

NOTAS MICOLOGICAS VIII: ACERCA DE *Thozetella tocklaiensis* EN ACICULAS SENESCENTES DE PINO (MISIONES, ARGENTINA)

(Mycological notes VIII: About *Thozetella tocklaiensis*
in senescent leaves of *Pinus* (Misiones, Argentina))

*Eduardo Piontelli L. & **Gustavo Giusiano

*Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina,
Cátedra de Micología, Casilla 92 V. Valparaíso, Chile. email- eduardo.piontelli@uv.cl

**Universidad Nacional del Nordeste, Inst. Med. Reg. Departamento de Micología
Av. Las Heras 727, 3500 Resistencia (Chaco), Argentina.

Palabras clave: Microhongos, *Thozetella tocklaiensis*, *Pinus elliottii*

Key words: Microfungi, *Thozetella tocklaiensis*, *Pinus elliottii*

RESUMEN

Se describen los aspectos morfológicos de *Thozetella tocklaiensis*, un raro hongo anamórfico aislado en la litera vegetal senescente de *Pinus elliottii* en la provincia de Misiones (Argentina), mediante el empleo de diferentes medios de cultivo (PCA, PDA, CMA y OA), con o sin adición de substratos vegetales tales como trozos estériles de tallos de *Lolium sp.* y hojas de *Musa sp.* Se comenta la distribución de las especies y algunos aspectos filogenéticos del género. En todos los medios empleados se obtuvieron fructificaciones que permitieron su identificación a nivel de especie.

Thozetella cristata, *T. radicata*, *T. falcata* y *T. tocklaiensis* producen sinnemata de variados tamaños y la morfología de este como la de los conidios y las setulas de *T. falcata*, *T. havanensis* y *T. tocklaiensis* son muy similares, difiriendo solamente en el largo y grosor de sus microaristas. *T. falcata*, *T. boonjiensis* también forman sinnemata sumergido en el agar al igual que *T. tocklaiensis* en PCA.

Como la sola morfología resulta muy similar y existen estrechas relaciones entre algunas especies, parece ser que los estudios moleculares serían los únicos en poder determinar si el marcado polimorfismo de los taxa observados en cultivos, corresponde más bien a cambios genéticos o a un fenotipo adaptativo de la especie en los diversos hábitat.

INTRODUCCION

La diversidad de microhongos en la litera de zonas forestales lluviosas y subtropicales es bastante más

ABSTRACT

Morphological aspects of *Thozetella tocklaiensis*, a rare anamorphic fungus isolated from the senescent vegetal litter of *Pinus elliottii* at the provincia de Misiones (Argentina), are hereim described. By using different culture media (PCA, PDA, CMA and OA), with or without the addition of vegetal substrata such as sterile stem pieces of *Lolium sp.* and leaves of *Musa sp.* Besides the distribution of species as well as some phylogenetic features of the genus is discussed. Fructifications resulting from all media employed made it possible their identification at species level.

Thozetella cristata, *T. radicata*, *T. falcata* and *T. tocklaiensis* produce sinnemata of different sizes and the morphology of the latter as well as that of conidia and setula of *T. falcata*, *T. havanensis* and *T. tocklaiensis* are very similar, differing only in length and thickness of their microedges. *T. falcata*, *T. boonjiensis*, also produce sinnemata when soaked in agar likewise *T. tocklaiensis* in PCA.

Considering that only morphology becomes very similar and the fact that there is a close relationship among some species, it seems that molecular study would be the unique means to determine whether the marked polymorphism of taxa examined in cultures is rather the result of genetic changes or of an adaptative phenotype of the species in diverse habitats.

abundante de lo que uno asume. Algunas especies son comunes en muchos substratos foliares senescentes, pertenecientes no solo a climas tropicales sino a otros más templados y fríos, otras son poco frecuentes o esporádi-

cas, mientras algunas se presentan muy raramente. Este patrón de distribución que parece ser común en la mayoría de la litera foliar, en muchas situaciones climáticas y a veces independiente del substrato seleccionado, depende de varios factores como; los procesos de sucesión, la microbiota, la microfauna y la flora presente, junto a situaciones edáficas y climáticas (Bills & Polishook, 1994).

Se ha estudiado con más énfasis la importancia de distribución de la riqueza de especies, pero su rareza parece acumular solo datos taxonómicos dispersos sin que se entienda su real aporte a la comunidad.

En un estudio referente a la diversidad y dominancia de las comunidades de microhongos en la litera de un bosque de coníferas (*Pinus elliottii*) de la provincia de Misiones (Argentina), se aisló dentro de la colección de hongos anamórficos, un taxa poco común del género *Thozetella* (*T. tocklaiensis*), al parecer no registrado en coníferas. Se describen algunas de sus variables características en cultivos puros y en varios substratos naturales, junto con comentar y discutir algunos datos de la distribución de las especies de este género en la literatura.

