>P. desertorum</i>	80-110	11-14 x 7.5-10	elipsoidales
<i>P. ellipsoidea</i>	75-180	7-9 x 5-6	ampliamente elipsoidales
<i>P. fimeti</i>	230-360	11-13 x 8-10	elipsoidales
<i>P. fusioidea</i>	50-100	6-7.5 x 3.5-4	estrechamente fusiformes

Sin embargo, actualmente este listado de especies ha cambiado debido al reciente estudio de Rainer y col. (2000). A raíz del análisis de secuencias de los espaciadores intergénicos (ITS) del ADNr, dichos autores consideraron que *P. angusta*, *P. ellipsoidea* y *P. fusioidea* eran especies sinónimas de *P. boydii*.

La especie más frecuentemente aislada del género, tanto a nivel ambiental como clínico, es *P. boydii*. En los últimos años ha adquirido especial relevancia como agente de infecciones oportunistas, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, presentando una elevada mortalidad probablemente debido a su resistencia intrínseca a los tratamientos antifúngicos más habituales (Castiglioni y col., 2002; Steinbach y Perfect, 2003). Pese a su creciente importancia en clínica, son aún pocos los estudios realizados sobre esta especie, siendo por ello el centro de estudio de la presente tesis.

## **1.2. Biología, ecología, importancia clínica y taxonomía de *Pseudallescheria boydii***

### **1.2.1. Biología y ecología**

Como ocurre en muchos otros ascomicetos (Figura 1), el ciclo biológico de *P. boydii* consiste en desarrollar una fase sexual o teleomorfo, caracterizado por la producción de esporas sexuales (ascosporas), y una fase asexual o anamórfica. En esta fase, sin embargo, no sólo desarrolla una única forma asexual productora de esporas asexuales (conidios), sino que es capaz de producir dos anamorfos, tal y como ya se ha comentado anteriormente. Uno de ellos se le conoce con el nombre de *Scedosporium apiospermum* Sacc. ex Castell. & Chalm., que suele estar presente en cualquiera de los aislados de la especie, y el otro anamorfo se le conocía tradicionalmente como *Graphium eumorphum* (Sacc.) Sacc. (de Hoog y col., 2000), aunque actualmente a este último se le considera una especie diferente a *P. boydii* (Rainer y col., 2000). La forma de *Graphium* se desarrolla con mucha menos frecuencia y especialmente en cultivos envejecidos. Las características morfológicas de estas formas se describen en el apartado 1.2.3.2.

El nicho natural de *P. boydii* no es aún conocido, pero se aísla con frecuencia de suelos y aguas altamente contaminadas (Domsch y col., 1980). El hecho de que esta especie haya emergido de su hábitat original en la naturaleza y se esté adaptando con éxito a ambientes dominados por el hombre, sugiere que está ocurriendo un proceso de competición entre los genotipos, seleccionándose aquellos que son capaces de sobrevivir en estos ambientes (Guého y de Hoog, 1991).



Las infecciones por *P. boydii* suelen adquirirse a raíz de un traumatismo o herida penetrante, frecuentemente tras la contaminación con suelo o estiércol (Steinbach y Perfect, 2003). También puede ocurrir en contextos de cirugía, inmersión accidental en aguas contaminadas, neutropenia, enfermedad granulomatosa crónica de la infancia, e inmunosupresión celular (trasplante, SIDA, corticoides, etc.) (Steinbach y Perfect, 2003). Las manifestaciones clínicas que ocasiona se pueden agrupar en tres síndromes (Steinbach y Perfect, 2003): a) enfermedad localizada después de un trauma, la cual puede darse en personas sanas, b) colonización prolongada asintomática o sintomática de cavidades, las cuales se observan en pacientes con predisposición a desordenes pulmonares y c) enfermedad sistémica invasiva que se presenta en pacientes inmunosuprimidos. Las diferentes manifestaciones de estos tres síndromes, se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Manifestaciones clínicas más habituales en *P. boydii* (Steinbach y Perfect, 2003)

Síndrome clínico	Manifestaciones
Enfermedad localizada	Micetoma blanco Artritis Osteomielitis Infecciones oculares y endoftalmitis Onicomycosis Infecciones linfocutáneas
Colonización	Sinusitis Otitis Bola fúngica pulmonar Alergia broncopulmonar Colonización pulmonar en fibrosis quística
Enfermedad sistémica invasiva	Infección invasiva pulmonar Endocarditis Infección diseminada Infecciones por <i>P. boydii</i> en pacientes de SIDA Infecciones en el SNC Near-drowning

Los mayores problemas para resolver estas infecciones son: (1) el agente causal es de difícil diagnóstico (en la fase infectiva presenta una morfología y ramificación de hifas en tejido similar a la de *Aspergillus*, con la que es habitualmente confundida), (2) aunque se llegue a diagnosticar, los tratamientos terapéuticos habituales son inadecuados, y (3) el conocimiento de su biología, su potencial clínico, su virulencia y sus rutas de transmisión e infección son pobremente conocidas.

### **1.2.3. Taxonomía**

#### **1.2.3.1. Perspectiva histórica**

Como ya hemos mencionado en el apartado 1.1., *P. boydii* fue descrita en 1922, a partir de una cepa aislada de un micetoma blanco en un paciente humano, bajo el nombre de *Allescheria boydii* (Shear, 1922). El género *Allescheria* R. Hartig fue establecido en 1899 por Saccardo y Sidow (1899) para acomodar *Eurotiosis gayoni* Cost., un género, este último, que había sido propuesto por Costantin en 1893 sin saber que el nombre de *Eurotiosis* había sido previamente utilizado por Karsten (1889) para esferopsidales. Así, *E. gayoni* en el año 1899 pasó a ser *Allescheria gayoni* (Costantin ex Laborde) Sacc. & P. Syd., la especie tipo del género. Ésta había sido ampliamente descrita por Costantin (1893), aunque no aportó ninguna ilustración, ni dejó ningún tipo de material o cultivo de la cepa. Basándose en las descripciones de Costantin, Malloch (1970) concluyó que *A. gayoni* pertenecía al género *Monascus* Tiegh. Malloch además constató que la segunda especie descrita del género, *A. boydii*, difería del hongo descrito por Costantin, por presentar ascosporas oscuras, ascomas marrones, cultivos pigmentados y un estado conidial muy diferente. Por ello, transfirió esta especie al género *Petriellidium* incluyéndolo en la familia Microascaceae. Este nuevo género parecía ser una forma cleistotecial de *Petriella*, aunque a parte del ascoma cerrado, difería por sus ascosporas menos pigmentadas y simétricas. No fue hasta el año 1982 con los estudios de McGinnis y col. (1982) que adquirió su nomenclatura actual pasando a denominarse *Pseudallescheria boydii* (ver apartado 1.1.).

Por otro lado su anamorfo, *S. apiospermum*, fue descrito por primera vez en el año 1911 recibiendo el nombre de *Monosporium apiospermum* Sacc., a partir de una cepa que también había sido aislada de un micetoma. Sin embargo, en la revisión del hongo realizada por Castellani y Chalmers en 1919 se pasa al nuevo género *Scedosporium* Sacc. ex Castell. & Chalm. y es a partir de entonces que se habla de *S. apiospermum* (Castellani y Chalmers,

1919). El género *Monosporium* Sacc. fue considerado posteriormente como nombre ilegítimo por Hughes (1958) al tratarse de un género ya utilizado para basidiomicetos. No obstante, no fue hasta 1944 que Emmons relacionó a *S. apiospermum* como el anamorfo de *P. boydii* ya que presentaban una clínica similar y el anamorfo asociado a *P. boydii* era morfológicamente similar a *S. apiospermum* (Emmons, 1944).

*G. eumorphum* fue descrito en el año 1886 por Saccardo. Inicialmente situó a esta especie en el género *Sporocybe* Fr., pero fue el mismo autor quien a través de un estudio del género *Graphium* emplazó a dicha especie en este último género. Más tarde fue considerada sinanamorfo de *P. boydii*, pero Okada y col. (1998) comprobaron que *G. eumorphum* era una especie diferente de *P. boydii*. Actualmente se emplea únicamente el nombre de *Graphium* para denominar al sinanamorfo sinnematoso de *P. boydii*.

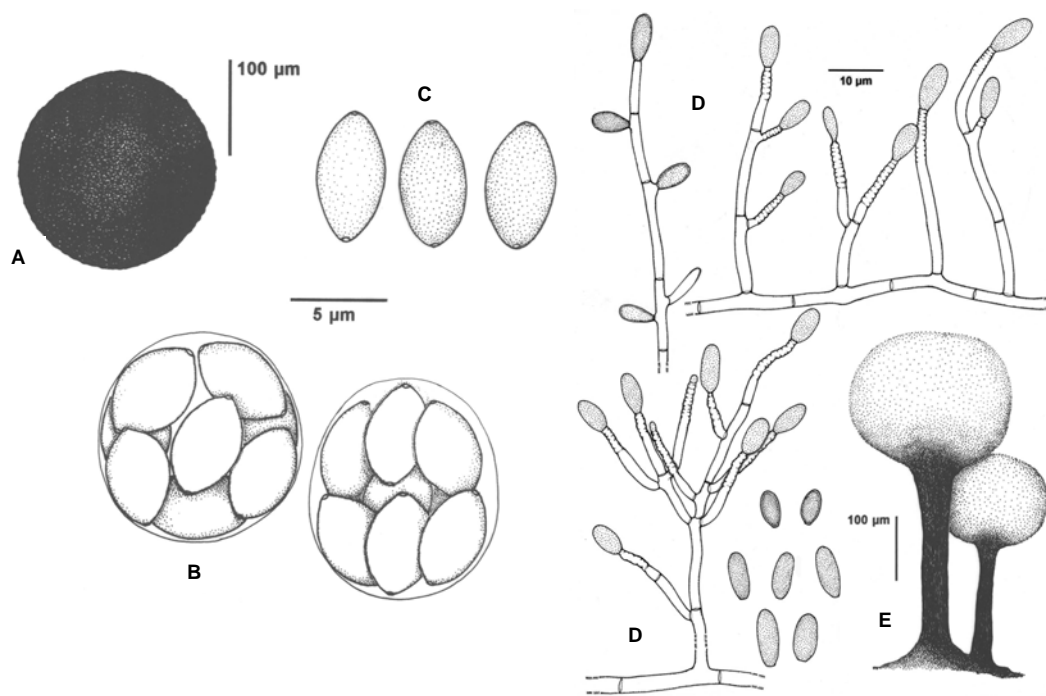
### 1.2.3.2. Caracteres fenotípicos

No todas las cepas de *P. boydii* tienen la capacidad de desarrollar el teleomorfo, aunque su formación se ve favorecida con la siembra de las mismas en agar harina de avena (OA) o en medios pobres como el agar patata zanahoria (PCA). Las ascomas se caracterizan por ser de color amarillo parduzco o negro, esféricos y con un diámetro que va de 140 a 200  $\mu\text{m}$  (Figura 2), los cuales acostumbran a formarse sumergidos en el agar (Shear, 1922). En el interior del ascoma se producen las ascosporas que son de forma elipsoidal, de color dorado y su tamaño oscila entre 6-7 x 3.5-4  $\mu\text{m}$  (Figura 2).

La forma anamórfica de *Scedosporium* (Figura 2) está presente en los cultivos de todas las cepas de *P. boydii*. Podemos encontrarnos muchas cepas que nunca originan ascomas pero en cambio, la forma *S. apiospermum* siempre se desarrolla. Ésta se caracteriza por tener células conidiógenas anelídicas, hialinas, que pueden surgir de hifas indiferenciadas. Dichas células conidiógenas producen conidios de un tamaño de 4-9 x 6-10  $\mu\text{m}$ . *S. apiospermum* se distingue fácilmente de la otra especie del género, *S. prolificans*, por que sus células conidiógenas son cilíndricas, mientras que las de *S. prolificans* son infladas en su base y con frecuencia nacen de conidióforos ramificados (de Hoog y col., 2000).

Tal y como ocurre en el teleomorfo, el sinanamorfo *Graphium* (Figura 2) no siempre está presente. Éste, como ya hemos comentado anteriormente, se caracteriza por la formación de sinemas. La conidiogénesis es similar a la del sinanamorfo *S. apiospermum*, y los conidios que originan suelen ser claviformes, subhialinos o marrones pálido, de base trunca, y su tamaño oscila entre 6-12 x 3.5-4  $\mu\text{m}$ . Dichos conidios son mucosos y se acumulan

en el ápice del conidióforo formando grandes masas de color blanquecino o grisáceo (de Hoog y col., 2000).



**Figura 2.** (A) Ascoma de *P. boydii*. (B) Ascosporas. (C) Ascosporas. (D) *Scedosporium apiospermum*. (E) Sinanamorfo *Graphium* (Guarro y col., 2006).

Desde el punto de vista fisiológico, sólo existe un trabajo, llevado a cabo por de Hoog y col. (1994), en donde se establecen algunos perfiles fisiológicos para *P. boydii*. El total de cepas de este hongo estudiadas en dicho trabajo fue de 9; se comprobó que la mayoría crecían a 37°C, y sólo algunas eran capaces de crecer a 42°C; que toleran elevadas concentraciones de cloruro de magnesio (al 5%), pero no de cloruro sódico; que eran proteolíticas y tenían la capacidad de asimilar la urea, la asparragina, el nitrato de potasio y el nitrato de amonio. Además, con las pruebas fisiológicas llevadas a término en este trabajo se pudieron diferenciar claramente las cepas de *P. boydii* de las de *S. prolificans*, ya que las de

esta última especie no asimilaron la sacarosa, el ribitol, el xilitol y el L-Arabinitol, a diferencia de las de *P. boydii*.

### 1.2.3.3. Problemática actual

Con lo expuesto anteriormente podemos pensar que *P. boydii* se trata de una especie bien caracterizada, no obstante numerosos trabajos demuestran que existe una gran variabilidad intraespecífica en este hongo, tanto a nivel fenotípico como genético.

Ya en los trabajos de Gordon (1957) y Cazin y Decker (1964) se demuestra que las cepas de *P. boydii* son variables respecto al crecimiento y la esporulación. Gordon (1957) puso en evidencia la distinta capacidad de formar ascomas aludiendo que este fenómeno probablemente no se debía al medio de cultivo utilizado, sino a alguna característica genética de las cepas. También observó variabilidad morfológica en cuanto a los caracteres macroscópicos de sus colonias, así como al tamaño y forma de los conidios.

Bell (1978) encontró diferencias en la virulencia de las cepas de *P. boydii* con las que trabajó en un modelo animal. Y, más recientemente, respecto a la sensibilidad antifúngica, los estudios *in vitro* llevados a cabo por Carrillo y Guarro (2001) y Capilla y col. (2004) nos demuestran también la distinta sensibilidad de las cepas respecto a los antifúngicos ensayados.

Y de nuevo se corrobora la enorme variabilidad intraespecífica que presenta esta especie a partir de estudios moleculares. De Hoog y col. (1994) estudiando la homología entre el ADN nuclear de diferentes cepas de *P. boydii* encontró la existencia de tres grupos intraespecíficos bien diferenciados. Rainer y col. (2000) comprobó la existencia de hasta 5 longitudes diferentes en el gen 18S del ADNr. Williamson y col. (2001) encontraron hasta 20 genotipos en 52 aislados secuenciando la región IGS del ADNr. Defontaine y col. (2002) en un total de 129 aislados obtenidos de enfermos de fibrosis quística usando la técnica de los RAPD (*Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN*) encuentran hasta 60 genotipos diferentes. Con el análisis de las secuencias correspondientes a los ITS del ADNr, Rainer y col. (2000) demuestran también una extrema variabilidad intraespecífica, variabilidad genética que incluso parecía ser superior a la encontrada en otras especies como *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour. (Gräser y col., 1999), *Hortaea werneckii* (Horta) Nishim. & Miyaji (Zalar y col., 1999), o *Cladophialophora bantiana* (Sacc.) de Hoog, Kwon-Chung & McGinnis (Gerrits van den Ende y de Hoog, 1999).



Todos estos datos sugieren que *P. boydii* sea probablemente un complejo de especies difíciles de diferenciar entre ellas, al menos morfológicamente (especies crípticas). En este sentido, otros trabajos con especies también de interés clínico como *Aspergillus flavus* Link (Geiser y col., 1998), *Coccidioides immitis* G.W. Stiles (Koufopanou, y col., 1997), *Pneumocystis carinii* P. Delanoë & Delanoë (Beard y col., 2000) y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (O'Donnell, 2000a), han demostrado mediante análisis multigénicos que albergaban más de una especie críptica. La existencia de especies crípticas en *P. boydii* podría ser la razón de esa gran variabilidad que caracteriza a este hongo.

### 1.3. La biología molecular aplicada a la taxonomía de los hongos

La taxonomía, hasta hace relativamente poco tiempo, se basaba casi exclusivamente en los caracteres morfológicos para delimitar las especies o los diferentes niveles taxonómicos. Sin embargo, dichos caracteres presentan una serie de problemas asociados como es la dificultad de diferenciar hongos estrechamente relacionados, la laboriosidad de sus métodos de estudio y, en algunos casos, incluso la insuficiente resolución para la delimitación de los taxones (Guarro y col., 1999). Es por ello que actualmente los taxónomos han recurrido a la biología molecular como una herramienta de apoyo para permitirles solucionar algunos de los problemas mencionados.

Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado hasta la fecha para resolver problemas taxonómicos, muchas ya están en desuso y otras, como el análisis filogenético con múltiples genes, se encuentran en pleno auge. Dentro de las técnicas moleculares clásicamente utilizadas para resolver la identidad de cepas morfológicamente similares podemos destacar la determinación del contenido guanina/citosina en el ADN nuclear (Kurtzman, 1994), o el grado de hibridación ADN-ADN (Vilgalys, 1988).

Para la misma finalidad, pero más recientemente, también se han aplicado métodos electroforéticos, aunque éstos son más adecuados para el tipado molecular de cepas. El análisis del *Polimorfismo en patrones de restricción* (RFLPs), basado en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas, es una técnica que se ha utilizado para clasificar cepas fúngicas dentro de una determinada especie (Viaud y col., 2000), para ver conexiones anamorfo–teleomorfo (Gené y col., 1996), así como para establecer variabilidad genética entre cepas de una misma especie (Jackson y col., 1999; Blanz y col., 2000; Quirk y Kupinski, 2002). Las regiones del genoma más frecuentemente trabajadas con esta técnica han sido el ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADNr. Otra de las técnicas electroforéticas es la de la *Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN* (RAPDs). Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de regiones del genoma al azar, para ello se utiliza uno o varios cebadores con una longitud de entre 10 y 12 nucleótidos que hibridan con regiones inespecíficas del genoma (Welsh y McClland, 1990). Ha sido básicamente utilizada para el tipado de cepas de una misma especie (Kano y col., 1998; Boldo y col., 2003), aunque su principal problema es la reproducibilidad (Taylor y col., 1999). Otra de las técnicas utilizadas para la identificación de cepas fúngicas (Majer y col., 1996;

Treadway y col., 1999; Schmidt y col., 2004) y tipado (Soll, 2000) es la de los *Polimorfismos de fragmentos de amplificación* (AFLPs) (Gräser y col., 1999). Esta técnica se basa en la unión de adaptadores al ADN genómico previamente digerido, seguido de una PCR con cebadores específicos para estos adaptadores que incluyen un isótopo radiactivo. Los patrones que se obtienen suelen tener entre 40 y 200 bandas informativas. Pero la verdadera revolución en la taxonomía de los hongos ha tenido lugar con la secuenciación del ADN. El análisis de secuencias, especialmente de los fragmentos del ADNr, ha ayudado al taxónomo a reorganizar la sistemática de los hongos de acuerdo a sus relaciones filogenéticas (Kirk y col., 2001). Sin embargo, en algunos grupos o taxones incluso el análisis del ADNr ha resultado poco informativo o insuficiente para dilucidar la ubicación taxonómica o incluso delimitarlo como especie. Es por ello que, en los últimos años, para los estudios de filogenia molecular se tiende a utilizar, además del ADNr, el análisis comparativo de las secuencias de más de un gen, seleccionando principalmente aquellos genes que codifican proteínas. Viendo la resolución de los estudios multigénicos, en la presente tesis se han secuenciado diversos genes para la caracterización de cepas de *Pseudallescheria*.

### **1.3.1. Ventajas e inconvenientes de los estudios moleculares**

Los datos moleculares presentan una serie de ventajas respecto a los morfológicos. Una de las características más obvias es el hecho de que las diferencias entre grupos son fáciles de cuantificar y de analizar estadísticamente, por lo tanto son objetivas. Estas diferencias se pueden cuantificar incluso entre taxones muy lejanos, hecho difícil de interpretar a partir de los caracteres morfológicos. Otro hecho importante es que la variación molecular se basa únicamente en el genotipo y, por tanto, es heredable. Además, los caracteres moleculares no son ambiguos – A, G, C, T son fácilmente reconocibles por técnicas de secuenciación. La detección de caracteres que provienen de un ancestro común (homologías) es relativamente fácil (Graur y Li, 2000). El parecido morfológico entre especies a menudo complica su discriminación, sin embargo utilizando datos moleculares se pueden llegar a distinguir claramente (Taylor y col., 2000).

Puede parecer que todo son ventajas en el trabajo con datos moleculares, pero estos también pueden presentar inconvenientes. Por ejemplo, las filogenias de genes no siempre coinciden con la de las especies. Aunque los genes de dos taxones sean verdaderamente ortólogos (genes homólogos que se encuentran en dos taxones diferentes y que realizan la

misma función en cada taxón), y no sean fruto, por ejemplo, de una duplicación génica (genes parálogos), los árboles de genes y la filogenia real de los organismos puede ser diferente a causa de la retención de polimorfismos ancestrales, del flujo génico entre poblaciones, la hibridación entre especies, etc... (Moritz y Hillis, 1996). Por lo que el uso de diferentes loci nos puede ayudar a detectar y corregir alguno de estos problemas (Hewit, 2001). También existen inconvenientes metodológicos a la hora de obtener y de tratar los datos moleculares (Maley y Marshall, 1998). La mayoría de estos inconvenientes están causados por problemas de homoplasia, un fenómeno frecuente en datos de secuencias moleculares. La homoplasia es la similitud de secuencias, pero que no es debida a un ancestro común, sino al resultado de una evolución independiente (convergencia, paralelismo, reversiones). Ésta puede ser debida al número limitado de estados posibles (A, G, C, T y gaps) y a altas tasas evolutivas. Otro problema añadido es la saturación de los datos. Si un gen ha variado tanto como para borrar la señal de los cambios sucedidos entre dos especies, podríamos observar un solo nucleótido de diferencia cuando en esa misma posición habrían existido dos o más cambios. De esta forma al no disponer de secuencias transitorias, estamos perdiendo información, lo que nos puede hacer llegar a una interpretación errónea de una filogenia determinada.

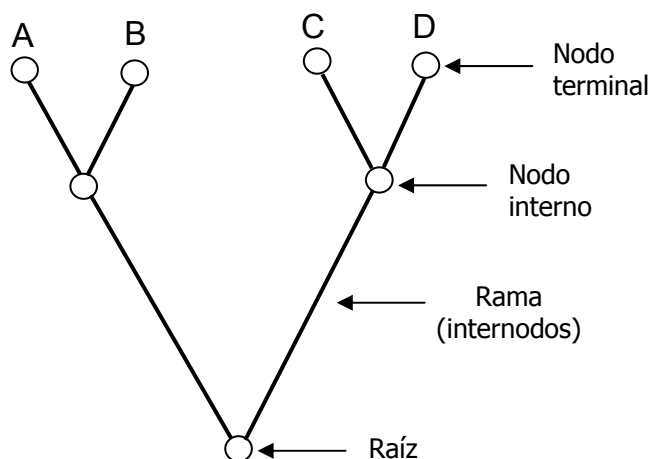
### **1.3.2. Filogenia molecular**

Entendemos como filogenia molecular al estudio de la evolución de los organismos a través del análisis de sus secuencias de ADN o de aminoácidos (Whelan y col., 2001). La filogenia nos proporciona el fundamento para la clasificación de los organismos. Morfológicamente no es posible comparar una bacteria con un hombre, sin embargo si que es posible establecer una comparación con moléculas de ADN de ambos organismos, ya que están formadas por el mismo lenguaje de bases (Vandamme, 2003).

La idea de partida en la filogenia molecular fue la teoría del reloj molecular, propuesta por Zuckerkandl y Pauling (1962), que consideraba que los cambios nucleotídicos se acumulaban de una manera constante en el tiempo. Con esta teoría se podría interpretar que cuando dos poblaciones o especies se separan, el número de diferencias genéticas que les distancian será proporcional al tiempo que hace que han divergido. En la actualidad sabemos que está teoría no es cierta ya que la tasa de cambio nucleotídico depende de muchos factores (Ayala y col. 1998; Conway-Morris, 2000), como son la tasa metabólica de la

especie, el tiempo de generación, presiones selectivas, etc., no siendo por tanto igual en todos los organismos (Vandamme, 2003).

Las relaciones filogenéticas entre organismos basadas en las secuencias de ADN o de proteínas, suele ilustrarse mediante un árbol filogenético, el cual nos muestra los organismos que están más íntimamente relacionados. Estos árboles incluyen un conjunto de nodos conectados por ramas (o ejes), como mostramos en la Figura 3. Los **nodos terminales** representan las secuencias conocidas de los organismos que disponemos o estamos estudiando. Los **nodos internos** representan divergencias ancestrales entre dos o más grupos de organismos genéticamente aislados, es decir, los ancestros hipotéticos que comparten estos grupos; cada nodo interno está unido a una rama (internodo) representante de la evolución desde su ancestro, y del mismo pueden partir dos o más ramas que representan a sus descendentes. El ancestro de todos los taxones que forman el árbol es la raíz del mismo; la longitud de las ramas en los árboles puede representar en algunos análisis, las distancias evolutivas que separan los nodos; y la topología del árbol es la información aproximada de las relaciones entre dichos taxones.



**Figura 3.** Representación esquemática de un árbol filogenético. A, B, C y D representan a organismos en estudio (adaptación de Berbee y Taylor, 1999).

Los diferentes métodos de inferencia filogenética como la máxima parsimonia, neighbor-joining, máxima verosimilitud, etc., tienen como resultado la construcción de estos árboles, en los cuales las diferencias entre secuencias homólogas de los organismos incluidos son el resultado de los procesos evolutivos que han sufrido cada uno de ellos. Así pues, los diferentes métodos pretenden ser modelos de estos procesos evolutivos y poder así reconstruir las relaciones de parentesco existentes entre esos organismos.

### **1.3.2.1. Inferencia filogenética**

La reconstrucción de las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos a partir de datos moleculares requiere de un trabajo riguroso para no generar filogenias erróneas. Existen múltiples programas para inferir filogenias, pero el procedimiento a seguir para la obtención de los árboles filogenéticos es común y consiste en (Ruiz-Trillo, 2002):

- A) Diseño del muestreo taxonómico
- B) Secuenciación y alineamiento de secuencias
- C) Análisis previo de los datos
- D) Inferencia filogenética
- E) Soporte de las ramas obtenidas

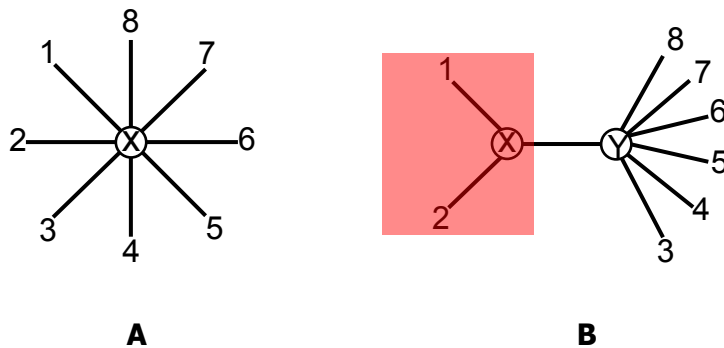
A) Para obtener un buen muestreo taxonómico, éste ha de ser lo más grande y diverso posible (Maley y Marshall, 1998), y debemos escoger un grupo externo (*outgroup*) lo más cercano posible a las muestras en estudio (*ingroup*). El *outgroup* permite "enraizar" nuestro árbol filogenético, dándole una dirección. Éste puede estar formado por uno o más organismos, los cuales se saben que son distantes de las muestras en estudio. Para realizar una mejor inferencia se recomienda que el *outgroup* sea cercano al grupo de estudio ya que de este modo compartirán caracteres históricamente similares, caracteres que entonces se consideran plesiomórficos (estado primitivo de un carácter) (Wheeler, 1990). En cambio, con un *outgroup* muy diferente los caracteres compartidos entre éste y los *ingroup* pueden deberse al azar y no a una historia evolutiva común. También se recomienda incluir un amplio número de *outgroups*, pues esto permitirá que los resultados sean más estables (Nixon y Carpenter, 1994).

B) En esta fase se realiza el alineamiento de las secuencias a estudiar. Mediante este paso podremos identificar si nuestras secuencias son o no homólogas. Seleccionaremos solamente las posiciones claramente homólogas, evitando aquellas posiciones dudosas.

C) La tercera fase consiste en un análisis de los datos, previo a la reconstrucción filogenética. Este análisis nos aportará información de cómo son y cómo se comportan nuestros datos. Se puede analizar entre otros datos: el grado de saturación, comparando los cambios observados con los cambios reales, en caso de utilizar modelos evolutivos en el análisis; la información filogenética contenida en el alineamiento (posiciones variables, parsimónicas informativas, etc.).

D) Pese a que existen diversos métodos para el estudio filogenético de los organismos, todos ellos tienen un mismo objetivo: estimar una historia evolutiva lo más próxima posible a la realidad a partir de los datos moleculares de que se disponen. De entre los métodos para inferir filogenia, los más utilizados por los taxónomos moleculares son:

-**Neighbor-joining**. Es un método algorítmico que calcula la distancia entre dos taxones, entendida ésta como una medida de su similitud genética, y que se relaciona directamente con sus relaciones filogenéticas (Saitou y Nei, 1987). Las distancias genéticas se corrigen para tener en cuenta los posibles cambios superimpuestos, es decir, cambios que se producen en una misma posición. Así la matriz de caracteres se transforma en una matriz de distancias que representa el grado de diferencia entre los diferentes taxones. A partir de esta matriz de distancias se construye un árbol inicial en forma de estrella (Figura 4). Este árbol se va, entonces, construyendo a medida que se unen los nodos con las distancias más cortas. El hecho de que sea un método de análisis rápido hace que sea muy empleado, sin embargo presenta inconvenientes: la topología del árbol varía según el orden de los taxones en el alineamiento (Farris y col., 1996), sólo muestra un árbol, y utiliza modelos evolutivos (Carpenter, 1992).



**Figura 4.** (A) Árbol inicial en forma de estrella sin estructura jerárquica. (B) Árbol en el que los taxones 1 y 2 se han agrupado (adaptado de Saitou y Nei, 1987).

-**Máxima parsimonia.** Este método supone que el camino evolutivo más probable es el más simple, el que se explica con el menor número de cambios. Esta metodología utiliza las secuencias obtenidas intactas y selecciona los árboles con el menor número de pasos evolutivos. Esta sencillez y la ausencia de modelo evolutivo son las ventajas que presenta este método (Farris, 1983). Pero es justamente esta ausencia de modelo evolutivo la crítica más grande, ya que contra más divergentes son las secuencias, mas grande es el grado de homoplasia, y si ésta no se corrige, la *máxima parsimonia* falla al recuperar el verdadero árbol. Otra crítica es que es el método más sensible al problema de *long-brach attraction* (Felsenstein, 1978). Este problema se da cuando introducimos en nuestro análisis taxones con tasas de sustitución más elevadas que el resto. A estos organismos se los denomina *fast-clock*, y en los árboles aparecen en el extremo de ramas largas, generando topologías erróneas.

-**Máxima verosimilitud.** Éste es un método estadístico utilizado para la construcción de filogenias (Huelsenbeck y Crandall, 1997). Se trata de considerar todos los escenarios posibles que han podido dar lugar a las secuencias observadas y establecer sus probabilidades utilizando un modelo evolutivo. El análisis consiste en hallar el árbol más verosímil (menor *logLikelihood*), es decir, aquel que hace más probable los datos observados. Este método tiene el problema que es computacionalmente muy costoso y requiere de ordenadores de



gran potencia. Pero es uno de los métodos más fiables debido a la posibilidad de utilizar complejos modelos evolutivos (Yang, 1996). Es el método menos afectado por errores de muestreo (Swofford y col., 1996) o por la presencia de organismos *fast-clock* (Huelsenbeck, 1997).

-**Inferencia Bayesiana.** Es un método descrito recientemente (Huelsenbeck y col., 2001) y se basa en el cálculo de la probabilidad posterior de un árbol, es decir, la probabilidad de que dicho árbol sea el correcto en función de los datos y el modelo evolutivo (Huelsenbeck y Bollback, 2001; Huelsenbeck y col., 2001). La filosofía es ligeramente parecida a la *máxima verosimilitud*. Es un método rápido y aporta medidas probabilísticas de la robustez del árbol que son fácilmente comparables a las medidas de la estadística tradicional.

E) En la quinta fase se calcula la robustez que presenta el árbol filogenético que hemos obtenido. Existen diversos métodos para obtener una estima del soporte estadístico para cada una de las ramas de nuestro árbol o ver cuanto mejor es una topología obtenida respecto a otra, probando así su fiabilidad. Dichos métodos son los siguientes:

-**Bootstrap.** Se basa en generar un número elevado de pseudoreplicas de la matriz original y analizarla utilizando cualquiera de los métodos de reconstrucción filogenética. Las pseudoréplicas se obtienen mediante el remuestreo al azar con repeticiones de las columnas (caracteres) de la matriz original para obtener una nueva matriz del mismo tamaño que el 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 75% tienen un buen soporte estadístico.

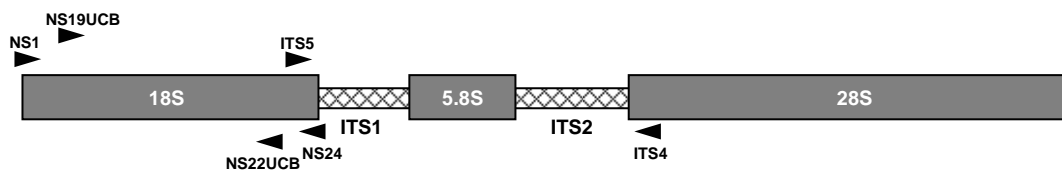
-**Comparación de topologías alternativas.** Una vez obtenido el árbol, existe la posibilidad, bien mediante el criterio de *máxima verosimilitud* o de *máxima parsimonia*, de probar estadísticamente topologías alternativas. Las pruebas más utilizadas son: 1) el test paramétrico de Kishino-Hasegawa (Kishino y Hasegawa, 1989), y el test no-paramétrico de Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira y Hasegawa, 1999) para el análisis de *máxima verosimilitud*; y 2) Kishino-Hasegawa, paramétrico, y Templeton y el winning-site test, como no-paramétricos, para el análisis de *máxima parsimonia*.

En el caso de estudios multigénicos, cuando pretendemos construir un árbol con los datos aportados por la unión de varios genes, previamente a la unión de éstos, hemos de realizar un test estadístico que nos permita ver si los loci escogidos se pueden combinar (congruencia filogenética). Para ello, el método más ampliamente utilizado es el test denominado ***Incongruence length Difference*** (ILD). Esta prueba se basa en la diferencia entre el número de pasos requeridos en los análisis individuales y combinados (Farris y col., 1995). La distribución del estadístico ILD se valora calculando el ILD para la partición original (la observada) y después para una serie de particiones aleatorias [suma de los ILD de las matrices (genes) individuales] (Farris y col., 1995).

### 1.3.2.2. Genes empleados en filogenia de hongos

#### 1.3.2.2.1. ADN ribosómico

El ADNr es la región del genoma fúngico más utilizada para estudios filogenéticos (Hillis y Dixon, 1991; Bruns y col., 1992). Esta región ha sido seleccionada principalmente por el hecho de que los genes del ADNr son multicopia y están organizados en tandem de hasta 200 copias por núcleo (Butler y Metzberg, 1989), lo que asegura un mínimo de una copia intacta por núcleo pese a que la calidad del ADN sea baja. Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 y ITS2) (Figura 5). También encontramos asociado a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS1 y ETS2) (Iwen y col., 2002). Todas estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos (Bruns y col., 1991).



**Figura 5.** Representación esquemática de los genes y los espaciadores internos del ADNr. Las flechas indican los cebadores utilizados en la presente tesis para la amplificación y secuenciación de estas regiones.

La región del gen 18S tiene alrededor de 1800 pb de tamaño, poseyendo tanto dominios variables como conservados. Los polimorfismos de esta región han permitido establecer relaciones taxonómicas principalmente de grandes grupos entre eucariotas, pero también han permitido, en algunos casos, la distinción entre géneros y especies (Einsele y col., 1997). Sin embargo, en el caso de los hongos esta región presenta una elevada similitud entre las especies, y puede ayudarnos a distinguir géneros pero no especies (Iwen y col., 2002).

La región del gen 5.8S, por otro lado, únicamente posee unos 160 pb y se encuentra altamente conservada entre los principales grupos de hongos. Debido a su pequeño tamaño y su conservada naturaleza, este gen no es apropiado para clarificar estudios filogenéticos. No obstante, su secuencia conservada ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, ITS1 y ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas (White y col., 1990).

El gen 28S es el que posee un mayor número de pb, alrededor de 3400, y presenta tanto regiones conservadas como variables. Son estas regiones variables, principalmente los denominados Dominios 1 y 2 (D1 y D2), los que han permitido delimitar especies (Iwen y col., 2002) e incluso categorías taxonómicas superiores (Sampaio y col., 2002).

Por otro lado, las regiones ITS1 e ITS2 que flanquean el gen 5.8S muestran una gran variabilidad entre los eucariotas. La longitud de las secuencias de cada una de estas dos regiones varía desde más de 1000 pb en las células humanas hasta menos de 300 pb en algunas levaduras (Gonzalez y col., 1990; Joseph y col., 1999). Estas regiones han sido utilizadas en numeroso estudios como diana para la identificación de especies fúngicas (Iwen y col., 2002).

#### **1.3.2.2.2. Otros genes**

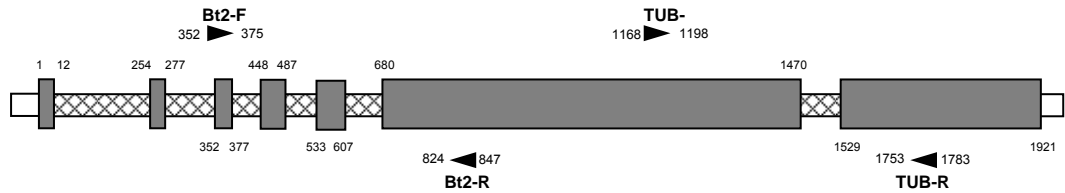
Como ya se ha indicado anteriormente, la mayoría de los análisis filogenéticos en taxonomía de hongos estaban basados principalmente en las secuencias del ADNr. Sin embargo, en determinados casos estas secuencias no han sido lo suficientemente informativas para dar respuesta a ciertos conflictos taxonómicos. Por ello, en los últimos años se ha extendido el uso del análisis de múltiples genes para los estudios filogenéticos, incorporando principalmente el análisis de genes codificantes de proteínas (Berbee y Taylor, 2001). Jong y col. (2001) demostraron que el análisis de múltiples loci puede aportar más resolución y permitir hacer hipótesis filogenéticas más fiables. Estos genes codificantes de

proteínas han de cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizados en filogenia de organismos como son el no haber sufrido transferencia horizontal ni frecuentes duplicaciones génicas. Dos ejemplos de estos genes son la  $\beta$ -tubulina y la calmodulina (Figura 6), ambos seleccionados para llevar a cabo parte de los estudios experimentales de la presente tesis por ser genes que han demostrado tener una gran eficacia para resolver problemas taxonómicos (O'Donnell y col., 1998; Cruse y col., 2002; Couch y Kohn, 2002). Además existen cebadores de las diferentes regiones de ambos genes que son prácticamente universales.

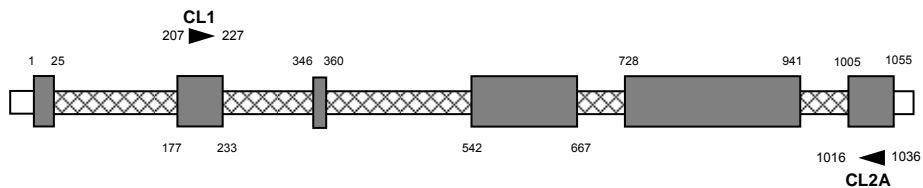
El gen de la  $\beta$ -tubulina es uno de los más utilizados en los últimos años para el estudio de filogenias. Este gen pertenece a la superfamilia de las tubulinas, la cual presenta otras 4 familias que acompañan a la  $\beta$ -, como son la  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, y la  $\epsilon$ -tubulina. La  $\beta$ -tubulina, junto con la  $\alpha$ -, forman los microtúbulos. O'Donnell y col. (1998) mostraron que el gen de la  $\beta$ -tubulina aporta 3.5 veces más información filogenética que el gen 18S del ADN mitocondrial y lo propusieron como marcador usual para el estudio de filogenias del género *Fusarium* Link. Craven y col. (2001) y Schoch y col. (2001) utilizaron secuencias de la  $\beta$ -tubulina como marcador para resolver filogenias en *Calonectria* De Not. o *Epichloë* (Fr.) Tul. & C. Tul. También se ha utilizado la secuencia de aminoácidos de su proteína para estudios de categorías taxonómicas superiores a la de especie (Baldauf y Palmer, 1993; Keeling y col., 2000). Los cebadores comúnmente empleados para la amplificación de este gen se muestran en la Figura 6.

La calmodulina es una proteína ligante de calcio que media los efectos de los iones calcio en numerosos sistemas biológicos, incluyendo señales de transducción, motilidad, secreción y regulación del ciclo celular (James y col., 1995; Rasmussen y col., 1990). Este gen ha sido utilizado en numerosos estudios filogenéticos (Nikoh y col., 1994; O'Donnell y col., 2000c; Couch y Kohn, 2002) para el estudio taxonómico a nivel de especie, aunque también puede ser utilizada para el estudio de grupos taxonómicos superiores debido a que su secuencia de aminoácidos está altamente conservada (Takagi y col., 1980).

## A. $\beta$ -tubulina



## B. Calmodulina



**Figura 6.** Estructura genómica de los genes codificantes de proteínas y de los cebadores utilizados en la presente tesis. Las cajas sombreadas marcan la secuencia codificante de proteína (exón), y las cajas con trama las zonas intrónicas. Los números situados encima y abajo del gen corresponden a la posición de la secuencia de ADN, siendo el número 1 la primera base de la secuencia codificante de proteína. (A) Estructura del gen de la  $\beta$ -tubulina en *Neurospora crassa*. Los cebadores Bt2-F y Bt2-R amplifican un fragmento de unos 495 pb y los cebadores TUB-F y TUB-R amplifican un fragmento de unos 615 pb en *N. crassa* (adaptado de Glass y Donaldson, 1995). (B) Estructura del gen de la calmodulina en *N. crassa*. Los cebadores CL1 y CL2A amplifican un fragmento de unos 809 pb en *N. crassa* (creada a partir de la secuencia completa de la calmodulina de *N. crassa* obtenida del GenBank).