Datos geográficos y climáticos de la zona de aislamiento

Misiones, se encuentra ubicada entre los paralelos 25° 28' y 28° 10' de Latitud Sur y los meridianos 53° 38' y 56° 03' de Longitud Oeste, en la región nordeste de la República Argentina. Casi la totalidad de sus límites está conformada por ríos; el Río Iguazú al norte, el Paraná al oeste el Pipirí Guazú y el Uruguay al oeste y el Chimiray al sur. Es una de las provincias más húmedas de la República con un clima subtropical húmedo sin periodos secos, con lluvias constantes y regulares todo el año (1800mm), pero principalmente en primavera y verano. Por su cercanía al trópico de Capricornio, experimenta veranos muy calurosos y húmedos e inviernos templados con temperaturas medias anuales de 20°C y mayores de 30°C en la época estival.

Comentarios históricos

El género *Thozetella* fue creado por O.Kuntze (1891) como género monotípico (= *Thozetia* Berk & F. Mueller (1881), non *Thozetia* F. Mueller ex Benth. (1868) *Asclepiadaceae*), y se incluye en los anamorfos de *Ascomycota* inc. sed (Kirk *et al.*, 2001). La única especie descrita en esos tiempos y por ende la especie tipo fue *Thozetia nivea* Berkeley (= *Thozetella nivea* (Berk.) O.Kuntze), colectada en madera en putrefacción en Queensland, Australia y al parecer nunca más colectada desde entonces, salvo que Hoehnel (1909), comenta haber aislado la misma especie en la corteza de un árbol en el Jardín Botánico de Buitenzorg (Austria), publicando una reducida redescrición que no asegura con certeza se trate del mismo hongo descrito por Kuntze (in Agnihotrudu,

1958).

Agnihotrudu (1958), en Tocklai Experimental Station, Indian Tea Association, Cinnamara, Assam (India), reporta un hongo aislado de la parte floral del te (*Camelia sinensis* (L.) O.Kuntze) que difiere en algunos aspectos de *Thozetella*; con "...bien desarrollados esporodocios, que produce esporas en el mismo modo que la forma de los pinnotes de *Fusarium*, conidióforos bien desarrollados, irregularmente ramificados, conidios distintamente fusoides, curvos, que terminan en forma obtusa a sub-aguda (9-13 (-18) x 1,3-3 µm), con largas y flexibles sétulas en ambos extremos de 3-8 (-13) µm de largo..." Este autor, no describe otros tipos secundarios de conidios los de tipo ante (microawn), considerándolos como elementos que se presentan entremezclados con los conidióforos como setas hialinas estériles. Estos elementos son de base ancha y fina pared basal y con un largo ápice semejante a un ante de paredes gruesas, refractivas, minutamente rugosas, derechas o levemente encorvadas, fuertemente uncinadas, onduladas, o de otras maneras (18-38 (-48) x 1,5-3 µm).

Por estas características que en varios aspectos no coinciden con las observadas por Hoehnel en *Thozetella*, en especial la presencia de hifas erectas en palizada bajo las estructuras esporógenas, Agnihotrudu (1958), propone un nuevo género (*Thozetellopsis*) y *Thozetellopsis tocklaiensis* como especie tipo. Posteriormente el mismo autor (1962), aísla nuevamente esta especie desde suelos de una plantación de te y Pirozynski (1972), desde litera vegetal en Tanzania. Un año después, Pirozynski & Hodges (1973), revisan el género y transfieren *Thozetellopsis* a *Thozetella* por considerarla congénica con este último taxa y describen una nueva especie (*Thozetella cristata*) y una nueva combinación (*T. radicata* (Morris) Pirozynski & Hodges (= *Neottiosporella radicata* Morris). Sherwood (1974), describe una nueva especie que denominan *Thozetellopsis calicioides* con conidios oscuros y sin microantes, sin considerar la revisión hecha por Pirozynski & Hodges (1973). Nag Raj (1976), describe a *T. canadensis* y Satton & Cole (1983), agregan una nueva especie al género (*T. effusa*) analizando el criterio empleado hasta la fecha en la diferenciación de especies dentro del género, como la variación de las estructuras de los tipos de conidias, conidióforos, conidios y la morfología de los microantes. Al mismo tiempo excluyen de *Thozetella* a *Thozetellopsis calicioides* Sherwood, por no ser congénica con las características del género. Castañeda Ruiz (1984) describe *T. havanensis*; Castañeda Ruiz & Arnold (1985) a *T. cubensis* y Mercado Sierra *et al.* (1997), a *T. ciliata*. En resumen hasta el siglo 20 se consideraron con un criterio no compartido por todos los autores, un total de 9 especies. Recientemente Paulus *et al.* (2004), describen 5 nuevas especies desde forestas lluviosas en