### 1.3.3. Concepto filogenético de especie

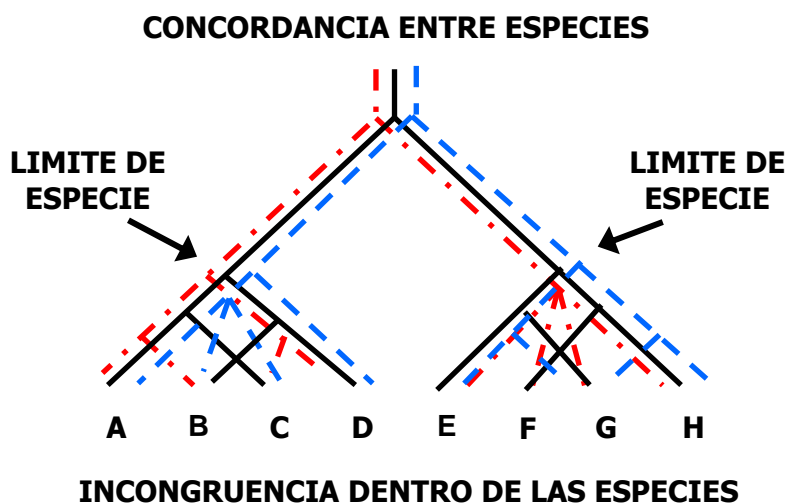
El concepto de especie y los criterios para reconocerlas han sido muy discutidos y todavía presentan muchas controversias. En los últimos años esta controversia no ha disminuido, sino más bien todo lo contrario al detectar que con frecuencia las especies definidas por sus caracteres fenotípicos (especies morfológicas) o reproductivos (especies biológicas) suelen albergar grupos genéticamente bien diferenciados, refiriéndose a ellos como especies filogenéticas. Este hecho ha sido demostrado en diferentes grupos de eucariotas, tales como en invertebrados (Hilton y Hey 1997; Gleason y col. 1998; van Oppen y col. 2000) o en angiospermas (Young, 1998) y de forma común en hongos (Vilgalys y Sun 1994; Hibbett y col. 1995; Aanen y col., 2000; Taylor y col., 2000; Harrington y col., 2002).

El concepto morfológico de especie (CME) es el concepto más utilizado para reconocer especies. Éste se ha aplicado a la mayoría de organismos eucariotas. A excepción de la mayoría de levaduras, las 70.000 especies de hongos descritas hasta la fecha se han identificado a partir de caracteres morfológicos (Kirk y col., 2001) o algún otro carácter fenotípico, como es el crecimiento a diferentes temperaturas (Pitt, 1979), la producción de metabolitos secundarios (Frisvad y Filtenborg, 1990), o la presencia de pigmentos (Besl y Bresinsky, 1997). Sin embargo, las diferencias morfológicas entre las especies de hongos filamentosos no siempre son apreciables debido a que probablemente primero se aíslan genéticamente y posteriormente se diferencian morfológicamente (Taylor y col., 2000).

El concepto biológico de especie (CBE) tal y como describió Mayr (1940) diagnostica la especie como "... grupos que real o potencialmente pueden cruzarse en poblaciones naturales, pero que están reproductivamente aisladas de otros grupos similares". Es el concepto de especie que más se acerca a la realidad de especie y éste debería de ser aplicado siempre que pudiera ser posible. El gran problema para diagnosticar especies biológicas en hongos es que aproximadamente un 20% de éstos son morfológicamente asexuales y no producen meiosporas (Kirk y col., 2001).

Afortunadamente, la secuenciación del ADN ha aportado una alternativa al CBE, el concepto filogenético de especie (CFE). El CFE definía a las especies como el grupo monofilético de organismos más pequeño que podemos diagnosticar, reconocible sobre la base de uno o más caracteres derivados, es decir, únicos y exclusivos del taxón (Cracraft, 1983). En base a esta definición se podían diagnosticar grupos individuales de forma fácil, pero la decisión sobre donde situar el límite de especie era subjetiva, pues, por ejemplo, si el

gen utilizado presentaba dos secuencias diferentes, éstas podían deberse a que fueran dos alelos en una misma población, o bien a las diferencias fijadas entre dos poblaciones diferentes. Podemos evitar esta subjetividad mediante los estudios multigénicos (concordancia entre las genealogías de más de un gen). Cuando la filogenia de los diferentes genes es concordante la topología de los árboles es la misma debido a la fijación de posiciones polimórficas durante el aislamiento genético. La concordancia entre las ramas del árbol permite conectar las especies. Como observamos en la Figura 7 las ramas coincidentes entre las diferentes genealogías permite separar grupos genéticamente aislados, las ramas terminales que no coinciden revelan un conflicto entre genealogías que puede deberse, por ejemplo, a la posible recombinación entre individuos de una misma especie. Por tanto, la transición que va de la concordancia al conflicto marca el límite de especie (Taylor y col., 2000).



**Figura 7.** Análisis de tres genealogías (negra, roja y azul). Observamos como en las especies genéticamente aisladas existe congruencia entre sus genealogías cuando sus ramas se superponen, mientras que dentro de cada especie existe incongruencia (adaptado de Taylor y col., 2000).

El CFE basado en la concordancia genealógica (Avisé y Ball, 1990; Baum y Shaw, 1995; Taylor y col. 2000) puede ser aplicado para todos los organismos, aunque estos sean asexuales o no cultivables, y es el que actualmente pondera en el caso de los hongos (Koufopanou y col., 1997; Geiser y col., 1998; Kasuga y col., 1999; O'Donnell y col., 2000a, b, c; Kroken y Taylor, 2001; Cruse y col., 2002).



## 1.4. Estudios de sexualidad en hongos

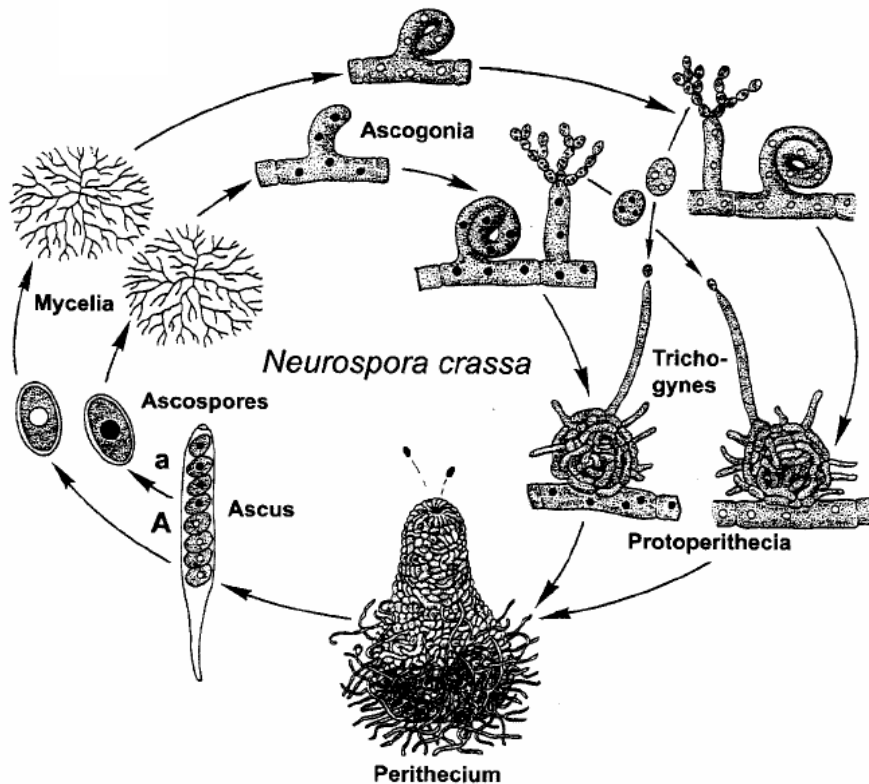
La sexualidad juega un papel crucial para garantizar la diversidad genética de las especies. En el caso de los hongos la reproducción sexual se lleva a cabo por la fusión de núcleos compatibles, para la posterior producción de esporas recombinantes. Aquellos individuos con núcleos sexualmente compatibles poseerán diferente tipo sexual o lo que en inglés se denomina "mating-type" (MAT).

En una especie suelen existir dos tipos diferentes de individuos que son sexualmente compatibles, es decir, dos MATs. Es lo equivalente en organismos superiores a la presencia de dos sexos diferentes. En el caso de los hongos, los individuos con diferente MAT no presentan dimorfismo sexual visible. La existencia de los MATs en hongos fue descubierta por Blakeslee (1904) a principios del siglo XX en mucorales (zigomicetos). Dicho autor introdujo los términos de homotalismo y heterotalismo para diferenciar los individuos fértiles por autofecundación de los estériles por autofecundación, respectivamente. Los individuos heterotáticos sólo se reproducían sexualmente por cruzamiento entre cepas compatibles, definiendo a estas cepas compatibles con los signos + y -. En posteriores trabajos con *Ascobolus magnificus* B.O. Dodge y *Ascobolus carbonarius* P. Karst. (Dodge, 1920) y con diferentes especies de *Neurospora* Shear & B.O. Dodge (Shear y Dodge, 1927) se comprobó que los MATs correspondían a dos formas alélicas de un mismo gen (locus MAT), demostrando en consecuencia que el heterotalismo era bipolar (Whitehouse, 1949). A su vez, se demostró que el heterotalismo de los hongos era independiente de las diferencias sexuales entre individuos, es decir, que las cepas de diferente MAT producen tanto elementos donadores como receptores en la reproducción, que es como decir que ambas aportaran estructuras reproductivas femeninas y masculinas (Figura 8). Sin embargo, el apareamiento de las cepas sólo será posible si ambas presentan diferente MAT (Gwynne-Vaughan y Williamson, 1932). A las diferentes secuencias encontradas en el locus MAT se las denominó "idiomorfos" y no alelos, por tratarse de secuencias muy diferentes que, sin embargo, ocupan el mismo locus en el genoma (Metzenberg y Glass, 1990).

A diferencia de los ascomicetos, los basidiomicetos pueden presentar en algunas especies 4 tipos de MAT diferentes con lo que la complejidad de la reproducción sexual de estos organismos es mayor (Kothe, 2001). Sólo ha sido publicado un ascomiceto filamentoso con múltiples MATs, *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (Cisar y TeBeest,

1999), en el cual la sexualidad está controlada por un locus que presenta múltiples idiomorfos.

La denominación de los idiomorfos en ascomicetos heterotálicos varía en función del grupo taxonómico al que pertenezca el hongo e incluso es propia en algunas especies que sirvieron como modelo para entender la genética de estos genes. Los idiomorfos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen fueron denominados como  $\alpha$  y  $a$ , y para *Schizosaccharomyces pombe* Lindner como  $h-$  (*matM*) y  $h+$  (*matP*) (Coppin y col., 1997). Los idiomorfos en pirenomicetales han sido denominados *mat A* y *mat a*, o *mat -* y *mat +*, mientras que en miembros de los loculoascomicetos y discomicetos como *MAT1-1* y *MAT1-2* (Coppin y col., 1997; Glass y Staben, 1997; Perkins, 1999; Turgeon y Yoder, 2000).



**Figura 8.** Ciclo de vida de la especie heterotálica *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge (Pöggeler, 2001).

Para entender mejor lo explicado anteriormente, en la Figura 8 se ilustra el ciclo de vida del ascomiceto heterotálico *Neurospora crassa*. En *N. crassa*, las ascosporas haploides portadoras cada una de ellas de uno de los dos idiomorfos (*mat A* o *mat a*) al germinar producen un micelio multinucleado. Las cepas haploides de *N. crassa* son hermafroditas. Ambas cepas, *mat A* y *mat a*, diferenciarán órganos sexuales femeninos, el ascogonio, los cuales están rodeados por hifas vegetativas con las que forman el protoperitecio. A través de hifas receptoras (tricógenas) los ascogonios son fertilizados por espermacios (esporas con el carácter sexual opuesto) que son también producidas por ambas cepas. La fertilización de los protoperitecios dará lugar a la formación de los peritecios. En esta fase dicariótica es donde dentro de los peritecios se forman ascos. La fusión nuclear se dará en el interior de los ascos entre células madre de MATs opuestos. La meiosis y una división postmeiotica generarán 8 ascosporas. Cuatro de las esporas de cada asco serán de tipo *mat A* y cuatro del tipo *mat a*.

Los ascomicetos homotálicos no presentan un MAT genéticamente definible y pueden autofecundarse (Glass y col., 1990). El micelio, el cual se origina a partir de una ascospora uninucleada o desde conidios, es capaz de completar el ciclo sexual sin buscar un cruzamiento con otro individuo. En estas especies ambos idiomorfos pueden encontrarse en un mismo individuo (situados en tandem en un mismo cromosoma).

Un tercer tipo de estrategia reproductiva que podemos encontrar en hongos filamentosos es el pseudohomotalismo. Las especies pseudohomotálicas desarrollan algunas esporas con dos núcleos, uno con cada idiomorfo, y por tanto estas son capaces de completar el ciclo sexual por si mismas. Sin embargo, otras esporas sólo contienen un núcleo, por lo que necesitan de un individuo de talo compatible para completar el ciclo sexual.

## 1.5. Estudios de sensibilidad antifúngica

Los estudios de sensibilidad antifúngica nos permiten valorar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos, correlacionar la actividad de los fármacos en estudios *in vivo* y predecir el pronóstico terapéutico. Son útiles también para detectar el desarrollo de cepas resistentes y determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico (Espinel-Ingroff, 1994). Es por ello sumamente importante su estudio en todas aquellas especies fúngicas que sean patógenas.

### 1.5.1. Métodos de estudio *in vitro* de la sensibilidad a los antifúngicos

Los métodos y técnicas de estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos a los agentes antifúngicos son similares a los de los antibacterianos, y su diseño sigue las mismas directrices (Espinel-Ingroff y Shadomy, 1989; Shadomy y col., 1991). En el caso de los hongos filamentosos las dificultades son mayores ya que determinados factores hacen difícil la evaluación de las pruebas *in vitro*. Entre ellos podemos citar su lento crecimiento que se traduce en periodos de incubación más largos provocando la pérdida de actividad de los antifúngicos, y la baja incidencia que presentan las infecciones fúngicas haciendo que la definición de los puntos de corte sea difícil de establecer.

Ante la falta de un método estándar para el estudio de la sensibilidad *in vitro* para los antifúngicos, en 1982 el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (anteriormente, *National Committee for Clinical Laboratory Standards* NCCLS) creó un subcomité con el objeto de establecer una normativa para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. El primer objetivo fue unificar los criterios metodológicos, primero para las levaduras y más tarde para los hongos filamentosos, con el fin de establecer correlaciones entre los resultados obtenidos en el laboratorio y en clínica. Tras varias publicaciones preliminares, en el 2002 el CLSI publicó el documento M27-A2 (NCCLS, 2002a) para el ensayo de antifúngicos con levaduras y el M38-A (NCCLS, 2002b) para los hongos filamentosos. Ambos documentos proponen un método de microdilución en medio líquido y establecen las variables experimentales críticas para los ensayos *in vitro*. Describen la preparación del inóculo, el medio de cultivo, las temperaturas y tiempos de incubación más adecuados así como los criterios de lectura. Desde su aparición, los protocolos establecidos por el CLSI han sido aceptados universalmente como el método de referencia para el ensayo de la actividad *in vitro* de los compuestos antifúngicos.

Sin embargo, este último documento presenta diversas limitaciones como es el hecho de no poseer puntos de corte para considerar a una cepa sensible o resistente a los diferentes antifúngicos, o haber considerado sólo a un reducido número de hongos patógenos humanos.

La técnica más utilizada para los hongos filamentosos, como *P. boydii*, es la dilución en medio líquido (micrométodo), aunque aún se siguen utilizando métodos de difusión en agar para hongos de crecimiento más lento, como los dermatofitos (Shadomy y col., 1991). Mediante estas técnicas se puede cuantificar la actividad de los antifúngicos, expresada como CMI (concentración mínima inhibitoria) o la concentración mínima fungicida (CMF). Por desgracia el proceso para estandarizar las pruebas de estudio a los antifúngicos es lento debido al gran número de variables que pueden influir en los resultados, como son el medio de cultivo, el pH del medio, la densidad del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación (Doern y col., 1986; Espinel-Ingroff y Shadomy, 1989; McGinnis y Rinaldi, 1991; Shadomy y col., 1991; Pfaller y Rinaldi, 1992; Rex y col., 1993).

### **1.5.2. Sensibilidad *in vitro* de *P. boydii* a los antifúngicos**

La mayoría de trabajos publicados sobre la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de *P. boydii* han demostrado una pobre eficacia de la mayoría de éstos frente a dicha especie. Así, antifúngicos como la anfotericina B (AMB), nistanina, nistatina liposomal, itraconazol (ITC), 5-flucitosina (5FC), fluconazol (FLC), terbinafina (TBF) y ketoconazol (KTC) han mostrado ser ineficaces para la mayoría de cepas ensayadas (Carrillo y Guarro, 2001; Cuenca-Estrella y col., 1999). Varios estudios han mostrado CMIs para estos fármacos que pueden indicar resistencia. Los únicos antifúngicos que han mostrado tener una cierta eficacia han sido el miconazol (CMI 90 de 1 µg/ml) (Armin y col., 1987), el ITC, aunque este último sólo de forma ocasional (Uchida y col., 2000; Walsh y col., 1995). Afortunadamente, los nuevos triazoles están mostrando tener una buena actividad *in vitro*. El voriconazol (VRC) presentó CMIs 90 de 0.25 µg/ml en Carrillo y Guarro (2001) y de 0.5 µg/ml en Meletiadis y col. (2002); el ravuconazol (RVC) de 0.125 µg/ml en Carrillo y Guarro (2001) y el posaconazol (PSC) de 0.25 µg/ml y 2 µg/ml en Carrillo y Guarro (2001) y Meletiadis y col., (2002), respectivamente. La actividad *in vitro* de las equinocandinas frente a *P. boydii* ha sido generalmente escasa. La media geométrica de las CMI de la caspofungina para 6 aislados fue de 1.3 µg/ml en Espinel-Ingroff (1998) y la mediana de la CMI para la anidulafungina para 5 cepas fue de 4 µg/ml en Odabasi y col. (2004). Estos resultados *in vitro* no siempre han mostrado correlación en

clínica, ya que la AMB en algunos casos ha resultado ser eficaz en pacientes infectados, habiendo demostrado una pobre actividad *in vitro* (Cunningham y Mitchell, 1996).

Considerando esta pobre actividad de los diferentes antifúngicos *in vitro*, algunos investigadores han intentado determinar la actividad de algunos fármacos ensayados en combinación. Walsh y col. (1995) determinaron la actividad antifúngica *in vitro* de la AMB sola y combinada con varios azoles. Dichos autores demostraron que algunas cepas eran sensibles a la AMB y que las combinaciones ensayadas mostraban una interacción sinérgica frente a un amplio número de aislados, no habiéndose detectado antagonismo en ningún caso. La combinación AMB/FLC mostró los mejores resultados (índice de concentración inhibitoria fraccional = 0.61) (Walsh y col., 1995), aunque en la actualidad los valores indicativos de sinergia deben ser inferiores a 0.5 (Johnson y col., 2004).

Todos estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de obtener nuevas terapias antifúngicas para el tratamiento de las infecciones causadas por este hongo e incluso profundizar en las denominadas terapias combinadas.

### **1.5.3. Tratamiento de las infecciones por *P. boydii***

De lo indicado en el apartado anterior se deduce que el control de las infecciones invasivas de *P. boydii* es dificultoso debido a la resistencia de esta especie a muchos agentes antifúngicos, entre ellos los más utilizados en clínica como son el FLC y la AMB (Ellis, 2002). El tratamiento de elección para las infecciones producidas por este hongo aún no ha sido establecido. La cirugía, cuando ha sido posible, y terapias antifúngicas con derivados de los azoles, principalmente ITC, han sido eficaces en algunos casos (Jabado y col., 1998; Liu y col., 1997; Nomdedeu y col. 1993; Piper y col., 1990). Sin embargo, otros pacientes no han respondido al tratamiento con ITC pese a mostrar eficacia *in vitro* (Lemerle y col., 1998). El miconazol ha sido utilizado con éxito en algunos casos (Wu y col., 2002), pero debido a su elevada toxicidad, a la no existencia de una formulación intravenosa comercializada y al elevado porcentaje de recurrencia de las infecciones causadas por *P. boydii* hacen que este fármaco no sea recomendado en la actualidad. El VRC ha mostrado ser eficaz tanto *in vitro* como al ser utilizado en diversos pacientes, por lo que se podría recomendar como tratamiento de elección, aunque la experiencia clínica requiere ser ampliada (Muñoz y col., 2000; Nesky y col., 2000; Hoffman y Rathbun, 2002). El PSC ha mostrado ser activo *in vitro* frente a *P. boydii*, resultado que se correlaciona con la actividad mostrada *in vivo* en modelo

animal, siendo incluso más eficaz que el ITC (González y col., 2003). Existe todavía muy poca experiencia clínica con PSC, pero podemos destacar un caso de un paciente con múltiples abscesos cerebrales por *P. boydii* que fue tratado previamente y sin éxito con ITC, AMB y KTC y que curó después de tratarlo con PSC (Mellinghoff y col. 2002). El uso de factores estimuladores de colonias de granulocitos se ha apuntado como un potencial fármaco para el tratamiento de diferentes infecciones fúngicas incluida la de pacientes no neutropénicos, sin embargo todavía no se disponen de resultados con infecciones producidas por *P. boydii*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **2. INTERÉS Y OBJETIVOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

En la introducción de esta tesis se ha destacado la importancia cada vez más creciente del género *Pseudallescheria* y en particular de la especie *Pseudallescheria boydii* por su importante implicación en clínica. Se considera un hongo patógeno emergente capaz de producir infecciones graves especialmente en los enfermos inmunodeprimidos. En los últimos años, esta especie ha sido objeto de diversos estudios moleculares que han mostrado su elevada variabilidad intraespecífica. Por otro lado, otros trabajos han puesto de relieve su variabilidad en cuanto a la respuesta a los antifúngicos así como la diferente virulencia que existe entre sus cepas. Todo ello hace suponer que en lugar de una sola especie nos hallamos frente a un complejo de especies que presentan una morfología parecida. Las estrategias seguidas hasta ahora para el estudio de este hongo no han podido determinar si era o no un complejo de especies. En los últimos años se ha demostrado que los análisis de secuencias multigénicas han resultado ser útiles para resolver este tipo de problemas. Ello nos ha hecho pensar que la utilización de este tipo de estrategias moleculares podría ayudarnos a comprobar si existen diferentes especies filogenéticas dentro de *P. boydii* lo que nos permitiría poder explicar la variabilidad antes aludida. Por otra parte, no existen estudios filogenéticos que hayan podido determinar las relaciones existentes entre las especies del género, así como entre éstas y otros géneros relacionados, por lo que la definición y delimitación del género es imprecisa y frecuentemente cuestionada.

Por ello, los objetivos que nos planteamos en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1.** Realizar estudios de secuenciación multilocus con un amplio número de cepas clínicas y ambientales morfológicamente identificadas como *Pseudallescheria boydii* o *Scedosporium apiospermum* (su anamorfo) para intentar detectar posibles nuevas especies crípticas.
- 2.** Caracterizar morfológica y fisiológicamente las posibles especies filogenéticas encontradas y evaluar la utilidad de diferentes marcadores fenotípicos para su detección e identificación en clínica.

## Interés y objetivos

3. Llevar a cabo estudios de sexualidad mediante cruzamientos *in vitro* de aquellas cepas pertenecientes a posibles clados filogenéticos que no hayan formado teleomorfo con la finalidad de comprobar su heterotalismo.
4. Determinar la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de cepas representativas de las posibles especies detectadas para contribuir a definir mejor los tratamientos de las infecciones que ellas producen.
5. Determinar mediante estudios experimentales en un modelo animal la virulencia de las posibles especies filogenéticas encontradas y si existen diferencias entre ellas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

### 3.1. Origen y aislamiento de las cepas

Las cepas utilizadas en los diferentes estudios se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Listado de las cepas estudiadas en la presente tesis.

Cepa	Especie	Procedencia
CBS 311.72 <sup>T</sup>	<i>P. africana</i>	Suelo arenoso marrón, Namibia
CBS 254.72 <sup>T</sup>	<i>P. angusta</i>	Tanque digestor de aguas residuales, Ohio, EUA
CBS 100.26 <sup>t</sup>	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Malasia
CBS 101.22 <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Micetoma en tobillo, Texas, EUA
CBS 103.48 ( <i>Acremonium lutzii</i> ) <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Gránulos y pus, Rio de Janeiro, Brasil
CBS 131.14 ( <i>Sporocybe chartoikoon</i> ) <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Aire, Holanda
CBS 218.35 <sup>a</sup>	<i>P. boydii</i>	Probable micetoma pedis
CBS 225.32 <sup>b</sup>	<i>P. boydii</i>	Probable micetoma pedis, Italia
CBS 267.28 <sup>c</sup>	<i>P. boydii</i>	Alemania
CBS 297.38 ( <i>Sporocybe borzini</i> ) <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Tronco árbol, Italia
CBS 591.90 ( <i>Pseudallescheria shearii</i> ) <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Micetoma en rodilla Buenos Aires, Argentina
CBS 695.70 ( <i>Acremonium suis</i> ) <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Cavidad nasal de un cerdo, Kiev, Ucrania
CBS 948.87 ( <i>Polycyella hominis</i> ) <sup>T</sup>	<i>P. boydii</i>	Micetoma pedis, India
FMR 4072	<i>P. boydii</i>	Sedimento del río Tordera, España
FMR 4167	<i>P. boydii</i>	Otitis Valladolid, España
FMR 6694	<i>P. boydii</i>	Absceso cerebral, Barcelona, España
FMR 6697	<i>P. boydii</i>	Esputo, Madrid, España
FMR 6918	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Barcelona, España
FMR 6919	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Barcelona, España
FMR 6920	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Barcelona, España
FMR 6921	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Barcelona, España
FMR 6922	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Barcelona, España
FMR 7884	<i>P. boydii</i>	Transplante, Madrid, España
FMR 7885	<i>P. boydii</i>	Líquido pleural, Madrid, España
FMR 8521	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, Montsià, España
FMR 8522	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, Deltebre, España
FMR 8530	<i>P. boydii</i>	Suelo cultivado, Deltebre, España
FMR 8532	<i>P. boydii</i>	Suelo cultivado, Montsià, España
FMR 8534	<i>P. boydii</i>	Suelo cultivado, Montsià, España
FMR 8535	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Buenos Aires, Argentina
FMR 8536	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Buenos Aires, Argentina
FMR 8537	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Buenos Aires, Argentina
FMR 8538	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Buenos Aires, Argentina
FMR 8539	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Buenos Aires, Argentina
FMR 8541	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Buenos Aires, Argentina
FMR 8619	<i>P. boydii</i>	Queratitis, Sao Paulo, Brasil
FMR 8620	<i>P. boydii</i>	Queratitis, Sao Paulo, Brasil
FMR 8621	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Barcelona, España
FMR 8622	<i>P. boydii</i>	Piel de pie, Barcelona, España
FMR 8623	<i>P. boydii</i>	Paciente con leucemia, Barcelona, España
FMR 8624	<i>P. boydii</i>	Uña, Barcelona, España
FMR 8625	<i>P. boydii</i>	Paciente con leucemia, Zaragoza, España
FMR 8627	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Madrid, España

---

<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Procedencia</b>
FMR 8628	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Madrid, España
FMR 8629	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Madrid, España
FMR 8630	<i>P. boydii</i>	Úlcera en tobillo, Sant. de Compostela, España
FMR 8703	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Buenos Aires, Argentina
FMR 8724	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial Zaragoza, España
FMR 8725	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial, Zaragoza, España
FMR 8726	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
FMR 8728	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
FMR 8731	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
FMR 8732	<i>P. boydii</i>	Piel del antebrazo, Zaragoza, España
FMR 8736	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial Madrid, España
FMR 8737	<i>P. boydii</i>	Espujo, Madrid, España
FMR 8763	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Tarragona, España
FMR 8827	<i>P. boydii</i>	Biopsia, Zaragoza, España
FMR 8828	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
FMR 8829	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
FMR 8831	<i>P. boydii</i>	Infección diseminada, Barakaldo, España
FMR 8832	<i>P. boydii</i>	Infección diseminada, Barakaldo, España
FMR 8833	<i>P. boydii</i>	Infección diseminada, Barakaldo, España
FMR 8834	<i>P. boydii</i>	Infección diseminada, Barakaldo, España
FMR 8904	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, La Gran Piedra, Cuba
FMR 8905	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, La Gran Piedra, Cuba
FMR 8906	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, La Gran Piedra, Cuba
FMR 8983	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
FMR 8984	<i>P. boydii</i>	Espujo, Zaragoza, España
IHEM 14263	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Angers, Francia
IHEM 14268	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Giens, Francia
IHEM 14354	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Giens, Francia
IHEM 14358	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Tours, Francia
IHEM 14451	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Giens, Francia
IHEM 14462	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Tours, Francia
IHEM 14464	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Tours, Francia
IHEM 14467	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Tours, Francia
IHEM 14638	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Angers, Francia
IHEM 14754	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Tours, Francia
IHEM 14758	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Angers, Francia
IHEM 15144	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Tours, Francia
IHEM 15149	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Giens, Francia
IHEM 15458	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Giens, Francia
IHEM 15579	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Angers, Francia
IHEM 15642	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Giens, Francia
MUCL 14009	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, Yangambi, Zaire
MUCL 14092	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, Yangambi, Zaire
MUCL 18784	<i>P. boydii</i>	Madera tratada, Costa de Marfil
MUCL 20263	<i>P. boydii</i>	Suelo de jardín, Herverlee, Bélgica
MUCL 29258	<i>P. boydii</i>	Fueloil, Antwerpen, Bélgica
MUCL 6106	<i>P. boydii</i>	Suelo de bosque, Haasrode, Bélgica
MUCL 8302	<i>P. boydii</i>	Suelo, Alemania
MUCL 8522	<i>P. boydii</i>	Suelo, Baarn, Holanda
RKI 19/04	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Berlín, Alemania
RKI 2782/95	<i>P. boydii</i>	Trauma y sepsis, Hamburgo, Alemania
RKI 2956/93	<i>P. boydii</i>	Lavado broncoalveolar, fluid Berlín, Alemania

---



Cepa	Especie	Procedencia
RKI 533/03	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Berlín, Alemania
RKI 830/01	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Berlín, Alemania
RKI 866/94	<i>P. boydii</i>	Esputo, Berlín, Alemania
RKI 988/01	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Berlín, Alemania
RV 43605	<i>P. boydii</i>	Origen clínico, Zaire
UTHSC 01-2617	<i>P. boydii</i>	Cavidad maxilar izquierda, Texas, EUA
UTHSC 02-1794	<i>P. boydii</i>	Conjuntiva, Washington, EUA
UTHSC 02-1993	<i>P. boydii</i>	Cavidad esfenoidal, Texas, EUA
UTHSC 02-2130	<i>P. boydii</i>	Esputo, Texas, EUA
UTHSC 02-2309	<i>P. boydii</i>	Uña dedo pulgar, Texas, EUA
UTHSC 02-2319	<i>P. boydii</i>	Nódulo limfático, California, EUA
UTHSC 02-2504	<i>P. boydii</i>	Linfoma, California, EUA
UTHSC 02-2689	<i>P. boydii</i>	Esputo, Colorado, EUA
UTHSC 02-2742	<i>P. boydii</i>	Lavado broncoalveolar, Montana, EUA
UTHSC 02-636	<i>P. boydii</i>	Esputo, Pennsylvania, EUA
UTHSC 02-862	<i>P. boydii</i>	Fibrosis quística, Texas, EUA
UTHSC 02-901	<i>P. boydii</i>	Esputo, Texas, EUA
UTHSC 03-1001	<i>P. boydii</i>	Hombro, Texas, EUA
UTHSC 03-1436	<i>P. boydii</i>	Left ring finger Florida, EUA
UTHSC 03-1438	<i>P. boydii</i>	Mano derecha, Pennsylvania, EUA
UTHSC 03-1575	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial Colorado, EUA
UTHSC 03-1824	<i>P. boydii</i>	Biopsia de la epidermis, Florida, EUA
UTHSC 03-2008	<i>P. boydii</i>	Cerebro, Utah, EUA
UTHSC 03-2327	<i>P. boydii</i>	Biopsia pulmonar Indiana, EUA
UTHSC 03-3680	<i>P. boydii</i>	Esputo, Texas, EUA
UTHSC 03-924	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial New Orleans, EUA
UTHSC 03-929	<i>P. boydii</i>	Esputo, Texas, EUA
UTHSC 04-1249	<i>P. boydii</i>	Esputo, Texas, EUA
UTHSC 04-1689	<i>P. boydii</i>	Pierna izquierda, California, EUA
UTHSC 04-2387	<i>P. boydii</i>	Lavado broncoalveolar, Ohio, EUA
UTHSC 04-2661	<i>P. boydii</i>	Esputo, Florida, EUA
UTHSC 04-2748	<i>P. boydii</i>	Escamas de pie, Minnesota, EUA
UTHSC 04-308	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial, Texas, EUA
UTHSC 04-359	<i>P. boydii</i>	Esputo, Texas, EUA
UTHSC 04-504	<i>P. boydii</i>	Pulmón, Delaware, EUA
UTHSC 05-1053	<i>P. boydii</i>	Biopsia nasal, Iowa, EUA
UTHSC 05-1175	<i>P. boydii</i>	Cavidad esfenoidal, Texas, EUA
UTHSC 05-1325	<i>P. boydii</i>	Cornea, Maryland, EUA
UTHSC 05-327	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial Florida, EUA
UTHSC 05-361	<i>P. boydii</i>	Lavado bronquial Florida, EUA
UTHSC 05-378	<i>P. boydii</i>	Lacrimal derecho, Texas, EUA
UTHSC 05-485	<i>P. boydii</i>	Esputo, Ohio, EUA
UTHSC 05-990	<i>P. boydii</i>	Lavado broncoalveolar, California, EUA
CBS 489.72 <sup>T</sup>	<i>P. desertorum</i>	Suelo salino, Kuwait
CBS 418.73 <sup>T</sup>	<i>P. ellipsoidea</i>	Suelo, Tayikistan
CBS 129.78 <sup>T</sup>	<i>P. fimeti</i>	Heces de cabra, Aligarh, India
CBS 106.53 <sup>T</sup>	<i>P. fusoides</i>	Heces de cabra, Aligarh, India
FMR 7249	<i>S. prolificans</i>	Origen clínico, California, EUA
FMR 7251	<i>S. prolificans</i>	Esputo, Massachusetts, EUA
FMR 7292	<i>S. prolificans</i>	Sangre, Australia
FMR 7294	<i>S. prolificans</i>	Sangre, Australia
FMR 8702	<i>S. prolificans</i>	Buenos Aires, Argentina

Abreviaturas utilizadas: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; IHEM, The BCCM<sup>TM</sup>/IHEM biomedical fungi and yeasts collection, Belgium; MUCL, The BCCMTM /MUCL - Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain, Belgium; RKI, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany; RV, Collection of the Institute for Tropical Medicine (ITG, Antwerp), Belgium; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, USA

<sup>a</sup> cepa recibida como *Indiella americana*; <sup>b</sup> cepa recibida como *Monosporium apiospermum*; <sup>c</sup> cepa recibida como *Sporotrichum councilmanii*; <sup>†</sup> cepa tipo

### 3.1.1. Cepas clínicas

Las cepas clínicas utilizadas en el presente estudio fueron facilitadas por diferentes clínicos de hospitales españoles y de otros países: I. Pujol y F. Ballester (Hospital San Juan, Reus); A. del Palacio (Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid); V. Cádiz (Hospital Valle de Hebron, Barcelona); P. Godoy (Escuela Paulista de Medicina, Universidad Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil); J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona); A. Rezusta (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza); R. Negroni (Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina); J. Llovo (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela); C. Rubio (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza); D. A. Sutton (Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA).

También se utilizaron cepas clínicas procedentes de las siguientes colecciones de cultivos: *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) (Utrecht, Holanda); *Biomedical Fungi and Yeasts Collection* (BCCM/IHEM) (Bruselas, Bélgica); *Institute for Tropical Medicine* (RV) (Amberes, Bélgica); y *Robert Koch Institute* (RKI) (Berlín, Alemania).

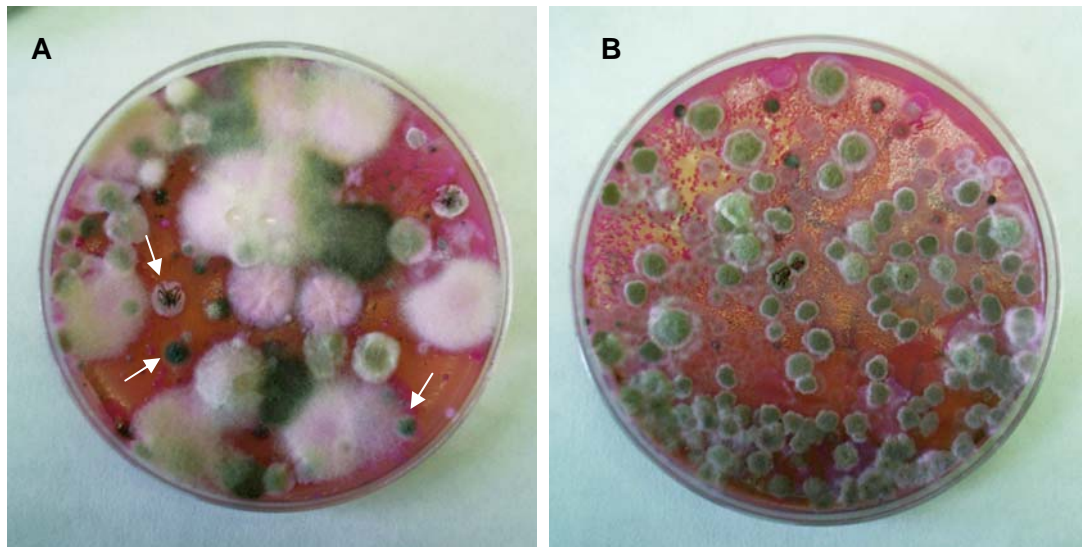
### 3.1.2. Cepas ambientales

Gran parte de las cepas ambientales estudiadas fueron aisladas a partir de muestras de tierras recolectadas durante diferentes campañas llevadas a cabo por el personal de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Medicina de Reus. También se incluyeron en el estudio numerosas cepas procedentes de diferentes colecciones de cultivos tales como: CBS; *Agro-Industrial Fungi and Yeasts Collection* (BCCM/MUCL) (Bruselas, Bélgica).

### 3.1.2.1 Activación de tierras, aislamiento y obtención de cultivos puros.

Las muestras de suelo fueron recolectadas preferentemente en jardines y de los estratos superficiales de los mismos, para ello se utilizaron bolsas de polietileno estériles. Un gramo de este material era suspendido en 10 mL de agua estéril y 1 mL de esta suspensión era depositado en el medio selectivo Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol agar (DRBC) (Oxoid, Reino Unido) con benomilo añadido a una concentración final de 10 µg/mL e incubadas a temperatura de 35°C. Los cultivos se observaban regularmente mediante el empleo de un microscopio estereoscópico para detectar crecimiento fúngico.

A partir de las colonias que presentaban la morfología propia de *P. boydii* (Figura 9), se realizaban montajes en lactofenol para su observación microscópica. Si la observación de las estructuras fúngicas correspondía a un posible *P. boydii* procedíamos a su aislamiento en cultivo puro en medio agar harina de avena (OA).



**Figura 9.** Cultivos obtenidos a partir de muestras de suelo en medio DRBC con benomilo. (A) Placa de DRBC mostrando colonias típicas de *P. boydii* (señaladas con flechas) con las de otras especies. (B) Placa de DRBC en donde la práctica totalidad de las colonias pertenecen a *P. boydii*.

### 3.1.3. Cepas de colección y de referencia

En el presente estudio se han utilizado también cepas tipo de las diferentes especies del género *Pseudallescheria* así como de especies sinónimas a *P. boydii* procedentes de la colección del CBS. Estas cepas se encuentran detalladas en la Tabla 3.

### 3.2. Medios de cultivo utilizados

Los medios de cultivo utilizados en el presente estudio fueron los siguientes:

#### - Agar patata y glucosa (PDA)

Patata	200 g
Glucosa	20 g
Agar Difco	20 g
Agua destilada	1000 mL

Las patatas se cortaban en porciones, se colocaban en un recipiente apropiado con 500 mL de agua, se llevaban a ebullición manteniéndola durante una hora. Posteriormente se filtraba el caldo a través de una gasa desechando el residuo sólido, se adicionaba la dextrosa y el agar previamente disuelto en 500 mL de agua y se agregaba más agua hasta completar 1000 mL. Se dispensaba en botellas de vidrio y se esterilizaba en autoclave durante 20 min a 121°C.

#### - Agar harina de avena (OA)

Harina de avena	30 g
Agar Difco	20 g
Agua destilada	1000 mL

Se colocaba en un recipiente apropiado la harina de avena y 500 mL de agua destilada y se calentaba hasta ebullición durante una hora. Posteriormente se filtraba el caldo mediante una gasa desechando el residuo sólido, se adicionaban 20 g de agar previamente disuelto en agua

y se agregaba más agua hasta completar 1000 mL. Se dispensaba en frascos de vidrio y se esterilizaban en autoclave durante 20 min a 121°C.

#### **- Agar patata y zanahoria (PCA)**

Patatas	20 g
Zanahoria	20 g
Agar Difco	20 g
Agua destilada	1000 mL

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

### **3.3. Conservación de las cepas**

Los cultivos puros se conservaban en tubos de polietileno con el medio de cultivo estéril, inclinado en "pico de flauta", preferentemente de OA, PCA y PDA. Para la conservación durante periodos más largos se cubría totalmente el cultivo con aceite de vaselina o parafina líquida estéril. Estos cultivos se almacenaban a temperatura ambiente.

Para conservar material en herbario se procedía a la desecación de las colonias en las que se había observado un crecimiento óptimo del hongo, en una estufa a 45-55°C. Una vez deshidratadas se almacenaban en sobres de papel encerado. Tanto los holotipos como los cultivos vivos de las cepas de interés se depositaban en colecciones internacionales de cultivos, preferentemente en el *International Mycological Institute* (IMI, CABI) (Egham, Gran Bretaña), BCCM/IHEM, BCCM/MUCL y el CBS.

Para la conservación durante largos periodos de tiempo, las cepas también eran liofilizadas. Para ello eran sembradas en OA e incubadas durante 2 semanas a 30°C. Posteriormente se recogía todo el cultivo con un asa de siembra y se mezclaba en 3 mL de leche desnatada al 10% (crioprotector) previamente esterilizada a 121°C en 1 atmósfera de

sobrepresión durante 15 min. Se dispensaban 0.5 mL de la mezcla en viales de vidrio estéril de 1.5 mL y a continuación se congelaban a  $-45^{\circ}\text{C}$  durante 1 h dentro del propio liofilizador (Advantage 2.0 Series; Virtis Company Gardiner NY, Estados Unidos). La sublimación se conseguía cuando el condensador llegaba a la temperatura de  $-45^{\circ}\text{C}$ , y seguidamente se hacía un vacío de 200 mTorr y se programaba el siguiente ciclo de liofilización:  $-30^{\circ}\text{C}$  240 min,  $-10^{\circ}\text{C}$  240 min,  $+10^{\circ}\text{C}$  300 min,  $+30^{\circ}\text{C}$  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.

### **3.4. Técnicas de biología molecular**

#### **3.4.1. Extracción de ADN**

El ADN era obtenido a partir de material fúngico crecido en placas de PDA. Estos cultivos eran jóvenes, de aproximadamente 1 semana, para minimizar compuestos inhibidores de la PCR como pueden ser los pigmentos.