Tabla 1.- Medios de cultivo y morfometría de las principales estructuras de *Thozetella tocklaiensis*: mediciones (μm) efectuadas bajo imágenes digitalizadas en el programa Zeiss KS 100

Medio de cultivo	Morfología y tamaño de conidioma	Morfología y tamaño de microantes (n= 40)	Conidios y séptulas (n= 40)
Acículas de pino en agar papa-zanahoria (PCA)	Esporodocios entre 400-600 μm largo x 70-200 ancho, tienden a alargarse en el tiempo, dando el aspecto de un sinnema.	De diferentes tamaños, forma de hoz, L, u otras formas, con sus ápices finamente rugosos (20,64-42,6 x 2,5-2,9 μm) Promedio = 35,84 - 2,68 μm (Figura 4)	Conidios: 10,31-14,81 x 1,8-2,5 μm Promedio = 12,72 μm Séptulas: 5,2 - 7,1 μm Promedio = 6,2 μm
Agar harina de maíz con tallos vegetales estériles (CMA)	Esporodocios de 200 a 350 μm de alto y algunos sinnema hasta 900 μm de alto sobre el tallo de la gramínea. (Figura 1)	De diferentes tamaños, forma de hoz, L, u otras formas, un poco más cortas, pero más anchas que en las acículas de pino. Apices rugosos. 25,13-51,25 x 2,85-4,05 μm Promedio = 34,3x3,35 μm	Conidios: menos falcados que en acículas, vacuolados. 10,36-14,66 x 1,91-2,85 μm , Promedio = 12 x 2,52 μm Séptulas: 6,5-10,53 μm Promedio = 7,1 μm (Figura 9)
Agar harina de maíz con hojas de plátano esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5%	Esporodocio de aspecto redondeado, a veces confluentes en cojín 125-250 ancho x 100-300 μm de alto, masa conidial de 100-135 de alto x 125-200 μm de ancho	De diferentes tamaños, forma de hoz, L, sigmoideos y casi rectas con ángulos abiertos y ápices rugosos: 20,32 -53 x 3-4 μm Promedio = 25,33 x 3,48 μm (Figura 7)	Conidios: 9,5 -12,25 x 1,81-2,95 μm Promedio = 10,82 x 2,53 μm Séptulas: 3,43-6,1 μm Promedio = 4,22 μm (Figura 7)
Cultivos en agar papa-zanahoria (PCA)	Conidomas largos sinnematosos paralelos a divergentes, inmersos y erumpentes. (Figura 2). 150-500 de largo x 45-75 μm de ancho en la base.	De diferentes tamaños, forma de hoz, L, sigmoideos y casi rectas con ángulos abiertos y ápices rugosos. Microaristas: 20,6-52,66 x 3-4 μm , Promedio = 34,33 x 3,62 μm	Conidios: 9,1-12,5 x 1,94-3,13 μm Promedio = 10,81x 2,58 μm Séptulas: 3,3-6 μm Promedio = 4,28 μm
Cultivos en agar papa-dextrosa (PDA)	Sinnemas en fascículos independientes a partir de un conjunto de tejido hifal basal de 1200-2100 x 110-170 μm de ancho en la parte superior, con típica tendencia a formar embudo al inicio de la masa conidial (Figura 3,8)	De diferentes formas, de hoz, L, sigmoideos y casi rectas con ángulos abiertos y ápices rugosos, 24-50 x 2,5-3,5 μm , Promedio = 36,4 x 3,3 μm (Figura 5)	Conidios: 11,2-15,3 x 2-2,5 μm Promedio = 12,48 μm Séptulas: 5-7 μm Promedio = 5,70 μm (Figura 5)
Cultivos en agar avena (OA)	Esporodocios abundantes, solitarios o gregarios, de 250 a 450 μm de alto (sin considerar la masa conidial) y 100-125 μm de ancho en la base	De diferentes formas, de L abierta, en forma de hoz y otras formas, con ápices rugosos, 25-50 x 3-3,4 μm Promedio = 42,67 x 3, 21	Conidios: 13,1-16,32 x 202-2,77 μm (Figura 6) Promedio = 14,82 x 2,36 μm Séptulas: 6,5-10,53 μm Promedio = 7,43 μm

Australia (*T. acerosa*, *T. boonjiensis*, *T. falcata*, *T. gigantea* y *T. queenslandica*), mediante su desarrollo en cultivos y en su substrato natural, confirmando los datos morfológicos con los moleculares. Al mismo tiempo indican las cercanas relaciones filogenéticas de este género anamórfico con *Chaetosphaeria* (Sordariales, Ascomycota).

Distribución

Thozetella tocklaiensis, fue aislada primeramente en la India (Agnihotrudu, 1958), en Sud Africa, Australia, Papua (Neva Guinea) (en Sutton 1983), Tanzania (Pirozynski, 1972), Nueva zelandia (Waipara *et al.*, 1996), en el norte de Ar-

gentina (este trabajo). Parece ser la primera vez que esta especie se aísla de acículas de pino, sin embargo, hubo otro aislamiento en Japón de *Thozetella* desde este mismo substrato que no fue clasificada a nivel de especie (Aoki & Tokumasu (1995). Se ha detectado esporádicamente la presencia de varios integrantes del género en el continente sudamericano, generalmente dispersas en zonas cálidas y húmedas a excepción de *T. canadensis* en Ontario Canadá (Nag Raj, 1976). Las otras especies antes del trabajo de Paulus *et al.* (2004), también son desde el trópico hasta las zonas subtropicales (Lat 0° a lat 20° sur y norte). *T. havanensis*, en Cuba, Brasil y Nigeria (Grandi *et al.*, 1995;

Calduch, *et al.*, 2002; Castañeda-Ruiz, 1984) *T. cubensis* en Cuba (Castañeda & G. Arnold, 1985; Castañeda *et al.*, 2003 a-b) y Brasil (Pascholati *et al.*, 2001). *T. cristata*, en Brasil, (Pascholati *et al.*, 2001; Grandi 1998, 2002; en Sutton 1983), Venezuela (Castañeda-Ruiz *et al.*, 2003b) Italia, Japón y México (en Grandi, 2002) y Carolina del Sur USA (en Sutton, 1983). *T. nivea*, en Australia (Agnihotrudu, 1958) Tailandia (Somrithipol *et al.*, 2002; Sivichai *et al.*, 2002) y en Austria? (Hoehnel, 1909). *T. radicata*, en La isla Barro Colorado, Zona del Canal, Panamá (Pirozynski & Hodges, 1973) y *T. effusa*, en Texas (USA) (Sutton, 1983).

Otros autores, Aoki & Tokumasu (1995), aislaron en Japón una especie de *Thozetella* sin clasificar desde acículas de pino y Katz (1981), otra desde hojas de dicotiledóneas de la litera en Brasil.

Morfología de *T. tocklaiensis* en substrato natural y cultivos. (Todas las mediciones se efectuaron directamente en pantalla sobre imágenes digitalizadas con el programa KS100 de Zeiss)

A) En acículas de pino. El desarrollo de las colonias se obtuvo a temperatura ambiente (entre 20-22°C), con un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (no se empleó luz UV). El crecimiento en acículas de *Pinus elliottii* lavadas con agua estéril y colocadas sobre agar papa zanahoria fue lento, debido a la presencia de una variada mycota asociada, principalmente especies de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* y *Fusarium*. Se observó la presencia de escasos conidiomata bajo la lupa estereoscópica después de los 30 días, tomándose las muestras para su determinación morfológica después de los 35 días.

Presencia de escaso micelio aéreo pardo a oliváceo, septado, liso, disperso en el agar y formando masas blanquecinas algodonosas a pardas sobre las acículas, que en algunos puntos se agrupaban formando masas compactas de hifas oscuras, visibles a bajos aumentos en la lupa estereoscópica, que presentaban un relativamente corto pero visible conidioma intermedio entre un esporodoquio y un sinnema de 400-600µm de largo, solitarios o a veces pulvinados, reunidos sobre una estructura basal de aspecto estromático, hialina, capaz de originar hasta 2 o 3 nuevos conidiomas separados o adosados unos a otros, de aspectos compacto y de color café oliva a negruzco, angosto en su base (70-200µm), que en el tiempo se alargan y toman un aspecto más sinnematoso, que en su parte apical se ensanchan individualmente en forma de embudo (110-290µm) dando origen en el tiempo a una cabeza mucoide hialina a parda de aspecto ovoide (200-450µm), que excede en tamaño el cono ascendente del conidioma, opaca, compuesta superficialmente por abundantes microaristas (Fig. 4) y una gran masa de conidios en su interior. Células conidiógenas filídicas, enteroblásticas, en palizadas