El ADN se extrajo directamente a partir de las colonias mediante el kit *Fast DNA Kit* (Qbiogene, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Añadir a un eppendorf del kit *FastDNA* 1000  $\mu\text{L}$  de CLS Y e introducir el material fúngico raspado de la superficie del cultivo (unos 200 mg).
2. Homogenizar en el "bead beater" durante 30 s a velocidad 5 (repetir proceso de 2 o 3 veces, en función de pared del hongo, con 5 minutos de reposo en hielo entre cada homogenización).
3. Centrifugar durante 5 min a 14.000 rpm.
4. Resuspender por agitación la "binding matrix" y añadir 600  $\mu\text{L}$  en un eppendorf de 2 mL previamente rotulado.
5. Añadir 600  $\mu\text{L}$  de la muestra y vortear.
6. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 1 min a 14000 rpm.
8. Eliminar el sobrenadante por pipeteo.

9. Resuspender con 500  $\mu\text{L}$  de SEWS-M con el vortex (al abrir un nuevo kit, este producto se tiene que resuspender con 100 mL de etanol absoluto).
10. Centrifugar 1 min a 14000 rpm.
11. Eliminar el sobrenadante por pipeteo, apurando con pipetas de pequeños volúmenes.
12. Resuspender con 100  $\mu\text{L}$  de DES con ayuda del vortex e incubar 3 min a temperatura ambiente.
13. Centrifugar durante 1 min a 14.000 rpm.
14. Pipetear el sobrenadante en un eppendorf limpio de 1,5 mL (unos 100  $\mu\text{L}$ ). Centrifugar 3 min a 14.000 rpm.
15. Recoger el sobrenadante (ADN limpio) con mucho cuidado de no aspirar los restos de la "binding matrix" en otro eppendorf limpio de 1,5 mL (unos 80  $\mu\text{L}$ ).
16. Preparar una dilución 1/50 en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ .

Durante la presente tesis se probaron otros métodos de extracción pero este fue el que mostró un mejor resultado.

El ADN extraído era posteriormente cuantificado y valorada su pureza mediante el espectrofotómetro GeneQuant *Pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

### **3.4.2. Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ADNr**

Para la amplificación de la región ITS completa (ITS1, ITS2) y el gen 5.8S del ADNr se usaron los cebadores ITS5 e ITS4 (Tabla 4), descritos por White y col. (1990). La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  que contenía de 20 a 60 ng de ADN genómico, 1 X tampón (10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 0.4  $\mu\text{M}$  de cebador ITS5, 0.4  $\mu\text{M}$  de cebador ITS4 (Tabla 3), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de cada dNTP's y 1.5 U *Taq* polimerasa (Applied Biosystems). El programa de amplificación fue el siguiente: pre-desnaturalización a 94°C, 5 min; 30 ciclos de: 95°C, 30 s (desnaturalización), 50°C, 1 min (hibridación) y 72°C, 1 min (extensión); extensión final a 72°C, 7 min.

### **3.4.3. Amplificación parcial de dos regiones del gen de la $\beta$ -tubulina**

Se amplificaron dos regiones diferentes del gen de la  $\beta$ -tubulina tal y como se ha especificado en el apartado 1.3.5.2.

Con el par de cebadores TUB-F/TUB-R (Tabla 4) se amplificó la región denominada TUB. La mezcla de PCR se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ L que contenía de 20 a 60 ng de ADN genómico, 1 X tampón (10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1  $\mu$ M de cebador TUB-F, 1  $\mu$ M de cebador TUB-R (Cruse y col., 2002), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP's y 1.5 U *Taq* polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: pre-desnaturalización a 94°C, 5 min; 35 ciclos de: 95°C, 30 s (desnaturalización), 55°C, 1 min (hibridación) y 72°C, 1 min (extensión); extensión final a 72°C, 7 min.

Para la amplificación del fragmento BT2 se diseñaron dos cebadores (Tabla 4) con posiciones degeneradas a partir de los descritos por Glass y Donaldson (1995). La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ L que contenía de 20 a 60 ng de ADN genómico, 1 X tampón (10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2  $\mu$ M de cebador Bt2-F, 2  $\mu$ M de cebador Bt2-R (Tabla 4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP's y 1.5 U *Taq* polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: pre-desnaturalización a 94°C, 5 min; 35 ciclos de: 95°C, 30 s (desnaturalización), 60°C, 1 min (hibridación) y 72 °C, 1 min (extensión); extensión final a 72°C, 7 min.

#### **3.4.4. Amplificación parcial del gen de la calmodulina**

Para la amplificación de una región parcial del gen de la calmodulina se utilizaron los cebadores CL1 y CL2A (Tabla 4) (O'Donnell y col., 2000c). Las concentraciones de los productos y del ADN genómico así como el programa de PCR utilizado fue el mismo que en el caso del par de cebadores TUB-F/TUB-R (sección 3.4.3).

#### **3.4.5. Amplificación del gen 18S del ADNr**

La amplificación parcial del gen 18S del ADNr fue realizado utilizando los pares de cebadores NS1 (White y col., 1990) y NS24UCB (Gargas y Taylor, 1992). La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ L que contenía de 20 a 60 ng de ADN genómico, 1 X tampón (10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 0.4  $\mu$ M de cebador NS1, 0.4  $\mu$ M de cebador NS24UCB (Tabla 4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP's y 1.5 U *Taq* polimerasa. El protocolo utilizado para la amplificación fue el descrito por Henrion y col. (1994) con algunas modificaciones (Gené y col., 1996). La reacción de PCR constaba de los siguientes pasos: pre-desnaturalización a 94°C, 5 min; 30 ciclos de: 94°C, 1 min



(desnaturalización), 42°C, 1 min (hibridación) y 72°C, 3 min (extensión); extensión final a 72°C, 7 min.

### 3.4.6. Comprobación y purificación del producto amplificado

Los productos finales se analizaban mediante electroforesis en geles de agarosa (agarose MP; Boehringer-Mannheim) al 1.5% para el gen 18S y al 2% para el resto de amplificaciones. Para comprobar el tamaño de los amplificados se añadía en el primer y último pocillo de cada gel el marcador de peso molecular *100 bp Ladder* (Invitrogen, Groningen, The Netherlands).

El producto de PCR se purificaba con el kit comercial *GFX™ PCR DNA and gel band Purification kit* (Amersham Biosciences, NJ. USA.), siguiendo el siguiente protocolo:

1. Preparar una columna de GFX para cada purificación.
2. Añadir 500 µL de Capture buffer a la GFX columna y transferir todo el ADN amplificado.
3. Mezclar cuidadosamente pipeteando de unas 4 a 6 veces.
4. Centrifugar 2 min a 12.000 rpm.
5. Eliminar el líquido que contiene el *collection tube* y colocar la columna GFX dentro del *collection tube*.
6. Añadir 500 µL de Wash Buffer a la columna y centrifugar 2 min a 12.000 rpm.
7. Descartar el *collection tube* y transferir la columna GFX a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
8. Poner 30 µL de TE directamente sobre la superficie de la matriz de la columna GFX
9. Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar 3 min a 12.000 rpm y recuperar el ADN purificado. Tirar la matriz.

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

### 3.4.7. Secuenciación de los productos de la PCR

Los cebadores que se utilizaron para la secuenciación son los mismos que en el caso de la amplificación de los diferentes genes (Tabla 4), a excepción del amplificado del 18S. En

este caso para la reacción de secuenciación se utilizaron el par de cebadores NS19UCB y NS22UCB (Gargas y Taylor, 1992) (Tabla 4).

Para la reacción de secuenciación se utilizaron dos tubos eppendorf por amplificado, uno para cada cebador, de forma que al final del proceso obtuviéramos las dos cadenas de ADN secuenciadas. El volumen final en cada tubo eppendorf era de 10  $\mu$ L que contenía 100-200 ng (4  $\mu$ L) de producto de PCR purificado, 4  $\mu$ L de ABI PRISM BigDye™ Terminators vers. 2.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1  $\mu$ L (3.2 pmol) de cebador y 1  $\mu$ L de  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ . 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 ésta reacción fue precipitado con etanol y analizado en el secuenciador capilar automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

**Tabla 3.** Cebadores y secuencias utilizadas para la PCR y la secuenciación de ADN.

Cebador	Locus	Secuencia (5'a 3')	Referencias
ITS 5	ITS ADNr	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White y col. (1990)
ITS 4	ITS ADNr	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White y col. (1990)
TUB-F	$\beta$ -tubulina	CTG TCC AAC CCC TCT TAC GGC GAC CTG AAC	Cruse y col. (2002)
TUB-R	$\beta$ -tubulina	ACC CTC ACC AGT ATA CCA ATG CAA GAA AGC	Cruse y col. (2002)
Bt2-F	$\beta$ -tubulina	GG(CT) AAC CA(AG) AT(ATC) GGT GC(CT) GC(CT)	Glass y Donaldson (1995)
Bt2-R	$\beta$ -tubulina	ACC CTC (AG)GT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass y Donaldson (1995)
CL1	Calmodulina	GA(GA) T(AT)C AAG GAG GCC TTC TC	O'Donnell y col. (2000c)
CL2A	Calmodulina	TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC	O'Donnell y col. (2000c)
NS1	SSU ADNr	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	White y col. (1990)
NS19UCB	SSU ADNr	CCG GAG AAG GAG CCT GAG AAA C	Gargas y Taylor (1992)
NS22UCB	SSU ADNr	AAT TAA GCA GAC AAA TCA CT	Gargas y Taylor (1992)
NS24UCB	SSU ADNr	AAA CCT TGT TAC GAC TTT TA	Gargas y Taylor (1992)

### 3.4.8. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

Para la obtención de las secuencias consenso a partir de las dos secuencias complementarias, se empleó el programa AutoAssembler vers. 1.40 (Applied Biosystems).

Una vez obtenidas todas las secuencias consensos, para cada gen se alineaban utilizando el programa informático de alineamiento múltiple Clustal X (Thompson y col., 1997). Los alineamientos se corrigieron visualmente mediante el procesador de textos Microsoft Word 2002.

### **3.4.9. Depósito y obtención de secuencias de bases de datos Internacionales**

Todas las secuencias obtenidas en la presente tesis eran depositadas en la base de datos del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) online a través de Webin ([www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html](http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html)). Esta es una herramienta de Internet para la sumisión de secuencias nucleotídicas para la base de datos del EMBL. Otras secuencias empleadas en la presente tesis han sido obtenidas de la base de datos del GenBank a través de la pagina web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **3.4.10. Inferencia filogenética**

Todos los análisis previos de los datos se realizaron construyendo árboles filogenéticos mediante el método de distancias del *Neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987). Esto nos permitía realizar una más rápida valoración de nuestros datos antes del análisis con el método de máxima parsimonia, más costoso computacionalmente. El análisis filogenético con el método de *Neighbor-Joining* se realizó a partir de las secuencias alineadas utilizando el programa informático *MEGA* version 3.1 (Kumar y col., 2004) seleccionando el modelo de Kimura- 2 parametros (Kimura, 1980) y el test de *bootstrap* con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) para comprobar la fiabilidad estadística de las diferentes ramas generadas.

El análisis filogenético final se realizó mediante el método de máxima parsimonia utilizando para ello el programa PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) en su versión 4.0b10 (Swofford, 2001) para PC. 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 ha dejado la opción Multrees por defecto (PAUP\* guarda todos los árboles mínimos que encuentra durante el intercambio de ramas) y se han colapsado las ramas con longitud máxima igual a cero. A parte del número

de pasos, en los análisis se ha obtenido el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI). La medida de confianza o fiabilidad de los grupos obtenidos ha sido valorada mediante un análisis de bootstrap de 500 réplicas.

En el caso de generación de árboles de máxima parsimonia uniendo la información de varios genes, se realizaba previamente un test ILD (*Incongruence length Difference*) también denominado en el software del PAUP\* *partition homogeneity test* (PHT). Si el valor de ILD generado por la unión de nuestros genes tenía una  $P < 0.001$  los genes no podían ser unidos para un análisis combinado (Cunningham, 1997).

Ya habíamos comentado en el apartado 1.4.3. de la introducción la importancia de la elección de un buen grupo externo o *outgroup* para los análisis filogenéticos. Este debía de ser cercano de forma que permitiera una mejor inferencia al compartir caracteres históricamente similares, facilitando así el alineamiento de secuencias. Para la mayoría de estudios la especie de elección como *outgroup* fue *Scedosporium prolificans*. En aquellos estudios que no permitían la selección de un buen *outgroup*, el método utilizado para enraizar el árbol filogenético fue la opción del PAUP\* *root at the midpoint*.

### **3.5. Estudios morfológicos**

Paralelamente a los estudios filogenéticos se realizó la caracterización morfológica de cada una de las cepas trabajadas. Se realizó un estudio macroscópico en cultivo de las colonias y, posteriormente, el estudio morfológico microscópico.

#### **3.5.1. Estudios culturales**

Para la caracterización macroscópica de las colonias se utilizaron diferentes medios de cultivo: PCA, PDA y OA.

Las colonias se incubaban a diferentes temperaturas (25, 37, 40, 42, 45, y 50°C en oscuridad), observando las características macroscópicas de las mismas a los 7 y 14 días de su inoculación, y determinando las siguientes características:

- Diámetro
- Color (anverso y reverso) mediante el libro de colores de Kornerup y Wanscher (1984)

- Textura (algodonosa, pulverulenta, granulosa, aterciopelada,...)
- Topografía (lisa, rugosa, radiada, plana, elevada,...)
- Márgenes (enteros, fimbriados,...)
- Pigmento difusible (ausencia, presencia y color)
- Gotas de exudado
- Presencia de formas teleomórficas

### 3.5.2. Estudios microscópicos

Para caracterizar microscópicamente los hongos se han estudiado diferentes estructuras. Para la forma teleomórfica: **ascosporas** (color, forma, tamaño, ornamentación), **ascos** (tipo, forma), **ascoma** (color, forma, tamaño) y **peridio** (tipo, forma). Para los anamorfos: **células conidiógenas** (conidiogénesis, forma, tamaño), **conidios** (color, forma, tamaño), **conidióforos** (tipo, forma, tamaño), **sinemas** (forma, tamaño), y **clamidosporas** (color, forma, tamaño). Para estudiar las estructuras descritas anteriormente se han utilizado diferentes técnicas que se detallan a continuación.

#### 3.5.2.1. Microscopía óptica

Las muestras fueron observadas con los siguientes microscopios: Leitz Dialux 20EB con contraste de fases, Olympus CH2 y Olympus BH2 con contrastes de fases e interferencia Nomarski. Las microfotografías fueron obtenidas con un microscopio Leitz Dialux 20, usando contraste de fase e interferencia Nomarski, captando las imágenes con una cámara digital Olympus DP10 acoplada, y procesando las imágenes en el programa "Analysis" (Soft Imaging System GMBH, Germany).

##### a. Preparación directa

Con una aguja hipodérmica estéril se recogía una porción de la colonia y se depositaba en un portaobjetos al que previamente se le colocaba una gota de ácido láctico al 85%. Luego se depositaba un cubreobjetos y se procedía al estudio de dicha preparación. De cada una de las cepas fúngicas se realizaban preparaciones procedentes de los diferentes medios de cultivo.

Para la observación y la documentación gráfica de los mismos, se utilizó el microscopio Olympus BH-2. Se utilizaron los objetivos de x4 y x10 para medir y fotografiar los

ascomas, el de x40 y x100, para observar y medir células conidiógenas, siendo este último el único empleado en la observación y toma de medidas de ascos, ascosporas y conidios.

### **b. Microcultivo**

Una vez aislados los hongos en cultivo puro, se estudiaban las características principalmente de los anamorfos mediante la técnica del microcultivo. En una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo adecuado para el estudio, se cortaban asépticamente bloques de 1 cm<sup>2</sup> y se colocaban sobre el medio de agar no recortado, se inoculaban las cuatro aristas superiores de cada uno de estos bloques y se depositaba un cubreobjetos estéril (Figura 10). Cuando se observaba un desarrollo apropiado del hongo, se hacían preparaciones, separando cuidadosamente el cubreobjetos del bloque de agar, y depositándolo sobre un portaobjetos con líquido de montaje.



**Figura 10.** Técnica de microcultivo empleada en la presente tesis.

### **3.5.2.2. Microscopía electrónica de barrido**

Para la observación detallada de diferentes estructuras, se utilizó la microscopía electrónica de barrido. En estos casos las muestras fueron procesadas siguiendo el método descrito por Figueras y Guarro (1988), el cual incluye las siguientes fases:

- **Fijación.** Se seleccionaban las áreas de la colonia con crecimiento óptimo mediante el microscopio estereoscópico, y se cortaban mediante una hoja de bisturí estéril. Las muestras, de unos 5-7 mm de lado, se sumergían en una solución fijadora de 2-glutaraldehído al 2% v/v en tampón fosfato de concentración 0.1 M y pH 7.3-7.4 (Sabatini y col., 1963), contenida en viales de cristal. Para evitar que las muestras flotaran y para aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el fijador, se agregaba una gota de Tween 80 (Carroll y Carroll, 1973). Los viales se colocaban dentro de un desecador y se sometían a la acción del vacío, generado por una bomba acoplada, durante una hora (Campbell, 1972; Hanlin, 1982; Rosing, 1982). Posteriormente, las muestras eran separadas del fijador por decantación cuidadosa y se lavaban durante 15 minutos con solución de tampón fosfato 0.1 M. Se llevaba a cabo una fijación secundaria mediante una solución de tetraóxido de osmio ( $O_4Os$ ) 1% p/v en solución de tampón fosfato 0.1M (Palade, 1952).

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

1. Solución 30% v/v.....15 minutos
2. Solución 50% v/v.....15 minutos
3. Solución 70% v/v.....15 minutos
4. Solución 80% v/v.....15 minutos
5. Solución 90% v/v.....15 minutos
6. Solución 96% v/v.....15 minutos
7. Solución 100% v/v..... 60 minutos  
(renovando el alcohol absoluto cada 20 minutos)

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

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

- **Secado.** Para secar las muestras se utiliza la técnica del punto crítico, previa sustitución del agua de la muestra por CO<sub>2</sub> (Anderson, 1953; Bartlet y Burstyn, 1975). 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 CO<sub>2</sub>.

- **Montaje y metalización.** Las muestras secas se pegaban a un porta-muestras de aluminio mediante plata coloidal o pegamento de secado rápido. Los bordes de la muestra se cubrían con plata coloidal para favorecer su conductividad. Las muestras así acondicionadas se introducían en un metalizador Polaron Sputter Coater, se sometían a una atmósfera de gas argón y, siguiendo la técnica de *sputtering* (Echlin y Kaye, 1979), se cubrían con una capa de oro de 100-200 µm de espesor.

- **Observación y fotografía de las muestras.** Las muestras ya procesadas se examinaban en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400 del servicio de Microscopía Electrónica del Servicio de Recursos Científicos y Técnicos de la Universidad Rovira i Virgili. Las microfotografías se obtenían de forma digitalizada en los formatos .tif o .jpg.



### 3.6. Estudios fisiológicos

Se realizaron un total de 59 pruebas fisiológicas. Las fuentes para las pruebas de asimilación del carbono probadas fueron: D-glucosa, D-galactosa, D-glucosamina, D-ribosa, D-xylosa, L-arabinosa, D-arabinosa, L-ramnosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, salicin, melibiosa, lactosa, rafinosa, almidón soluble, glicerol, ribitol, xilitol, L-sorbosa, L-arabinitol, D-manitol, inositol, citrato, metanol, etanol, ácido láctico, ácido tánico, ácido málico, D-fructosa, D-manosa, melecitosa, D-glucitol y dextrina. Las fuentes utilizadas para las pruebas de asimilación de nitrógeno fueron: nitrato, nitrito, L-lisina, cadaverina, creatina y creatinina. También se realizaron las siguientes pruebas fisiológicas: tolerancia a la cicloheximida (0.05% y 0.1%), al NaCl (2, 5 y 10%) y MgCl<sub>2</sub> (2, 5 y 10%), hidrólisis de la urea, formación de almidón, licuefacción de la gelatina, producción de ácido y termotolerancia (25, 37, 40, 42, 45 y 50°C).

El inóculo fue preparado rascando la colonia fúngica, después de 7 días creciendo en PDA, ayudándonos de un asa de cultivo y suspendiendo el micelio en solución salina estéril. La suspensión fúngica se agitó mediante un vortex durante 15 s y filtrada a través de una gasa estéril, con el objetivo de eliminar las hifas y obtener una suspensión exclusivamente de conidios. La concentración de la suspensión de conidios fue ajustada con una cámara de Neubauer a 10<sup>5</sup> conidios/mL. La viabilidad de los conidios fue siempre verificada sembrando 100 µL en PDA de una dilución seriada de cada inóculo e incubando posteriormente a 25°C. El crecimiento y la capacidad de asimilación fueron probados en medio líquido siguiendo el protocolo descrito por Yarrow (1998). El medio de cultivo usado para testar las fuentes de carbono y nitrógeno fue medio de nitrógeno base (Becton Dickinson Co, Sparks, Maryland) y de carbón base (Becton Dickinson Co, Sparks, Maryland), respectivamente. El medio de cultivo para los controles negativos únicamente contenía medio base. La tolerancia a la cicloheximida fue probada de acuerdo a Yarrow (1998). La tolerancia al MgCl<sub>2</sub> y al NaCl fue probada usando un 5% de glucosa en medio de nitrógeno base (de Hoog y col., 1994). Todas las pruebas, con la excepción de la ureasa, licuefacción de la gelatina, producción de ácido y formación de almidón, fueron realizadas usando microplacas de 96 pocillos, estériles y desechables. Se dispensó un volumen de 150 µL de medio en las filas 1 a 12 de la microplaca con el uso de pipetas multicanal. La columna 1 fue para los controles positivos y la 12 para los negativos. Cada pocillo fue inoculado con 50 µL de la suspensión de conidios. Las microplacas

fueron incubadas a 25°C. La producción de biomasa fue verificada a los 7 días, con una lectura final a los 14 días.

La hidrólisis de la urea fue probada usando el agar urea Christensen (Yarrow, 1998), incubando a 25°C durante 4 días, y el resultado fue considerado positivo si el medio viraba a rosa. La producción de ácido fue probada en el medio *Cluster's chalk* (50 g glucosa, 5 g CaCO<sub>3</sub>, 5 g extracto de levadura, 20 g de agar, 1 L de agua destilada) (Yarrow, 1998). La licuefacción de la gelatina fue probada en un medio compuesto por 100 g gelatina, 5 g glucosa, 6.7 g de medio de nitrógeno base y 1 L de agua destilada e incubado a 21°C durante 3 semanas. Las lecturas fueron realizadas después de 2 horas de incubación a 4°C (Yarrow, 1998). La prueba de la formación extracelular de almidón fue realizada en el medio II (10 g glucosa, 6.7 g de medio de nitrógeno base, 15 g agar, 1 L agua destilada) e incubado posteriormente a 25°C (Yarrow, 1998). Para los estudios de termotolerancia los aislados fueron cultivados en PDA e incubados en oscuridad durante 14 días.

### 3.7. Estudios de sexualidad

Mediante los estudios de sexualidad se pretendía detectar posibles especies heterotálicas entre aquellas que habían mostrado ser autoestériles en los diferentes medios probados. Para ello se obtuvieron cultivos monospóricos de diferentes cepas autoestériles y se cruzaron entre sí. En el caso de hallar cruzamientos positivos, se obtenían ascosporas de uno de los ascomas generados, y tras realizar cultivos monopóricos, éstos eran cruzados entre sí con el objetivo de corroborar el bialelismo que poseen las especies heterotálicas, así como la esperada segregación mendeliana 1:1 que deberían de presentar los dos MATs.

#### 3.7.1. Obtención de cultivos monospóricos

Los cultivos monospóricos se obtuvieron a partir de conidios y ascosporas.

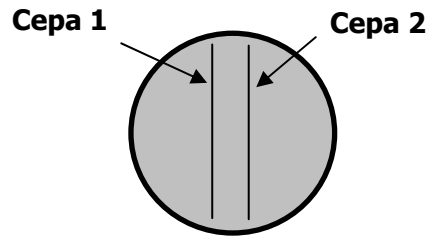
- **Conidios:** Se seleccionaron un total de 15 cepas que fueron subcultivadas en placas de PDA, a 30°C durante 5 a 6 días. Una vez comprobada la esporulación de la placa mediante un microscopio estereoscópico, estas eran rascadas ayudándonos de una asa de cultivo y suspendiendo el micelio en agua estéril. Dicha suspensión fue filtrada a través de una gasa estéril para obtener una suspensión exclusivamente constituida por conidios. La cuantificación

de la misma fue mediante una cámara de Neubauer, posteriormente se inoculaba en una placa de PDA una dilución que permitiera una buena separación entre colonias. Estas placas eran cultivadas a 30°C y revisadas a partir de las 24 h de incubación, con el objetivo de apreciar la germinación de los conidios con un microscopio estereoscópico. Cada microcolonia se recogía junto con el agar con ayuda de una aguja hipodérmica, y se depositaba en una nueva placa de PDA para la obtención del cultivo monospórico.

- **Ascosporas:** Se obtuvieron los cultivos monospóricos de ascomas a partir de un cruzamiento fértil. Así se recogía uno de los ascomas cerrados y se depositaba en un tubo con agua estéril. Este ascoma era limpiado repetidamente con agua estéril con la ayuda de una pipeta pasteur esteril, con el fin de eliminar los conidios que pudieran estar adheridos a su pared. Se transfería a un nuevo tubo con agua destilada estéril. Posteriormente, se depositaba sobre la superficie estéril de una placa de petri vacía realizando estas manipulaciones con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se cubría el ascoma con unas gotas de agua destilada estéril y con la ayuda de una aguja hipodérmica, se provocaba su rotura para la liberación de las ascosporas. Estas eran recogidas con la ayuda de un asa de cultivo y eran depositadas en un nuevo tubo con 50  $\mu$ L de agua destilada estéril. Una alícuota de la suspensión de ascosporas era examinada mediante un microscopio con el fin de asegurar la ausencia de conidios. Las ascosporas eran inoculadas en PDA, e incubadas a 30°C toda una noche en oscuridad. Posteriormente eran observadas con un microscopio estereoscópico y las colonias eran repicadas en otra placa de PDA para asegurarnos que procedía de una sola ascospora.

### **3.7.2. Cruzamientos**

A partir de los cultivos monospóricos las diferentes cepas a probar eran enfrentadas en una placa de OA. Cada cepa era inoculada en una mitad de la placa de OA en una línea que atravesara toda la placa, tal y como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Representación gráfica de una placa de cruzamiento, donde cada una de las líneas representa la zona de inoculación de la cepa a testar.

La distancia entre las cepas enfrentadas era de aproximadamente 1 cm. Se cruzaron las 15 cepas entre si en todas las posibles combinaciones incluyendo el enfrentamiento de una cepa consigo misma. Se realizaron dos placas de OA por cruzamiento. Estas placas eran cultivadas a 30°C en oscuridad y eran observadas periódicamente para la detección de ascomas. Una vez observados estos, se realizaban preparaciones para comprobar de que se trataban de ascomas fértiles. El seguimiento de los cruzamientos se realizaba durante un periodo máximo de 8 meses.

En el caso de las ascosporas la metodología empleada era la misma, pero se cruzaron únicamente 10 ascosporas provenientes de un único ascoma.

### 3.8. Estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Técnica de microdilución

Se realizaron estudios de sensibilidad *in vitro* frente a diferentes antifúngicos para un total de 84 cepas. Éstas representaban los diferentes grupos filogenéticos encontrados en el estudio 4.1.1.

#### 3.8.1. Antifúngicos utilizados

Para la realización de los estudios de sensibilidad *in vitro* se utilizaron los antifúngicos que figuran en la Tabla 5. Todos los antifúngicos empleados fueron sustancias puras. En ningún caso se ensayaron preparados comerciales. Todos se almacenaron a temperatura ambiente, excepto la terbinafina, que se guardó en la nevera.

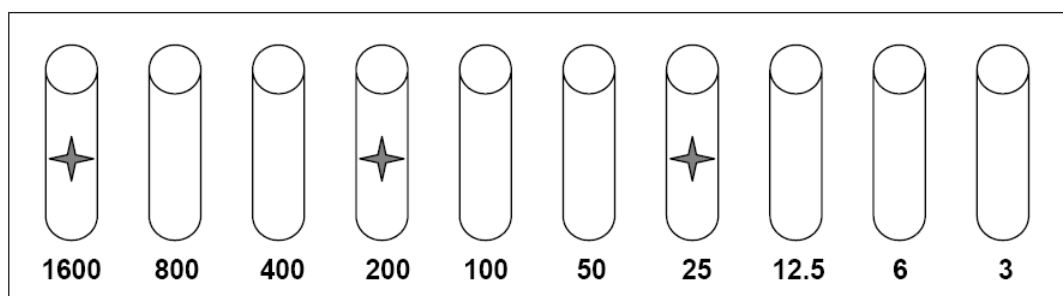
**Tabla 5.** Relación de antifúngicos utilizados en las pruebas de sensibilidad *in vitro* y procedencia de los mismos.

Antifúngico	Procedencia
Albaconazol (UR-9825) (ABC)	Uriach, Barcelona, España
Anfotericina B (AMB)	Farmacopea americana USP (Rockville, Maryland, EEUU)
Fluconazol (FLC)	Pfizer, Madrid, España
Itraconazol (ITC)	Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica
Ketoconazol (KTC)	Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica
Micafungina (MFG)	Fujisawa GmbH, München, Alemania
Posaconazol (PSC)	Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, Reino Unido
Ravuconazol (BMS-207147) (RVC)	Bristol-Myers Squibb Company, de New Brunswick, New Jersey, EEUU
Terbinafina (TBF)	Novartis, Basilea, Suiza
Voriconazol (VRC)	Pfizer, Madrid, España
Flucitosina (5FC)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EEUU

#### 3.8.2. Preparación de las microplacas de antifúngicos

Para la preparación de las microplacas se siguió el método descrito en el documento M38-A del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*). De forma resumida, primero se establecía para cada antifúngico el rango de diluciones que se quería ensayar. Si el

antifúngico estaba incluido en el documento M38-A (AMB, ITC, FLC, KTC, PSC, RVC, VRC, 5FC) se utilizaba el rango indicado, y si el antifúngico no estaba incluido (ABC, MFG, TBF), se consultaba la bibliografía existente. A continuación se preparaba un banco de diluciones dobles seriadas utilizando como disolvente DMSO (dimetil sulfóxido), siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 12. A partir de la dilución más concentrada (solución madre de 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el ejemplo representado en la figura), cada concentración representa la mitad de la anterior.



**Figura 12.** Esquema de las diluciones de un antifúngico. Los tubos señalados con una estrella son los que sirven para preparar las tres diluciones siguientes (adaptado de Ortoneda, 2003).

Las diluciones se preparaban siguiendo un esquema que minimiza los errores de pipeteo. A partir del primer tubo (concentración 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se preparaban los tres tubos siguientes (800, 400, 200). A partir del tubo con una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se preparaban los tubos con 100, 50, y 25, y a partir de este último se preparaban el resto.

Posteriormente se diluía el contenido de cada uno de los 10 tubos en medio RPMI en proporción 1:50 y se dispensaba en las microplacas (100  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ ). Cada dilución se dispensaba en una columna comenzando por la columna 1 en orden de mayor a menor concentración (Figura 13). Las dos últimas columnas (11 y 12) se llenaban con medio RPMI + 2%DMSO. Se utilizaban para hacer el control negativo (control del medio) y el positivo (control del crecimiento del hongo). Las placas un vez preparadas se guardaban congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
C	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
D	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
E	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
F	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
G	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	C-	C+
H	16*	8*	4*	2*	1*	0.5*	0.25*	0.125*	0.06*	0.03*	C-*	C+*

**Figura 13.** Esquema correspondiente a la distribución de las concentraciones de antifúngico en la microplaca siguiendo el gradiente de concentraciones de la anterior figura. Las concentraciones están expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ . \*, cepa control; C-, control del medio de cultivo (ausencia de antifúngico e inóculo); C+, control de crecimiento de la cepa (ausencia de antifúngico).

### 3.8.3. Preparación de los inóculos para los estudios *in vitro*

Las cepas estudiadas fueron subcultivadas en placas de PDA, a 30°C durante 5 a 6 días. Las colonias fueron rascadas ayudándonos de una asa de cultivo y suspendiendo el micelio obtenido en solución fisiológica. Dicha suspensión fue filtrada a través de gasa estéril para obtener exclusivamente una suspensión constituida por conidios. Luego se ajustaron a la concentración de  $4 \times 10^5 - 5 \times 10^6$  conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer, realizando a continuación diluciones 1/50 en RPMI. Se dispensaban 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de esporas en cada pocillo, obteniéndose una concentración final de esporas en cada microplaca de  $4 \times 10^3 - 5 \times 10^4$  UFC/mL. Una vez dispensado el inóculo en la microplaca, ésta se incubaba a 35°C.

### **3.8.4. Lectura e interpretación de los resultados**

La lectura de la microplaca se realizaba a las 48 horas. Para la lectura se utilizaba un espejo invertido y se evaluaba el crecimiento fúngico en cada uno de los pocillos con una escala de 0 a 4. Se asignaba un valor de 4 a aquellos pocillos cuyo crecimiento era igual al del pocillo control positivo, es decir, 0% de inhibición, 3 para 25% de inhibición, 2 para el 50%, 1 para escaso crecimiento y 0 en el caso de no observarse crecimiento del hongo. Se utilizaron dos criterios de lectura para la CMI. Para la AMB, la TBF y los triazoles, la CMI se definió como la menor concentración de antifúngico que provocaba un 100% de inhibición del crecimiento fúngico. Para FLC, KTC, 5FC, y MFG, la CMI se definió como la menor concentración que provocaba un 50% de inhibición del crecimiento fúngico comparado con el control.

### **3.9. Comparación de la virulencia de diferentes cepas en un modelo animal**

A partir de los resultados obtenidos en el estudio 4.1.1 se seleccionaron un total de 10 cepas, representantes de 5 de los grupos filogenéticos obtenidos en el estudio 4.1.1. Se ensayó la virulencia de las diferentes cepas tanto en animales inmunosuprimidos como en animales inmunocompetentes.

#### **3.9.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron un total de 10 ratones para cada una de las cepas ensayadas. Fueron así utilizados 100 ratones inmunosuprimidos y 100 ratones inmunocompetentes. Los ratones eran machos OF1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) con un peso medio de 30 g por cepa estudiada. Los animales fueron estabulados en condiciones estándar y con acceso libre a agua y comida. El estudio realizado fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili.

#### **3.9.2 Inmunosupresión**

En el caso de estudio con animales inmunosuprimidos, los ratones recibieron una dosis única de dos fármacos el día anterior a la infección. Estos dos fármacos son la ciclofosfamida (Genoxal, Laboratorios Funk S. A., Barcelona) administrada por vía



intraperitoneal a 200 mg/kg, y 5-fluorouracilo (Fluoro-uracil, Productos Roche S. A., Madrid) administrado por vía intravenosa a 150 mg/kg.

### **3.9.3. Infección de los animales**

Para el establecimiento de la infección sistémica en ratón, los inóculos se administraron intravenosamente a través de la vena lateral de la cola en un volumen de 0.2 mL a una concentración de  $5 \times 10^4$  conidios/mL en el caso de animales inmunosuprimidos, y de  $1 \times 10^6$  conidios/mL en animales inmunocompetentes .

Los animales eran supervisados durante 30 días después de la infección y se valoraba únicamente la supervivencia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **4. RESULTADOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **4.1. TAXONOMÍA: FILOGENIA, MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA EN *PSEUDALLESCHERIA* Y HONGOS RELACIONADOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

# 4.1.1. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species

Fèlix Gilgado, Josep Cano, Josepa Gené y Josep Guarro

*Journal of Clinical Microbiology*, 43:4930–4942

## Resumen:

En este trabajo hemos realizado un estudio morfológico y molecular con 60 cepas de origen clínico y ambiental procedentes de diferentes regiones geográficas con el objeto de determinar si realmente *Pseudallescheria boydii* es una especie bien delimitada o si se trata de un complejo de especies. El análisis de secuencias parciales de los genes  $\beta$ -tubulina [2 loci (BT2 y TUB)] y calmodulina y de la región ITS del ADNr ha demostrado que en realidad *P. boydii* es un complejo de especies. *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea* y *Pseudallescheria fusioidea*, las cuales fueron previamente consideradas como sinónimas de *P. boydii*, han podido ser diferenciadas genética y morfológicamente de ésta. En base a nuestros estudios filogenéticos hemos propuesto dos nuevas especies para la ciencia, *Pseudallescheria minutispora* y *Scedosporium aurantiacum*. Hemos hallado características morfológicas relevantes que nos permiten diferenciarlas de las otras especies del complejo. Todos los aislados incluidos en *S. aurantiacum* tienen un origen clínico, mientras que los incluidos en *P. minutispora* son ambientales.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



## ABSTRACT

*Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*) is the species responsible for human scedosporiosis, a fungal infection with a high mortality rate and which is difficult to treat. Recently, it has been demonstrated that high genetic variation exists within this species. We have performed a morphological and molecular study involving numerous strains of clinical or environmental origins and from different countries. The analysis of partial sequences of the  $\beta$ -tubulin (two loci) and calmodulin genes and the internal transcribed spacer region of the rRNA gene has demonstrated that *P. boydii* is a species complex. The combined analysis of the sequences of the four loci of 60 strains has showed the presence of 44 haplotypes in the ingroup. Three species morphologically related to *P. boydii* sensu stricto, i.e., *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, and *Pseudallescheria fusoidea*, which had previously been considered synonyms, could be differentiated genetically from *P. boydii* in our study. It is relevant that two of the three strains now included in *P. ellipsoidea* have caused invasive infections. The species *Pseudallescheria minutispora* and *Scedosporium aurantiacum* are clearly phylogenetically separated from the other species studied and are here proposed as new. Morphological features support this proposal. All the strains included in *S. aurantiacum* species have a clinical origin, while those included in *P. minutispora* are environmental. Further studies are needed to demonstrate whether all the species included in the *P. boydii* complex have different clinical spectra and antifungal susceptibility.

## INTRODUCTION

*Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*) is a ubiquitous ascomycetous fungus that causes a wide array of human infections that can affect practically all the organs of the body (8). These infections have been known for a long time, but in recent years, a marked increase in severe invasive infections has been noticed, mainly in immunocompromised hosts. The treatment of these infections has not yet been resolved, and the mortality rate is very high (3, 17). One of the most typical features of this species, which

is very rare in other pathogenic fungi, is its ability to develop sexual structures on routine culture media. The presence of spherical ascomata (cleistothecia) and fusiform or ellipsoidal ascospores allows easy identification of this species and its differentiation from the other species of *Scedosporium*, *Scedosporium prolificans*, whose sexual state still remains unknown.

On the basis of nuclear DNA-DNA reassociation, some studies have proved that important genetic variation exists in *P. boydii*. Gueho and de Hoog (10) found three infraspecific ecological and clinical groups. Rainer et al. (16) reported the existence of five different small-subunit rRNA gene sequence lengths. Random amplified polymorphic DNA studies also demonstrated that numerous and very different genotypes can be found (7). Other authors have reported considerable differences with respect to growth and sporulation (4, 5, 9). In addition, a high variability in antifungal susceptibility of the different isolates and in their clinical response has been observed (1, 2). All these data seem to suggest that *P. boydii* is probably a species complex. In recent years, application of the phylogenetic species concept in different biological species of pathogenic fungi has revealed phylogenetic lineages that reflected species divergence (12, 13) and the existence of cryptic species. These putative cryptic species in *P. boydii* can show different pathological behavior and different antifungal susceptibility, so their delimitation and characterization are key in order to choose the appropriate treatment of the severe infections caused by these fungi.

This paper reports the results of a combined phenotypic and phylogenetic study of numerous clinical and environmental strains, including several fresh isolates, of the *P. boydii* species complex and the description of two new species.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal isolates.** Sixty isolates of *Pseudallescheria boydii* and relatives from environmental or clinical sources were included in the study (Table 1). Clinical isolates were provided by different reference culture collections (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands [CBS], Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain, [FMR], The BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussels, Belgium [IHEM], Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium [MUCL], Collection of the Institute for Tropical Medicine, Antwerp, Belgium [RV], and Robert Koch Institute, Berlin, Germany [RKI]) or different physicians. Environmental isolates were generally fresh isolates recovered by the authors from soil samples from different geographical regions, and others were also provided

by different culture collections. In addition, reference strains of each of the species *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, and *Pseudallescheria fusoidea* were included in the study. Isolates were stored at 4 to 7°C until morphological or molecular studies were performed.

**Isolation from soil.** Soil samples were collected mainly from the superficial layer of soil (mainly garden soils) by using sterilized polyethylene bags. These bags were closed by rubber bands and labeled. Suspensions of this material were cultured on the selective medium Dichloran Rose-Bengal chloramphenicol agar (Oxoid, United Kingdom) with benomyl added at a final concentration of 10 µg/ml and incubated at room temperature. When typical colonies of *P. boydii* were observed, we tried to isolate them in pure culture.

**DNA extraction, amplification, and sequencing.** DNA was extracted and purified directly from fungal colonies according to the Fast DNA kit protocol (Bio101, Vista, Calif.), with a minor modification that consisted of the homogenization step repeated three times with a FastPrep FP120 instrument (Thermo Savant, Holbrook, N.Y.). The DNA was quantified with GeneQuant *pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). The internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear rRNA gene was amplified with the primer pair ITS5 and ITS4 (21), a fragment of the nuclear gene calmodulin (CAL) was amplified with the degenerated primer pair CL1 and CL2A (14), and two regions within the β-tubulin gene, BT2 and TUB, were amplified using the degenerated primer pair BT2-F (5'-GG(CT)AACCA(AG)AT (ATC)GGTGC(CT)GC(CT)-3') and BT2R(5'CCCTC(AG)GTGTAGTGACCCTTGGC-3') and TUB-F/TUB-R (6), respectively.

The PCR mixture (25 µl) included 20 to 60 ng of fungal DNA template, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (10X Perkin-Elmer buffer II plus MgCl<sub>2</sub> solution; Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.), 100 µM each deoxynucleoside triphosphate (Promega, Madison, Wis.), 1 µM of each primer, and 1.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Roche). The amplification program included an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing for 1 min at 50°C (ITS), 55°C (CAL and TUB), or 60°C (BT2), and extension for 1 min at 72°C. A final extension step at 72°C for 7 min was included at the end of the amplification. After PCR, the products were purified with a GFX™ PCR DNA purification kit (Pharmacia Biotech, Cerdanyola, Spain) and stored at -20°C until they were used in sequencing.

#### 4.1. Taxonomía: Filogenia, Morfología y Fisiología

The protocol for sequencing was the *Taq* DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Gouda, The Netherlands). Reactions were run with a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). The consensus sequences were obtained using the Autoassembler program (Applied Biosystems).

**Phylogenetic analysis.** The sequences were aligned using the Clustal X (version 1.8) computer program (19) followed by manual adjustments with a text editor. Most-parsimonious tree (MPT) analyses were performed by using PAUP\* version 4.0b10 (18). 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. *Scedosporium prolificans* (FMR 7294) and *Pseudallescheria africana* (CBS 311.72) were chosen as the outgroup. Regions of sequences with ambiguous alignments were excluded from all analyses (ITS, positions 58 and 59; BT2, positions 90 to 126), and gaps were treated as missing data. Support for internal branches was assessed using a heuristic parsimony search of 500 bootstrapped data sets. The combined data set was tested for incongruence with the partition homogeneity test (PHT), as implemented in PAUP\*. To avoid detecting incongruence that is expected within lineages, partition homogeneity tests were restricted to data sets containing only 20 individuals that represented the main lineages (CBS 254.72, FMR 4072, FMR 4167, FMR 6694, FMR 6697, FMR 6920, FMR 6921, FMR 7884, FMR 8532, FMR 8540, FMR 8541, FMR 8623, FMR 8625, FMR 8630, IHEM 14268, IHEM 14467, IHEM 15458, MUCL 14009, RKI 2956/93, RKI 2782/95, and RV 43605). To test alternative phylogenetic relationships, the Kishino-Hasegawa maximum-likelihood ratio test (11) was performed, as implemented in PAUP\*.

**Morphological study.** The fungi were subcultured on potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) for macroscopic examination and growth rates at 25, 37, 40, 42, 45, and 50°C in darkness. For the study of microscopic characteristics, they were cultivated on oatmeal agar (OA) (30 g oat flakes, 1 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g agar, 1 liter tap water). The microscopic features were determined by making wet mounts with lactic acid, which were then examined under a light microscope (Leitz Dialux 20).

**Nucleotide sequence accession numbers.** All the sequences obtained were deposited in the GenBank database. Accession numbers are shown in Table 1.

**Table 1.** Isolates included in the study and their origins

Isolate	Source	GenBank accession no.			
		BT2	TUB	CAL	ITS
FMR 4072	River sediment, Tordera River, Spain	AJ889592	AJ890122	AJ890216	AJ888384
FMR 4167	Otitis, Valladolid, Spain	AJ888952	AJ889580	AJ890152	AJ888385
FMR 6694	Cerebral abscess, Barcelona, Spain	AJ888953	AJ889581	AJ890153	AJ888386
FMR 6697	Sputum, Madrid, Spain	AJ888954	AJ889582	AJ890154	AJ888387
FMR 6918	Garden soil, Barcelona, Spain	AJ888955	AJ889583	AJ890155	AJ888433
FMR 6919	Garden soil, Barcelona, Spain	AJ888956	AJ889585	AJ890156	AJ888388
FMR 6920	Garden soil, Barcelona, Spain	AJ888957	AJ889986	AJ890157	AJ888434
FMR 6921	Garden soil, Barcelona, Spain	AJ888958	AJ889987	AJ890158	AJ888389
FMR 6922	Garden soil, Barcelona, Spain	AJ888959	AJ889988	AJ890159	AJ888390
FMR 7884	Transplant, Madrid, Spain	AJ889594	AJ890126	AJ890209	AJ888391
FMR 7885	Pleural liquid, Madrid, Spain	AJ888960	AJ889989	AJ890160	AJ888392
FMR 8521	Forest soil, Montsia, Spain	AJ889853	AJ890007	AJ890178	AJ888430
FMR 8522	Forest soil, Deltebre, Spain	AJ889854	AJ890008	AJ890179	AJ888431
FMR 8530	Cultivated soil, Deltebre, Spain	AJ889857	AJ890011	AJ890182	AJ888406
FMR 8532	Cultivated soil, Montsia, Spain	AJ889858	AJ890012	AJ890183	AJ888407
FMR 8534	Cultivated soil, Montsia, Spain	AJ889859	AJ890013	AJ890185	AJ888408
FMR 8535	Soil, Buenos Aires, Argentina	AJ889860	AJ890014	AJ890186	AJ888409
FMR 8537	Soil, Buenos Aires, Argentina	AJ889861	AJ890110	AJ890187	AJ888410
FMR 8538	Soil, Buenos Aires, Argentina	AJ889862	AJ890111	AJ890188	AJ888443
FMR 8539	Soil, Buenos Aires, Argentina	AJ889863	AJ890112	AJ890189	AJ888411
FMR 8540	Soil, Buenos Aires, Argentina	AJ889864	AJ890113	AJ890190	AJ888412
FMR 8541	Soil, Buenos Aires, Argentina	AJ889605	AJ890128	AJ890215	AJ888413
FMR 8619	Keratitis, Brazil	AJ889584	AJ890115	AJ890192	AJ888416
FMR 8620	Keratitis, Brazil	AJ889585	AJ890116	AJ890193	AJ888417
FMR 8621	Cystic fibrosis, Barcelona, Spain	AJ889586	AJ890117	AJ890194	AJ888418
FMR 8622	Foot skin, Barcelona, Spain	AJ889587	AJ890118	AJ890195	AJ888419
FMR 8623	Leukemic patient, Barcelona, Spain	AJ889596	AJ890125	AJ890210	AJ888427
FMR 8625	Leukemic patient, Zaragoza, Spain	AJ889588	AJ890119	AJ890196	AJ888420
FMR 8630	Ulcer of ankle, Santiago de Compostela, Spain	AJ889597	AJ890133	AJ890219	AJ888440
RV 43605	Human, Zaire	AJ888951	AJ889579	AJ890341	AJ888383
IHEM 14263	Cystic fibrosis, patient 1, Angers, France	AJ888961	AJ889990	AJ890161	AJ888436
IHEM 14268	Cystic fibrosis, patient 4, Giens, France	AJ888962	AJ889991	AJ890162	AJ888393
IHEM 14354	Cystic fibrosis, patient 7, Giens, France	AJ888963	AJ889992	AJ890163	AJ888437
IHEM 14358	Cystic fibrosis, patient 9, Tours, France	AJ888964	AJ889993	AJ890164	AJ888438
IHEM 14451	Cystic fibrosis, patient 3, Giens, France	AJ888965	AJ889994	AJ890165	AJ888394
IHEM 14462	Cystic fibrosis, patient 8, Tours, France	AJ888966	AJ889995	AJ890166	AJ888395
IHEM 14464	Cystic fibrosis, patient 8, Tours, France	AJ888967	AJ889996	AJ890167	AJ888396
IHEM 14467	Cystic fibrosis, patient 9, Tours, France	AJ888968	AJ889997	AJ890168	AJ888397
IHEM 14638	Cystic fibrosis, patient 1, Angers, France	AJ888969	AJ889998	AJ890169	AJ888398
IHEM 14754	Cystic fibrosis, patient 8, Tours, France	AJ888970	AJ889999	AJ890170	AJ888399
IHEM 14758	Cystic fibrosis, patient 1, Angers, France	AJ889846	AJ890000	AJ890171	AJ888400
IHEM 15144	Cystic fibrosis, patient 8, Tours, France	AJ889847	AJ890001	AJ890172	AJ888401
IHEM 15149	Cystic fibrosis, patient 5, Giens, France	AJ889848	AJ890002	AJ890173	AJ888402
IHEM 15458	Cystic fibrosis, patient 6, Giens, France	AJ889599	AJ890135	AJ890221	AJ888441
IHEM 15579	Cystic fibrosis, patient 2, Angers, France	AJ889600	AJ890136	AJ890222	AJ888439
IHEM 15642	Cystic fibrosis, patient 4, Giens, France	AJ889849	AJ890003	AJ890174	AJ888403
MUCL 6106	Forest soil, Haasrode, Belgium	AJ889850	AJ890004	AJ890175	AJ888404
MUCL 8302	Soil, Germany	AJ889855	AJ890009	AJ890180	AJ888442
MUCL 8522	Humic soil, Baarn, the Netherlands	AJ889589	AJ890120	AJ890208	AJ888421
MUCL 14009	Forest soil, Yangambi, Zaire	AJ889851	AJ890005	AJ890176	AJ888422
MUCL 14092	Forest soil, Yangambi, Zaire	AJ889602	AJ890130	AJ890213	AJ888429
MUCL 18784	Treated wood ( <i>Coelocarpou preussi</i> ), Ivory Coast	AJ889856	AJ890010	AJ890181	AJ888405
MUCL 20263	Greenhouse soil, Herverlee, Belgium	AJ889852	AJ890006	AJ890177	AJ888423
MUCL 29258	Fuel oil, Antwerpen, Belgium	AJ889593	AJ890123	AJ890217	AJ888424
RKI 2782/95	Trauma and sepsis, Hamburg, Germany	AJ889598	AJ890134	AJ890220	AJ888432
RKI 2956/93	Bronchoalveolar lavage fluid, Berlin, Germany	AJ889865	AJ890114	AJ890191	AJ888415
CBS 101.22	Mycetoma, Texas	AJ889590	AJ890121	AJ890207	AJ888435
CBS 106.53	Goat dung, Aligarh, India	AJ889601	AJ890131	AJ890212	AJ888428
CBS 254.72	Half-digested sewage tank, Ohio	AJ889604	AJ890129	AJ890214	AJ888414
CBS 311.72	Brown sandy soil, Tsintsabis, Namibia	AJ889603	AJ890132	AJ890218	AJ888425
CBS 418.73	Soil, Tadzjikistan	AJ889595	AJ890124	AJ890211	AJ888426
FMR 7294	Blood, Australia	AJ889591	AJ890127	AJ890223	AJ888444

## RESULTS

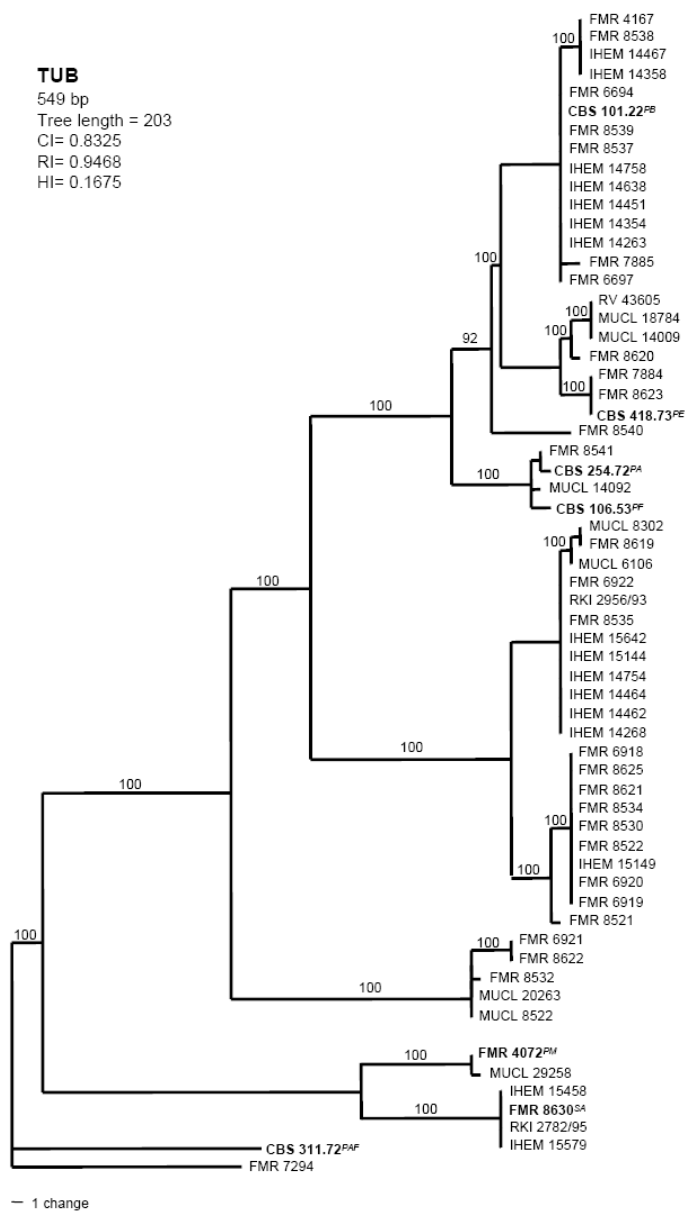
**Phylogeny.** Sixty isolates of *P. boydii* and relatives were chosen to examine species limits and evolutionary relationships among them. With the primers used, we were able to amplify and sequence 522 bp, 419 bp, 549 bp, and 570 bp of the ITS, BT2, TUB, and CAL loci, respectively. Of the 2,060 nucleotides sequenced, 386 characters (18.73%) were parsimony informative in the different *P. boydii* isolates. The lowest number was 42 in the ITS region, and the highest was 160 in CAL region. Sequences of the four region genes were analyzed phylogenetically as separate and combined data sets.

Phylogenetic analysis of the 419-bp BT2 data set yielded 12 MPT, which resulted in a total of 25 haplotypes (Fig. 1). There were 246 constant, 93 parsimony-informative, and 77 variable parsimony-uninformative characters in this fragment. The type strains of *P. fusoidea*, *P. ellipsoidea* and *P. angusta* were interspersed with the isolates of *P. boydii*. Four main highly supported clades (100%) were shown: the basal one comprising 4 European clinical isolates; two other small clades made up of 5 and 2 almost exclusively environmental isolates; and the biggest one, which comprised the 49 remaining isolates. However, inside the latter, another six terminal branches were present, each of them supported by a 100% bootstrap.

Parsimony analysis of the TUB data set yielded 420 MPT with 203 steps in length, in which 18 nodes received 100% bootstrap support. There were 420 constant, 90 parsimony-informative, and 39 variable parsimony-uninformative characters in this set. These trees resulted in a total of 22 different haplotypes (Fig. 2). Although the tree topology was slightly different from that of the previously mentioned locus, the three small, most-basal clades formed were also maintained here. Two of these clades, formed by four clinical and two environmental isolates, respectively, were the most phylogenetically distant.

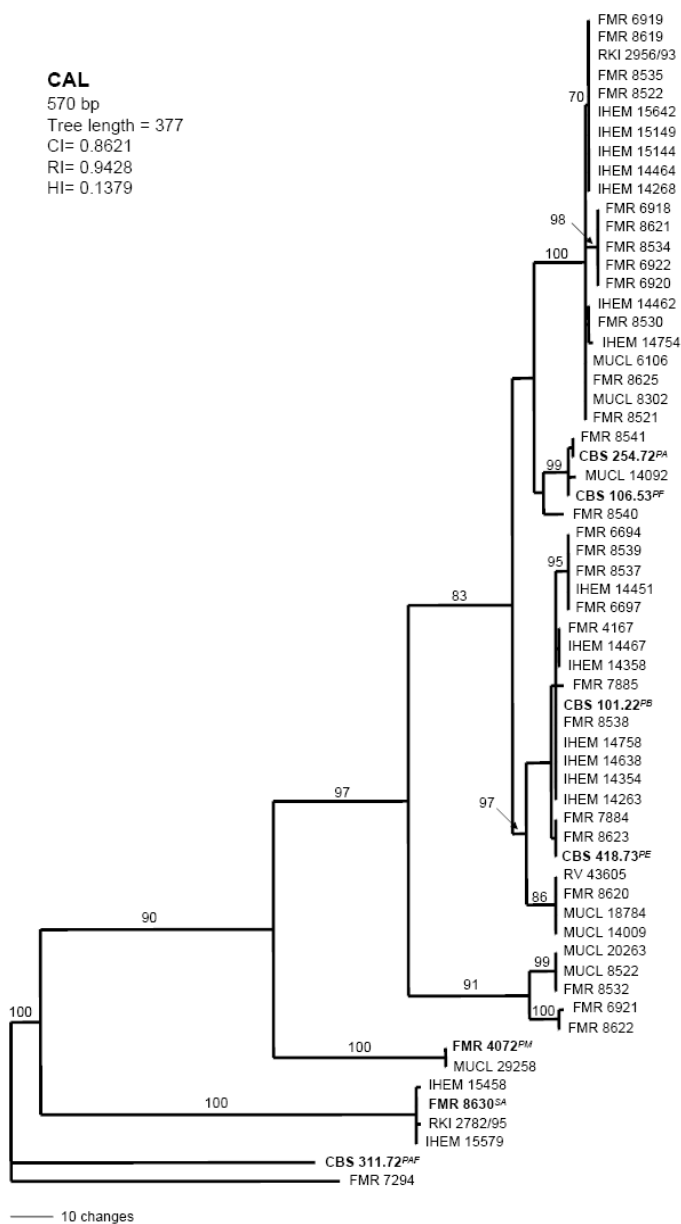
Analysis of CAL and ITS sequences yielded a single MPT of 377 steps in length and 5,000 MPT of 97 steps in length, respectively. The numbers of haplotypes observed were 21 in the CAL tree (Fig. 3) and 19 in the tree based on ITS sequences (Fig. 4). Both trees showed similar topologies to that of the BT2 tree. The two above-mentioned basal clades were also placed here away from the other isolates. Overall, the ITS rRNA gene data set is considerably less informative for phylogenetic reconstruction than the other three markers.





**Fig. 2.** One of the 420 most-parsimonious trees obtained from heuristic searches based on TUB sequence. Bootstrap support values above 90% are indicated at the nodes. Type strains are indicated with boldface type. *P. africana* and *S. prolificans* were used as outgroups. *PB*, *P. boydii*; *PE*, *P. ellipsoidea*; *PF*, *P. fusoidea*; *PA*, *P. angusta*; *PM*, *P. minutispora*; *SA*, *S. aurantiacum*; *PAF*, *P. africana*; *SP*, *S. prolificans*; CI, consistency index; RI, retention index; HI, homoplasy index.





**Fig. 3.** The single most-parsimonious tree obtained from heuristic searches based on CAL sequence. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. Type strains are indicated with boldface type. *P. africana* and *S. prolificans* were used as outgroups. *PB*, *P. boydii*; *PE*, *P. ellipsoidea*; *PF*, *P. fusioidea*; *PA*, *P. angusta*; *PM*, *P. minutispora*; *SA*, *S. aurantiacum*; *PAF*, *P. africana*; *SP*, *S. prolificans*; CI, consistency index; RI, retention index; HI, homoplasy index.





## 4.1. Taxonomía: Filogenia, Morfología y Fisiología

The result of the partition homogeneity test showed that the sequence data sets for the four loci were congruent ( $P = 0.07$ ) and could therefore be combined. A total of 2,496 MPT were produced from a heuristic search using the combined data set of 2,060 characters from the four loci (Fig. 5). From these characters, 1,440 were constant, 386 were parsimony informative, and 234 were variable parsimony noninformative. Clustering was similar to that observed in the particular trees of the different genes analyzed. A total of 44 haplotypes were shown. Most nodes in the combined analysis showed increased clade support as measured by bootstrapping (20 nodes with 100% bootstrap support). As within the ITS, TUB, and CAL gene trees, two clades were identified as the basal-most lineages (clades 1 and 2), each of them with a bootstrap support of 100%. Phylogenetic analysis of the remaining monophyletic ingroup taxa (bootstrap, 100%) identified a basal clade (clade 3) and two bigger clades (clades 4 and 5), all them with 100% bootstrap support. The type strains of *P. boydii*, *P. ellipsoidea*, *P. fusoidea*, and *P. angusta* were placed in clade 5.

**Morphology.** All the 60 isolates that constituted the ingroups in the different trees obtained in our phylogenetic analyses were clearly identified by the presence of a characteristic *Scedosporium* anamorph. Although no relevant morphological differences were observed among them, the isolates that constitute clade 1 showed narrower conidia (2 to 5  $\mu\text{m}$  wide) than the rest (3 to 6  $\mu\text{m}$  wide). In addition, the members of this clade produced a yellow diffusible pigment, absent in the rest, and showed a maximum growth at 45°C compared to 40°C for the rest of isolates. Practically all isolates also developed conidia growing directly on vegetative hyphae, which were usuually brown, thick-walled, and ellipsoidal to obovoidal. This latter feature was an important characteristic in differentiating the members of the subclade where the type strain of *P. boydii* is included, in which such conidia were globose to subglobose (Table 2).

**Table 2.** Relevant features to differentiate the clinical species of *Pseudallescheria/Scedosporium* spp.

Species	Diffusible pigment on PDA at 25°C	Maximum growth temp (°C)	Teleomorph		Anamorph	
			Development of ascomata	Shape of ascospores	Shape of conidiogenous cells	Most common shape of conidia borne on vegetative hyphae
<i>P. boydii</i>	–	40	±	Broadly fusiform	Cylindrical	Globose
<i>P. ellipsoidea</i>	–	40	+	Ellipsoidal	Cylindrical	Ellipsoidal
<i>S. aurantiacum</i>	+	45	–		Cylindrical or slightly flask-shaped	Obovoid
<i>S. prolificans</i>	–	40	–		Flask-shaped	Globose

Another typical feature, common to the half of the isolates included in the study, was the development of a second type of anamorph, namely, *Graphium* sp. *Graphium* is characterized by the production of synnemata terminated in a slimy head of conidia. The size of the synnemata was very variable (80 to 750  $\mu\text{m}$  long) and depended on the culture medium used and the age of the culture. The production of *Graphium* was not exclusive of any clade since the isolates that produced them were distributed in all the five clades (Fig. 5). However, it was most common in clade 4 (in 14 of the 22 isolates) and in the two isolates of clade 2. The presence of the teleomorph (the sexual state) was less frequent than the above-mentioned structures; it was produced only by the members of clades 5 (in 18 of the 27 isolates) and 2 (in the two isolates). Interestingly, the teleomorph of the isolates of the latter clade showed ascospores clearly different from those of the other species of *Pseudallescheria* included in the study. On the basis of the morphological differences, supported by the molecular data, we think that clades 1 and 2 represent two different species from those up to now accepted in *Scedosporium* and *Pseudallescheria*, respectively, and are consequently here proposed as new.

***Scedosporium aurantiacum***. Gilgado, Cano, Gené, et Guarro, sp. nov. (Fig. 6).

**Etym.:** referred to the yellow color of the diffusible pigment of the colonies.

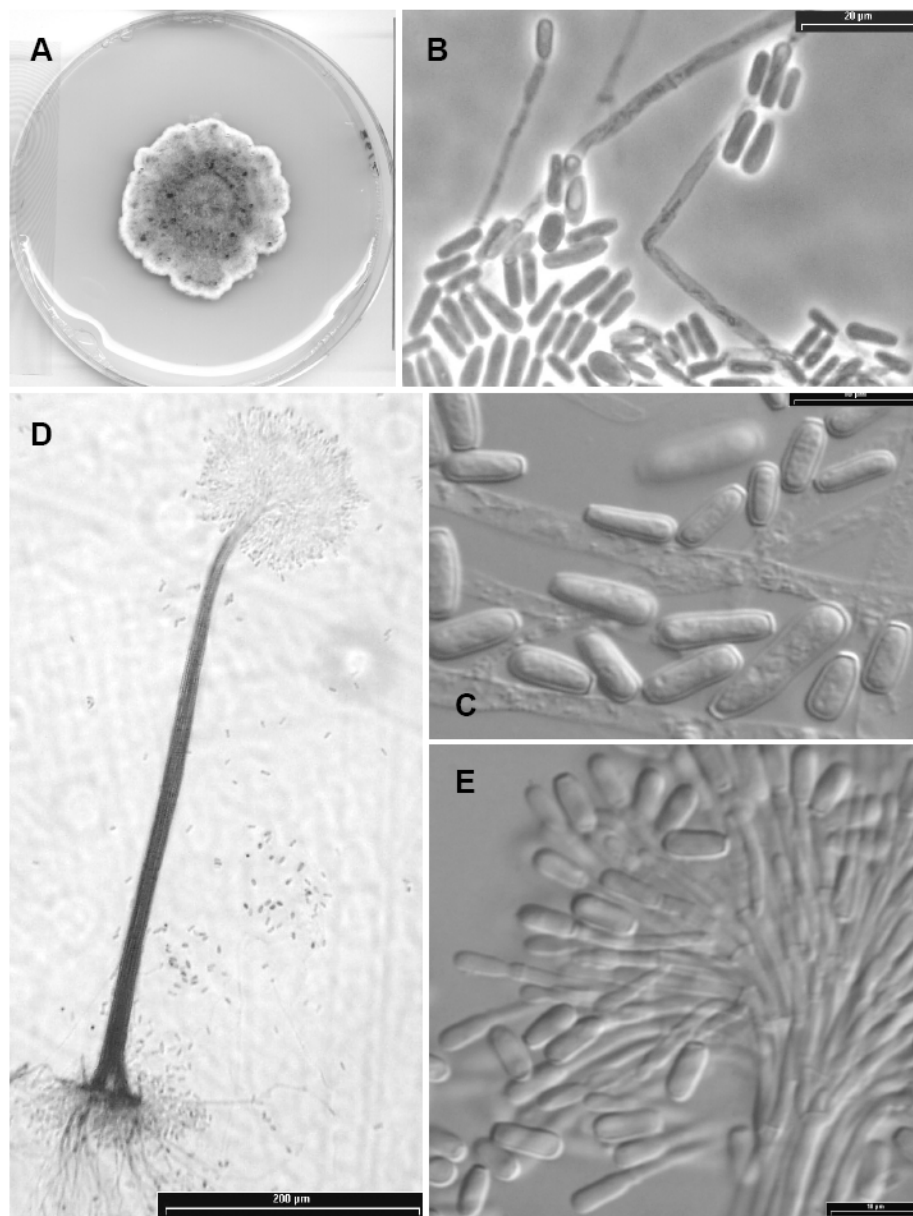
Coloniae in agarose dense, plerumque gossypinae, luteolus vel brunneolus griseae; reversum brunneolus aurantiacum. Pigmentis flavis in culturis formantis. Conidiophora solitaria vel synnemata. Synnemata erecta, 330 to 750  $\mu\text{m}$  alta, cum caule atro griseo, cylindrico, 7.5 to 17.5  $\mu\text{m}$  lato, et capitulo mucoso usque ad 60  $\mu\text{m}$  alto, 70 to 140  $\mu\text{m}$  lato. Conidia obovoidea, subcylindrica vel claviformia, 5 to 14 by 2 to 5  $\mu\text{m}$ . Conidia sessilis copiosae, laterales, unicellularia, brunnea, plerumquam obovoidea, 6 to 10 by 3 to 5  $\mu\text{m}$ . Teleomorphosis ignota. Holotypus, IMI 392886, ex mycosis humanum (cultura viva, FMR 8630, IHM 21147, CBS 116910).

The colonies on PDA attained a diameter of 40 to 50 mm after 14 days at 25°C. They were dense and usually cottony, but in some isolates they were lanose, especially at the center, frequently showing a concentric growth of aerial mycelium of different colors, yellowish gray combined with brownish gray areas, usually with a whitish, irregularly lobate and fimbriate margin, and the reverse was brownish orange at the center and brown to colorless towards the periphery. All isolates produced a light yellow diffusible pigment on PDA

#### 4.1. Taxonomía, Filogenia, Morfología y Fisiología

and OA after a few days of incubation. Conidiophores were solitary on aerial mycelium or grouped to form synnemata (*Graphium*) mainly on the agar surface. Solitary conidiophores were often reduced to a conidiogenous cell growing laterally on undifferentiated mycelium or branched, usually bearing verticils of two to three conidiogenous cells. Synnemata were present only in the isolates IHEM 15458 and RKI 2782/95. They were erect, 330 to 750  $\mu\text{m}$  long, consisting of a cylindrical stipe 7.5 to 17.5  $\mu\text{m}$  wide, dark gray, smooth-walled, and slightly roughened apically, and they terminated in a slimy head of conidia, up to 60  $\mu\text{m}$  long by 70 to 140  $\mu\text{m}$  wide. The conidiogenous cells were percurrent, lateral, or terminal, subhyaline, smooth-walled, cylindrical, or slightly flask shaped, 10 to 37  $\mu\text{m}$  long by 1.5 to 2.5  $\mu\text{m}$  wide, less frequent intercalary as a lateral projection on hyphae, and up to 5  $\mu\text{m}$  long by 2  $\mu\text{m}$  wide. There were three types of conidia: (i) those produced on solitary conidiophores were subhyaline, smooth-walled, obovoid, or subcylindrical, and 5 to 14  $\mu\text{m}$  by 2 to 5  $\mu\text{m}$ ; (ii) those produced on synnemata were predominantly cylindrical or claviform, 6 to 12  $\mu\text{m}$  by 3 to 5  $\mu\text{m}$  with a wide truncate base; (iii) those developed mainly from the undifferentiated hyphae of the substrate were sessile or on short protrusions, solitary, lateral, brown, smooth, and thick-walled, usually obovoid, 6 to 10  $\mu\text{m}$  long by 3 to 5  $\mu\text{m}$  wide. The latter were abundantly produced by all isolates. Teleomorph was unknown.

The optimum growth temperature was from 37°C to 40°C with colonies on PDA attaining a diameter up to 60 to 67 mm after 14 days. Maximum growth was at 45°C. The fungus did not grow at 50°C.



**Fig. 6.** *Scedosporium aurantiacum* isolates (A, D, E) IHEM 15458 and (B, C) FMR 8630. (A) Colony growing on PDA after 14 days of incubation at 25°C. (B, C) A conidiogenous cell and conidia from solitary conidiophores. (D) A synnema of the *Graphium* anamorph. (E) Apical

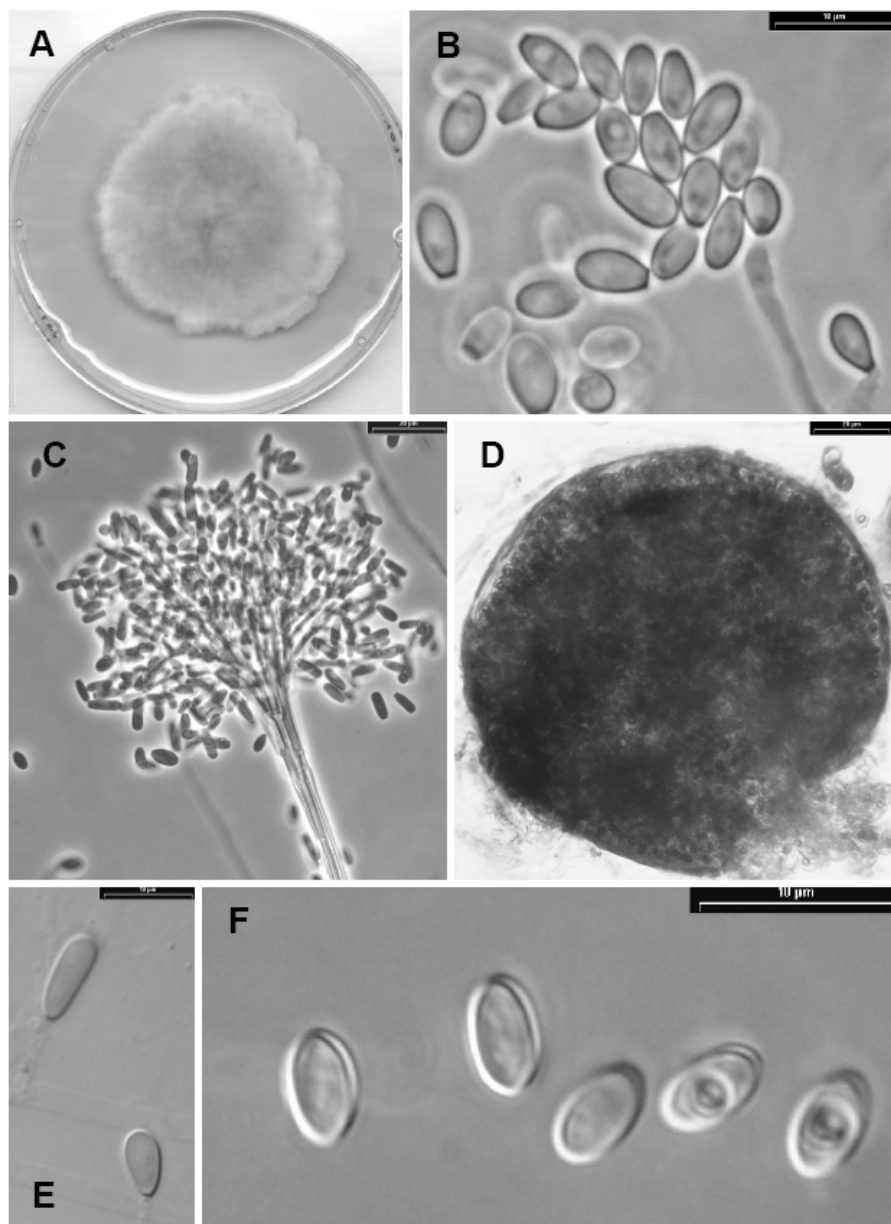
#### 4.1. Taxonomía: Filogenia, Morfología y Fisiología

***Pseudallescheria minutispora***. Gilgado, Gené, Cano, et Guarro, sp. nov. (Fig. 7).

**Etm.:** referred to the small size of the ascospores. Coloniae in agar dense, gossypinae vel lanosae, aurantium griseae vel brunneolus griseae; reversum incoloratum. Pigmentis in culturis non formantis. Ascomata solitaria, non ostiolata, globosa vel subglobosa, 50 to 150  $\mu\text{m}$ , luteolus vel brunneolus grisea, cum peridium ex textura epidermoidea. Asci octospori, globosi vel subglobosi, 12 to 15 by 10 to 13  $\mu\text{m}$ , evanescentes. Ascosporae unicellulares, subhyalinae vel dilute brunneae, laeves, tenuitunicatae, ellipsoideae, 5 to 7 by 3 to 4  $\mu\text{m}$ . Conidiophora solitaria vel synnemata. Synnemata erecta, 180 to 300  $\mu\text{m}$  alta, cum caule atrobrunneo, cylindrico, 7.5 to 17.5  $\mu\text{m}$  lato, et capitulo mucoso, 60 to 100  $\mu\text{m}$  alto et 80 to 170  $\mu\text{m}$  lato. Conidia obovoidea, ellipsoidea, cylindrica vel claviformia, 5 to 14 by 2.5 to 4.5  $\mu\text{m}$ . Conidia sessilis parvasae, laterales, unicellularia, subhyalina, plerumquam obvoidea, 7 to 10 by 2.5 to 5  $\mu\text{m}$ . Holotypus, IMI 392887, ex sedimentis fluvialibus (cultura viva, FMR 4072, IHEM 21148, CBS 11691).

The colonies on PDA attained a diameter of 50 to 57 mm after 14 days at 25°C. They were dense, cottony to lanose, orange gray combined with brownish gray areas, with a whitish, lobate or irregular, and fimbriate margin; the reverse was colorless. Diffusible pigment was absent. All isolates developed abundant ascomata on OA. The ascomata were solitary, nonostiolate, globose to subglobose, and 50 to 150  $\mu\text{m}$  in diameter, with a peridium of textura epidermoidea, yellowish gray to brownish gray, and often covered with brown, thick-walled septate, 2.2 to 3  $\mu\text{m}$  wide. The asci were eight-spored, globose to subglobose, and 12 to 15  $\mu\text{m}$  long by 10 to 13  $\mu\text{m}$  wide with evanescent walls. Ascospores were unicellular, subhyaline to light brown, smooth and thin-walled, ellipsoidal, and 5 to 7  $\mu\text{m}$  long by 3 to 4  $\mu\text{m}$  wide, with a germ pore at each pole and usually with oil drops. Both isolates developed the two typical anamorph simply or scarcely branched conidiophores, up to 35  $\mu\text{m}$  long. Its conidia were subhyaline to light brown, smoothwalled, obovoid, ellipsoidal or subclaviform, and 6 to 11  $\mu\text{m}$  long by 3 to 4  $\mu\text{m}$  wide. The *Graphium* anamorph produced synnemata which were erect and 180 to 300  $\mu\text{m}$  long, with a cylindrical stipe that was 7.5 to 17.5  $\mu\text{m}$  wide, and they were smoke brown, smooth-walled, slightly roughened apically, slightly inflated at the base, and up to 25  $\mu\text{m}$  wide and terminated in a slimy head of conidia that was 60 to 100  $\mu\text{m}$  long by 80 to 170  $\mu\text{m}$  wide. The conidia were predominantly cylindrical or claviform, 5 to 14  $\mu\text{m}$  long by 2 to 4.5  $\mu\text{m}$  wide, with a wide truncate base. The





**Fig. 7.** *Pseudallescheria minutispora* strain FMR 4072. (A) Colony growing on PDA after 14 days of incubation at 25°C. (B) Conidiogenous cells and conidia of the *Scedosporium* anamorph. (C) Apical part of a synnema of the *Graphium* anamorph producing conidia. (D) Ascoma. (E) Conidia borne on undifferentiated hyphae. (F) Ascospores.

conidiogenous cells were percurrent, lateral or terminal, subhyaline, smooth-walled, usually cylindrical, 10 to 35  $\mu\text{m}$  long by 1.5 to 2  $\mu\text{m}$  wide, and less frequently intercalary as a lateral projection on hyphae, up to 6  $\mu\text{m}$  long by 2  $\mu\text{m}$  wide. Conidia from undifferentiated hyphae were scarcely produced. They were lateral, usually sessile, subhyaline, smooth and thick-walled, ellipsoidal to obovoid, and 7 to 10  $\mu\text{m}$  long by 3.5 to 5  $\mu\text{m}$  wide.

The optimum growth temperature was from 25°C to 30°C with colonies on PDA attaining a diameter up to 50 to 61 mm after 14 days. Maximum growth was at 40°C. The fungus was unable to grow at 42°C.

## DISCUSSION

DNA sequences from four loci were analyzed to investigate phylogenetic relationships and species limits within the *P. boydii* species complex. Until recently, the genus *Pseudallescheria* was considered to comprise the following seven species (20): *P. africana*, *P. angusta*, *P. boydii*, *P. desertorum*, *P. ellipsoidea*, *P. fimeti*, and *P. fusoidea*. All of these species are morphologically very similar, and the main distinction among them is based on the size of the cleistothecia and ascospores (20). Recently, Rainer et al. (16), using different molecular techniques, concluded that *P. ellipsoidea*, *P. fusoidea*, and *P. angusta* are probable synonyms of *P. boydii*. In our study, we have included the type strains of these three species, and the results confirmed that all of them are genetically and morphologically different from *P. boydii*. We have also detected a high number of phylogenetic species, but only two of them can be clearly recognized morphologically.

The information provided by the four loci analyzed was very similar, which proved to be excellent phylogenetic markers for species level systematics within *Pseudallescheria*. The less informative locus was ITS, which only resolved 9 phylogenetically distinct species, whereas CAL, BT2, and TUB resolved 12, 14, and 15 species, respectively. Apart from *P. africana*, which was the outgroup of the present analysis, the two phylogenetic species most clearly separated were the two proposed as new, i.e., *S. aurantiacum*, represented by four clinical isolates, and *P. minutispora*, represented by two environmental isolates. However, we have recently studied another isolate of clinical origin from Germany (RKI 866/94) that genetically and morphologically matches the features of the latter species. The two clades formed by these species were highly supported in all the phylogenetic trees. Up to know,

practically all the described species of *Pseudallescheria*, with the exception of *P. boydii*, *P. fusioidea*, and *P. ellipsoidea*, were monotypic; i.e., they are known by only one isolate. In the present study, the type strain of *P. angusta* nested with another soil isolate (FMR 8541) from Argentina. Both isolates showed identical ITS sequences, and those of the other loci studied were only different in 1 or 2 nucleotides (BT2, 1 nucleotide; TUB, 1 nucleotide; CAL, 2 nucleotides). The type strain of *P. fusioidea* nested with an environmental isolate from Zaire in three of the four loci analyzed. Both isolates also showed identical ITS sequences and differed in a few nucleotides in the other genes (BT2, 8 nucleotides; TUB, 4 nucleotides; CAL, 2 nucleotides). Our phylogenetic study revealed that *P. fusioidea* and *P. angusta* were phylogenetically very close. They only differed in 22 bp in the combined data set. However, *P. angusta* showed smaller ascospores (up to 110  $\mu\text{m}$  in diameter versus up to 160  $\mu\text{m}$  in diameter for *P. fusioidea*) and narrower ascospores (3 to 3.5  $\mu\text{m}$  wide versus 4 to 4.5  $\mu\text{m}$  wide for *P. fusioidea*). In addition, the isolates of *P. fusioidea* grew faster than those of *P. angusta* (69 to 70 mm versus 52 to 54 mm at 14 days on PDA at 25°C). The teleomorphs developed by the isolates of *P. angusta*, *P. ellipsoidea*, and *P. fusioidea* were consistent with the morphological features for the species described previously by von Arx et al. (20). However, the isolates that nested with the type strain of *P. boydii* (CBS 101.22) showed larger ascospores (6 to 9 by 5 to 6  $\mu\text{m}$ ) than those described previously by von Arx et al. (20) for such species (6 to 7 by 3.5 to 4  $\mu\text{m}$ ). Unfortunately, in our study, the type strain of *P. boydii* only produced the *Scedosporium* anamorph. It is an old strain that has probably lost the ability to develop the sexual state. *P. ellipsoidea* was the species that was genetically and morphologically closest to the group of isolates that nested in the same branch as the type strain of *P. boydii*. However, *P. ellipsoidea* can be distinguished by its ellipsoidal ascospores, while the ascospores of the members of such groups of isolates are broadly fusiform. Moreover, in the former, the conidia from vegetative hyphae are ellipsoidal to obovoid and scarce, while those of the *P. boydii* branch are abundant and predominantly globose to subglobose (Table 2). Further studies of this group of isolates are required in order to define the morphological features of *P. boydii* sensu stricto.

Up to now, *P. boydii* had been considered the only pathogenic species of the genus *Pseudallescheria*, but this study has demonstrated that other phylogenetic species of the *P. boydii* complex also included clinical isolates. However, the clinical strains are not homogeneously distributed in the different clades, and some correlation between the clades and the clinical origin of the strains could be observed instead. Clinical strains were mainly

concentrated in three of the five clades. *Scedosporium aurantiacum* (clade 1) grouped European clinical strains exclusively. Clades 4 and 5 were the biggest ones and included numerous strains each. However, 72% of the isolates of clade 5 were clinical, while only 50% of the isolates of clade 4 had such origin. It is noteworthy that two of the three strains included in the *P. ellipsoidea* group (CBS 418.73, FMR 7884, and FMR 8623) had caused disseminated infections, which emphasizes the clinical relevance of this species.

Most of the terminal branches that grouped more than one isolate included clinical and environmental isolates. This seems to demonstrate that any environmental strain can cause infection under the appropriate conditions. Using a murine model of invasive infection by *S. prolificans*, Ortoneda et al. (15) proved that there are no virulence differences between environmental strains and those that caused colonization or infection.

As expected, these results have demonstrated that *P. boydii* does not represent a single species. It encompasses a high number of phylogenetic species, although only a few of them can be recognized morphologically. One of the most important findings of this work is to provide phenotypic features useful for the distinction of some of these species (Table 2). Considering that not all the hospitals have facilities for molecular diagnosis and that not all these species are equally involved in human infections, these results can be especially useful for clinical microbiologists or laboratorians in order to identify these fungi. Judging by the high clinical relevance of this fungal group, further investigation is expected in the near future. It is especially important to determine if these species, and perhaps others, that could be identified in the future using similar approaches and involving more isolates from different sources and geographical regions are equally pathogenic to humans. Knowledge of the degree of virulence of these species and their response to the antifungal drugs may also be very useful in order to choose the appropriate treatment of the severe and refractory infections attributed to *P. boydii* sensu lato. Furthermore, taking into account that many of these species can only be reliably separated through molecular phylogenetics of DNA.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussels, Belgium), Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain (Belgium), the Institute for Tropical Medicine (Antwerp, Belgium), and the Robert Koch Institute (Berlin, Germany) and to P.

Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Sao Paulo, Brazil), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Spain), A. Rezusta (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain), R. Negroni (Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina), J. Llovo (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain), and A. del Palacio (Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, Spain) for supplying many of the strains used in the study. This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grant CGL 2004-00425/BOS.

## REFERENCES

1. **Capilla, J., C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, and J. Guarro.** 2004. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4009–4011.
2. **Carrillo, A., and J. Guarro.** 2001. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2151–2153.
3. **Castiglioni, B., D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, J. Fung, and S. Kusne.** 2002. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*) infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine* **81**:333–348.
4. **Cazin, J., Jr., and D. W. Decker.** 1964. Carbohydrate nutrition and sporulation of *Allescheria boydii*. *J. Bacteriol.* **88**:1624–1628.
5. **Cazin, J., Jr., and D. W. Decker.** 1965. Growth of *Allescheria boydii* in antibiotic-containing media. *J. Bacteriol.* **90**:1308–1313.
6. **Cruse, M., R. Telerant, T. Gallagher, T. Lee, and J. Taylor.** 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**:814–822.