paralelas, cilíndricas, que se adelgazan hacia el ápice, mostrando un locus conidiógeno (collarete) pequeño y redondeado, integradas en fascículos, semejando un esporodoquio, difíciles de observar por su disposición compacta, septadas, rectas a onduladas, subhialinas cuando jóvenes a tonos café grisáceos en la madurez, de largos variables, 12,34-28,4 x 2,8-3,0 µm, que nacen de conidióforos macronematosos, ondulados, septados, lisos, ramificados bajo el septo, dispuestos en la parte superior y entrelazados con las hifas más apicales del sinnema, más oscuros que las células conidiógenas. De largo variable (40-60µm). Entermezclados entre estas hifas conidiógenas, se observan otros elementos hifales dispuestos más en la periferia que parecen originar las microaristas. Quizás la mejor descripción de estos últimos elementos se detalla en Waipara *et al.* (1996), por el uso de microscopio electrónico (SEM). Conidios (n=40) sigmoides a falcados, gutulados, hialinos, unicelulares, lisos, escasamente vacuolados (10,31-14,81 x 1,8-2,4 µm), con una única y delgada seta dispuesta en cada extremo aguzado del conidio (5,2-7,1 µm) de largo. Microaristas de diferentes tamaños, sin septos, en forma de hoz, de L u otras formas, con franco dominio de las formas de hoz (Fig. 4), con un extremo aguzado y rugoso, y una base más ancha y lisa, cuyas medidas en toda su extensión fueron 20,64-42,6 x 2,5-2,7 µm.

B) Otros medios de cultivo empleados.

La cepa se cultivó en diferentes medios de cultivo con y sin agregar substratos vegetales esterilizados en su superficie con Hipoclorito de sodio al 3% por 5 min*.

Todos los medios de cultivo empleados se mantuvieron a temperaturas de 20-22°C durante 30 días con un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (no se empleó luz UV).

Los medios de cultivo empleados fueron:

- 1) Agar papa zanahoria (PCA) en placas de 10 cm más 3 a 4 acículas de pino senescentes esterilizadas.*
- 2) Agar harina de maíz (CMA) con tallos vegetales senescentes de *Lolium sp.* esterilizados.*
- 3) Agar harina de maíz en placas con trozos de hojas verdes de plátano esterilizadas.*
- 4) Agar papa zanahoria en placas
- 5) Agar papa dextrosa en placas con 1% de glucosa (PDA).
- 6) Agar avena en placa (OA).

Aspectos filogenéticos

Nuestro trabajo no incluyó los aspectos filogenéticos de esta especie y los datos que se comentan solo se refieren a la literatura. Actualmente, Réblová (2000) y Réblová & Winka (2000), en un análisis basado en las secuencias de las largas subunidades de rDNA, redefinen el género teleomorfo de *Chaetosphaeria sensu stricto*, separándolo en 2 clades y ambas en 2 subclades. Estas

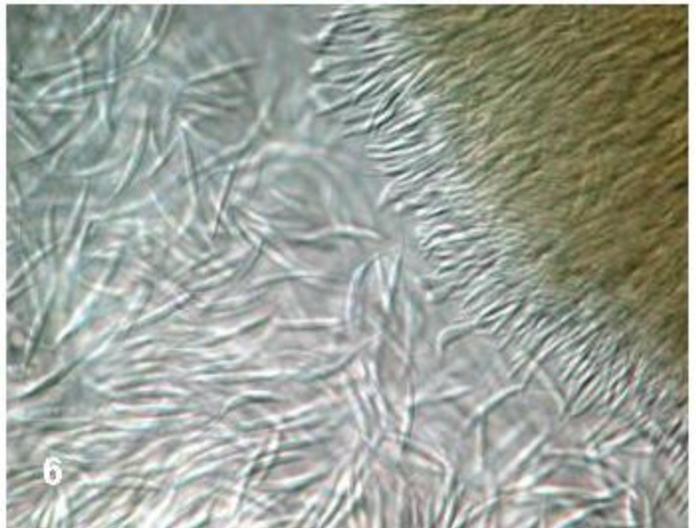
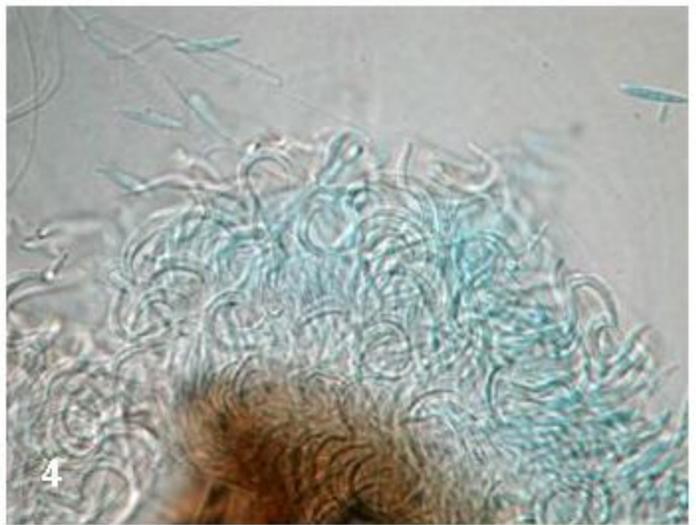
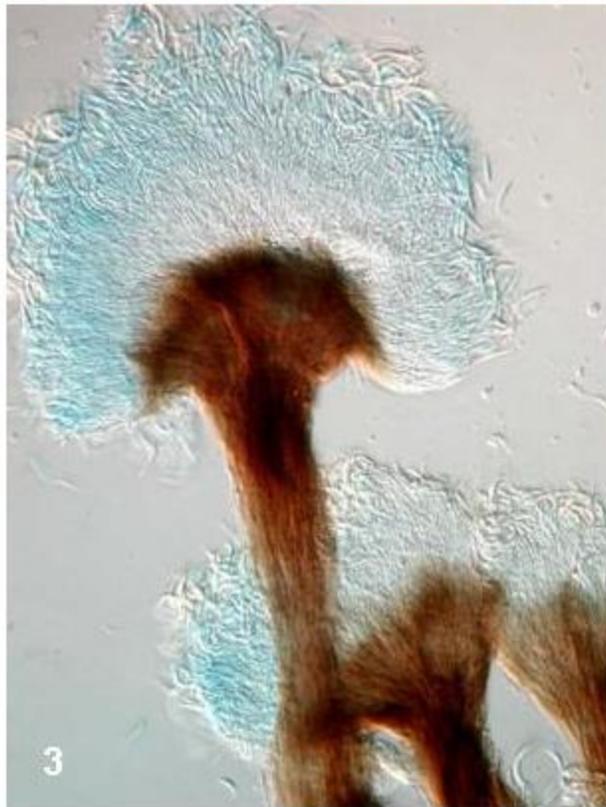


Figura 1. 1-6 *Thozetella tocklaiensis*. 1.- Substrato vegetal (*Lolium* sp.), mostrando la formación intermedia entre esporodoquios y sinnema, 50 x. 2.- Hifas sinnematosas ramificadas sumergidas en el agar (PCA), 200x. 3.- Parte apical del sinnema mostrando conidios y microantes en PDA después de 30 días, 400 x. 4.- Parte apical de un sinnema mostrando microaristas externas sobre la cabeza mucoides (sobre acículas de pino). 5.- Microaristas y conidios en PDA. 6.- Células conidiógenas en empalizada y conidios en CMA+ hojas de plátano. La barra de 10 μm en 5 es válida también para 4 y 6.

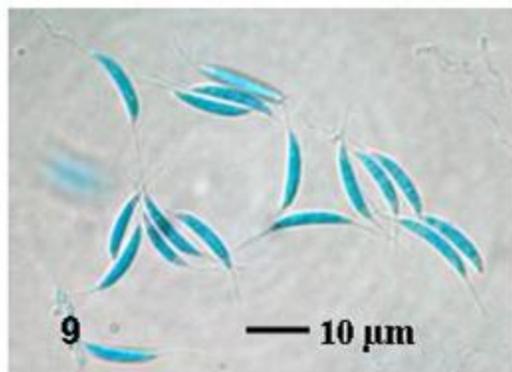
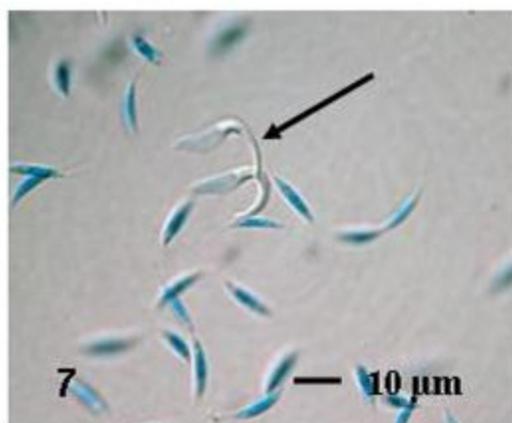


Figura 2.- 7, 8, 9 *T. tocklaiensis*, 7.- Conidios y microaristas (flecha) en CMA. 8.- Sennemas ramificados desde un punto común de nacimiento en PDA (no incluido en la fotografía). 9.- Conidios falcados-vacuolados y sétulas en CMA.