7. **Defontaine, A., R. Zouhair, B. Cimon, J. Carre`re, E. Bailly, F. Symoens, M. Diouri, J. N. Hallet, and J. P. Bouchara.** 2002. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2108–2114.
8. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
9. **Gordon, M. A.** 1957. Nutrition and sporulation of *Allescheria boydii*. *J. Bacteriol.* **73**:199–205.
10. **Gueho, E., and G. S. de Hoog.** 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J. Mycol. Med.* **1**:3–9.
11. **Kishino, H., and M. Hasegawa.** 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* **29**:170–179.
12. **Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, and J. W. Taylor.** 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol. Biol. Evol.* **18**:1246–1258.
13. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919–938.
14. **O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, T. Aoki, and E. Cigelnik.** 2000. A multigene phylogeny of the *Giberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**:61–78.
15. **Ortoneda, M., F. J. Pastor, E. Mayayo, and J. Guarro.** 2002. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **51**:924–928.

16. **Rainer, J., G. S. de Hoog, M. Wedde, I. Graser, and S. Gilges.** 2000. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3267–3273.
17. **Steinbach, W. J., and J. R. Perfect.** 2003. *Scedosporium* species infections and treatments. *J. Chemother.* **15**:16–27.
18. **Swofford, D. L.** 2001. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
19. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876–4882.
20. **von Arx, J. A., M. J. Figueras, and J. Guarro.** 1988. Sordariaceous ascomycetes without ascospore ejaculation. *Beihefte Nova Hedwigia* **94**:1–104.
21. **White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. Academic Press, New York, N.Y.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



## 4.1.2. Molecular and phenotypic data support distinct species status for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the new species *Scedosporium dehoogii*

Félix Gilgado, Josep Cano, Josepa Gené, Deanna A. Sutton y Josep Guarro

*Journal of Clinical Microbiology* (Sometido)

### Resumen

En este estudio con la aportación de datos morfológicos, fisiológicos y moleculares (gen de la  $\beta$ -tubulina) de 141 aislados pertenecientes a las diferentes especies del complejo *Pseudallescheria boydii* (incluyendo diferentes sinónimos), se propone la nueva especie *Scedosporium dehoogii*. Estos datos también nos permiten considerar a *Scedoporium apiospermum* y *P. boydii* como dos especies diferentes. Se propone el nombre de *Scedosporium boydii* para el anamorfo de *P. boydii*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## ABSTRACT

**Based on the morphologic, physiologic, and molecular ( $\beta$ -tubulin gene) study of 141 isolates of the *Pseudallescheria boydii* species complex (including several synonyms) and relatives, the new species *Scedosporium dehoogii* is proposed. *Scedoporium apiospermum* and *P. boydii* are considered two different species and the new name *Scedosporium boydii* is proposed for the anamorph of the latter species. A summary of the key physiological features for distinguishing the species of *Pseudallescheria/Scedosporium* is provided.**

In recent years molecular phylogenetic analyses based on DNA sequences have promoted a great change in the taxonomy of clinical fungi (4). Currently it is accepted that numerous common pathogenic species, traditionally considered as homogeneous, are indeed polyphyletic (1, 6, 9-12). *Pseudallescheria boydii*, one of the most common clinical moulds following *Aspergillus fumigatus*, is another example. Based on a multilocus study, we recently delineated 8 phylogenetic species within this species, grouped in 5 different clades (2). The clades 1 and 2 were described as the new species *Scedosporium aurantiacum* and *Pseudallescheria minutispora*, respectively. Clade 5 consisted of four subgroups incorporating the ex-type strains of *P. boydii*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea* and *Pseudallescheria fusioidea*. Clades 3 and 4 remained unnamed. Here, we have phenotypically characterized those 8 phylogenetic species. In order to increase the robustness of the different clades, we have included numerous fresh isolates in this study identified by sequencing the TUB region of the  $\beta$ -tubulin gene, the most informative molecular marker of the four evaluated previously (2).

A total of 141 isolates was studied, including the available reference or type strains of synonymous species of *P. boydii* and *Scedosporium apiospermum* (Table 1). The procedures for DNA extraction, amplification, sequencing and phylogeny were described previously (2). Morphology was assessed by features observed on potato dextrose agar (PDA) and on oatmeal agar (OA) after incubation at 25<sup>o</sup> C for 2 months.

Fifty-nine physiological tests were performed in duplicate. Inocula, adjusted to 10<sup>5</sup> conidia/mL by hemacytometer counts, were prepared from 7-day-old PDA plates. Growth,

**Table 1.** Isolates included in the study and their origin

Isolate	Current name	Source of isolate	Origin	EMBL n°	
				TUB	ITS
CBS 254.72 (type strain of <i>P. angusta</i> )	<i>P. angusta</i>	Half-digested sewage tank	Ohio, USA	AJ890129	-
FMR 8541	<i>P. angusta</i>	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AJ890128	-
FMR 8905	<i>P. angusta</i>	Forest soil	La Gran Piedra, Cuba	AM261053 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-327	<i>P. angusta</i>	Bronchial wash	Florida, USA	AM261052 <sup>a</sup>	-
CBS 101.22 (type strain of <i>P. boydii</i> )	<i>P. boydii</i>	Ankle mycetoma	Texas, USA	AJ890121	-
CBS 103.48 (type strain of <i>Acremonia lutzii</i> )	<i>P. boydii</i>	Pus and granules	Rio de Janeiro, Brazil	AM492779 <sup>a</sup>	-
CBS 591.90 (type strain of <i>Pseudallescheria shearii</i> )	<i>P. boydii</i>	Knee mycetoma	Buenos Aires, Argentina	AM492778 <sup>a</sup>	-
FMR 4167	<i>P. boydii</i>	Otitis	Valladolid, Spain	AJ889580	-
FMR 6694	<i>P. boydii</i>	Cerebral abscess	Barcelona, Spain	AJ889581	-
FMR 6697	<i>P. boydii</i>	Sputum	Madrid, Spain	AJ889582	-
FMR 7885	<i>P. boydii</i>	Pleural liquid	Madrid, Spain	AJ889989	-
FMR 8537	<i>P. boydii</i>	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AJ890110	-
FMR 8538	<i>P. boydii</i>	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AJ890111	-
FMR 8539	<i>P. boydii</i>	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AJ890112	-
FMR 8620	<i>P. boydii</i>	Keratitis	Sao Paulo, Brazil	AJ890116	-
FMR 8627	<i>P. boydii</i>	Clinical isolate	Madrid, Spain	AM261062 <sup>a</sup>	-
FMR 8724	<i>P. boydii</i>	Bronchial wash	Zaragoza, Spain	AM261063 <sup>a</sup>	-
FMR 8731	<i>P. boydii</i>	Sputum	Zaragoza, Spain	AM261044 <sup>a</sup>	-
FMR 8737	<i>P. boydii</i>	Sputum	Madrid, Spain	AM261064 <sup>a</sup>	-
FMR 8828	<i>P. boydii</i>	Sputum	Zaragoza, Spain	AM261065 <sup>a</sup>	-
FMR 8829	<i>P. boydii</i>	Sputum	Zaragoza, Spain	AM261066 <sup>a</sup>	-
FMR 8904	<i>P. boydii</i>	Forest soil	La Gran Piedra, Cuba	AM261036 <sup>a</sup>	-
IHEM 14263	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Angers, France	AJ889990	-
IHEM 14354	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ889992	-
IHEM 14358	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Tours, France	AJ889993	-
IHEM 14451	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ889994	-
IHEM 14467	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Tours, France	AJ889997	-
IHEM 14638	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Angers, France	AJ889998	-
IHEM 14758	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Angers, France	AJ890000	-
MUCL 14009	<i>P. boydii</i>	Forest soil	Yangambi, Zaire	AJ890005	-
MUCL 18784	<i>P. boydii</i>	Treated wood	Costa Ivory	AJ890010	-

**Table 1.** Isolates included in the study and their origin

Isolate	Current name	Source of isolate	Origin	EMBL nº	
				TUB	ITS
RKI 830/01	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Berlin, Germany	AM261041 <sup>a</sup>	-
RV 43605	<i>P. boydii</i>	Clinical isolate	Zaire	AJ889579	-
UTHSC 01-2617	<i>P. boydii</i>	Left maxilar sinus	Texas, USA	AM261051 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-862	<i>P. boydii</i>	Cystic fibrosis	Texas, USA	AM261050 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-2130	<i>P. boydii</i>	Sputum	Texas, USA	AM261043 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-2319	<i>P. boydii</i>	Lymph node	California, USA	AM261067 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-2742	<i>P. boydii</i>	Bronchoalveolar lavage	Montana, USA	AM261042 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-1436	<i>P. boydii</i>	Left ring finger	Florida, USA	AM261037 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-2008	<i>P. boydii</i>	Brain	Utah, USA	AM261035 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-504	<i>P. boydii</i>	Lung	Delaware, USA	AM261049 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-1249	<i>P. boydii</i>	Sputum	Texas, USA	AM261048 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-2387	<i>P. boydii</i>	Bronchoalveolar lavage	Ohio, USA	AM261047 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-2748	<i>P. boydii</i>	Right foot-scales	Minnesota, USA	AM261046 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-990	<i>P. boydii</i>	Bronchoalveolar lavage	California, USA	AM261045 <sup>a</sup>	-
CBS 418.73 (type strain of <i>P. ellipsoidea</i> )	<i>P. ellipsoidea</i>	Soil	Tadjikistan	AJ890124	-
FMR 7884	<i>P. ellipsoidea</i>	Transplant	Madrid, Spain	AJ890126	-
FMR 8623	<i>P. ellipsoidea</i>	Leukaemic patient	Barcelona, Spain	AJ890125	-
FMR 8726	<i>P. ellipsoidea</i>	Sputum	Zaragoza, Spain	AM261038 <sup>a</sup>	-
FMR 8831	<i>P. ellipsoidea</i>	Disseminated infections	Barakaldo, Spain	AM261040 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-308	<i>P. ellipsoidea</i>	Bronchial wash	Texas, USA	AM261039 <sup>a</sup>	-
CBS 106.53 (type strain of <i>P. fusioidea</i> )	<i>P. fusioidea</i>	Goat dung	Aligarh, India	AJ890131	-
FMR 8906	<i>P. fusioidea</i>	Forest soil	La Gran Piedra, Cuba	AM261054 <sup>a</sup>	-
MUCL 14092	<i>P. fusioidea</i>	Forest soil	Yangambi, Zaire	AJ890130	-
CBS 116911 (=FMR 4072, type strain of <i>P. minutispora</i> )	<i>P. minutispora</i>	River sediment	Tordera river, Spain	AJ890122	-
MUCL 29258	<i>P. minutispora</i>	Fuel oil	Antwerpen, Belgium	AJ890123	-
RKI 866/94	<i>P. minutispora</i>	Sputum	Berlin, Germany	AM261032 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-2661	<i>P. minutispora</i>	Sputum	Florida, USA	AM261033 <sup>a</sup>	-
CBS 116910 (=FMR 8630, type strain of <i>S. aurantiacum</i> )	<i>S. aurantiacum</i>	Ulcer of ankle	Santiago de Compostela, Spain	AJ890133	-
IHEM 15458	<i>S. aurantiacum</i>	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ890135	-
IHEM 15579	<i>S. aurantiacum</i>	Cystic fibrosis	Angers, France	AJ890136	-
RKI 2782/95	<i>S. aurantiacum</i>	Trauma and sepsis	Hamburg, Germany	AJ890134	-
UTHSC 05-361	<i>S. aurantiacum</i>	Bronchial wash	Florida, USA	AM261034 <sup>a</sup>	-

**Table 1.** Isolates included in the study and their origin

Isolate	Current name	Source of isolate	Origin	EMBL nº	
				TUB	ITS
CBS 117406 (=FMR 6921, type strain of <i>S. dehoogii</i> )	<i>S. dehoogii</i>	Garden soil	Barcelona, Spain	AJ889987	-
FMR 8532	<i>S. dehoogii</i>	Cultivated soil	Montsia, Spain	AJ890012	-
FMR 8622	<i>S. dehoogii</i>	Foot skin	Barcelona, Spain	AJ890118	-
MUCL 8522	<i>S. dehoogii</i>	Humic soil	Baarn, Netherlands	AJ890120	-
MUCL 20263	<i>S. dehoogii</i>	Greenhouse soil	Herverlee, Belgium	AJ890006	-
CBS 225.32 (received as <i>Monosporium apiospermum</i> )	<i>S. apiospermum</i>	Probably mycetoma pedis	Italy	AM492782 <sup>a</sup>	-
CBS 297.38 (type strain of <i>Sporocybe borzini</i> )	<i>S. apiospermum</i>	Wood pulp	Italy	AM492783 <sup>a</sup>	-
CBS 695.70 (type strain of <i>Acremonium suis</i> )	<i>S. apiospermum</i>	Nasal cavity of a pig	Kiev, Ukraine	AM492780 <sup>a</sup>	-
CBS 948.87 (type strain of <i>Polycyttella hominis</i> )	<i>S. apiospermum</i>	Mycetoma pedis	India	AM492781 <sup>a</sup>	-
FMR 6918	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil	Barcelona, Spain	AJ889583	-
FMR 6919	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil	Barcelona, Spain	AJ889985	-
FMR 6920	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil	Barcelona, Spain	AJ889986	-
FMR 6922	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil	Barcelona, Spain	AJ889988	-
FMR 8521	<i>S. apiospermum</i>	Forest soil	Montsia, Spain	AJ890007	-
FMR 8522	<i>S. apiospermum</i>	Forest soil	Deltebre, Spain	AJ890008	-
FMR 8530	<i>S. apiospermum</i>	Cultivated soil	Deltebre, Spain	AJ890011	-
FMR 8534	<i>S. apiospermum</i>	Cultivated soil	Montsia, Spain	AJ890013	-
FMR 8535	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AJ890014	-
FMR 8619	<i>S. apiospermum</i>	Keratitits	Sao Paulo, Brazil	AJ890115	-
FMR 8621	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Barcelona, Spain	AJ890117	-
FMR 8624	<i>S. apiospermum</i>	Finger nail	Barcelona, Spain	AM261505 <sup>a</sup>	-
FMR 8625	<i>S. apiospermum</i>	Leukaemic patient	Zaragoza, Spain	AJ890119	-
FMR 8628	<i>S. apiospermum</i>	Clinical isolate	Madrid, Spain	AM261504 <sup>a</sup>	-
FMR 8629	<i>S. apiospermum</i>	Clinical isolate	Madrid, Spain	AM261880 <sup>a</sup>	-
FMR 8703	<i>S. apiospermum</i>	Clinical isolate	Buenos Aires, Argentina	AM261509 <sup>a</sup>	-
FMR 8725	<i>S. apiospermum</i>	Bronchial wash	Zaragoza, Spain	AM261510 <sup>a</sup>	-
FMR 8728	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Zaragoza, Spain	AM261503 <sup>a</sup>	-
FMR 8732	<i>S. apiospermum</i>	Forearm skin	Zaragoza, Spain	AM261874 <sup>a</sup>	-
FMR 8736	<i>S. apiospermum</i>	Bronchial wash	Madrid, Spain	AM261502 <sup>a</sup>	-
FMR 8763	<i>S. apiospermum</i>	Clinical isolate	Tarragona, Spain	AM261501 <sup>a</sup>	-
FMR 8827	<i>S. apiospermum</i>	Biopsy	Zaragoza, Spain	AM261875 <sup>a</sup>	-
FMR 8832	<i>S. apiospermum</i>	Disseminated infection	Barakaldo, Spain	AM261083 <sup>a</sup>	-

**Table 1.** Isolates included in the study and their origin

Isolate	Current name	Source of isolate	Origin	EMBL n°	
				TUB	ITS
FMR 8833	<i>S. apiospermum</i>	Disseminated infection	Barakaldo, Spain	AM261082 <sup>a</sup>	-
FMR 8834	<i>S. apiospermum</i>	Disseminated infection	Barakaldo, Spain	AM261872 <sup>a</sup>	-
IHEM 14268	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ889991	-
IHEM 14462	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Tours, France	AJ889995	-
IHEM 14464	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Tours, France	AJ889996	-
IHEM 14754	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Tours, France	AJ889999	-
IHEM 15144	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Tours, France	AJ890001	-
IHEM 15149	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ890002	-
IHEM 15642	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ890003	-
MUCL 6106	<i>S. apiospermum</i>	Forest soil	Haasrode, Belgium	AJ890004	-
MUCL 8302	<i>S. apiospermum</i>	Soil	Germany	AJ890009	-
RKI 19/04	<i>S. apiospermum</i>	Clinical isolate	Berlin, Germany	AM261879 <sup>a</sup>	-
RKI 533/03	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Berlin, Germany	AM261507 <sup>a</sup>	-
RKI 988/01	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis	Berlin, Germany	AM261506 <sup>a</sup>	-
RKI 2956/93	<i>S. apiospermum</i>	Bronchoalveolar lavage fluid	Berlin, Germany	AJ890114	-
UTHSC 02-636	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Pennsylvania, USA	AM261057 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-901	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Texas, USA	AM265568 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-1794	<i>S. apiospermum</i>	Conjunctiva	Washington, USA	AM261878 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-1993	<i>S. apiospermum</i>	Left sinus sphenoid	Texas, USA	AM261881 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-2309	<i>S. apiospermum</i>	Right thumb ( fingernail)	Texas, USA	AM261873 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-2504	<i>S. apiospermum</i>	Lymphoma	California, USA	AM261058 <sup>a</sup>	-
UTHSC 02-2689	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Colorado, USA	AM261508 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-924	<i>S. apiospermum</i>	Bronchial wash	New Orleans, USA	AM261059 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-929	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Texas, USA	AM261060 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-1001	<i>S. apiospermum</i>	Right shoulder	Texas, USA	AM261877 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-1438	<i>S. apiospermum</i>	Right hand	Pennsylvania, USA	AM261055 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-1575	<i>S. apiospermum</i>	Bronchial wash	Colorado, USA	AM261061 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-1824	<i>S. apiospermum</i>	Skin biopsy	Florida, USA	AM261074 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-2327	<i>S. apiospermum</i>	Lung biopsy	Indiana, USA	AM261075 <sup>a</sup>	-
UTHSC 03-3680	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Texas, USA	AM261076 <sup>a</sup>	-
UTHSC 04-359	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Texas, USA	AM261077 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-378	<i>S. apiospermum</i>	Right lacrimal-eye	Texas, USA	AM261056 <sup>a</sup>	-

**Table 1.** Isolates included in the study and their origin

Isolate	Current name	Source of isolate	Origin	EMBL nº	
				TUB	ITS
UTHSC 04-1689	<i>S. apiospermum</i>	Left leg	California, USA	AM261876 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-485	<i>S. apiospermum</i>	Sputum	Ohio, USA	AM261078 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-1053	<i>S. apiospermum</i>	Nasal biopsy	Iowa, USA	AM261079 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-1175	<i>S. apiospermum</i>	Left sinus sphenoid	Texas, USA	AM261080 <sup>a</sup>	-
UTHSC 05-1325	<i>S. apiospermum</i>	Cornea	Maryland, USA	AM261081 <sup>a</sup>	-
FMR 7249	<i>S. prolificans</i>	Clinical isolate	California, USA	AM265569 <sup>a</sup>	-
FMR 7251	<i>S. prolificans</i>	Sputum	Massachusetts, USA	AM265570 <sup>a</sup>	-
FMR 7292	<i>S. prolificans</i>	Blood	Australia	AM265571 <sup>a</sup>	-
FMR 7294	<i>S. prolificans</i>	Blood	Australia	AJ890127	-
FMR 8702	<i>S. prolificans</i>	Toenail	Buenos Aires, Argentina	AM265572 <sup>a</sup>	-
CBS 267.28 (received as <i>Sporotrichum councilmanii</i> )	<i>S. prolificans</i>	-	Germany	-	AM492785 <sup>a</sup>
CBS 131.14 (type strain of <i>Sporocybe chartoikoon</i> ) <sup>b</sup>	-	Air	Netherlands	-	AM492784 <sup>a</sup>
CBS 100.26 (type strain of <i>Acladium castellanii</i> ) <sup>c</sup>	-	Human	Malaysia	-	AM492786 <sup>a</sup>
CBS 218.35 (received as <i>Indiella americana</i> )	-	Probably mycetoma pedis	-	AM712308 <sup>a</sup>	-

Abbreviations used: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; IHEM, The BCCM™/IHEM biomedical fungi and yeasts collection, Belgium; MUCL, The BCCM™/MUCL - Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium; RKI, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany; RV, Collection of the Institute for Tropical Medicine (ITG, Antwerp), Belgium; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, USA;

<sup>a</sup> newly generated sequences in this study.

<sup>b</sup> 88 % similarity with *S. prolificans* (BLAST).

<sup>c</sup> 94 % similarity with an uncultured basidiomycete (BLAST).



**Table 2.** Polymorphic sites in TUB locus (exons 5-6) identified using DnaSP v.4.10.3\*. Sites with alignment gaps were included if there was a polymorphism. The sequence of type strain of *P. boydii* CBS 101.22 (GenBank accession no. AJ890121) was used as the master sequence; otherwise, nucleotides are shown as dots. A hyphen (-) denotes a gap.

**Polymorphic sites in TUB locus**

Species	Polymorphic sites in TUB locus																																					
	4 7	7 4	1 3	1 6	1 9	1 5	1 8	1 1	1 6	1 5	1 2	1 9	2 0	2 0	2 4	2 7	2 8	2 1	2 2	2 6	2 3	2 8	2 3	2 4	2 5	2 6	2 0	2 1	2 6	2 7	2 8	3 0	3 0	3 0	3 5			
<i>P. boydii</i>	C	T	G	T	T	T	T	T	G	T	C	C	A	T	A	T	C	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	C	T	A	G	T	C	C	
<i>S. apiospermum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C/-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. aurantiacum</i>	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	T	C	-	-	G	C	A	C	C	C	C	.	C	C/-	.	C	C	A	A	.	.	A	
<i>S. dehoogii</i>	.	C	T	.	G	.	C	.	.	.	C	.	.	.	T	.	T/-	.	T/-	-	-	-	-	T	T	T	.	T	.	.	.	A	A	.	.	.	.	
<i>P. angusta</i>	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	A	.	G	T	.	.	A	.	.	.	.
<i>P. ellipsoidea</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
<i>P. fusioidea</i>	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	A	.	G	T	.	.	A	.	.	.	.	
<i>P. minutispora</i>	G	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	G	T	.	-	-	-	G	G	T	T	T	T	T	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

**Polymorphic sites in TUB locus**

Species	Polymorphic sites in TUB locus																																							
	3 6	3 7	3 0	3 1	3 2	3 9	3 2	3 3	3 5	3 6	3 7	3 8	3 9	3 0	3 1	3 3	3 4	3 8	3 9	3 0	3 9	3 0	3 2	3 3	3 4	3 5	3 9	4 2	4 0	4 1	4 3	4 9	4 6	4 9	5 8	5 1	5 2	5 5		
<i>P. boydii</i>	T	G	C	G	A	C	T	C	C	C	-	G	T	G	A	G	A	C	T	C	A	G	A	G	T	T	C	T	C	T	G	C	T	T	T	C	T			
<i>S. apiospermum</i>	.	.	A/G	.	.	.	.	T	-	-	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	A	G	.	G	G	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	
<i>S. aurantiacum</i>	C	A	.	.	G	.	G	T	G	T	-	-	A	G	.	G	-	C	.	-	.	G	.	C	.	T	C	T	.	.	T	C	C	C	.	.	C			
<i>S. dehoogii</i>	G	A	T	A	G	G	C	G	T	-	-	A	.	.	.	A	C	-	.	T	G	T	G/C	T	.	.	-	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>P. angusta</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>P. ellipsoidea</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>P. fusioidea</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>P. minutispora</i>	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	.	.	A	G	-	.	.	C	.	G	T	G	.	.	T	C	A	.	C	C	C	T	.	.	.	.	.	

including growth on cycloheximide (0.05 – 0.1 %), and assimilation abilities were tested in liquid medium according to Yarrow (15). All the tests, with the exception of urease, gelatin liquefaction, acid production and starch formation, were performed in sterile, disposable, multiwell microplates. The medium was dispensed into the wells in 150 µL volumes with a multichannel pipette and each well was inoculated with 50 µL of the conidial suspension. The microplates were incubated at 25° C in darkness for 14 days. For thermotolerance studies, the isolates were subcultured onto PDA and incubated in darkness for 14 days.

A heuristic search of the partial sequence of the TUB region produced 18 most parsimonious trees; one of them is shown in Fig. 1. The topology of the tree was similar to that obtained in our previous study (2). Most of the new isolates were included in clade 4, which makes it the most common phylogenetic species of the complex. The polymorphic nucleotides for all the species of the *P. boydii* complex are shown in Table 2. A relatively large number of carbon and nitrogen sources were assimilated by all the species studied (see the supplementary material). The assimilation patterns for *P. boydii*, *P. angusta*, *P. ellipsoidea* and *P. fusioidea* were similar with no significant differences. Assimilation of sucrose, maltose, D-ribose, L-arabinitol and ribitol and growth at 40 and 45°C were the most useful characters for discriminating the species included in the study (Table 3).

**Table 3.** Physiological key characters for differentiating among species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex and *S. prolificans*

Species	Assimilation					Growth	
	Ribitol	L-Arabinitol	Sucrose	Maltose	D-Ribose	40°C	45°C
<i>P. boydii</i> and relatives <sup>a</sup> (clade 5)	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. minutispora</i> (clade 2)	+	+	+	-	-	+	-
<i>S. apiospermum</i> (clade 4)	+	+	+	+	-	+	-
<i>S. aurantiacum</i> (clade 1)	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. dehoogii</i> (clade 3)	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. prolificans</i>	-	-	-	+	-	+	V

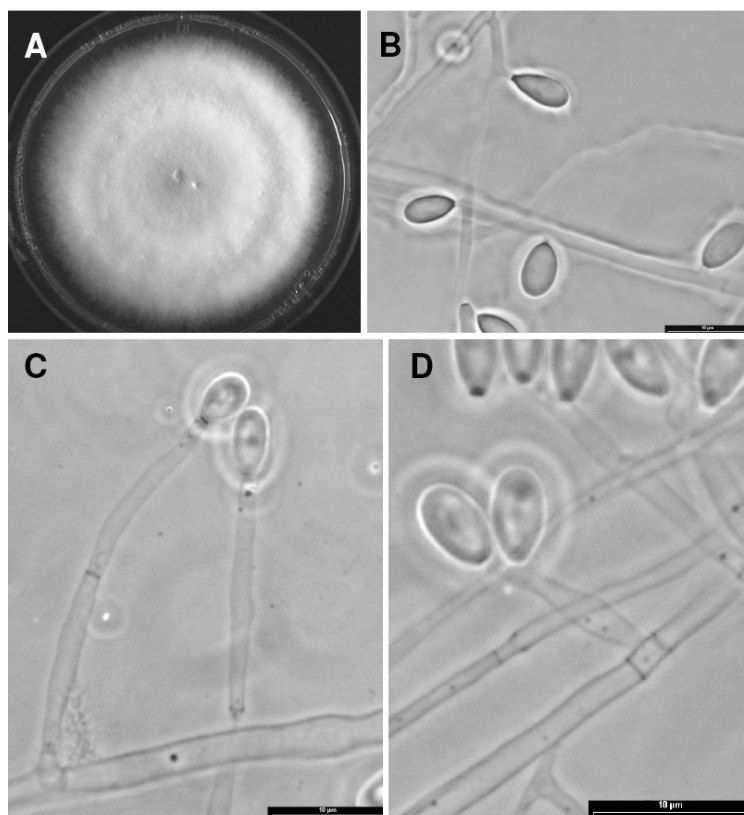
Abbreviations and symbols used: -, all strains of the species displayed a negative response; +, all strains of the species displayed a positive response; V, variable: some strains were positive, others negative.

<sup>a</sup> *P. angusta*, *P. ellipsoidea* and *P. fusioidea*. These species can be identified by molecular and morphological characters.

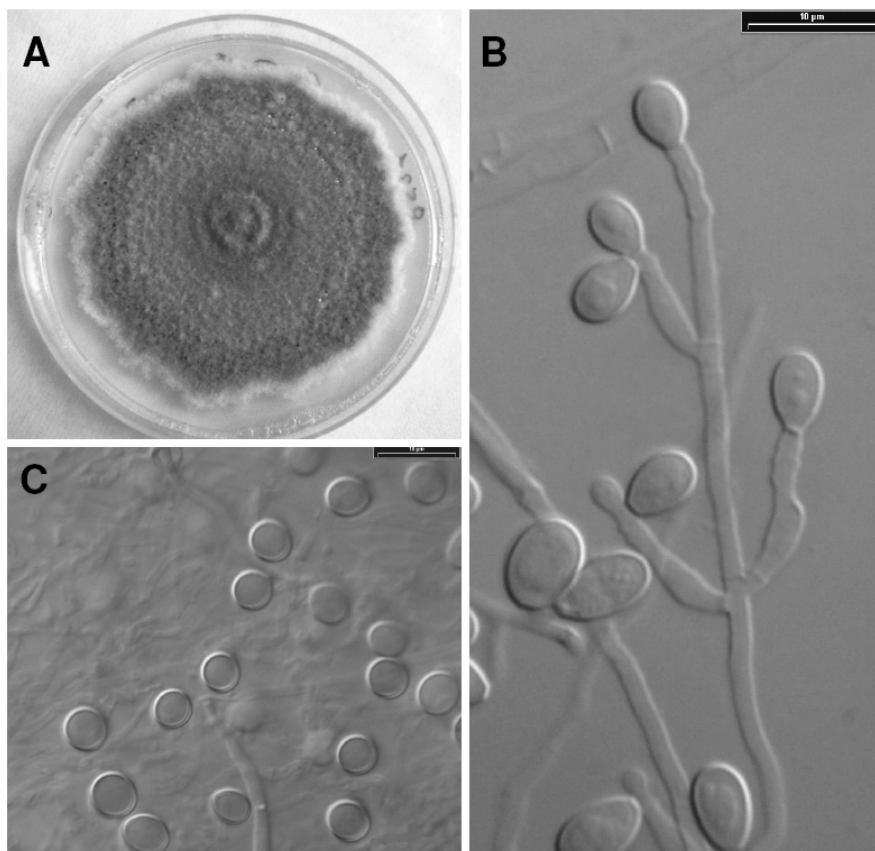


with a T. Strains of *S. prolificans* were used as outgroups. CI, consistency index; RI, retention index; P, *Pseudallescheria*; S, *Scedosporium*. \*The reference strain of *Indiella americana*.

The morphology of the conidiophores and the sessile conidia (conidia borne individually along the sides of the vegetative hyphae), and the appearance of the colonies on PDA were the most useful phenotypic features for separating the different clades. None of the isolates of clades 3 and 4 developed the teleomorph (sexual state) after two months, while all of them developed the *Scedosporium* anamorph. Synnematosus conidiophores (*Graphium* anamorph) were usually absent in isolates from clade 3, while they were present in more than 90% of the isolates in clade 4. Clade 3 was characterized by solitary and usually unbranched conidiophores, subhyaline to pale gray and thin-walled, sessile conidia, and pale gray colonies (Fig. 2), whereas members of clade 4 showed branched conidiophores, brownish and thick-walled sessile conidia, and brownish colonies (Fig. 3).



**Fig. 2.** (A-D) *Scedosporium dehoogii*, CBS 117406. (A) Colony growing on PDA after 14 days at 25°C. (B) Sessile conidia. (C, D) Conidiogenous cells and conidia.



**Fig. 3.** (A-C) *Scedosporium apiospermum*, FMR 8619. (A) Colony growing on PDA after 14 days at 25°C. (B) Conidiogenous cells and conidia. (C) Sessile conidia

Given the genotypic and phenotypic uniqueness of clade 3, we therefore propose the following new species:

***Scedosporium dehoogii*** Gilgado, Cano, Gené et Guarro, sp. nov.

= Clade 3 *sensu* Gilgado et al. (2).

Coloniae dilute griseae coloratae. Conidiophora solitaria plerumque non-ramosa. Conidia sessilis subhyalina vel dilute grisea, tenuitunicata, plerumque obovata, 5 vel 8 per 5 vel 6  $\mu\text{m}$ . Teleomorphosis ignota. Assimilantur ribitolum, L-arabinitolum, sucrosum et maltosum. Non assimilantur D-ribosum. Augmentum fit in temperatura 37°C.

The colonies on PDA attained a diameter of 45 to 60 mm at 25°C after 14 days. They were cottony and white to pale gray. Solitary conidiophores were usually reduced to conidiogenous cells, which were subhyaline, smooth-walled, usually cylindrical, 6 to 50 µm long by 1 to 1.5 µm wide, and produced pale brown, obovoid or ellipsoidal conidia measuring 6 to 11 µm long by 4 to 5 µm wide. Synnematos conidiophores were erect, 80 to 450 µm long, and terminated in a slimy head of conidia. Those conidia were cylindrical or claviform, 6 to 11 µm long by 3 to 4 µm wide, with a wide truncate base. Sessile conidia were subhyaline to pale gray, thin-walled, mostly obovate, 5 to 8 µm long by 5 to 6 µm wide. A teleomorph was not observed for any isolate after 2 months. Maximum growth temperature was at 37°C (5 to 10 mm diam. after 14 days). The fungus was able to assimilate ribitol, L-arabinitol, sucrose and maltose, but not D-ribose.

**Holotype.** IMI 394089, from garden soil, Barcelona, Spain. Ex-type living cultures CBS 117406 and FMR 6921.

**Etymology.** After the mycologist G. Sybren de Hoog.

The members of clade 4 are morphologically indistinguishable from the anamorph of *Pseudallescheria boydii* (clade 5), but they can be separated by the response to D-ribose test (Table 3) and by the absence of a teleomorph. Clade 4 also included the type strains of *Acremonium suis*, *Sporocybe borzinii* and *Polycytella hominis* and the only reference strain of *Scedosporium apiospermum*. Therefore, the clade 4 must be identified as *S. apiospermum*, since this name has priority from a nomenclatural point of view over the other species included in the clade. A previous name is *Monosporium apiospermum*, which was proposed by Saccardo (13) in 1911 based on a mycetoma isolate, but later *Monosporium* was considered as a *nomen illegitimum* (5). One of the most important aspects of this study has been to precisely demonstrate that *S. apiospermum* (clade 4) and *P. boydii* (clade 5) are really two different species. Up to now, the former had been considered as the anamorph of the latter (7, 8). Since the type of *S. apiospermum* is apparently lost and, according the CBS curators (personal communication), it is presumed that the strain CBS 225.32 is a subculture of the original strain from which Saccardo based the description of the species, we have chosen this strain as the neotype. A dried culture of this strain is deposited in the Centraalbureau voor

Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands) as CBS H-199939. An isotype is also deposited in the CABI Bioscience in England as IMI 395708.

A new name should be proposed for the anamorph of *P. boydii*. Because it was originally described as *Cephalosporium boydii* by Shear in 1922 (14) and later defined as a *Scedosporium* species, it can be classified as *Scedosporium boydii* (Shear) Gilgado, Gené, Cano et Guarro **comb. nov.** [Basionym: *Cephalosporium boydii* Shear, Mycologia 14: 242, 1922].

The study of the type strains of *Acladium castellanii*, *Sporocybe chartoikoon*, and *Sporotrichum councilmanii*, also considered synonyms of *S. apiospermum* | *P. boydii*, revealed that they are morphologically incompatible with the anamorphs of the *P. boydii* complex. The ITS region of these strains were sequenced and when compared with the sequences of the GenBank database, all matched with species other than those in the *P. boydii* complex (Table 1). The only synonymous species which was morphologically compatible with anamorphs of *Pseudallescheria* was *Indiella americana*. However, the TUB sequence placed this species in a branch phylogenetically distant to the species of the *P. boydii* complex (Fig. 1). Because the taxonomy of *I. americana* is ill-defined, an extensive study with more strains would be required for the proper delineation of this species.

Traditionally the identification of the fungi of clinical interest has been based on morphology. However, molecular methods, based mainly on sequencing rRNA genes, have recently evolved as useful tools for this purpose. Combining both approaches is not yet a common practice, but seems to be the best approach for obtaining a more natural classification. In recent years, different authors have used multigene analyses to demonstrate the existence of numerous cryptic species in important clinical fungi (6, 9, 11). In our study, we have used a polyphasic approach that combines morphologic, physiologic, and molecular data sets to characterize the species of the genus *Pseudallescheria* and its relatives.

Although it has been shown that the TUB region is a good marker for delimiting the different species of the complex, many clinical laboratories may not have the capability for molecular characterization of isolates. The fact that these species can also be identified using simple and inexpensive phenotypic methods has made their delineation in routine laboratories possible. Now that phylogenetic species of the *P. boydii* complex can be recognized and their different responses to the antifungals drugs have been demonstrated (3), it will be of interest to see if they also elicit different clinical manifestations.

The authors are grateful to Dr. G. Sybren de Hoog (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) for his useful comments on the taxonomy of the fungi included in the study. This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grants CGL 2004-00425/BOS and CGL2005-7394.

## REFERENCE

1. **Bard, C. B., J. L. Carter, S. P. Keely, L. Huang, N. J. Pieniazek, I. N. Moura, J. M. Roberts, A. W. Hightower, M. S. Bens, A. R. Freeman, S. Lee, J. R. Stringer, J. S. Duchin, C. del Rio, D. Rimland, R. P. Baughman, D. A. Levy, V. J. Dietz, P. Simon, and T. R. Navin.** 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:265-272.
2. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.
3. **Gilgado, F., C. Serena, J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:4211-4213.
4. **Guarro, J., J. Gené, and A. M. Stchigel.** 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.
5. **Hughes, S. J.** 1958. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Can. J. Bot.* **36**:727-836.
6. **Koufopanou, V., A. Burt, and J. W. Taylor.** 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:5478-5482.



7. **Malloch, D.** 1970. New concepts in the Microascaceae illustrated by two new species. *Mycologia* **62**:727-739.
8. **McGinnis, M. R., A. A. Padhye, and L. Ajello.** 1982. *Pseudallescheria* Negroni et Fischer, 1943 and its later synonym *Petriellidium* Malloch, 1970. *Mycotaxon* **14**:94-102.
9. **Mostert, L., J. Z. Groenewald, R. C. Summerbell, V. Robert, D. A. Sutton, A. A. Padhye, and P. W. Crous.** 2005. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1752-1767.
10. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919-938.
11. **O'Donnell, K., D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, K. C. Magnon, P. A. Cox, S. G. Revankar, S. Sanche, D. M. Geiser, J. H. Juba, J. A. van Burik, A. Padhye, E. J. Anaissie, A. Francesconi, T. J. Walsh, and J. S. Robinson.** 2004. 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.* **42**:5109-5120.
12. **Pringle, A., D. M. Baker, J. L. Platt, J. P. Wares, J. P. Latge, and J. W. Taylor.** 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* **59**:1886-1899.
13. **Saccardo, P. A.** 1911. Notae mycologicae [Mycological notes]. *Annls. Mycol.* **9**:249-257.
14. **Shear, C. L.** 1922. Life history of an underscribed ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. *Mycologia* **14**:239-243.

15. **Yarrow, D.** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, p.95-97. *In* C. P. Kurtzman, and J. W. Fell (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.



	Species								
	<i>P. boydii</i> (clade 5)	<i>P. ellipsoidea</i> (clade 5)	<i>P. fusoidea</i> (clade 5)	<i>P. angusta</i> (clade 5)	<i>S. apiospermum</i> (clade 4)	<i>S. dehoogii</i> (clade 3)	<i>P. minutispora</i> (clade 2)	<i>S. aurantiacum</i> (clade 1)	<i>S. prolificans</i>
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	v	+	+	+	v	+	+	-
D-Glucitol	v	v	v	v	v	v	v	v	+
Dextrine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate	v	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrite	v	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cadaverine	-	-	-	v	-	-	-	-	-
Creatinine	+	+	+	+	+	v	+	+	+
Creatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.05% Cycloheximide	v	+	+	+	v	+	+	+	-
0.1% Cycloheximide	v	+	+	+	v	v	+	+	-
2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5% NaCl	v	v	v	v	-	-	-	-	v
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2% MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5% MgCl <sub>2</sub>	v	v	+	+	v	+	+	+	+
10 % MgCl <sub>2</sub>	v	-	+	+	v	+	-	v	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	+	v

Abbreviations and symbols used: +, more of 90% of the strains tested displayed a positive response; -, more of 90% of the strains tested displayed a negative response;

V, variable: some strains were positive, others negative.

### **4.1.3. Reclassification of *Graphium tectonae* as *Parascedosporium tectonae* gen. nov., comb. nov., *Pseudallescheria africana* as *Petriellopsis africana* gen. nov., comb. nov. and *Pseudallescheria fimeti* as *Lophotrichus fimeti* comb. nov.**

Fèlix Gilgado, Josepa Gené, Josep Cano y Josep Guarro

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2171–2178

#### **Resumen**

Durante el estudio que llevamos a cabo sobre hongos geófilos, utilizando el medio DRBC suplementado con benomilo, aislamos un hongo interesante de suelo de Argentina que presentaba una morfología similar a la de *Scedosporium*. Un estudio más detallado a nivel genético y morfológico nos ha permitido ver que este hongo era diferente a las especies conocidas de éste y otros géneros relacionados, por lo que proponemos el nuevo género *Parascedosporium*. Su carácter distintivo es el desarrollo simpodial de los conidios a partir de células conidiógenas denticuladas. Este aislado resultó ser morfológicamente idéntico a *Graphium tectonae*, por lo que propusimos la nueva combinación *Parascedosporium tectonae*. El análisis filogenético de las secuencias de 4 regiones de los 3 genes ya trabajados en el primer estudio confirmó nuestra propuesta. El mismo análisis filogenéticos, además de otros estudios morfológicos, nos permitieron excluir a *Pseudallescheria africana* y *Pseudallescheria fimeti* del género *Pseudallescheria*, proponiendo el nuevo genero *Petriellopsis* para el primero y acomodando en *Lophotrichus* a *P. fimeti*.

Algunas de las ilustraciones del presente estudio han sido seleccionadas para la portada del IJSEM de Octubre del 2007 (ver Anexo).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## ABSTRACT

During a biodiversity survey of Argentinean soil fungi, we recovered a rare *Scedosporium*-like fungus which was proven to be genetically and morphologically different from the known species of *Scedosporium* (anamorph of *Pseudallescheria*) and relatives and is proposed here as the new genus *Parascedosporium*. This genus is mainly characterized by producing sympodial conidia from denticulate conidiogenous cells. This isolate was morphologically identical to *Graphium tectonae* and thus the new combination *Parascedosporium tectonae* is proposed. Sequence analysis of four regions of three genes, i.e.  $\beta$ -tubulin (two loci), calmodulin and the internal transcribed spacer region of the 5.8S ribosomal RNA, confirmed our proposals. Both, the phylogenetic analysis and morphological studies excluded *Pseudallescheria africana* and *Pseudallescheria fimeti* from the genus *Pseudallescheria*. The former is proposed as the new genus *Petriellopsis*, and the latter has been reaccommodated in *Lophotrichus*. The type strains of *P. tectonae*, *Petriellopsis africana* and *Lophotrichus fimeti* are CBS 127.84<sup>T</sup>, CBS 311.72<sup>T</sup> and CBS 129.78<sup>T</sup>, respectively.