subclades tienen ciertas coincidencias morfológicas que consideraron como grupos naturales dentro del género. Estos 4 grupos naturales apoyados por estudios morfológicos, culturales y moleculares, incluyen anamorfos con géneros con diferencias morfológicas, pero que guardan cierta relación a pesar de sus patrones de variabilidad. De estos 4 grupos informales que se basan en la asociación de géneros anamorfos relacionados, el Grupo IA o el llamado Grupo *Menispora*, asociado con 2 distintos géneros teleomorfos (*Chaetosphaeria* y *Striatosphaeria* Samuels & E.Müll.), nos interesa específicamente porque incluye 3 principales anamorfos fialídicos como *Menispora* Pers, *Codinea sesu stricto* Maire y *Codinaeopsis* Morgan-Jones, todos ellos con células conidiógenas laterales, en racimos o integradas en el conidióforo, con un único locus conidiógeno que da origen a conidios oblongos, fusiformes, a menudo curvos, hialinos o café, septados o no septados, usualmente con 2 finas sétulas en ambos extremos. Sin embargo, otras especies que no se consideraron en estos 2 estudios, pueden tener anamorfos también relacionados con *Chaetosphaeriaceae* y *Trichosphaeriaceae* (Posiblemente éstas últimas relacionadas con los *Sordariales*), porque muestran similares características en sus conidióforos, posición y estructura de las fialídes y la morfología de los conidios, tales como *Dictyochaeta sensu*

stricto Sacc.(con conidios setulosos), *Dictyochaetopsis* Arambarry & Cabello, *Zanglospora* S.Hughe & Kendrick, *Menidochium* Castañeda & Kendrick, *Menisporopsis* S. Hughes (posiblemente como miembros de las *Trichosphaeriaceae* (Siboe *et al.*, 1999, Réblová, 1999), y por supuesto *Thozetella* O.Kunze. Los datos de ITS no fueron de ayuda para resolver las relaciones filogenéticas de *Chaetosphaeria* y sus anamorfos (Réblová & Winka, 2000).

Paulus *et al.* (2004), en un análisis de secuencia de datos de ITS rDNA, asociaron sus especies de *Thozetella* con las especies de *Chaetosphaeria* del subgrupo IA, sin embargo, su análisis fue menos resolutivo que el de Réblová & Winka (2000), que consideraron dos regiones separadas del genoma. Sugieren al mismo tiempo que el teleomorfo de las especies individuales de *Thozetella* es aún desconocido y la divergencia de nucleótidos entre las secuencias disponibles de *Thozetella* y *Chaetosphaeria* consistentemente fue mayor que un 11%.

Las estructuras y características de los anamorfos (o sinanamorfos asociados), en combinación con los caracteres del teleomorfo, en especial la morfología de las ascosporas, han sido de gran importancia en la clasificación morfológica y filogenética de *Chaetosphaeria*, debido a que es un género que posee pocos y simples caracteres morfológicos a veces indistinguibles que dificultan la

separación de sus especies. Una característica observada desde varias décadas por muchos autores (ver Constantinescu *et al.*, 1995).

Recientemente Huhndorf *et al.* (2004), basándose en datos morfológicos y moleculares (LSU nrDNA), redefinen el orden **Sordariales** y elevan a nivel de orden a las **Chaetosphaeriaceae** y **Conoichaetaceae** por poseer distintivos teleomorfos y anamorfos asociados, una aspiración que habían insinuado con anterioridad Réblová & Winka (2001).

DISCUSION

Existen en algunos géneros ciertos caracteres morfológicos bastante estables aún en diferentes substratos, considerados de valor primario para su uso en una clave. Sin embargo, como se aprecia en la literatura, en algunas de las especies de *Thozetella* parece difícil determinar cual es el carácter primario o secundario a considerar, debido a que en varias son coincidentes y solo difieren en unos pocos y a veces en uno solo, Agnihotrudu (1958), al analizar *T. tocklaiensis* en varios medios de cultivo comunes y en agar extracto de té, obtuvo esporodoquios "sésiles" en forma de cojín en cultivos jóvenes, con producción de conidios y microaristas (como setas estériles), bastante estables en sus dimensiones en los medios empleados, pero no pudo observar la formación en el tiempo de verdadero sinnema de más de 1,5 mm en subcultivos viejos (examinados por Pirozynski & Hodges, 1973). Castañeda-Ruiz (1984), también comenta las mínimas diferencias observadas en los conidios y las microaristas de *T. havanensis* desde substrato natural y cultivos, sin embargo, a pesar que las microaristas de esta especie y las de *T. tocklaiensis* son verrucosas en sus extremos y semejantes en sus largos, las de *T. havanensis* son uniformes en su ancho. Pirozynski & Hodges (1973), consideraron a *T. tocklaiensis*, *T. cristata* y *T. radicata* como variantes geográficas de formas de crecimiento de una misma especie como antes sugirió Pirozynski (1972), a pesar que el sinnema de *T. radicata* es siempre más pequeño que el de *T. tocklaiensis*. No obstante, por la configuración variable del sinnema y sus diferencias en tamaño bajo variadas condiciones de crecimiento, mantienen los 3 taxa como especies separadas. Waipara (1996), caracteriza a varios aislados de *T. tocklaiensis*, estudiándolos en 10 diferentes medios de cultivo bajo condiciones variables de temperatura y exposición a UV, obteniendo buena esporulación sólo en PCA, OA y agar heno, manteniendo la terminología de esporodoquios al referirse a hifas elongadas oscuras bien apretadas que forman un estroma.