## INTRODUCTION

*Pseudallescheria* is a genus of the family Microascaceae, whose species are usually polymorphic (Arx *et al.*, 1988; de Hoog *et al.*, 2000). They show a teleomorph (sexual state) characterized by closed ascomata (cleistothecia), a peridium (ascomata wall) of "*textura epidermoidea*", asci broadly clavate or spherical, and ellipsoidal or fusiform ascospores which are symmetrical or nearly so. In addition, they can develop two anamorphs (asexual states), *Scedosporium*, characterized by hyaline, cylindrical conidiogenous cells arising from undifferentiated hyphae which produce obovoidal, hyaline, sticky conidia; and *Graphium*, characterized by large, erect bundles of hyphae terminating in a dense aggregate of conidiogenous cells. Both anamorphs produce conidia from a short extension of the conidiogenous cells with annellidic development. Although not for all strains, the three forms can be found in a single culture.

The genus *Pseudallescheria* until recently comprised the following species: *P. africana*, *P. angusta*, *P. boydii*, *P. ellipsoidea*, *P. desertorum*, *P. fimeti* and *P. fusioidea* (Arx *et*

#### 4.1. Taxonomía, Filogenia, Morfología y Fisiología

*al.*, 1988). All these species are morphologically very similar and the differences between them are in the size of the cleistothecia and ascospores. *P. boydii* is the most common species of the genus, but at the same time it has been proven to be genetically highly variable (de Hoog *et al.*, 1994; Rainer *et al.*, 2000; Gilgado *et al.*, 2005; Rainer & de Hoog, 2006). Gilgado *et al.* (2005), based on multilocus analysis, described two new species within *P. boydii* complex (*P. minutispora* and *Scedosporium aurantiacum*), although other phylogenetic species remain undescribed. Similar conclusions were reached by Rainer & de Hoog (2006) based on the sequence analysis of the ribosomal RNA genes. In addition, recent molecular studies revealed that *P. africana* and *P. fimeti* are phylogenetically very distant from the other *Pseudallescheria* species, suggesting that they may belong to other genera of Microascaceae (Issakainen *et al.*, 1999, 2003; Rainer & de Hoog, 2006), but unfortunately only one strain of each of the two mentioned species exists (CBS 311.72 and CBS 129.78, respectively).

Although these fungi can infect animals, including humans, most of them are geophilic. Considering that one of the limitations of Microascaceae is that only a very reduced number of strains are known for the different species, the soil can be an important source of fresh isolates useful for performing phylogenetic studies. In a recent soil survey of different geographic regions, we recovered a fungus (CBS 120338) which developed two types of anamorphs, but the teleomorph was not observed. It produced a *Graphium* anamorph similar to that developed by *Pseudallescheria* spp., and a second type of anamorph characterized by solitary conidiophores that produced conidia from denticulate conidiogenous cells similar to those of the anamorph genus *Sporothrix*. This fungus was morphologically similar to *Graphium tectonae* (Booth, 1964), an uncommon poorly studied phytopathogenic fungus. The present paper focuses on its morphological and molecular characterization using a multilocus sequence analysis, and determines its phylogenetic relationships with *Pseudallescheria* and relatives.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal strains.** The isolates and sequences included in the study and their origin are shown in Table 1. A total of 38 isolates were studied, most of them were reference strains provided by different culture collections and 7 were isolated by the authors from soil of different geographical regions. One hundred and six sequences of different species of *Pseudallescheria*,



**Table 1.** Fungal species, source code, geographic origin and GenBank/EMBL/DDBJ accession number of the isolates included in this study.

Species	Isolate	Source	Origin	Accession number				
				TUB	BT2	CAL	ITS	SSU
<i>G. tectonae</i>	CBS 127.84 <sup>T</sup>	Seed of <i>Tectona grandis</i>	Jamaica	-	-	-	AM749440	-
	CBS 118694	Leaf lesion <i>Actinidia deliciosa</i>	New Zealand	-	-	-	AM749452	-
	CBS 120338	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AM409116 <sup>a</sup>	AM409105 <sup>a</sup>	AM409102 <sup>a</sup>	AM409113 <sup>a</sup>	-
<i>L. plumbescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	AF048806
<i>L. indicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	AF048804
<i>P. africana</i>	CBS 311.72 <sup>T</sup>	Brown sandy soil	Namibia	AJ890132	AJ889603	AJ890218	AJ888425	-
<i>P. angusta</i>	CBS 254.72 <sup>T</sup>	Half-digested sewage tank	Ohio, USA	AJ890129	AJ889604	AJ890214	AJ888414	-
	FMR 8541	Garden soil	Buenos Aires, Argentina	AJ890128	AJ889605	AJ890215	AJ888413	-
	FMR 8905	Forest soil	La Gran Piedra, Cuba	AM261053 <sup>a</sup>	AM409109 <sup>a</sup>	AM409099 <sup>a</sup>	AM409110 <sup>a</sup>	-
<i>P. boydii</i>	CBS 101.22 <sup>T</sup>	Mycetoma	Texas, USA	AJ890121	AJ889590	AJ890207	AJ888435	U43913
	FMR 4167	Otitis	Valladolid, Spain	AJ889580	AJ888952	AJ890152	AJ888385	-
	FMR 6697	Sputum	Madrid, Spain	AJ889582	AJ888954	AJ890154	AJ888387	-
	FMR 6921	Garden soil	Barcelona, Spain	AJ889987	AJ888958	AJ890158	AJ888389	-
	FMR 8532	Cultivated soil	Montsià, Spain	AJ890012	AJ889858	AJ890183	AJ888407	-
	FMR 8622	Foot skin	Barcelona, Spain	AJ890118	AJ889587	AJ890195	AJ888419	-
	FMR 8619	Keratitis	Brasil	AJ890115	AJ889584	AJ890192	AJ888416	-
	IHEM 15642	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ890003	AJ889849	AJ890174	AJ888403	-
	RKI 2956/93	BAL	Berlin, Germany	AJ890114	AJ889865	AJ890191	AJ888415	-
	-	Lung tissue	UK	-	-	-	-	AJ812012
<i>P. desertorum</i>	CBS 489.72 <sup>T</sup>	Salt marsh soil	Kuwait	AM409117 <sup>a</sup>	AM409106 <sup>a</sup>	AM409101 <sup>a</sup>	AY879798	-
<i>P. ellipsoidea</i>	CBS 418.73 <sup>T</sup>	Soil	Tajikistan	AJ890124	AJ889595	AJ890211	AJ888426	U43911
	FMR 8623	Leukemic patient	Barcelona, Spain	AJ890125	AJ889596	AJ890210	AJ888427	-
	FMR 7884	Transplant	Madrid, Spain	AJ890126	AJ889594	AJ890209	AJ888391	-

Species	Isolate	Source	Origin	Accession number				
				TUB	BT2	CAL	ITS	SSU
<i>P. fimeti</i>	CBS 129.78 <sup>T</sup>	Goat dung	Aligarh, India	-	-	-	AY879799	AM409202 <sup>a</sup>
<i>P. fusoides</i>	CBS 106.53 <sup>T</sup>	Goat dung	Aligarh, India	AJ890131	AJ889601	AJ890212	AJ888428	-
	FMR 8906	Forest soil	La Gran Piedra, Cuba	AM261054 <sup>a</sup>	AM409108 <sup>a</sup>	AM409098 <sup>a</sup>	AM409112 <sup>a</sup>	-
<i>P. minutispora</i>	FMR 4072 <sup>T</sup>	River sediment	Tordera river, Spain	AJ890122	AJ889592	AJ890216	AJ888384	-
	MUCL 29258	Fuel oil	Antwerpen, Belgium	AJ890123	AJ889593	AJ890217	AJ888424	-
	RKI 866/94	Sputum	Berlin, Germany	AM261032 <sup>a</sup>	AM409107 <sup>a</sup>	AM409100 <sup>a</sup>	AM409111 <sup>a</sup>	-
<i>Pe. asymmetrica</i>	CBS 238.38 <sup>T</sup>	Bark of <i>Populus nigra</i>	-	-	-	AY882361	-	
<i>Pe. guttulata</i>	CBS 362.61 <sup>T</sup>	Partridge dung	Germany	-	-	-	AY879800	-
<i>Pe. setifera</i>	CBS 559.80	Woodland soil	Ocho Rios, Jamaica	-	-	-	AY882356	-
	CBS 745.69	Wood of <i>Populus tremuloides</i>	Ontario, Canada	-	-	-	AY882350	-
	CBS 385.87	Human toe nail	Helsinki, Finland	-	-	-	-	AF048808
<i>Pe. sordida</i>	CBS 184.73	-	Stockholm, Sweden	-	-	-	AY882360	-
	UTHSC 03-394	Nasal infection	California, USA	AM409115 <sup>a</sup>	AM409104 <sup>a</sup>	AM409103 <sup>a</sup>	AM409114 <sup>a</sup>	-
	-	-	-	-	-	-	-	AF048810
<i>S. aurantiacum</i>	FMR 8630 <sup>T</sup>	Ankle ulcer	S. Compostela, Spain	AJ890133	AJ889597	AJ890219	AJ888440	-
	IHEM 15458	Cystic fibrosis	Giens, France	AJ890135	AJ889599	AJ890221	AJ888441	-
	IHEM 15579	Cystic fibrosis	Angers, France	AJ890136	AJ889600	AJ890222	AJ888439	-
<i>S. prolificans</i>	FMR 7294	Clinical	California, USA	AJ890127	AJ889591	AJ890223	AJ888444	-
	CBS 336.95	Sputum of an AIDS patient	Manchester, UK	-	-	-	AY882363	-
	CBS 114.90	Bone biopsy	USA	-	-	-	-	U43910
	CBS 467.74	Bone biopsy	USA	-	-	-	-	U43909

*Scedosporium* and other morphologically close species of the family Microascaceae were obtained from GenBank and a total of 24 sequences (6 of TUB, 6 of BT2, 6 of CAL, 5 of ITS and 1 of 18S ribosomal RNA genes) were newly generated for the present study. The techniques and culture media used for the isolation of the soil isolates were described previously (Gilgado *et al.*, 2005).

**DNA extraction, amplification, sequencing.** The procedures used for the DNA extraction, amplification, sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal RNA (rRNA) genes, a fragment of the nuclear gene calmodulin (CAL), and two regions within the  $\beta$ -tubulin gene, BT2 and TUB, were described previously (Gilgado *et al.*, 2005). A partial region of 18S (SSU) rRNA gene was amplified by using the primers NS1 and NS24UCB and sequenced with the primers NS19UCB and NS22UCB (Gargas & Taylor, 1992). The protocol used for the amplification and sequencing was that described by Gargas & DePriest (1996).

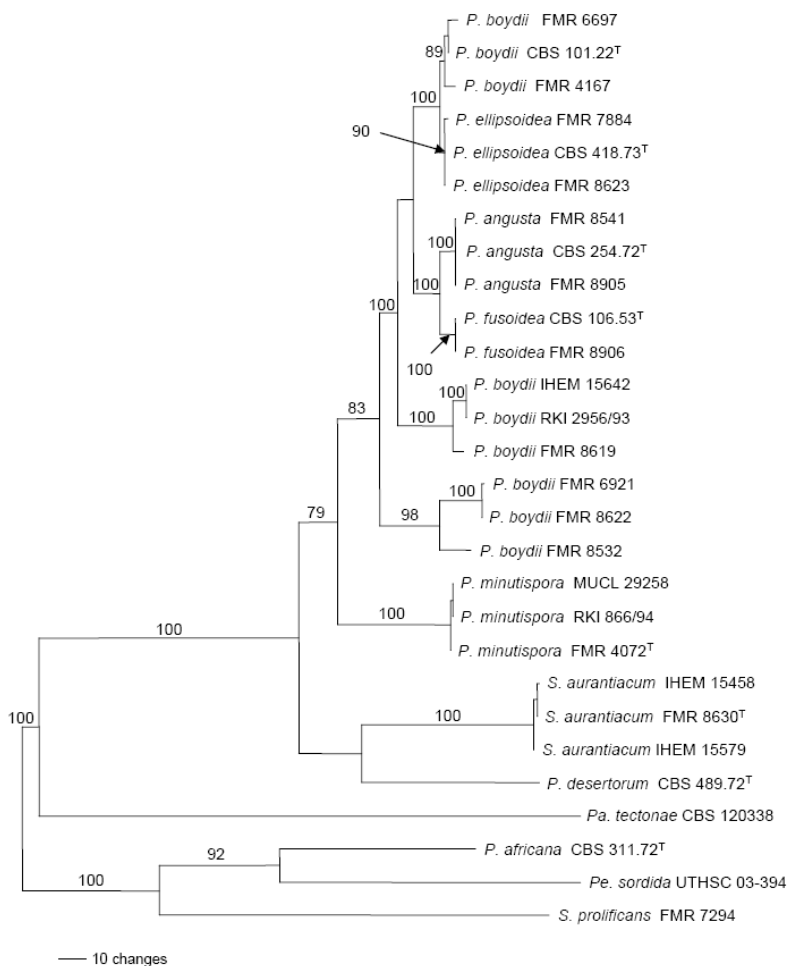
**Phylogenetic analysis.** The sequences were aligned with Clustal X (version 1.8) computer program (Thomson *et al.*, 1997) followed by manual adjustments with a text editor. Ambiguously aligned regions were excluded from the analysis (Supplementary Table in IJSEM Online). The phylogenetic analysis was performed using PAUP\* version 4.0b10 (Swofford, 2002). Briefly, the most-parsimonious tree (MPT) was obtained after one hundred heuristic searches with random sequence addition and tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches and saving all minimal-length trees (MulTrees). Support for internal branches was assessed using a heuristic parsimony search of 1000 bootstrapped data sets. The combined datasets of the ITS, CAL, BT2 and TUB were tested for incongruence with the partition homogeneity test, as implemented in PAUP\*. Kishino-Hasegawa tests were performed in order to determine whether trees were significantly different. The trees obtained were rooted at the midpoint with the exception of the ITS, which was rooted with a sequence of an isolate of *Scopulariopsis chartarum* as outgroup.

**Morphological study.** The isolates were subcultured on potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich) and on oatmeal agar (OA; 30 g oat flakes, 1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5 g  $KH_2PO_4$ , 15 g agar, 1 L tap water) at 25°C in darkness. The microscopic features were examined by direct observation in wet mounts with 85 % lactic acid and by slide cultures on OA, the medium in which these fungi showed the best sporulation. In descriptions, color

notations in parentheses were from Kornerup & Wanscher (1984). Photomicrographs were obtained under a Leitz Dialux 20 light microscope, using phase contrast and Nomarski differential interference. Growth rates were obtained on PDA at 25, 37, 40, 42 and 45°C in the dark.

## RESULTS

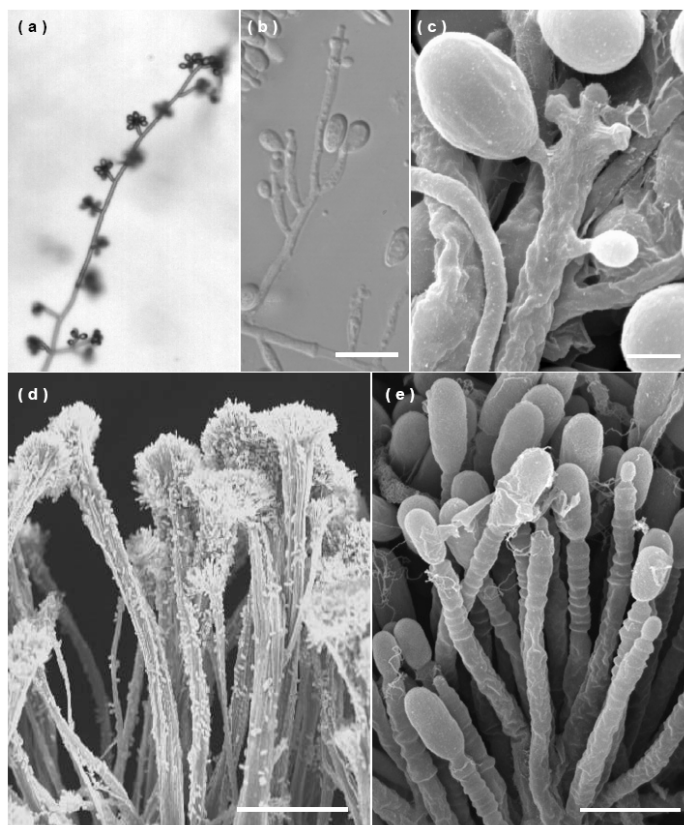
Phylogenetic data of the ITS, SSU rRNA, TUB, BT2 and CAL loci, based on parsimony analyses, are shown in Supplementary Table in IJSEM Online. The MPT topology of the ITS sequences showed three main clades (Supplementary Fig. S1 in IJSEM Online). These results demonstrated that the genus *Pseudallescheria* is clearly polyphyletic since two of the species traditionally included in the genus, i.e. *P. fimeti* and *P. africana*, were clearly separated from the rest and were found genetically closer to species of other genera. The type strain of *P. fimeti* formed a basal clade, and the type strain of *P. africana* was grouped with representatives of the genus *Petriella* and two strains of *Scedosporium prolificans*. The isolate CBS 120338 was also accommodated in this clade, although clearly separated from the remaining species. In the phylogram based on TUB gene sequences (Supplementary Fig. S2 in IJSEM Online), *P. africana* and CBS 120338 were again separated from the other *Pseudallescheria* spp. and grouped with *Petriella sordida* and *S. prolificans* (bootstrap support of 100%). The analysis of CAL and BT2 sequences (Supplementary Fig. S3 and S4 in IJSEM Online) also confirmed the exclusion of *P. africana* from the *Pseudallescheria* species complex. The clade formed by *Pseudallescheria africana*, *Petriella sordida* and *S. prolificans* in the trees inferred from the analysis of the two last loci received a 100% bootstrap support. In general, the phylogenetic relationships between CBS 120338 and the other fungi included in the analysis were not completely resolved since it was found close to the *Pseudallescheria* clade in the CAL and BT2 trees and to *Petriella* spp., *S. prolificans* and *P. africana* in the ITS and TUB trees. Since the homogeneity partition test indicated that the four sequence datasets were congruent and combinable ( $P=0.09$ ), we combined the sequence datasets of the four loci of 28 isolates (Fig. 1). This analysis confirmed again the close relationship of *Pseudallescheria africana* with *Petriella sordida* and *S. prolificans*. The clade formed by these species received a 100% bootstrap support. The clear separation of the isolate CBS 120338 from the other *Pseudallescheria* and *Scedosporium* isolates was proved.



**Fig. 1.** The single most-parsimonious tree obtained from heuristic searches based on analysis produced from the combined ITS, TUB, BT2 and CAL sequences. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. Tree was rooted at the midpoint. <sup>T</sup>, type strain. *P.*, *Pseudallescheria*; *Pa.*, *Parascedosporium*; *Pe.*, *Petriella*; *S.*, *Scedosporium*.

The morphological study of the fungi included in this analysis showed that the isolate CBS 120338 had two different asexual structures (Fig. 2). One showed the typical features of *Graphium*, similar to those observed in the other species studied here. The second one was characterized by solitary conidiophores with sympodial conidia emerging from denticulate conidiogenous cells, as mentioned above. The latter type of conidiogenesis is clearly different

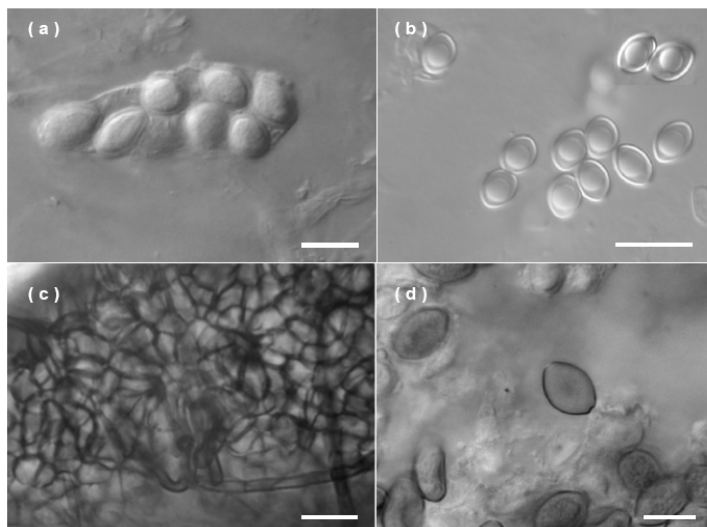
from that of *Scedosporium* and similar to that showed by *G. tectonae*. Comparisons of the ITS sequences (485 bp) of the Argentinian isolate (CBS 120338) with those of two reference strains of *G. tectonae* (CBS 127.84, type strain; CBS 118694) showed 100% similarity and confirmed the identification of this isolate as *G. tectonae*.



**Fig. 2.** *Parascedosporium tectonae* gen. nov. & comb. nov. CBS 120338. (a) Aerial hyphae with simple or branched conidiophores producing sympodial conidia ; (b) detail of a branched conidiophore; (c) conidia emerging from a denticulate conidiogenous cell; (d) synnemata and (e) annelidic conidiogenous cells of the *Graphium* anamorph (SEM). Bars, 10  $\mu$ m (b), 2  $\mu$ m (c), 100  $\mu$ m (d) and 5  $\mu$ m (e).

In the case of the type strain of *P. africana* (Fig. 3 a, b), we noted the presence of clavate asci and asymmetrical ascospores with inconspicuous or absent germ pores. In *Pseudallescheria* spp. the asci are globose to ovoid, and the ascospores are symmetrical or

nearly so and with a conspicuous germ pore at each pole (Arx *et al.*, 1988). The absence of ostiolate ascomata differentiates *P. africana* from the other species of *Petriella*.



**Fig. 3.** (a-b) *Petriellopsis africana* gen. nov. & comb. nov. CBS 311.72<sup>T</sup>; (a) asci; (b) ascospores. (c-d) *Lophotrichus fimeti* comb. nov. CBS 129.78<sup>T</sup>; (c) peridium of *textura angularis*; (d) ascospores. Bars, 10  $\mu$ m.

The morphological study of *P. fimeti* revealed that its ascomata were non-ostiolate with a peridium of “*textura angularis*”, and that its ascospores were dextrinoid, large and with a wide germ pore at each pole (Fig. 3 c, d). In addition, no anamorph was observed. These features are typical of *Lophotrichus*, a different genus belonging also to the Microascaceae. To confirm this, a comparative sequence analysis of a partial portion of SSU gene of the *P. fimeti* type strain and other sequences from different Microascaceae taxa retrieved from GenBank was performed. In the phylogram obtained (Supplementary Fig. S5 in IJSEM Online), *P. fimeti* was nested with the two *Lophotrichus* species (*L. plumbescens* and *L. indicus*) included in the study, and placed very far from the species of *Pseudallescheria* and *Petriella*.

## DISCUSSION

The results obtained in this study provide enough evidence for considering an interesting fungus, recovered from an Argentinean sample of soil, as phylogenetically distant and phenotypically different from the known species of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium*. Since the comprehensive revision of Arx *et al.* (1988), numerous taxonomical studies on Microascaceae, mainly based on different molecular analysis, have been published (de Hoog *et al.*, 1994; Guého & de Hoog, 1991; Issakainen *et al.*, 1999, 2003; Rainer *et al.*, 2000, 2006) and several new species have been proposed (Gilgado *et al.*, 2005). However, none of the species of those genera shows the type of conidiogenesis observed in the Argentinean fungus. Given the genotypic and phenotypic uniqueness of such this fungus, *Parascedosporium tectonae* gen. and comb. nov. are proposed.

The results of the combined loci dataset demonstrated that *P. africana* was clearly separated from the other species of *Pseudallescheria*. In a recent study, the phylogenetic position of this species was ambiguous, since on the basis of LSU sequences data it was placed in the *Petriella* clade, and based on ITS sequences in the *Pseudallescheria* branch (Rainer & de Hoog, 2006). Judging from its non-ostiolate ascomata, the authors suggested that this species should be classified in *Pseudallescheria*. However, our study revealed that this species was phylogenetically distant from the *Pseudallescheria* clade. Issakainen *et al.* (1999, 2003), based on the analysis of a partial large subunit rRNA gene sequences, had already demonstrated that *P. africana* was phylogenetically distant from the rest of *Pseudallescheria* species. Therefore, on the basis of its phenotypic and molecular characteristics the new genus *Petriellopsis* is proposed.

The present study also revealed that *P. fimeti* was placed out of the *Petriella* and *Pseudallescheria* clades, which agrees with Issakainen *et al.* (1999) and Rainer & de Hoog (2006). We examined the type strain of this species and noticed that its peridium has a "textura angularis", a typical feature of the genus *Lophotrichus* (Arx *et al.*, 1988). In the analysis of a partial portion of the SSU rRNA gene, *P. fimeti* clustered in the same clade as the two species of *Lophotrichus* included in the study. These results confirm that *P. fimeti* should be reclassified in *Lophotrichus*, and consequently, the new combination *Lophotrichus fimeti* is proposed.



**Latin diagnosis of *Parascedosporium* Gilgado, Gené, Cano *et* Guarro gen. nov.**

*Ad fungos conidiales hyphomycetes pertinens. Conidiophora erecta, simplicia vel ramosa. Cellulae conidiogenae polyblasticae, terminales, sympodiales, cum denticulis cylindricis manifestis praeditae. Conidia solitaria, sicca, unicellularia, subhyalina vel brunnea, laevia et crassitunicata. Synanamorphosis: Graphium. Teleomorphosis ignota.*

*Typus: Parascedosporium tectonae* (C. Booth) Gilgado, Gené, Cano *et* Guarro.

**Description of *Parascedosporium* Gilgado, Gené, Cano & Guarro gen. nov.**

*Parascedosporium* (Gr. prep. *para*, beside; N.L. neut. n. *Scedosporium*, a genus name; N.L. neut. n. *Parascedosporium*, resembling to the genus *Scedosporium*, because the morphology is similar to that of *Scedosporium*).

Conidial fungi, hyphomycetes. Conidiophores erect, simple or irregularly branched. Conidiogenous cells polyblastic, usually terminal, forming conidia by sympodial growth on conspicuous cylindrical denticles. Conidia solitary, dry, 1-celled, subhyaline to brown, thick-walled. A *Graphium* synanamorph is present. Teleomorph unknown.

The type species is *Parascedosporium tectonae* (C. Booth) Gilgado, Gené, Cano & Guarro.

**Description of *Parascedosporium tectonae* (C. Booth) Gilgado, Gené, Cano & Guarro comb. nov.**

*Parascedosporium tectonae* (tec.to'.nae. L. fem. adj. *tectonae*, referring to the plant taxon from where the fungus was isolated).

Basionym: *Graphium tectonae* C. Booth, *Mycol. Pap.* 94, 5 (1964).

Since the original description of the species is quite incomplete, the following description is provided.

#### 4.1. Taxonomía, Filogenia, Morfología y Fisiología

The colonies on PDA at 25°C attained a diameter of 49 to 50 mm after 14 days at 25°C. They were velvety, radially folded, grey (2D-E1), slightly granular at the centre due to the presence of numerous synnemata, smooth and dark grey (2F1) at the periphery, with a entire and slightly fimbriate margin; reverse dark-grey (2F1) to black at the centre, pale grey (2B-C1) at the periphery. The colonies on OA were zonate and olive-grey (2F2-4), with aerial mycelium practically absent and granular at the centre due to the abundance of synnemata, the margin was diffuse and the reverse colorless. The conidiophores were solitary and emerging from aerial mycelium or forming synnemata (*Graphium*) mainly from surface mycelium. Solitary conidiophores were simple, and often reduced to a conidiogenous cells, or irregularly branched, with branches often bearing two to three conidiogenous cells. The conidiogenous cells were cylindrical to flask-shaped, 6-20 x 1.5-2.5 µm, hyaline, thin-walled, usually terminating in a cluster of 2-5 cylindrical denticles, up to 1 µm long. The conidia were often obovate, 5-6 x 3-4 µm, smooth and more or less thick-walled. The synnemata were erect, 325-450 µm long, consisting of a cylindrical stipe, 12.5-25 µm wide, dark grey, smooth-walled, slightly roughened apically, and they terminated in a slimy head of conidia, 50-87 x 80-138 µm. The conidiogenous cells were percurrent, with conspicuous annellations, lateral or terminal, subhyaline, smooth-walled, cylindrical, 10-37 x 1.5-2.5 µm, less frequently intercalary as a lateral projection on hyphae, and up to 5 x 2 µm. The conidia were (sub)cylindrical or clavate, 5.5-7.5 x 2.5-3.5 µm. The conidia developing from undifferentiated hyphae of the substratum were also observed. They were scarcely produced, lateral, usually sessile, brown, smooth- and thick-walled, subglobose to obovate, 6-8 x 4.5-6 µm. The optimum growth temperature was from 25°C to 30°C. Maximum growth was at 37°C. The fungus did not grow at 40°C. Phylogenetic placement, as deduced by analysis of the combined data of four loci, is shown in Fig. 1. Relevant morphologic features are shown in Fig. 2.

The type strain is CBS 127.84<sup>T</sup>.

#### **Latin diagnosis of *Petriellopsis* Gilgado, Cano, Guarro *et* Gené gen. nov.**

*Ascomata sphaerica, non ostiolata, fusca. Asci unitunicati, clavati, structure apicalis absens, evanescentes. Ascospores uniseriate, unicellulares, ellipsoideae, asymmetrcae, poris germinationis inconspicuous vel absentibus. Conidia modo Scedosporii et Graphii.*

*Typus: Petriellopsis africana* (Arx et G. Franz) Gilgado, Cano, Guarro et Gené.

### **Description of *Petriellopsis* Gilgado, Cano, Guarro & Gené gen. nov.**

*Petriellopsis* (pe.trie.llop'sis. N.L. n. *Petriella*, a genus name; N.L. fem. n. *opsis* (from Gr. fem. n. *opsis*), appearance; N.L. fem. n. *Petriellopsis*, resembling to the genus *Petriella*, because the morphology is similar to *Petriella*).

The ascomata were spherical, non-ostiolate, immersed to nearly superficial, blackish brown, with a membranaceous peridium, composed of several layers of cells, "*textura epidermoidea*" in surface. The asci were unitunicate, clavate, without distinct apical structures, evanescent. The ascospores were uniseriate, 1-celled, broadly ellipsoidal, asymmetrical, with inconspicuous or absent germ pores, orange to greenish colored. The fungus produced a *Scedosporium* and a *Graphium* anamorph. Its phylogenetic placement, as deduced by analysis of the combined data of four loci, is shown in Fig. 1. Relevant morphological features are shown in Fig. 3 (a, b).

The type species is *Petriellopsis africana* (Arx & G. Franz) Gilgado, Cano, Guarro & Gené comb. nov.

### **Description of *Petriellopsis africana* (Arx & G. Franz) Gilgado, Cano, Guarro & Gené comb. nov.**

Basionym: *Pseudallescheria africana* (Arx & G. Franz) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Mycotaxon* 14, 97 (1982).

*Petriellopsis africana* (a.fri.ca'na. L. fem. adj. *africana* pertaining to the African continent).

Synonym: *Petriellidium africanum* Arx & G. Franz (1973).

A detailed description of this species was reported by Arx (1973). The relevant morphological features to distinguish this fungus from other related genera are its clavate asci and the asymmetrical ascospores with inconspicuous or lacking germ pores (Fig. 3 a, b).

The type strain is CBS 311.72<sup>T</sup>.

#### **Transfer of *Pseudallescheria fimeti* to *Lophotrichus*.**

This species was described by Arx (1978). The analysis of the SSU sequences proved that it clustered together with members of *Lophotrichus* (Supplementary Fig. S5 in IJSEM Online).

#### **Description of *Lophotrichus fimeti* (Arx, Mukerji & N. Singh) Gilgado, Guarro, Gené & Cano comb. nov.**

Basionym: *Pseudallescheria fimeti* (Arx, Mukerji & N. Singh) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Mycotaxon* 14, 98 (1982).

*Lophotrichus fimeti* (fi.me'ti. L. gen. n. *fimeti*, of a dung-hill, referring to its coprophilous habitat).

Synonym: *Petriellidium fimeti* Arx, Mukerji & N. Singh (1978).

The morphological characters to distinguish this fungus from other related genera are its non-ostiolate ascomata with a peridium of "*textura angularis*", its large ascospores with wide germ pores (Fig. 3 c, d), and the absence of *Scedosporium* and *Graphium* anamorphs.

The type strain is CBS 129.78<sup>T</sup>.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Dr. Sybren de Hoog (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) for his useful comments and for kindly providing fungal sequences.

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grant CGL2005-07394/BOS.

## REFERENCES

**Arx, J. A. von (1973).** The genera *Petriellidium* and *Pithoascus* (Microasceae). *Persoonia* **7**, 367-375.

**Arx, J. A. von (1978).** Notes on Microasceae with the description of two new species. *Persoonia* **10**, 23-31.

**Arx, J. A. von, Figueras, M. J. & Guarro, J. (1988).** Sordariaceous ascomycetes without ascospore ejaculation. *Beih. Nova Hedwigia* **94**, 1-104.

**Booth, C. (1964).** Studies of pyrenomycetes: VII. Mycol. Pap. **94**, 1-16.

**de Hoog, G. S., Marvin-Sikkema, F. D., Lahpoor, G. A., Gottschall, J. C., Prins, R. A. & Guého, E. (1994).** Ecology and physiology of *Pseudallescheria boydii*, an emerging opportunistic fungus. *Mycoses* **37**, 71-78.

**de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M. J. (2000).** *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, The Netherlands/Reus, Spain.

**Gargas, A. & Taylor, J. W. (1992).** Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rRNA from lichenized fungi. *Mycologia* **84**, 589-592.

**Gargas, A. & DePriest P. T. (1996).** A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia* **88**, 745-748.

**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.

**Guého, E. & de Hoog, G. S. (1991).** Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J mycol méd* **1**, 3-9.

**Issakainen, J., Jalava, J., Saari, J. & Campbell, C. K. (1999).** Relationship of *Scedosporium prolificans* with *Petriella* confirmed by partial LSU rDNA sequences. *Mycol Res* **103**, 1179-1184.

**Issakainen, J., Jalava, J., Hyvönen, J., Sahlberg, N., Pirnes, T. & Campbell, C. K. (2003).** Relationships of *Scopulariopsis* based on LSU rDNA sequences. *Med Mycol* **41**, 31-42.

**Kornerup, A. & Wanscher, J. H. (1984).** *Methuen Handbook of Colour*, 3rd edn. London: Erye Methuen.

**Rainer, J., de Hoog, G. S., Wedde, M., Graser, I. & Gilges, S. (2000).** Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J Clin Microbiol* **38**, 3267-3273.

**Rainer, J. & de Hoog, G. S. (2006).** Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (*Microasceae*) containing opportunistic agents on humans. *Mycol Res* **110**, 151-160.

**Swofford, D. L. (2002).** PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods), version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

**Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **4.2. ESTUDIOS DE SEXUALIDAD**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



# **Heterothallism in *Scedosporium* *apiospermum***

**Fèlix Gilgado, Josepa Gené, Josep Cano y Josep Guarro**

***Medical Mycology* (en preparación)**

## **Resumen**

Durante mucho tiempo *Scedosporium apiospermum* ha sido considerado el anamorfo de *Pseudallescheria boydii*. Sin embargo, en un estudio previo demostramos que se trataba en realidad de dos especies diferentes. Debido a que ninguna de las cepas identificadas como *S. apiospermum* han desarrollado la forma sexual, consideramos interesante determinar si se trataba de una especie heterotálica. En este estudio realizamos cruzamientos con 15 cepas de *S. apiospermum* en todas las combinaciones posibles, incluyendo cruzamientos consigo misma. Algunos cruzamientos entre distintas cepas produjeron ascomas fértiles, mientras que los cruzamientos con subcultivos de una misma cepa resultaron autoestériles. Las cepas pudieron separarse en dos diferentes "mating types". Corroboramos el bi-alelismo del sistema de cruzamiento heterotálico mediante cruzamientos entre las ascosporas de la progenie F1 de un cruzamiento positivo. Todos estos datos confirman que *S. apiospermum* es una especie heterotálica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## ABSTRACT

*Scedosporium apiospermum* was traditionally considered the anamorph of *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae, Ascomycota). However, recent molecular studies have demonstrated that they are two different species. Since none of the strains studied of the *S. apiospermum*, never developed the sexual state we considered of interest to determine if it was a heterothallic species. In this study have been tested 15 strains of *S. apiospermum* which were paired in all possible combinations, including self-pairings. All strains were self-sterile and several combinations of strains produced fertile ascomata. The strains could separate in two groups of different mating types. We corroborated the bi-allelic heterothallic mating system suggested by these results with crosses among F1 progeny ascospores from one positive mating test. All these data confirmed that *S. apiospermum* is a heterothallic species. The new species *Pseudallescheria apiospermum* is described.

## INTRODUCTION

*Pseudallescheria* is an ascomycetous genus belonging to the family Microascaceae (Arx *et al.*, 1988), whose species are usually polymorphic. They show a teleomorph (sexual state) characterized by closed ascomata (cleistothecia), and two anamorphs *Scedosporium* and *Graphium* which produce conidia from a short extension of the conidiogenous cells with annellidic development. Although not for all strains, the three forms can be found in a single culture. Currently, the genus includes 6 species, being *Pseudallescheria boydii* the most common. It is a fungus common in soil, manure, polluted water, etc., and able to cause severe infections in humans and animals, being one of the most common clinical moulds after *Aspergillus fumigatus* (Guarro *et al.*, 2006). Based on DNA sequence data of four loci, Gilgado *et al.* (2005) delineated numerous phylogenetic species in this previously apparently single morphological species. Up to recently it was thought that *S. apiospermum* was the anamorph of *P. boydii* *sensu stricto* (Guarro *et al.*, 2006; de Hoog *et al.*, 2000). However, recently the combination of morphological, physiological and molecular studies allowed to distinguish phenetically most of the phylogenetic species of the complex and demonstrated that *P. boydii* and *S. apiospermum* (clade 4) were two different species (Gilgado *et al.*, 2007). At the same

time it was demonstrated that *S. apiospermum* is the most common of the species of the complex which represented approximately half of the isolates, randomly chosen, included in the study (Gilgado et al. 2007). While the production of ascomata in routine culture media is a common characteristic among the species of the complex, this ability was not obtained in none of the 64 strains of *S. apiospermum* studied (Gilgado *et al.* 2007). This could be explained by several reasons as for instance that this species needs special conditions to develop its teleomorph or that this ability has been lost following an exclusive clonal reproduction but also by the fact that it were an heterothallic species (Taylor et al., 1999). The existence of heterothallism is not rare in Microascaceae, and in other genera such as *Microascus* which have heterothallic and homothallic species are present (Abbot and Sigler, 2001).

The aim of the current study was to investigate the hypothesis of heterothallism in the species *S. apiospermum*.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal isolates and culturing conditions.** Fifteen isolates of *S. apiospermum* were included in the study (Table 1) from which single conidial isolates were obtained. The isolates were subcultured on potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.). All mating tests were done on oatmeal agar (OA) (30 g oat flakes, 1 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g agar, 1 liter tap water).

**Matings tests.** Fifteen single-conidia *S. apiospermum* isolates were grown on PDA plates for 1 week. These isolates were paired in all combinations including self-crosses. Each pair of isolates was replicated two times. Each isolate was streaked onto one half of an oatmeal agar (OA) plate (30 g oat flakes, 1 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g agar, 1 liter tap water) opposite to other isolate streak, allowing for a central zone of contact as the isolates grew. Plates were sealed with Parafilm and incubated at 30°C, examined macroscopically each week up to 6 months for the presence of ascomata. The developed ascomata were examined for ascospores production.

Two strains that mated to produce fertile ascomata were designated as plus (FMR 8619) and minus (IHEM 14464) mating types, and eight single ascospore isolates were obtained from one ascoma of this cross. To isolate progeny from crosses, ascomata not yet

completely mature and that not yet released their ascospores were collected with sterile needles, washed with sterile water to remove conidia, and then crushed in a droplet of water. A sterile metal loop was used to collect the released ascospores and to transfer them to 50  $\mu$ l of sterile water. An aliquot of the ascospores suspension was examined under a microscope to ensure that conidia were not present. Ascospores were plated onto PDA, incubated 24 h in the dark at room temperature, and then colonies were picked under a stereo-microscope to ensure that they were derived from a single ascospore. Further crosses were made with these ascospore isolates using the procedure described above. In addition, these single ascospores progeny were backcrossed with the parental strains. Two single ascospores found to be of opposite mating type arbitrarily were designated as plus and minus. The plus and minus mating type ascospore were crossed as described above with asexual species of *Scedosporium*, as *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* and *S. prolificans* (table 1) to investigate the biological species boundaries of these.

**Table 1.** *Scedosporium* isolates selected for pairing experiments to assess mating types and interspecies fertility.

Isolate	Species	Origin
FMR 6920	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil, Barcelona, Spain
FMR 8530	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil, Deltebre, Spain
FMR 8531	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil, Deltebre, Spain
FMR 8534	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil, Montsia, Spain
FMR 8535	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil, Buenos Aires, Argentina
FMR 8522	<i>S. apiospermum</i>	Garden soil, Deltebre, Spain
FMR 8619	<i>S. apiospermum</i>	Keratitis, Sao Paulo, Brazil
FMR 8621	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis, Barcelona, Spain
FMR 8624	<i>S. apiospermum</i>	Fingernail, Barcelona, Spain
FMR 8625	<i>S. apiospermum</i>	Leukemic patient, Zaragoza, Spain
FMR 8628	<i>S. apiospermum</i>	Clinical isolate, Madrid, Spain
FMR 8725	<i>S. apiospermum</i>	Bronchial wash, Zaragoza, Spain
FMR 8833	<i>S. apiospermum</i>	Disseminated infection, Barakaldo, Spain
IHEM 14464	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis, Tours, France
IHEM 15149	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis, Giens, France
FMR 8630	<i>S. aurantiacum</i>	Ulcer of ankle, Santiago de Compostela, Spain
IHEM 15458	<i>S. aurantiacum</i>	Cystic fibrosis Giens, France
FMR 6921	<i>S. dehoogii</i>	Garden soil, Barcelona, Spain
FMR 8622	<i>S. dehoogii</i>	Foot skin, Barcelona, Spain
FMR 7249	<i>S. prolificans</i>	Clinical isolate, California, USA
FMR 7294	<i>S. prolificans</i>	Blood, Australia

Abbreviations used: FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; IHEM, The BCCM™/IHEM biomedical fungi and yeasts collection, Belgium.

**Table 2.** Schematic representation of a mating study with single conidia isolates of *Scedosporium apiospermum*.

<b>Isolate</b>	FMR 6920	FMR 8530	FMR 8531	FMR 8534	FMR 8535	FMR 8522	FMR 8619	FMR 8621	FMR 8624	FMR 8625	FMR 8628	FMR 8725	FMR 8833	IHEM 14464	IHEM 15149
FMR 6920	-														
FMR 8530	-	-													
FMR 8531	-	-	-												
FMR 8534	-	-	-	-											
FMR 8535	+	-	-	-	-										
FMR 8522	-	-	-	-	-	-									
FMR 8619	-	-	-	-	-	-	-								
FMR 8621	-	+	-	+	-	-	-	-							
FMR 8624	-	+	-	+	-	-	+	-	-						
FMR 8625	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-					
FMR 8628	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-				
FMR 8725	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
FMR 8833	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-		
IHEM 14464	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
IHEM 15149	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Symbols used: -, no ascoma formed; +, formation of ascoma with fertile ascospores.

**Morphological study.** The microscopic features of ascoma on OA were examined by direct mount in 85 % lactic. Photomicrographs were obtained under a Leitz Dialux 20 light microscope, using phase contrast and Nomarski differential interference.

## RESULTS

**Mating experiments.** The 15 isolates of *S. apiospermum* tested in this study were all self-sterile. Of a total of 120 mating tests performed, 27 were successful (table 2). All the positive crosses yielded fertile ascomata. In general ascomata were produced between one to two months, with some few exceptions that required up to 6 months. Of the 15 isolates that were mated four belonged to one mating type and seven to the other. Two strains mated with isolates of both mating types and two strains did not mate with any isolate. No interspecies positive matings were observed between *S. apiospermum* and the strains of *S. aurantiacum*, *S. dehoogi* and *S. prolificans*.

The bi-allelic heterothallic mating system suggested by these results was verified with crosses among F1 ascospores progeny. Of 8 single ascospore isolates used from one ascoma, 4 grouped in one mating type and 4 in the other, thus agreeing with a 1:1 Mendelian segregation of mating type (Table 3).

**Table 3.** Schematic representation of crosses from single ascospores of *Scedosporium apiospermum* obtained from a fertile mating (IHEM 14464 X FMR 8619).

Isolate	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
A1	-							
A2	-	-						
A3	+	+	-					
A4	-	-	+	-				
A5	+	+	-	+	-			
A6	-	-	+	-	+	-		
A7	+	+	-	+	-	+	-	
A8	+	+	-	+	-	+	-	-

Symbols used: -, no ascoma formed; +, formation of ascoma with fertile ascospores.

The morphological features of the ascomata and ascospores produced in the positive mating test were typical of the genus *Pseudallescheria*. However, apart from the size of the ascomata which is bigger in the teleomorph of *S. apiospermum*, no other character are useful for distinguishing this species from the rest, especially from *P. boydii* (Table 4). The most relevant morphological character was the size of ascomata, which was the biggest ascomata of the genus.

**Table 4.** Comparative morphological features among the different species of *Pseudallescheria*.

Species	Ascomata	Ascospores	
	diam. in $\mu\text{m}$	size in $\mu\text{m}$	shape
Teleomorph of <i>S. apiospermum</i>	140-480	7-8 x 4-5	broadly fusiform
<i>P. angusta</i>	55-110	5.5-6.5 x 3-3.5	fusiform
<i>P. boydii</i>	50-200	6-9 x 5-6	broadly fusiform
<i>P. ellipsoidea</i>	55-150	7-9 x 5-6	ellipsoidaf
<i>P. fusoida</i>	50-160	6-7 x 4-4.5	fusiform
<i>P. minutispora</i>	50-150	5-7 x 3-4	ellipsoidal

Based on these results, the new species *Pseudallescheria apiospermum* is described. It is distinguished from the other species of the genus by its bigger ascomata and heterothallism.

## Taxonomy

### ***Pseudallescheria apiospermum* AUTORS sp. nov.**

*Anamorph:* *Scedosporium apiospermum* Sacc. ex Castell. & Chalm. 1919. Manual of Tropical Medicine (London): 1122.

*Heterothallicus.* Ascomata vulgo submersa, sphaerica, fusca, non ostiolata, 140–480  $\mu\text{m}$  diam., peridium membranaceum textura epidermoidea; asci ellipsoidei, evanescentes, 8-spore, 12-15 x 10-12  $\mu\text{m}$ ; ascosporae fusiformes, stramineae, duobus poris germinationis praeditae, 7-8 x 4-5  $\mu\text{m}$ .

*Typus:* FMR XXXX colonia exsiccata ex combinatione cruce IHEM 14464 x FMR 8619.



#### 4.2. Estudios de sexualidad

The ascomata were submerged or semi-immersed, spherical or nearly so, non-ostiolate, dark brown, of 140 to 480  $\mu\text{m}$  in diameter and with membranaceous peridium of *textura epidermoidea*. The asci were ellipsoidal, evanescent, 8-spored, 12 to 15  $\mu\text{m}$  long by 10 to 13  $\mu\text{m}$  wide. The ascospores were broadly fusiform, attenuated at both ends, yellowish or straw-coloured, with two distal germ pores, and usually with oil drops and 7 to 8  $\mu\text{m}$  long by 4 to 5  $\mu\text{m}$  wide. The conidiophores were solitary (*Scedoporium*) or synnematus (*Graphium*). Solitary conidiophores were usually branched, up to 70 to 133  $\mu\text{m}$  long, with 1 to 3 conidiogenous cells at the end of each branch. The conidiogenous cells were lateral or terminal, subhyaline, smooth-walled, usually cylindrical, 6 to 80  $\mu\text{m}$  long by 1 to 2  $\mu\text{m}$  wide, producing percurrent conidia that were obovoid or ellipsoidal, 5 to 14  $\mu\text{m}$  long by 3 to 5  $\mu\text{m}$  wide. Synnematus conidiophores developed by most of the isolates were erect, 135 to 340  $\mu\text{m}$  long, with a cylindrical stipe of 7.5 to 17.5  $\mu\text{m}$  wide, and terminated in a slimy head of conidia of 60 to 100  $\mu\text{m}$  long by 80 to 170  $\mu\text{m}$  wide. The conidia were predominantly cylindrical or claviform, 5 to 13  $\mu\text{m}$  long by 2 to 4  $\mu\text{m}$  wide, with a wide truncate base. Conidia from undifferentiated hyphae were also abundantly produced. They were lateral, usually sessile, brown and thick-walled, mostly globose or subglobose, 5 to 7  $\mu\text{m}$  long by 4 to 6  $\mu\text{m}$  wide. The optimum growth temperature was 30°C, with colonies on PDA attaining a diameter up to 64 to 75 mm after 14 days. They were dense, cottony to lanose, brownish at the center, with a whitish, lobate or irregular and fimbriate margin. Maximum temperature for growth was 40°C; did not grow at 42°C. The fungus was able to assimilate sucrose and maltose, but not D-ribose (Gilgado *et al.*, 2007). Heterothallic.

## DISCUSSION

These studies confirmed that isolates of *S. apiospermum* are capable of mating in a heterothallic type system. This species in other studies (Gilgado 2005, 2007) did not produce ascomata in any of the isolates studied. This is the first account of heterothallism in the *Scedosporium* and *Pseudallescheria* spp. and is confirmed in *S. apiospermum* by absence of a sexual stage in single conidia and ascospores isolate, and by fertility between single conidia isolate pairs and single ascospore isolates. Mann (1981) performed mating trials with strains *S. apiospermum* but he did not found fertile crosses among isolates. One explanation for these results may be that he tested strains of the same species because until Gilgado *et al.* (2005, 2007) it was unknown that *P. boydii* was a complex of species.

One mating type included 6 clinical and 1 environmental isolates, whereas the other group only presented one clinical isolate, being the other 3 of environmental origin. These results suggest the possibility that the distributions of the two mating types may be different among isolates of clinical and environmental origin. Further studies are necessary to confirm these results.

The fact that two of the 15 isolates tested formed ascoma with both mating types is intriguing. Initially we suspected that these strains could be originated from more than one conidium. For this reason we realized several repetitions of the experiment using always single conidia, gave the same results. A possible explanation for these results is that these two strains are actually heterokaryons. This phenomenon has been described in some heterothallic species i.e. *Cryphonectria parasitica* (McGuire et al., 2004) and *Ceratocystis eucalypti* (Witthuhn et al. 2000). Further studies are necessary to corroborate this hypothesis. One of these could be the detection of both mating-type idiomorphs in single conidial isolates by PCR with specific primers (McGuire et al. 2004).

Historically, if the teleomorph for an asexual fungus was unknown, pairings among different isolates were done to determine the mating system but this process may be extremely difficult and is time-consuming. To overcome these obstacles, recent advancements have been made in the isolation and characterization of mating (*MAT*) genes of many heterothallic fungi (Arie et al., Bennett, Hsiang, Wallace). All heterothallic ascomycetes have a mating type (*MAT*) locus that determines compatibility between opposite fungal strains. Opposite strains have alternate alleles, either *MAT1-1* or *MAT1-2*, which are also termed idiomorphs. Arie et al. (1997) established a PCR approach to isolate *MAT* genes from ascomycetes by amplifying high mobility group (HMG) proteins encoded by the *MAT1-2* idiomorph. This PCR assay allows detect and sequence the *MAT1-2* idiomorph, and obtaining the complete sequence of this idiomorph. This approach was attempted in our study with opposite mating type isolates of *P. apiospermum* without success. The selected primer pairs may not have been specific for our isolates, or the thermocycler conditions were less than optimal, or both. A dependable PCR-based assay for determination of mating types would be a beneficial tool for understanding the population structure of *P. apiospermum*.

## REFERENCES

**Abbott SP, Sigler L** (2001) Heterothallism in the Microasceae demonstrated by three species in the *Scopulariopsis brevicaulis* series. *Mycologia* 93: 1211-1220.

**Arie, T., Christiansen, S. K., Yoder, O. C., and Turgeon, B. G.** 1997. Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG box. *Fungal Genet. Biol.* 21:118-130.

**Blakeslee, A. F.** 1904. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 40:205–319.

**Bennett, R. S., Yun, S. H., Lee, T. Y., Turgeon, B. G., Arseniuk, E., Cunfer, B. M., and Bergstrom, G. C.** 2003. Identity and conservation of mating type genes in geographically diverse isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. *Fungal Genet. Biol.* 40:25-37.

**de Hoog, G. S., F. D. Marvin-Sikkema, G. A. Lahpoor, J. C. Gottschall, R. A. Prins, and E. Guého.** 1993. Ecology and physiology of *Pseudallescheria boydii*, an emerging opportunistic fungus. *Mycoses* 37:71-78.

**de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and University Rovira i Virgili, Reus, Spain.

**Gilgado F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43:4930-4942.

**Gilgado F., J. Cano, J. Gené, D. A. Sutton, and J. Guarro.** 2007. Phenotypic characterization of phylogenetic species of the *Pseudallescheria boydii* complex.

**Guarro, J., A. S. Kantarcioglu, R. Horre, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, J. Berenguer, and S. de Hoog.** 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* **44**:295-327.

**Hsiang, T., Chen, F., and Goodwin, P. H.** 2003. Detection and phylogenetic analysis of mating type genes of *Ophiosphaerella korrae*. *Can. J. Bot.* 81:307-315.

**Kueß, U., and L. A. Casselton.** 1992. The origin of multiple mating types in mushrooms. *J. Cell Sci.* **104**:227–230.

**Mann VM.** 1981. **Taxonomy of *Petriellidium*** [MSc Thesis]. Edmonton, Alberta: Univ. Alberta. 210 p.

**McGuire IC, Marra RE, Milgroom MG** (2004). Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol* **41**: 521-533.

**von Arx, J. A., M. J. Figueras, and J. Guarro.** 1988. Sordariaceous ascomycetes without ascospore ejaculation. *Beihefte Nova Hedwigia* **94**:1–104.

**Taylor, J. W., Jacobson, D. J., and Fisher, M. C.** 1999. The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 197–246.

**Wallace, M. M., and Covert, S. F.** 2000. Molecular mating type assay for *Fusarium circinatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5506- 5508.

**Witthuhn RC, Harrington TC, Wingfield BD, Steimel JP, Wingfield MJ** (2000) Deletion of MAT-2 mating type gene during unidirectional mating-type switching in *Ceratocystis*. *Curr Genet* 38:48-52

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **4.3. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

# Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex

Fèlix Gilgado, Carolina Serena, Josep Cano, Josepa Gené y Josep Guarro

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:4211-4213

## Resumen

En este estudio hemos determinado la sensibilidad antifúngica de 84 aislados pertenecientes a las 8 especies que constituyen el complejo *Pseudallescheria boydii*. Se han evaluado un total de 11 antifúngicos mediante la técnica de microdilución. Encontramos diferencias significativas entre las especies, siendo *Scedosporium aurantiacum* la más resistente. En general, el voriconazol fue el antifúngico más activo, seguido del posaconazol.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



## ABSTRACT

**Eighty-four isolates belonging to 8 species that constitute the *Pseudallescheria boydii* complex were tested against eleven antifungal agents, using the microdilution method. There were significant differences among the species, *Scedosporium aurantiacum* being the most resistant. In general, voriconazole was the most active drug, followed by posaconazole.**

In the last few decades *Pseudallescheria boydii* sensu lato has been emerging as an important human pathogen, particularly in the immunocompromised host (8). Optimal treatment for these infections is unknown and the mortality rate is very high despite aggressive antifungal treatment (8). It has been repeatedly demonstrated that *P. boydii* sensu lato has low in vitro (6) and in vivo (3, 4, 9) susceptibility to traditional antifungal drugs. However, the new triazoles such as voriconazole (VRC), ravuconazole (RVC) and posaconazole (PSC) have showed some in vitro activity against this fungus (5). VRC has also showed efficacy, both in animal models (3, 4) and in the clinical setting (1, 13). However, not all the strains of *P. boydii* tested responded equally to VRC. For instance, Capilla *et al.* (3) demonstrated that one strain that showed a VRC MIC of 0.5-1 µg/ml was susceptible to this drug in a guinea pig model while another strain with a VRC MIC of 8 µg/ml was resistant. Similarly, some human infections have responded to treatment with this drug (1) and others not (15). This could be explained by the fact that *P. boydii* does not represent a single species, instead it is a complex comprising at least six known species (*P. boydii*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, *Pseudallescheria fusoides*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium aurantiacum*) and two cryptic species, represented by the clades 3 and 4 of Gilgado *et al.* (7). Since the antifungal susceptibility of these species is unknown, we have evaluated the in vitro activity of 11 drugs against strains representing all them.

Eighty-four isolates were tested (Table 1). The isolates were stored on potato dextrose agar plates (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) covered with paraffin oil, subcultured on PDA and incubated at 30°C for 5 to 6 days. *Candida krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were included as quality controls. Antifungal agents were obtained as pure powders. AMB (USP, Rockville, MD), itraconazole (ITC) and ketoconazole (KTC)

**Table 1.** Activity of conventional and new antifungal drugs against 84 isolates belonging to species of the *P. boydii* complex.

Fungus (n° isolates tested)	MIC (µg/ml)	AMB	FLC	ITC	VRC	RVC	PSC	ABC	MFG	TBF	KTZ
<i>S. aurantiacum</i> (7)	Range	16->16	16-64	2->16	0.5->16	4->16	1->16	4->16	>32	>16	1-4
	GM <sup>a</sup>	28.98	32	19.5	1.48	9.75	3.62	5.38	>32	>16	2.2
	50% <sup>b</sup>	>16	32	>16	1	8	2	4	>32	>16	2
	90% <sup>c</sup>	>16	64	>16	>16	>16	>16	>16	>32	>16	4
<i>P. minutispora</i> (4)	Range	2->16	4-64	1-8	0.12-1	0.5-4	0.12-1	0.5-4	>32	>16	0.12-1
	GM	8	20.15	2.37	0.41	2	0.49	1.68	>32	>16	0.39
	50%	4	32	2	0.5	2	1	2	>32	>16	0.5
	90%	>16	64	8	1	4	1	4	>32	>16	1
Clade 3 <sup>d</sup> (5)	Range	4->16	4-64	1->16	0.25-1	2-16	0.5-1	0.5-8	>32	>16	1
	GM	18.37	16	9.18	0.5	8	0.87	2.29	>32	>16	1
	50%	>16	32	>16	0.5	16	1	2	>32	>16	1
	90%	>16	32	>16	1	16	1	8	>32	>16	1
Clade 4 <sup>d</sup> (26)	Range	1->16	2->64	0.5->16	0.12-2	0.25-8	0.5-2	0.5-8	32-64	>16	0.25-2
	GM	4.33	19.80	1.89	0.48	2.54	0.87	2.34	60.67	>16	0.56
	50%	4	16	2	0.5	4	1	2	>32	>16	0.5
	90%	8	64	>16	1	8	1	8	>32	>16	1
<i>P. boydii</i> (30)	Range	2->16	0.5->64	0.5->16	0.5-2	0.5-16	0.12-1	0.25-8	1-64	>16	0.12-2
	GM	16.87	16.46	2.41	0.68	3.11	0.66	2.28	29.34	>16	0.53
	50%	>16	16	1	0.5	2	0.5	2	>32	>16	0.5
	90%	>16	64	>16	1	4	1	4	>32	>16	1
<i>P. angusta</i> (4)	Range	16->16	32-64	1->16	0.5-1	4-8	1-2	2-4	8-64	>16	1-2
	GM	26.9	40.31	6.72	0.7	5.65	1.58	3.36	32	>16	1.58
	50%	>16	32	8	0.5	4	2	4	>32	>16	2
	90%	>16	64	>16	1	8	2	4	>32	>16	2
<i>P. fusioidea</i> (2)	Range	>16	64	2->16	0.5	2-8	2	2-4	>32	16-32	1-2
	GM	>16	64	8	0.5	4	2	2.82	>32	22.62	1.41
	50%	>16	64	2	0.5	2	2	2	>32	16	2

<b>Fungus (n° isolates tested)</b>	<b>MIC (µg/ml)</b>	<b>AMB</b>	<b>FLC</b>	<b>ITC</b>	<b>VRC</b>	<b>RVC</b>	<b>PSC</b>	<b>ABC</b>	<b>MFG</b>	<b>TBF</b>	<b>KTZ</b>
<i>P. ellipsoidea</i> (6)	Range	2->16	2-64	0.5->16	0.5-1	0.5->16	0.25-2	0.5-8	0.5-64	2-32	0.12-1
	GM	14.25	10.55	1.74	0.56	2.82	0.57	1.78	16	20.15	0.41
	50%	>16	16	1	0.5	0.5	0.5	1	>32	>16	0.25
	90%	>16	64	>16	1	>16	2	8	>32	>16	1
Total (84)	Range	2->16	0.5->64	0.5->16	0.12->16	0.25->16	0.12->16	0.25->16	0.5-64	2-32	0.12-4
	GM	11,31	19.29	3,1	0,61	3,44	0,89	2,46	43,18	29,59	0.70
	50%	16	32	2	0.5	2	1	4	>32	>16	1
	90%	>16	64	>16	1	16	2	8	>32	>16	2

<sup>a</sup> GM, geometric mean; <sup>b</sup> 50%, MIC at which 50% of the isolates were inhibited; <sup>c</sup> 90%, MIC at which 90% of the isolates were inhibited; <sup>d</sup> Gilgado *et al.* (7)

(Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), albaconazole (ABC) (J. Uriach & Cía, Barcelona, Spain), VRC (Pfizer Inc., Madrid, Spain), PSC (Schering-Plough Ltd, Hertfordshire, UK), RVC (Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ) and terbinafine (TBF) (Novartis, Basel, Switzerland) were diluted in dimethyl sulfoxide (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain), and micafungin (MFG) (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd; Osaka, Japan), 5FC (Sigma- Aldrich corp., St. Louis, U.S.A.) and FLC (Pfizer Inc., Madrid, Spain) in sterile distilled water. Microplates were prepared as described in the document M38-A (11). Final drug concentrations ranged from 32 to 0.06 µg/ml for MFG, from 64 to 0.12 µg/ml for FLC and 5FC, and from 16 to 0.03 µg/ml for the other drugs. The microplates were incubated at 35°C and read at 48 h. The MIC endpoint for the triazoles and AMB was defined as the lowest concentration that produced complete inhibition of growth, and for FLC, KTC, 5FC and MFG as the lowest concentration that produced 50% growth inhibition. Approximately 80% of the tests were repeated, and they showed the same tendency (data not shown). However, when they did not coincide, the test was repeated and a modal MIC of the three values was considered.

Results are shown in Table 1. VRC was the most active drug showing a total geometric mean (GM) MICs of 0.61 µg/ml. *S. aurantiacum* was the most resistant species to this drug (GM MIC of 1.48 µg/ml). PSC was the second most active drug with a total GM MIC value of 0.89 µg/ml, although this drug was not active against species such as *S. aurantiacum* (GM MIC= 3.62 µg/ml) and *P. fusoidea* (GM MIC = 2 µg/ml). The activity of PSC was more variable than VRC and depended on the species tested.

AMB was not active against any of the isolates tested, but important differences were noticed between the MICs for the two species more commonly involved in human infections (7, F. Gilgado, J. Cano, J. Gené, and J. Guarro, abstr 16<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, abstr. P-0750, 2006). Thus, against the isolates of clade 4 this drug showed a GM MIC of 4.33 whereas against *P. boydii* it was 14.92 µg/ml. 5FC MICs were always >64 µg/ml.

In some works (5, 17) drugs like ITC and RVC showed good in vitro activity, but in our study they were poor against most of the strains tested. This could be explained by the fact that we have tested a greater number of isolates than previous studies. The poor activity of ITC agrees with the failure of this drug to resolve some clinical cases (9, 13). The treatment of *Pseudallescheria* infections is often challenging and complex. This study confirms VRC as the recommended treatment for scedosporiosis (8, 12) since it is the drug that

showed the lowest MIC against the eight species tested. PSC has also shown good activity but there is little clinical experience with this drug. Therapy with this drug resolved completely a brain abscess in a leukaemia patient (10). Since MFG showed a poor activity against all the species tested in our study, candins, in general, would be expected to have low activity against *Pseudallescheria* species. However, Yustes and Guarro (18) demonstrated that the combination of MFG with AMB has potential for the treatment of scedosporiosis.

Application of the genealogical concordance phylogenetic species recognition, which is an operational method based in the analysis of multi-gene sequences, in numerous pathogenic fungi (16), revealed the existence of numerous cryptic species. As in the *P. boydii* complex, several phylogenetic species with different antifungal susceptibility have been recognized in other important pathogenic fungi such as *Candida albicans* (14) or *Aspergillus fumigatus* (2).

In conclusion, this study demonstrates that proper identification of the species of the *P. boydii* complex involved in a given infection could be important for appropriate treatment. For instance, if the species causing the infection is *S. aurantiacum* it is likely that the response to the treatment with VRC would be poorer than if the species was *P. boydii*.

## REFERENCES

1. **Apostolova, L. G., E. K. Jonson, and J. P. Adams.** 2005. Disseminated *Pseudallescheria boydii* infection successfully treated with voriconazole. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. **76**:1741-1742.
2. **Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle, and K. A. Marr.** 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot. Cell **4**:625–632.
3. **Capilla, J., and J. Guarro.** 2004. Correlation between in vitro susceptibility of *Scedosporium apiospermum* to voriconazole and in vivo outcome of Scedosporiosis in guinea pigs. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:4009-4011.

4. **Capilla, J., C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, and J. Guarro.** 2003. Efficacy of voriconazole in the treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3976-8.
5. **Carrillo, A. J. and J. Guarro.** 2001. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2151-2153.
6. **Cuenca-Estrella, M., B. Ruiz-Diez, J. V. Martinez-Suarez, A. Monzon, and J. L. Rodríguez-Tudela.** 1999. Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:149-151.
7. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4930-4942.
8. **Guarro, J., A. S. Kantarcioglu, R. Horre, J. L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, J. Berenguer, and S. de Hoog.** 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* **44**:295-327.
9. **Kowacs, P. A., C. E. Soares-Silvado, S. Monteiro, M. Ramos, K. Abrao, L. E. Madaloso, R. L. Pinheiro, and L. C. Werneck.** 2006. Infection of the CNS by *Scedosporium apiospermum* after near drowning. Report of a fatal case and analysis of its confounding factors. *J. Clin. Pathol.* **57**:205-7.
10. **Mellinghoff, I. K., D. J. Winston, G. Mukwaya, and G. J. Schiller.** 2002. Treatment of *Scedosporium apiospermum* brain abscesses with posaconazole. *Clin. Infect. Dis.* **34**:1648-1650.
11. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

12. **Pfaller, M. A. P. G. Pappas, and J. R. Wingard.** 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* **43**:S3-14.
13. **Porte, L., L. El Hajj, S. Cassaing, A. Berry, P. Massip, M. D. Linas, J. F. Magnaval, N. Sans, and B. Marchou.** 2005. *Scedosporium apiospermum* mycetoma with bone involvement successfully treated with voriconazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**:891-4.
14. **Pujol, C., M. A. Pfaller, and D. R. Soll.** 2004. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:262–266.
15. **Symoens, F., C. Knoop, M. Schrooyen, O. Denis, M. Estenne, N. Nolard, and F. Jacobs.** 2006. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **25**:603-607.
16. **Taylor, J. W., D. J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett, and M. C. Fisher.** 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **31**:21–32.
17. **Walsh, T. J., J. Peter, D. A. MCGough, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, and P. A. Pizzo.** 1995. Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1361-1364.
18. **Yustes, C. and J. Guarro.** 2005. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3498-3500.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **4.4. ESTUDIOS DE VIRULENCIA**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

# Differences in virulence among the species of the *Pseudallescheria boydii* complex

Fèlix Gilgado, Carolina Serena, Josep Cano, Josepa Gené y Josep Guarro

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (En preparación)

## Resumen

Mediante este estudio pretendíamos comparar la virulencia de 10 aislados pertenecientes a 5 especies del complejo *Pseudallescheria boydii* (*P. boydii*, *P. minutispora*, *Scedosporium aurantiacum*, *S. apiospermum* y *S. dehoogii*), en un modelo murino con animales inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Se seleccionaron 2 inóculos diferentes,  $5 \times 10^4$  conidia/mL (para los animales inmunosuprimidos) y  $1 \times 10^6$  conidia/mL (para los animales inmunocompetentes). *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* fueron significativamente las especies más virulentas, causando la muerte del 80% y 70% de los ratones inmunocompetentes, respectivamente, mientras que el resto de las especies sólo consiguió entre un 0% y un 20% de mortalidad.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## ABSTRACT

**A murine model with immunocompetents and immunosuppressed animals was used in a comparative study of experimental pathogenicity of 10 isolates belonging to the five most frequent species of *Pseudallescheria boydii* species complex (*P. boydii*, *P. minutispora*, *Scedosporium aurantiacum*, *S. apiospermum* and *S. dehoogii*). We used two different inocula, i.e.,  $5 \times 10^4$  conidia/ml (for immunosuppressed animals) and  $1 \times 10^6$  conidia/ml (for immunocompetents animals), for each fungal strain tested. *S. aurantiacum* and *S. dehoogii* were significantly the most virulent species; these species caused the death of 80% and 70% of mice, respectively, versus 0%-20% for the other species in immunocompetents mice.**

## INTRODUCTION

*Pseudallescheria boydii* sensu lato is a significant opportunistic fungi that in the last years has become recognized as a potent etiologic agent of severe infections in immunocompromised and occasionally also in immunocompetent patients (Guarro et al. 2006). Based on DNA sequence data of four loci, Gilgado et al. (2005) delineated numerous phylogenetic species in this previously apparently single morphological species. These lineages were collectively called the *Pseudallescheria boydii* species complex. The possible different virulence of these species is unknown yet.

This study describes an experimental murine model to compare the pathogenicity of the five most frequent species of the *Pseudallescheria boydii* species complex.

## MATERIALS AND METHODS

**Organisms.** Ten strains represented the species *Pseudallescheria boydii*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium dehogii* and *Scedosporium aurantiacum* were used in the study (Table 1). Clinical isolates were provided by different reference culture collections and also by many physicians involved in fungal infections management and environmental isolates were isolated from soil. The strains were cultured on potato dextrose agar (PDA) for 7–10 days at 30°C. The inocula were prepared by flooding the

surface of the agar plate with sterile saline, scraping the sporulating mycelium with a culture loop, and drawing up the resultant suspension with a sterile Pasteur pipette. The suspensions were then filtered once through sterile gauze to remove hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum size with a hemocytometer and verified by plating dilutions of the suspensions on PDA plates.

**Table 1.** Isolates of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* spp. included in the study and their origins.

Strain	Species	Origin
FMR 8630	<i>S. aurantiacum</i>	Ulcer of ankle, Santiago de Compostela, Spain
IHEM 15458	<i>S. aurantiacum</i>	Cystic fibrosis, Giens, Francia
FMR 8619	<i>S. apiospermum</i>	Keratitis, Sao Paulo, Brazil
IHEM 14464	<i>S. apiospermum</i>	Cystic fibrosis, Tours, France
FMR 6921	<i>S. dehoogii</i>	Garden soil, Barcelona, Spain
FMR 8532	<i>S. dehoogii</i>	Cultivated soil, Montsia, Spain
FMR 6694	<i>P. boydii</i>	Cerebral abscess, Barcelona, Spain
FMR 8627	<i>P. boydii</i>	Clinical, Madrid, Spain
FMR 4072	<i>P. minutispora</i>	River sediment, Tordera River, Spain
RKI 866/94	<i>P. minutispora</i>	Sputum, Berlin, Germany

FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; IHEM, The BCCM™/IHEM biomedical fungi and yeasts collection, Belgium; RKI, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany.

**Animals.** Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. The animals were housed in standard boxes with corncob bedding and had free access to food and water. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare Committee.

**Infection.** We proved two inoculum size,  $5 \times 10^4$  conidia/ml and  $1 \times 10^6$  conidia/ml, for each fungal strain. For the first inoculum the mice were immunosuppressed by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratorios Funk S. A., Barcelona, Spain) per kg of body weight plus a single intravenous injection of 150 mg of 5-fluorouracil (Fluoro-uracil; Productos Roche S. A., Madrid, Spain) per kg 1 day before infection. In the case of inoculum of  $1 \times 10^6$  conidia/ml the mice were immunocompetents.

Inoculum suspensions (0.2 ml of  $5 \times 10^4$  conidia/ml or  $1 \times 10^6$  conidia/ml) of each fungal strain were injected intravenously via the lateral tail vein in groups of 10 mice. Mortality was recorded daily for 30 days.

**Statistical analysis.** Mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan–Meier method and compared among groups by the log-rank test.

## RESULTS

The two fungal inoculum used in this work were chosen in a preliminary experiment which compared the mortality rate caused by several inocula of the strain FMR 8630 of *S. aurantiacum* ranging from  $1 \times 10^8$  to  $1 \times 10^6$  conidia/ml for immunocompetents mice and  $1 \times 10^7$  to  $5 \times 10^4$  conidia/ml for immunosuppressed mice. The inoculum choose for immunocompetents and for immunosuppressed mice were  $1 \times 10^6$  and  $5 \times 10^4$  conidia/ml, respectively.

**Table 2.** Survival of immunosuppressed and immunocompetent mice infected with isolates of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* spp.

Species	Strain	Imunosupressed		Imunocompetent	
		MST <sup>a</sup> (95 % CI <sup>b</sup> )	Mortality (%)	MST <sup>a</sup> (95 % CI <sup>b</sup> )	Mortality (%)
<i>S. aurantiacum</i>	IHEM 15458, FMR 8630	5.36 (5.06-5.66) <sup>c</sup>	100	10.45 (4.63-16.28) <sup>c</sup>	80
<i>S. dehoogii</i>	FMR 8532, FMR 6921	5.5 (5.06-5.93) <sup>c</sup>	100	17.40 (11.15-23.64) <sup>c</sup>	70
<i>P. boydii</i>	FMR 8627, FMR 6694	11.20 (6.43-15.97) <sup>d</sup>	100	28.00 (25.52-30.47) <sup>f</sup>	20
<i>P. minutispora</i>	FMR 8610, FMR 4072	16.20 (9.19-23.20) <sup>e</sup>	60	30.00 (30.00-30.00) <sup>g</sup>	0
<i>S. apiospermum</i>	IHEM 14464, FMR 8619	6.50 (5.77-7.23) <sup>f</sup>	100	25.8 (20.47-31.12) <sup>f</sup>	20

<sup>a</sup> MST, median survival time in days.

<sup>b</sup> CI, confidence interval.

<sup>c</sup> P < 0.05 versus *P. boydii*, *P. minutispora* and *S. apiospermum*.

<sup>d</sup> P < 0.05 versus *S. aurantiacum* and *S. dehoogii*.

<sup>e</sup> P < 0.05 versus *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* and *S. apiospermum*.

<sup>f</sup> P < 0.05 versus *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* and *P. minutispora*.

<sup>g</sup> P < 0.05 versus the other species.

#### 4.4. Estudios de virulencia

Table 2 summarize the results obtained from inoculating immunosuppressed and immunocompetent mice with the five species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* spp. *S. aurantiacum* and *S. dehoogii* were significantly the most virulent species; these species caused the death of 80% and 70%, respectively, of immunocompetent animals within the study period. The other three species caused a significantly lower degree of mortality varying from 0 to 20% of the animals tested.

The two strains of *P. minutispora* tested were significantly less virulent in immunosuppressed and immunocompetent mice than those of the rest of species tested. These strains did not cause the death of any immunocompetent animal and only the 60% of mortality in immunosuppressed animals, while the rest of species produced a 100% of mortality in immunosuppressed mice.

## DISCUSSION

Although in this study, only a few strains have been compared because of the complexity of testing many animals, the results seem to demonstrate that the new species described recently, *S. aurantiacum* and *S. dehoogii*, are the most virulent of the previously denominated *Pseudallescheria boydii* species complex (Gilgado et al., 2005).

Ortoneda et al. (2002) used a murine model of disseminated infection to compare the virulence of several strains of *Scedosporium prolificans*. In this study were included two strains of *S. apiospermum* of clinical origin and proved that these strains were clearly less virulent than the strain of *S. prolificans*. Actually we know that these two strains of *S. apiospermum* are strains of *P. boydii*. In our study *P. boydii* showed a less virulence than *S. aurantiacum* and *S. dehoogii*, and probably the virulence of the former species are more similar to *S. prolificans* than to the other *Scedosporium* and *Pseudallescheria* spp. Further studies including strains of *S. prolificans* were needed to verify this hypothesis.

In recent years *Pseudallescheria* and *Scedosporium* infections have been increasing markedly, mainly in patients with haematological malignancies (Tapia et al., 1994) or solid organ transplantation (Tamm et al. 2001; Castiglioni et al., 2002; Talbot et al. 2002; Campagnaro et al. 2002). Other invasive diseases caused by *S. apiospermum* also have been described as after haematopoietic stem cell transplantation (Safdar et al. 2002), in conjunction with chronic corticosteroid therapy (Muñoz et al. 2000), and in patients with HIV infection (Yao and Messner, 2001; Eckburg et al. 1999), nephritic syndrome (Ichikawa et al.,



1997), or chronic granulomatous disease (Gompels et al., 2002; Jabado et al., 1998) among others. Invasive mycoses after near-drowning have been classically related to this fungus (Ruchel and Wilichowski, 1995). Until Gilgado *et al.* (2005, 2007) *P. boydii*/*S. apiospermum* was considered a single species. All the infections that involved *Pseudallescheria boydii* were associated with this single species. With the delimitation of *P. boydii* in different species is necessary to know the degree of involvement of each individual species in human infections. Recently the antifungal susceptibility of all these species was realized, showing significant differences among the species, with *Scedosporium aurantiacum* being the most resistant (Gilgado et al., 2006).

In conclusion, the results of this study revealed the existence of significant differences in the virulence between species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* studied. In addition, the results also suggest that *S. aurantiacum* could be an important opportunistic pathogen and so the necessity of the proper identification of this species in the clinical laboratory.

## REFERENCES

- Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S.** 2002. *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. **81**: 333–48.
- Campagnaro EL, Woodside KJ, Early MG et al.** 2002. Disseminated *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) infection in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis*. **4**: 207–11.
- Eckburg PB, Zolopa AR, Montoya JG.** 1999. Invasive fungal sinusitis due to *Scedosporium apiospermum* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 212–13.
- Gilgado F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.

#### 4.4. Estudios de virulencia

**Gilgado, F., C. Serena, J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:4211-4213.

**Gilgado F., J. Cano, J. Gené, D. A. Sutton, and J. Guarro.** 2007. Phenotypic characterization of phylogenetic species of the *Pseudallescheria boydii* complex.

**Gompels MM, Bethune CA, Jackson G, Spickett GP.** 2002. *Scedosporium apiospermum* in chronic granulomatous disease treated with an HLA matched bone marrow transplant. *J Clin Pathol* **55**: 784–6.

**Guarro, J., A. S. Kantarcioglu, R. Horre, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca- Estrella, J. Berenguer, and S. de Hoog.** 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* **44**:295–327.

**Ichikawa T, Saiki M, Tokunaga S, Saida T.** 1997. *Scedosporium apiospermum* skin infection in a patient with nephrotic syndrome. *Acta Derm Venereol* **77**: 172–3.

**Jabado N, Casanova JL, Haddad E et al.** 1998. Invasive pulmonary infection due to *Scedosporium apiospermum* in two children with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* . **27**: 1437–41.

**Muñoz P, Marin M, Tornero P, Martin Rabadan P, Rodriguez-Creixems M, Bouza E.** 2000. Successful outcome of *Scedosporium apiospermum* disseminated infection treated with voriconazole in a patient receiving corticosteroid therapy. *Clin Infect Dis.* **31**: 1499–501.

**Ortoneda, M., F. J. Pastor, E. Mayayo, and J. Guarro.** 2002. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **51**:924-928.

**Ruchel R, Wilichowski E.** 1995. Cerebral *Pseudallescheria* mycosis after near-drowning. *Mycoses.* **38**: 473–5.

**Safdar A, Papadopoulos EB, Young JW.** 2002. Breakthrough *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) brain abscess during therapy for invasive pulmonary aspergillosis following high-risk allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Recent Adv Antifungal Ther Transpl Infect Dis.* **4:** 212–17.

**Talbot TR, Hatcher J, Davis SF, Pierson RN 3rd, Barton R, Dummer S.** 2002. *Scedosporium apiospermum* pneumonia and sternal wound infection in a heart transplant recipient. *Transplantation* **74:** 1645–7.

**Tamm M, Malouf M, Glanville A.** 2001. Pulmonary scedosporium infection following lung transplantation. *Transpl Infect Dis;* **3:** 189–94.

**Tapia M, Richard C, Baro J et al.** 1994 *Scedosporium inflatum* infection in immunocompromised haematological patients. *Br J Haematol;* **87:** 212–4.

**Yao M, Messner AH.** 2001. Fungal malignant otitis externa due to *Scedosporium apiospermum*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **110:** 377–80.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **5. DISCUSIÓN GENERAL**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **5.1. Taxonomía: filogenia, morfología y fisiología en *Pseudallescheria* y hongos relacionados**

Tal y como se indicó en la introducción, a raíz de los estudios realizados por von Arx y col. (1988) el género *Pseudallescheria* quedó constituido por las siguientes especies: *P. africana*, *P. angusta*, *P. boydii*, *P. desertorum*, *P. ellipsoidea*, *P. fimeti* y *P. fusioidea* pudiéndose distinguir todas ellas en mayor o menor grado por el tamaño del ascoma y de sus ascosporas. Sin embargo, en un estudio molecular reciente, Rainer y col. (2000) concluyeron que *P. angusta*, *P. ellipsoidea*, *P. fusioidea* y *P. boydii* eran especies genéticamente muy similares y que deberían considerarse sinónimas de la última, *P. boydii*.

*P. boydii* es la especie más frecuente de *Pseudallescheria* y también la de mayor interés por su cada vez más elevada implicación en clínica, siendo capaz de causar infecciones de pronóstico grave, difíciles de resolver y con una elevada mortalidad (de Hoog y col., 2000). Su importancia clínica y las dificultades que presenta su diagnóstico probablemente derivado de la variabilidad fenotípica indicada al principio (ver apartado 1.2.3.3.) son las razones principales que nos impulsaron a escoger a dicha especie como objeto de estudio de la presente tesis.

En numerosos trabajos se ha demostrado que *P. boydii* no sólo presenta variabilidad fenotípica (Gordon, M. A., 1957; Cazin y col., 1964; de Hoog y col., 1994) sino también variabilidad genética (Rainer y col., 2000; Williamson y col., 2001; Defontaine y col., 2002). Por ello, nuestro primer objetivo fue intentar dilucidar, sobre una base genética, si *P. boydii* era una especie bien delimitada, o bien comprendía a más de una especie. Para ello realizamos un estudio molecular basado en la secuenciación del ADN de 4 loci para determinar las relaciones filogenéticas entre numerosas cepas identificadas morfológicamente como *P. boydii*, tanto ambientales como clínicas, así como de diferentes orígenes geográficos. Para llevar a cabo este estudio incluimos además las cepas tipos de las diferentes especies de *Pseudallescheria* y las 3 que Rainer y col. (2000) consideraron sinónimas de *P. boydii*. Los loci que escogimos eran aquellos que ya habían sido utilizados por otros autores en estudios taxonómicos similares, tales como ITS,  $\beta$ -tubulina y calmodulina. La información que nos aportaron los 4 loci analizados fue importante y muy similar, demostrando que eran buenos marcadores filogenéticos para las especies de *Pseudallescheria* y hongos relacionados. Sin embargo el gen de la  $\beta$ -tubulina (región TUB) fue el que nos proporcionó una mayor

información. Mediante el análisis de estos loci pudimos separar 5 grupos (clados) de forma clara dentro de *P. boydii*. Los clados 1 y 2 fueron los que se presentaban más claramente separados genéticamente, siendo a su vez los que recibieron un mayor soporte estadístico en todos los árboles filogenéticos generados. El estudio morfológico corroboró los datos filogenéticos y dichos clados fueron propuestos como nuevas especies, que fueron denominadas *S. aurantiacum* (clado 1), que estaba representada por cuatro aislados de origen clínico, y *P. minutispora* (clado 2), representada por dos aislados ambientales. El clado 5 incluyó a las 4 cepas tipo representantes de las especies *P. angusta*, *P. boydii*, *P. ellipsoidea* y *P. fusioidea*. El estudio permitió confirmar que todas estas especies constituyen grupos genéticamente diferentes de *P. boydii* y podían considerarse como especies filogenéticas en base al criterio de concordancia genealógica propuesto por Avise y Ball (1990). Los caracteres morfológicos que observamos en los aislados de *P. angusta*, *P. ellipsoidea*, y *P. fusioidea* fueron consistentes con las características morfológicas descritas previamente por von Arx y col. (1988). Sin embargo, los aislados que se agrupaban con la cepa tipo de *P. boydii* (CBS 101.22) presentaban unas ascosporas más largas (6-9 x 5-6  $\mu\text{m}$ ) que las descritas previamente por von Arx y col. (1988) (6-7 x 3.5-4  $\mu\text{m}$ ). Por tanto no podían ser considerada estas especies como sinónimas de *P. boydii* como habían propuesto Rainer y col. (2000). En este primer estudio los clados 3 y 4 no pudieron ser diferenciados a nivel morfológico pese a la diferencias filogenéticas que observamos entre ellos. El clado 4 era el que incluía a un mayor número de cepas.

Hasta este trabajo, *P. boydii* había sido considerada como la única especie patógena del género *Pseudallescheria* (de Hoog y col., 2000), pero en nuestro estudio multilocus pudimos demostrar que otras especies filogenéticas del complejo *P. boydii* también incluían aislados de origen clínico. Es interesante destacar el hecho de encontrar aislados clínicos causantes de infecciones diseminadas pertenecientes a la especie *P. ellipsoidea*. Hasta la fecha existían pocas cepas pertenecientes a esta especie, y ninguna de ellas había sido asociada con casos clínicos.

La utilización del medio DRBC con benomilo al 0.01% como medio selectivo para el aislamiento de *P. boydii* ha aportado resultados interesantes. El medio DRBC había sido descrito originalmente por King y col. (1979) para el recuento y el aislamiento de hongos en alimentos. Dicho medio pensamos que podía ser útil para el aislamiento de hongos de suelo, ya que la mezcla de dicloran y rosa de bengala inhibe el desarrollo de muchos hongos de crecimiento rápido, facilitando el aislamiento de muchos hongos debido al reducido diámetro



de todas las colonias que se desarrollan. Mientras muchas especies de hongos no crecen en presencia del fungicida benomilo, las especies de *Pseudallescheria* y *Scedosporium* son resistentes a la acción de dicho compuesto (Summerbell, 1993). Por lo tanto, añadiendo este fungicida en concentraciones que permitían el desarrollo de varias cepas de *P. boydii* que ensayamos, pudimos disponer de un medio selectivo que nos permitió aislar un elevado número de nuevas cepas ambientales provenientes de suelos de regiones geográficas diferentes.

El siguiente estudio consistió en ensayar un elevado número de marcadores fisiológicos, con el objetivo de intentar caracterizar fenotípicamente las especies filogenéticas detectadas en el estudio de secuenciación multilocus. Con la finalidad de incrementar el número de miembros de los diferentes clados incluimos en el estudio un mayor número de cepas de diferente origen (n=141) muchas de ellas aisladas a partir del medio indicado anteriormente. Incluimos también todas las cepas tipo disponibles de las especies que habían sido sinonimizadas con *P. boydii* o *S. apiospermum*. Para este nuevo estudio, sólo se secuenció la región TUB del gen de la  $\beta$ -tubulina, ya que fue la que nos aportó una mayor información filogenética en el estudio anterior. Este incremento en el número de cepas estudiadas nos permitió aumentar el tamaño de los clados y con excepción del clado 3, todos ellos incluían ahora aislados de origen clínico (estudio 4.1.2.). Ello parece indicar que cualquier cepa de origen ambiental tiene el potencial para causar infecciones en el hombre en condiciones apropiadas. En un estudio anterior con *S. prolificans*, especie cercana a *P. boydii*, Ortoneda y col. (2002), usando un modelo animal de infección invasiva por dicha especie, demostraron que no existían diferencias en la virulencia entre cepas ambientales y clínicas ni entre aquellas que habían causado infección invasiva o que se habían comportado como meramente colonizadoras. También cabe destacar que el clado 4 englobaba a la mayoría de aislados de origen clínico, a la vez que incluía al mayor número de cepas del complejo. Los resultados del presente estudio permitieron confirmar la utilidad de la región TUB como marcador molecular para la distinción de las especies filogenéticas del complejo, ya que la topología del árbol filogenético obtenido a grandes rasgos era muy parecida a la del árbol obtenido con el análisis combinado de los 4 marcadores previamente ensayados. El hecho de poder utilizar un único marcador para poder definir todas las especies existentes en el complejo de *P. boydii* permitirá un reconocimiento más fácil de las mismas. En base a los resultados morfológicos y fisiológicos obtenidos pudimos definir al clado 3 como una nueva especie que fue descrita y propuesta como *Scedosporium dehoogii*. También nos permitió

detectar caracteres fisiológicos útiles para la diferenciación de las dos especies descritas en el anterior trabajo, *S. aurantiacum* y *P. minutispora*. En el caso del clado 4 encontramos marcadores fisiológicos capaces de diferenciar esta especie del resto, con la excepción de la nueva especie *S. dehoogii*. Sin embargo, *S. dehoogii* se puede separar del clado 4 por caracteres morfológicos, así como el crecimiento a 40°C. Un aspecto interesante relacionado con los miembros del clado 4 fue el hecho de que estos sólo presentaban el anamorfo *S. apiospermum*, en algunos casos combinado con el sinanamorfo *Graphium* sp. En el árbol filogenético dentro de este clado se situó una cepa de referencia de *Monosporium apiospermum*, especie que había sido sinonimizada con *P. boydii*. Este epíteto específico debe considerarse prioritario desde el punto de vista nomenclatural debido a que fue descrito en 1911 por Saccardo, y no en cambio el nombre *Monosporium* pues éste había sido considerado nombre ilegítimo pues ya existía para un basidiomiceto (Hughes, 1958). Decidimos así denominar a este clado como *Scedosporium apiospermum*. Pero debido a que la cepa tipo de esta especie se había perdido nosotros propusimos a la cepa CBS 225.32 como neotipo. La denominación del clado 4 como *S. apiospermum* podía traer confusiones nomenclaturales, especialmente en clínica, por el hecho de separar a *P. boydii* de *S. apiospermum* ya que, hasta nuestro trabajo, *S. apiospermum* era considerado el anamorfo de *P. boydii*. Por ello decidimos proponer un nuevo nombre para el anamorfo de *P. boydii*. Como esta especie fue originalmente descrita como *Cephalosporium boydii* por Shear en 1922 y más tarde paso a ser redefinida como *Scedosporium*, decidimos realizar la nueva combinación *Scedosporium boydii* para el anamorfo de *P. boydii*.

Como sospechábamos inicialmente, mediante el estudio molecular y fenotípico se pudo demostrar que *P. boydii* no representaba una única especie (ver Anexo 2), sino que en realidad bajo este nombre se incluyen un elevado número de especies filogenéticas, alguna de las cuales han podido ser descritas como nuevas especies en los diferentes trabajos derivados de la presente tesis (Gilgado y col., 2005; estudio 4.1.2.).

Nuestros estudios también confirmaron resultados de anteriores trabajos como los de Issakainen y col. (1999, 2003) y Rainer y col. (2000) que demostraban que las especies *P. africana* y *P. fimeti* se hallaban muy distanciadas a nivel genético del complejo *P. boydii*. Pudimos constatar que *P. africana* estaba claramente separada del resto de especies de *Pseudallescheria* en el análisis de todos los genes ensayados y que se hallaba relativamente próxima al género *Petriella*. Estos datos fueron corroborados a nivel morfológico ya que observamos que dicho hongo presentaba características intermedias entre *Petriella* y

*Pseudallescheria*, por lo que se propuso un género nuevo y la nueva combinación *Petriellopsis africana*. En el caso de *P. fimeti* ya McGinnis y col. (1982) habían indicado que era la única especie del género que no producía los anamorfos típicos del mismo. Por nuestra parte estudiando las secuencias de la región ITS comprobamos que esta especie era la más lejana a nivel genético de todas las especies que componen el género *Pseudallescheria*. Mediante un estudio morfológico detallado vimos que esta especie mostraba caracteres propios del género *Lophotrichus* (von Arx y col., 1988), que pertenece también a la familia Microascaceae. El posterior estudio filogenético en base al gen 18S del ADNr nos confirmó dicha relación y propusimos la nueva combinación *Lophotrichus fimeti*.

Como hemos destacado anteriormente, el uso del medio selectivo DRBC con benomilo nos permitió la obtención de un amplio número de cepas ambientales de *P. boydii*. Gracias al trabajo de búsqueda de nuevas cepas en suelos de todo el mundo pudimos encontrar en muestras de Argentina un hongo peculiar que en principio parecía mostrar las características del género *Scedosporium*, aunque un estudio morfológico más detallado nos permitió observar que el sistema de conidiogénesis de tipo simpodial era diferente y único dentro de la familia Microascaceae (von Arx y col., 1988). El análisis filogenético nos demostró que este nuevo hongo era genéticamente diferente de las especies conocidas de los géneros *Pseudallescheria*, *Petriella* y *Scedosporium*. En base a este aislamiento se propuso el nuevo género *Parascedosporium*, nombre que destaca la proximidad morfológica de éste con el género *Scedosporium*. Este nuevo hallazgo pone de manifiesto que probablemente todavía quedan muchos taxones por descubrir dentro de este complejo grupo de hongos y que el disponer de este medio de cultivo selectivo puede ser de gran ayuda en su búsqueda en hábitats todavía no explorados.

## 5.2. Estudios de sexualidad

En los trabajos anteriores pudimos comprobar que todas las cepas incluidas en las especies *P. angusta*, *P. ellipsoidea* y *P. fuosidea* solían formar el teleomorfo cuando crecían en un medio axénico y que, por tanto, siguiendo el criterio clásico, a estas especies se las podría considerar homotáticas, tal y como se había hecho para *P. boydii* (de Hoog y col., 1994). Sin embargo, no todas las cepas de *P. boydii* tenían la capacidad de formar ascomas, hecho que ya había sido apuntado en anteriores trabajos (de Hoog y col., 1994; Gilgado y col., 2005;

Rainer y de Hoog, 2006). Lo nos llamó más la atención en nuestro estudio fue el hecho de que en los árboles filogenéticos aparecían clados con cepas exclusivamente anamórficas. Estos clados correspondieron a las especies *S. apiospermum*, que incluía un elevado número de cepas, y *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*, ambos constituidos por relativamente pocas cepas. Ello nos llevó a suponer que estas tres especies podrían ser heterotálicas, pero para comprobarlo era necesario hacer estudios de cruzamiento entre las cepas o bien secuenciar los posibles idiomorfos de los genes MATs de las mismas.

De entre las cepas de *S. apiospermum* escogimos sólo 15 para llevar a cabo un volumen asequible de trabajo dada la gran cantidad de cepas pertenecientes al grupo. Se escogieron cepas que intentaban representar la variabilidad intraespecífica observada en esta especie en el estudio multilocus. Paralelamente ensayamos todas las cepas identificadas como *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*. De los cruzamientos de las cepas de estas dos últimas especies no obtuvimos la forma teleomórfica en ningún caso, por lo que deberíamos esperar reunir más cepas para poder confirmar si son especies que han perdido su capacidad de reproducirse sexualmente o bien si son heterotálicas. Sin embargo, de los cruzamientos entre las cepas de *S. apiospermum* sí obtuvimos resultados positivos. Del total de cruzamientos realizados en 27 se desarrolló el teleomorfo, confirmando que se trataba de una especie heterotálica. El nombre que propusimos al teleomorfo fue *Pseudallescheria apiospermum* y comprobamos que se distinguía del resto de especies de *Pseudallescheria* principalmente por el mayor tamaño de sus ascomas.

Mediante este estudio hemos podido aplicar el concepto biológico de especie (Taylor y col., 2000) en *S. apiospermum*, demostrando así que esta especie puede ser diagnosticada tanto desde un punto de vista filogenético (Gilgado y col., 2005), fenotípico (estudio 4.1.2.) así como biológico. Este último concepto es el más aceptado por la comunidad científica, especialmente los zoólogos, ya que es el que más se aproxima a la realidad de especie, pero en el caso de los hongos la aplicación del mismo no es siempre posible pues se estima que aproximadamente el 20% de ellos son asexuales y no producen meiosporas (Reynolds, 1993). Además, muchos de ellos son homotálicos, como pasa en *P. boydii sensu stricto*, por lo que no es necesario cruzar cepas compatibles para la producción de meiosporas. En nuestro caso, los estudios filogenéticos nos han permitido delimitar de forma precisa a la especie *S. apiospermum* y separarla de *P. boydii* de la que se creía que era su anamorfo, y así mediante los estudios de cruzamiento confirmar que se trata de una especie heterotálica, con una estrategia de reproducción sexual inédita hasta la fecha en otras especies del género.

### 5.3. Sensibilidad antifúngica

Las infecciones provocadas por *Pseudallescheria* spp. son de difícil tratamiento debido a la resistencia que presentan a casi todos los antifúngicos disponibles (Guarro y col., 2006). El objetivo de nuestro estudio era averiguar si las diferentes especies filogenéticas encontradas en *P. boydii* presentaban diferente respuesta a los antifúngicos como ya había sido mostrado para otras especies filogenéticas de *Candida albicans* (Pujol y col., 2003) y *Aspergillus fumigatus* (Balajee y col., 2004).

Pudimos demostrar que el VRC, antifúngico recomendado en la escedosporiosis (Guarro y col., 2006; Pfaller y col., 2006), era el más activo *in vitro* en todas las especies ensayadas. El PSC fue el segundo en actividad y especialmente frente a especies como *P. boydii*, *P. minutispora*, *P. ellipsoidea* y *S. dehoogii*, pudiendo ser para las infecciones producidas por estas especies un tratamiento alternativo en aquellos casos en que la terapia con VRC falle. El KTC también mostró ser eficaz en gran parte de las especies probadas, pero su uso como antifúngico tópico limita su utilización en clínica.

Es de destacar también que antifúngicos como el ITC y el RVC, que se habían apuntado como posibles terapias gracias a los buenos resultados mostrados *in vitro* en algunos trabajos (Walsh y col., 1995; Carrillo y Guarro, 2001), en nuestro estudio mostraron una actividad baja, presentando una considerable variabilidad intraespecífica. En el caso del ITC esta baja actividad concuerda con los malos resultados recientes obtenidos en algunos casos clínicos (Kowacs y col., 2006; Porte y col., 2006).

A nivel general, podemos concluir que la especie que mostró una mayor resistencia a todos los fármacos ensayados fue *S. aurantiacum*; presentó en todos los casos las mayores CMI, siendo sólo el VRC activo frente a alguna de las cepas ensayadas.

### 5.4. Estudios de virulencia

Mediante este estudio pretendíamos determinar si existían diferencias en la virulencia entre algunas de las especies más habituales del complejo de *P. boydii*. Numerosos estudios de virulencia en modelos animales habían demostrado que existían diferencias en la virulencia entre especies próximas que pertenecían a un mismo género (Mayayo y col., 1999; Ortoneda y col., 2002; Pujol y col., 2002). Fueron estos estudios los que nos sirvieron de base para

## Discusión general

nuestro trabajo. Para ello desarrollamos un modelo de infección diseminada con una cepa de *S. aurantiacum* que fue reproducible tanto en animales inmunocompetentes como en animales que habían sido inmunosuprimidos con una combinación de 5-fluorouracilo y ciclofosfamida. Estos modelos de infección fueron probados con 2 cepas de cada una de las siguientes especies: *P. boydii*, *P. minutispora*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*.

Este estudio puso de manifiesto que *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* eran las especies que presentaban una mayor virulencia en el modelo animal. Esta virulencia podía ser comparada con la de la especie próxima *S. prolificans*, más virulenta que *P. boydii* como había sido demostrado por Cano y col. (1992) y Ortoneda y col. (2002).

Este último trabajo demuestra la importancia de la correcta identificación de todas las especies del complejo. Hemos visto como la nueva especie *S. aurantiacum* ha demostrado ser la especie más resistente a los antifúngicos ensayados así como la más virulenta en un modelo animal, por lo que es muy importante la correcta identificación de esta especie en infecciones humanas. Es de esperar que todos los marcadores, tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular, descritos en la presente Tesis sirvan de ayuda en este objetivo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **6. CONCLUSIONES**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007



1. Se ha llevado a cabo un estudio filogenético basado en el análisis de las secuencias de fragmentos de los genes de la  $\beta$ -tubulina, la calmodulina y las regiones ITS del ADNr que ha permitido demostrar que *Pseudallescheria boydii* es un complejo de especies crípticas.
2. El gen de la  $\beta$ -tubulina ha demostrado ser, de todos los ensayados, el marcador molecular que aporta una mayor información filogenética.
3. Las especies *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea* y *Pseudallescheria fusioidea* han sido revaluadas, definiéndose las características morfológicas y genéticas que las diferencian de *P. boydii*.
4. En base a un estudio polifásico que ha incluido la secuenciación multilocus y un detallado estudio fisiológico y morfológico, se han propuesto las siguientes nuevas especies para la ciencia: *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium aurantiacum* y *Scedosporium dehoogii*.
5. Se ha demostrado que *Pseudallescheria boydii* y *Scedosporium apiospermum*, anteriormente consideradas como el teleomorfo y anamorfo de una misma especie, son dos especies diferentes.
6. *Scedosporium apiospermum* ha demostrado ser una especie heterotálica, estrategia reproductiva no observada hasta ahora en ninguna especie del género *Pseudallescheria*. Ello ha permitido proponer el nuevo teleomorfo *Pseudallescheria apiospermum*.
7. Se propone la exclusión de la especie *Pseudallescheria africana* del género *Pseudallescheria*, y su inclusión en el nuevo género *Petriellopsis*, proponiéndose la nueva combinación: *Petriellopsis africana*.
8. La especie *Pseudallescheria fimeti* ha sido transferida al género *Lophotrichus*, y propuesto la nueva combinación: *Lophotrichus fimeti*.

9. Se propone el nuevo género *Parascedosporium* y la nueva combinación:  
*Parascedosporium tectonae*.
  
10. *Scedosporium aurantiacum* ha demostrado ser la especie más resistente *in vitro* a los antifúngicos dentro del complejo *P. boydii*.
  
11. *Scedosporium aurantiacum* y *Scedosporium dehoogii* han demostrado ser en un modelo murino las especies más virulentas del complejo *P. boydii*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

- Aanen DK, Kuyper TW, Mes THM, Hoekstra RF.** 2000. The evolution of reproductive isolation in the ectomycorrhizal *Hebeloma crustuliniforme* aggregate (Basidiomycetes) in northwestern Europe: a phylogenetic approach. *Evolution* 54:1192-1206.
- Anderson TF.** 1953. Techniques for the preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for electron microscope. *Tr. N. York Acad. Sc.* 13:130-134.
- Armin AR, Reddy VB, Orfei E.** 1987. Fungal endocarditis caused by *Pseudallescheria (Petriellidium) boydii* in an intravenous drug abuser. *Tex. Heart Inst. J.* 14:321-324.
- Awise JC, Ball RM.** 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Pp. 45-67. En: *Oxford surveys in evolutionary biology* (Futuyma D and Antonovics J, eds.), Oxford Univ. Press, Oxford. United Kingdom.
- Ayala FJ, Rzhetsky A, Ayala FJ.** 1998. Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:606-611.
- Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA.** 2004. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1197-1203
- Baldauf SL, Palmer JD.** 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: Congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11558-11562.
- Bartlet AA, Burstyn HP.** 1975. A review of the physics of critical point drying. *Proceedings of the 8th Annual IITRI-SEM Symposium 1*, pp.305-316, Chicago.
- Baum DA, Shaw KL.** 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Pp. 289-303. En: *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* (Hoch PC and Stephenson AG, eds.), Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO.

- Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, Roberts JM, Hightower AW, Bens MS, Freeman AR, Lee S, Stringer JR, Duchin JS, del Rio C, Rimland D, Baughman RP, Levy DA, Dietz VJ, Simon P, Navin TR.** 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 6:265-272.
- Bell RG.** 1978. Comparative virulence and immunodiffusion analysis of *Petriellidium* (Shear) Malloch strains isolated from feedlot manure and a human mycetome. *Can. J. Microbiol.* **24**:856-863.
- Berbee ML, Taylor JW.** 1999. Fungal phylogeny. Pp. 21-77. En: *Molecular Fungal Biology* (Oliver RP and Schweizer M, eds.), Cambridge University Press. United Kingdom
- Berbee ML, Taylor JW.** 2001. Fungal Molecular Evolution: Gene Trees and Geologic Time. Pp. 229-245. En: *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* (McLaughlin DJ, McLaughlin E, eds.), Volume VII, Springer. New York.
- Besl H, Bresinsky A.** 1997. Chemosystematics of Suillaceae and Gomphidiaceae (suborder Suillineae). *Plant Syst. Evol.* 206:223-242.
- Blakeslee AF.** 1904. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 40:205-319.
- Blanz P, Buzina W, Ginter G, Gräser Y.** (2000). Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. *Mycoses* 43:suppl. 1:11-19.
- Boldo XM, Villa-Tanaca L, Zúñiga G, Hernández-Rodríguez C.** 2003. Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and Multilocus enzyme electrophoresis Analyses. *J. Clin. Microbiol.* 41:4799-4804.

**Bruns TD, White TJ, Taylor JW.** 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22:525-564.

**Bruns TD, Vilgalys R, Barns SM, Gonzalez D, Hibbett DS, Lane DJ, Simon L, Stickel S, Szaro TM, Weisburg WG, Sogin ML.** 1992. Evolutionary relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1:231-241.

**Butler DK, Metzberg RL.** 1989. Premeiotic change of nucleolus organizer site in *Neurospora*. *Genetics* 122:783-791.

**Campbell R.** 1972. Ultrastructure of conidium ontogeny in the deuteromycete fungus *Stachybotrys atra* Corda. *New phytologist* 71:1143-1149.

**Capilla J, Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Guarro J.** 2004. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4009-4011.

**Carpenter JM.** 1992. Random cladistics. *Cladistics* 8:174-153.

**Carrillo AJ, Guarro J.** 2001. *In vitro* activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:2151-2153.

**Carroll FE, Carroll GC.** 1973. Senescence and death of conidiogenous cell in *Stemphylium botryosum* Wallroth. *Arch. Microbiol.* 94:109-124.

**Castellani A, Chalmers AJ.** 1919. Manual of tropical medicine, 3rd ed. William, Wood and Co., New York.

**Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S.** 2002. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*) infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine* 81:333-348.

- Cazin J, Decker DW.** 1964. Carbohydrate nutrition and sporulation of *Allescheria boydii*. *J. Bacteriol.* 88:1624-1628.
- Cimon B, Carrere J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP.** 2000. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19:53-56.
- Cisar CR, TeBeest DO.** 1999. Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. *Curr. Genet.* 35:127-133.
- Conway-Morris SC.** 2000. Evolution: bringing molecules into the fold. *Cell* 100: 1-11.
- Coppin E, Debuchy R, Arnaise S, Picard M.** 1997. Mating-types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:411-428.
- Costantin MJ.** 1893. *Eurotiopsis*, nouveau genre d'ascomycètes. *Bull. Soc. Bot. France* 40:236-238.
- Couch BC, Kohn LM.** 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94:683-693.
- Cracraft J.** 1983. Species concepts and speciation analysis. Pp.159-187. En: *Current Ornithology* (Johnston RF, ed.), Vol. 1, Plenum Press. New York.
- Craven KD, Hsiao PTW, Leuchtmann A, Hollin W, Schardl CL.** 2001. Multigene phylogeny of *Epichloë* species, fungal symbionts of grasses. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 88: 14-34.
- Cruse, M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW.** 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-822.



- Cuenca-Estrella M, Ruiz-Diez B, Martinez-Suarez JV, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL.** 1999. Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:149–51.
- Cunningham C.** 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* 14:733-740.
- Cunningham R, Mitchell DC.** 1996. Amphotericin B responsive *Scedosporium apiospermum* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. *J. Clin. Pathol.* 49:93-94.
- de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E.** 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 37:71-78.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ.** 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Utrech, The Netherlands; Reus, Spain.
- 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.
- Dodge BO.** 1920. The life history of *Ascobolus magnificus*. *Mycologia* 12:115-134.
- Doern GV, Tubert TA, Chopin K, Rinaldi MG.** 1986. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 24:507-511.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH.** 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, Inc., New York.

- Dykstra MJ, Salkin IF, McGinnis MR.** 1989. An ultrastructural comparison of conidiogenesis in *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium inflatum* and *Scopulariopsis brumptii*. *Mycologia* 81:896-904.
- Echlin P, Kaye G.** 1979. Thin films for high electron microscopy and X-ray microanalysis. *Scan. Electron. Microsc.* 2:21-30.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, Van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U.** 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J. Clin. Microbiol.* 35:1353-1360.
- Ellis D.** 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 7–10.
- Emmons CW.** 1944. *Allescheria boydii* and *Monosporium apiospermum*. *Mycologia* 36:188-193.
- Espinel-Ingroff A, Shadomy S.** 1989. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:352-361.
- Espinel-Ingroff A.** 1994. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev. Esp. Quimioter.* 7:20-31.
- Espinel-Ingroff A.** 1998. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 36:2950-2956.
- Farris JS.** 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. Pp. 277-302. En: *Advances in Cladistics* (Platnick NI and Funk VA, eds.), Columbia University Press. New York.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AC, Bult C.** 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.* 44:570–572.

- Farris JS, Albert VA, Källersjo M, Lipscomb D, Kluge AG.** 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein J.** 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Sys. Zool.* 27: 401-410.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Figueras MJ, Guarro J.** 1988. A scanning electron microscopic study of ascoma development in *Chaetomium malaysiense*. *Mycologia* 80:298–306.
- Frisvad JC, Filtenborg O.** 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Pp. 373-384. En: *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification* (Samson RA and Pitt JI eds.), Plenum Press, New York.
- Gargas A, Taylor JW.** 1992. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rRNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84:589-592.
- Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW.** 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:388–393.
- Gené J, Guillamón JM, Guarro J, Pujol I, Ulfing K.** 1996. *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterization and antifungal susceptibility. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 70:49-57.
- Gerrits van den Ende AHG, de Hoog GS.** 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Stud. Mycol.* 43:151-162.
- 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.

- Glass NL, Metzenberg RL, Raju NB.** 1990. Homothallic Sordariaceae from nature: the absence of strains containing only the *a* mating-type sequence. *Exp. Mycol.* 14:274-289.
- Glass NL, Donaldson GC.** 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330.
- Glass NL, Staben C.** 1997. *Neurospora* mating type symbol *mt* is revised to *mat*. *Fungal Genet. Newsl.* 44:64.
- Gleason JM, Griffith EC, Powell JR.** 1998. A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: Conflicts between species concepts? *Evolution* 52:1093-1103.
- González GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Rinaldi MG, Loebenberg D, Graybill JR.** 2003. Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: in vitro and in vivo assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1436-1438.
- Gonzalez IL, Chambers C, Gorski JL, Stambolian D, Schmickel RD, Sylvester JE.** 1990. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *J. Mol. Biol.* 212:27-35.
- Gordon, MA.** 1957. Nutrition and sporulation of *Allescheria boydii*. *J. Bacteriol.* 73:199-205.
- Gräser Y, Kühnisch J, Presber W.** 1999. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* 37:3713-3717.
- Graur D, Li WH.** 2000. Fundamentals of molecular evolution (2nd edition). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM.** 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:454-500.

- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Berenguer J, de Hoog S.** 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* 44:295-327.
- Guého E, de Hoog GS.** 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J. Mycol. Med.* 118: 3-9.
- Gwynne-Vaughan HCI, Williamson HS.** 1932. The cytology and development of *Ascobolus magnificus*. *Ann. Bot.* 46:653-670.
- Hanlin RT.** 1982. Conidiogenesis in *Spinifer meineckellus*. *Mycologia* 74:236-241.
- Harrington TC, Pashenova NV, McNew DL, Steimel J, Konstantinov MY.** 2002. Species delimitation and host specialization of *Ceratocystis laricicola* and *C. polonica* to larch and spruce. *Plant Dis.* 86:418-422.
- Henrion B, Chevalier G, Martin F.** 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98:37-43.
- Hewitt GM.** 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Mol. Ecol.* 10:537-549.
- Hibbett DS, Fukumasanakai Y, Tsuneda A, Donoghue MJ.** 1995. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87:618-638.
- Hillis DM, Dixon MT.** 1991. Ribosomal DNA — molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66:410-453.
- Hilton H, Hey J.** 1997. A multilocus view of speciation in the *Drosophila virilis* species group reveals complex histories and taxonomic conflicts. *Genet. Res.* 70:185–194.
- Hironaga M, Watanabe S.** 1980. Anellated conidiogenous cells in *Petriellidium boydii* (*Scedosporium apiospermum*). *Sabouraudia* 18:261-268.

**Hoffman HL, Rathbun RC.** 2002. Review of the safety and efficacy of voriconazole. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11:409-29.

**Huelsenbeck JP.** 1997. Is the Felsenstein zone a fly trap? *Syst. Biol.* 46:69-74.

**Huelsenbeck JP, Crandall KA.** 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:437-466.

**Huelsenbeck JP, Ronquist R, Nielsen R, Bollback JP.** 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science* 294:2310-2314.

**Huelsenbeck JP, Bollback JP.** 2001. En: *Handbook of Statistical genetics* (Bishop M, ed.), Wiley. London.

**Hughes SJ.** 1958. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Can. J. Bot.* 36:727-836.

**Issakainen J, Jalava J, Eerola E, Campbell CK.** 1997. Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences. *J. Med. Vet. Mycol.* 35:389-398.

**Issakainen J, Jalava J, Saari J, Campbell CK.** 1999. Relationship of *Scedosporium prolificans* with *Petriella* confirmed by partial LSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 103:1179-1184.

**Issakainen J, Jalava J, Hyvönen J, Sahlberg N, Pirnes T, Campbell CK.** 2003. Relationships of *Scopulariopsis* based on LSU rDNA sequences. *Med. Mycol.* 41:31-42.

**Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME.** 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol.* 40:87-109.

**Jabado N, Casanova JL, Haddad E, Dulieu F, Fournet JC, Dupont B, Fischer A, Hennequin C, Blanche S.** 1998. Invasive pulmonary infection due to *Scedosporium apiospermum* in two children with chronic granulomatous disease. *Clin. Infect. Dis.* 27:1437-41.

**Jackson JC, Barton RC, Evans EGV.** 1999. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J. Clin. Microbiol.* 37:931-936.

**James P, Vorherr T, Carafoli E.** 1995. Calmodulin-binding domains: just two-faced or multifaceted. *Trends Biochem. Sci.* 20:38-42.

**Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH.** 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:693-715.

**Jong SN, Lévesque CA, Verkley GJM, Abeln ECA, Rahe JE, Braun PG.** 2001. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the  $\beta$ -tubulin gene. *Mycol. Res.* 105:658-669.

**Joseph N, Krauskopf E, Vera MI, Michot B.** 1999. Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Res.* 27:4533-4540.

**Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A.** 1998. Differentiation of *Microsporium* species by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses* 41:229-233.

**Karsten PA.** 1889. Fungi novi Brasilienses. *Rev. Mycologique* 11:206.

**Kasuga T, Taylor JW, White TJ.** 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 37:653-663.

- Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD.** 2000 Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17:23-31.
- Kimura M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- King AD Jr, Hocking AD, Pitt JI.** 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:959-964.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA.** 2001. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 9th edn. CAB International, Wallingford.
- Kishino H, Hasegawa M.** 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequences data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29:170-179.
- Kornerup A, Wanscher JH.** 1984. *Methuen Handbook of Colour*, 3rd edn. Erye Methuen. London.
- Kothe E.** 2001. Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:602-612.
- Koufopanou V, Burt A, Taylor JW.** 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5478-5482.
- Kowacs PA, Soares-Silvado CE, Monteiro S, Ramos M, Abrao K, Madaloso LE, Pinheiro RL, Werneck LC.** 2006. Infection of the CNS by *Scedosporium apiospermum* after near drowning. Report of a fatal case and analysis of its confounding factors. *J. Clin. Pathol.* 57:205-207.
- Kroken S, Taylor JW.** 2001. A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* 93:38-53.



**Kumar S, Tamura K, Nei M.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.

**Kurtzman CP.** 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* 10:1727-1740.

**Lemerle E, Bastien M, Demolliens-Dreux G, Forest JL, Boyer E, Chabasse D, Célérier P.** 1998. Cutaneous *Scedosporium* infection revealed by bullous-necrotic purpura. *Ann. Dermatol. Venereol.* 125: 711-14.

**Liu YF, Zhao XD, Ma CL, Li CX, Zhang TS, Liao WJ.** 1997. Cutaneous infection by *Scedosporium apiospermum* and its successful treatment with itraconazole. *Clin. Exp. Dermatol.* 22:198–200.

**Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP.** 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100:1107-1111.

**Maley LE, Marshall CR.** 1998. The coming of age of molecular systematics. *Science* 279:505-506.

**Malloch D.** 1970. New concepts in the Microascaceae illustrated by two new species. *Mycologia* 62:727–740.

**Mayayo E, Pujol I, Guarro J.** 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.* 48:363-366.

**Mayr E.** 1942. Systematics and the origin of species. Columbia Univ. Press. New York.

**McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L.** 1982. *Pseudallescheria* Negroni et Fischer, 1943 and its later synonym *Petriellidium* Malloch, 1970. *Mycotaxon* 14: 97.

**McGinnis MR, Rinaldi MG.** 1991. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. Pp. 176-211. En:

*Antibiotic in Laboratory Medicine*. 3rd ed. (Lorian V. ed.), The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

**Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, Rodriquez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE.**

2002. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:62-68.

**Mellinghoff IK, Winston DJ, Mukwaya G, Schiller GJ.** 2002. Treatment of *Scedosporium*

*apiospermum* brain abscesses with posaconazole. *Clin. Infect. Dis.* 34:1648-50.

**Metzenberg RL, Glass NL.** 1990. Mating and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays*

12:53-59.

**Moritz C, Hillis DM.** 1996. Molecular systematics: context and controversies. Pp. 1-13. En:

*Molecular Systematics*, 2nd ed. (Moritz C, Hillis DM and Mable BK, eds.), Sinauer Associates, Sunderland.

**Muñoz P, Marin M, Tornero P, Martin Rabadan P, Rodriguez-Creixems M, Bouza E.**

2000. Successful outcome of *Scedosporium apiospermum* disseminated infection treated with voriconazole in a patient receiving corticosteroid therapy. *Clin. Infect. Dis.* 31:1499-501.

**National Committee for Clinical and Laboratory Standards.** 2002a. M27-A2. Reference

method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS. Wayne, Pennsylvania, USA.

**National Committee for Clinical and Laboratory Standards.** 2002b. M38-A. Reference

method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. NCCLS. Wayne, Pennsylvania, USA.

**Negróni P, Fisher I.** 1944. *Pseudallescheria sheari* n. gen., n. sp. aislada de un

paramicetoma de la rodilla. *Rev. Inst. Bacteriol.* 12:195-204.

- Nesky MA, McDougal EC, Peacock JE Jr.** 2000. *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. *Clin. Infect. Dis.* 31:673-677.
- Nikoh N, Hayase N, Iwabe N, Kuma K, Miyata T.** 1994. Phylogenetic relationships of the kingdoms Animalia, Plantae and Fungi, inferred from 23 different protein species. *Mol. Biol. Evol.* 11:762-768.
- Nixon KC, Carpenter JM.** 1994. On outgroups. *Cladistics* 9:413-426.
- Nomdedeu J, Brunet S, Martino R, Altes A, Ausina V, Domingo-Albos A.** 1993. Successful treatment of pneumonia due to *Scedosporium apiospermum* with itraconazole: case report. *Clin. Infect. Dis.*; 16:731-733.
- Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L.** 2004. In vitro activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1912-1915.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg, HI.** 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.
- O'Donnell K.** 2000a. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919-938.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH.** 2000b. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:7905-7910.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E.** 2000c. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.

- Okada G, Seifert KA, Takematsu A, Yamaoka Y, Miyazaki S, Tubaki K.** 1998. A molecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. *Can. J. Bot.* 76:1495-1506.
- Ortoneda M, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J.** 2002. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol.* 51:924–928.
- Ortoneda M.** 2003. Fongs oportunistes: avaluació de la patogènia i la sensibilitat als antifúngics. Tesis Doctoral. URV. Tarragona.
- Palade GE.** 1952. A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95:285.
- Perkins DD.** 1999. *Neurospora* genetic nomenclature. *Fungal Genet. Newslett.* 46:34-41.
- Pfaller MA, Rinaldi MG.** 1992. In vitro testing of susceptibility of fluconazole. En: *The antifungal agents. Fluconazole* (Powderly WB and Vant Wout JW, eds.) Marius Press. Lancashire. United Kingdom.
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR.** 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* 43:S3–S14.
- Piper JP, Golden J, Brown D, Broestler J.** 1990. Successful treatment of *Scedosporium apiospermum* suppurative arthritis with itraconazole. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:674-675.
- Pitt JI.** 1979. *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces.* Academic Press, London.
- Pöggeler S.** 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:589–601.

- Porte L, El Hajj L, Cassaing S, Berry A, Massip P, Linas MD, Magnaval JF, Sans N, Marchou B.** 2006. *Scedosporium apiospermum* mycetoma with bone involvement successfully treated with voriconazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100:891–894.
- Pujol I, Aguilar C, Ortoneda M, Pastor J, Mayayo E, Guarro J.** 2002. Experimental pathogenicity of three opportunist *Paecilomyces* species in a murine model. *J. Mycol. Med.* 12:86–89.
- Pujol C, Pfaller MA, Soll DR.** 2003. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic glade of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:262-266.
- Quirk JT, Kupinsky JM.** 2002. Interespecific mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia* 94:1078-1086.
- Rainer J, de Hoog GS, Wedde M, Gräser Y, Gilges S.** 2000. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* 38:3267-3273.
- Rasmussen CD, Means RL, Lu KP, May GS, Means AR.** 1990. Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 265:13767-13775.
- Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN.** 1993. Antifungal susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:367-381.
- Reynolds DR.** 1993. The fungal holomorph: An overview. Pp. 15-25. En: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (Reynolds DR and Taylor JW, eds.), CAB International, Wallingford. United Kingdom.
- Rosing WC.** 1982. Ultrastructure of ascus and ascospore development in *Chaetomium brasiliense*. *Mycologia* 76:67-73.

- Ruiz-Trillo I.** 2002. Acels i nemertodermàtides: bilaterals basals o Plathelminths? Aproximació multigènica a l'origen dels metazous bilaterals. Tesis Doctoral. UB. Barcelona.
- Sabatini DD, Bensch K, Barnetti RJ.** 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cell ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17:19.
- Saccardo PA.** 1886. *Sylloge Fungorum.* 4:611.
- Saccardo PA, Sidow P.** 1899. *Sylloge Fungorum* 14: 464.
- Saccardo PA.** 1911. Notae mycologicae [Mycological notes]. *Annls. Mycol.* 9:249-257.
- Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sampaio JP, Weiß M, Gadanho M, Bauer R.** 2002. New taxa in the Tremellales: *Bulleribasidium oberjochense* gen. et sp. nov., *Papiliotrema bandonii* gen. et sp. nov. and *Fibulobasidium murrhardtense* sp. nov. *Mycologia.* 94:873-887.
- Schmidt H, Niessen L, Vogel RF.** 2004. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*-evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *Int. J. Food Microbiol.* 95:297-304.
- Schoch CL, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ.** 2001. Phylogeny of *Calonectria* based on b-tubulin DNA sequence comparisons. *Mycol. Res.* 105:1045-1052.
- Shadomy S, Espinel-Ingroff A, Cartwright RY.** 1991. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. Pp. 1173-1183. En: *Manual of Clinical Microbiology* (Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ eds.). American Society for Microbiology. Washington DC.

**Shear CL.** 1922. Life history of an undescribed ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. *Mycologia* 14:239-243.

**Shear CL, Dodge BO.** 1927. Life histories and heterothallism of the red bread mould fungi of the *Monilia sitipholia* group. *J. Agric. Res.* 34:1019-1042.

**Shimodaira H, Hasegawa M.** 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1114-1116.

**Soll DR.** 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:332-370.

**Steinbach WJ, Perfect JR.** 2003. *Scedosporium* species infections and treatments. *J. Chemother.* 15:16-27.

**Summerbell RC.** 1993. The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology. *J. Clin. Microbiol.* 31:572-577.

**Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM.** 1996. Phylogenetic Inference. Pp. 407-514. En: *Molecular systematics* (Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds.). Sinauer Associates, Sunderland.

**Swofford DL.** 2001. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

**Takagi T, Nemoto T, Konishi K, Yazawa M, Yagi K.** 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:377-381.

**Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V.** 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:126-146.

**Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC.**

2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31:21-32.

**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.

**Treadway LP, White JF Jr, Gaut BS, Reddy PV, Richardson MD, Clarke BB.** 1999.

Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium endophytes* as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. *Mycol. Res.* 103:1593-1603.

**Turgeon BG, Yoder OC.** 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of

filamentous ascomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 31:1-5.

**Uchida K, Nishiyama Y, Yokota N, Yamaguchi H.** 2000. In vitro antifungal activity of a

novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens. *J. Antibiot.* 53:1175-1181.

**van Oppen MJH, Willis BL, Van Vugt H, Miller DJ.** 2000. Examination of species

boundaries in the *Acropora cervicornis* group (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses. *Mol. Ecol.* 9:1363-1373.

**Vandamme AM.** 2003. Basic concepts of molecular evolution. Pp. 1-23. En: *The*

*Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny* (Salemi M and Vandamme AM, eds.). Cambridge University Press. Cambridge. England.

**Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y.** 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS.

*Mycol. Res.* 9:1027-1032.

**Vilgalys R.** 1988. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as

measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology* 78:698-702.



- Vilgalys R, Sun BL.** 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:4599-4603.
- von Arx JA.** 1973. Ostiolate and nonostiolate Pyrenomycetes. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 76:289-296.
- von Arx JA, Figueras MJ, Guarro J.** 1988. Sordariaceous ascomycetes without ascospore ejaculation. *Beihefte Nova Hedwigia* 94:1-104.
- Walsh TJ, Peter J, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Pizzo PA.** 1995. Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1361-1364.
- Welsh J, McClland M.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*18:7213-8.
- Wheeler WC.** 1990. Nucleic acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics* 6:363-368.
- Whelan S, Liò P, Goldman N.** 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends Genet.* 17:262-272.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. En: *PCR protocols: a guide to the methods and applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds.), Academic Press. New York. USA.
- Whitehouse HLK.** 1949. Heterothallism and sex in the fungi. *Biol. Rev.* 24:411-447.
- Williamson ECM, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJJ.** 2001. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR

## Bibliografía

---

- amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J. Clin. Microbiol.* 39:47-50.
- Wu Z, Ying H, Yiu S, Irvine J, Smith R.** 2002. Fungal keratitis caused by *Scedosporium apiospermum*. Report of two cases and review of treatment. *Cornea*; 21: 519-23.
- Yang Z.** 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 11:367-372.
- Yarrow D.** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Pp. 95-97. En: *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. (Kurtzman CP and Fell JW eds.), Elsevier. Amsterdam. The Netherlands.
- Young ND.** 1998. Pacific Coast *Iris* species delimitation using three species definitions: biological, phylogenetic and genealogical. *Biol. J. Linn. Soc.* 63:99-120.
- Zalar P, De Hoog GS, Gunde-Cimerman N.** 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Stud. Mycol.* 43:38-48.
- Zuckerkindl E, Pauling L.** 1962. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity, Pp. 189-225. En: *Horizons in Biochemistry*, (Kasha M and Pullman B, eds.) Academic Press, New York.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## **8. ANEXOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## Portada del IJSEM de Octubre del 2007



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007

## Clave dicotómica de las especies del complejo *P. boydii*

- 1a Ascomata present on OA ..... **2**  
1b Ascomata absent on OA ..... **6**
- 2a Ascospores ellipsoidal ..... **3**  
2b Ascospores fusiform ..... **4**
- 3a Ascospores 5-7 x 3-4  $\mu\text{m}$ ; no growth with maltose or D-ribose..... ***P. minutispora***  
3b Ascospores 7-9 x 5-6  $\mu\text{m}$ ; growth with maltose and D-ribose ..... ***P. ellipsoidea***
- 4a Ascospores wider than 3.5  $\mu\text{m}$ ; conidia borne on vegetative hyphae abundant ..... **5**  
4b Ascospores 5.5-6.5 x 3-3.5  $\mu\text{m}$ ; conidia borne on vegetative hyphae scarce..... ***P. angusta***
- 5a Ascospores 6-9 x 5-6  $\mu\text{m}$ ; conidia borne on vegetative hyphae  
globose to subglobose ..... ***P. boydii***  
5b Ascospores 6-7 x 4-4.5  $\mu\text{m}$ ; conidia borne on vegetative hyphae  
ellipsoidal to obovoid ..... ***P. fusoidea***
- 6a Yellow pigment absent; growth with sucrose..... **7**  
6b Diffusible yellow pigment on PDA at 25°C; no growth with sucrose..... ***S. aurantiacum***
- 7a No growth with D-ribose..... **8**  
7b Growth with D-ribose ..... ***S. boydii*** (anamorph of ***P. boydii***)
- 8a No growth at 40°C; solitary conidiophores usually unbranched; conidia borne  
on vegetative hyphae subhyaline or pale gray and thin-walled ..... ***S. dehoogii***  
8b Growth at 40°C; solitary conidiophores branched; conidia borne on vegetative  
hyphae brown and thick-walled ..... ***S. apiospermum***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL GÉNERO PSEUDALLESCHERIA Y GÉNEROS AFINES

Félix Gilgado Barbadilla

ISBN: 978-84-691-1010-2/DL:T.2218-2007