Paulus *et al.* (2004), llegan a una conclusión similar al comparar sus 5 nuevas especies de *Thozetella* ya sea en substrato natural como en cultivo. Sin embargo, consi-

deran importante la temperatura óptima de crecimiento como un factor que puede alterar el tamaño de los conidios en algunas de sus especies (*T. gigantea*), situación que hemos observado también en *T. tocklaiensis*. Al mismo tiempo consideran un carácter estable la formación del tipo de conidioma en las nuevas especies descritas, situación que consideramos prematura para evaluar las restantes especies del género sin un medio adecuado y condiciones estándar. No es fácil dar un valor límite en micrones (especialmente en largo) a lo que se considera un esporodoquio o un sinnema, cuando ambos presentan en sus estructuras de soporte hifas paralelas que han perdido su individualidad. Al parecer los conidioma observados en *T. tocklaiensis* puede sufrir variaciones acorde al tiempo, el substrato y la reducción de agua en el medio, como observamos en cultivos en tubos de PDA después de los 30 días donde algunos esporodoquios se transformaron en largos sinnemas en las zonas más secas del agar (Fig. 3 y 8). Esta situación junto con otros datos morfológicos similares entre las especies descritas del género, dificulta el uso de la clave de Paulus *et al.* (2004).

Parece de utilidad el empleo de un medio de cultivo como el propuesto por estos autores (CMA+ hojas de plátano) u otro en una revisión de todas las especies descritas, debido a que varias se conocen sólo sobre su substrato natural, pero no en cultivos puros o viceversa.

Según la literatura, *T. cristata*, *T. radicata*, *T. falcata* y *T. tocklaiensis* producen sinnema de variados tamaños y su morfología como la de los conidios y las setulas de *T. falcata* y *T. tocklaiensis* son muy similares, difiriendo solamente en el largo, pero no en la forma de sus microaristas. Además *T. falcata* y *T. boonjiensis* también forman sinnema sumergidos en el agar al igual que *T. tocklaiensis* en PCA.

En todos los medios usados en nuestro trabajo con o sin substrato vegetal agregado, no se apreciaron en *T. tocklaiensis* grandes diferencias en el tamaño de los conidios y las setulas, las mayores fueron sobre acículas de pino y en OA y solo en este último se obtuvo un promedio mayor en las microaristas, sin embargo, las mediciones de esporodoquios, sinnemas, conidios, setulas y microaristas están dentro de los límites de las descripciones de esta especie en la literatura.

Los medios pobres parecen favorecer las fructificaciones de *T. tocklaiensis*; PCA, PDA (1% de glucosa) y OA se consideraron los mejores para su estudio en cultivo puro, presentando especialmente en PCA gran cantidad de micelio sumergido, formando inicios de conidiomas sinnematosos muy ramificados desde el punto inicial de crecimiento (Figura 2).

Como la sola morfología es bastante similar en algunas especies del género, el empleo de técnicas moleculares podrán determinar si el polimorfismo observado

en cultivo y sobre diversos sustratos naturales corresponde más bien a cambios genéticos o a un fenotipo adaptativo de las especies en sus diversos hábitat.

La cepa se depositó como cultivo vivo en el cepario del Laboratorio de Micología, de la Escuela de Medicina (Univ. de Valparaíso), con el número CMEM202.

REFERENCIAS

- Agnihotrudu, V.** (1958). Notes on fungi from north-east India. I. A new genus of Tuberculariaceae. *Mycologia* 50:570-579
- Agnihotrudu, V.** (1962). A comparison of some technique for the isolation of fungi from tea soils. *Mycopathology* 16:234-242
- Aoki, T. & Tokumasu, S.** (1995). Dominance and diversity of the fungal communities on fir needles. *Mycological research* 99:1439-1449
- Bills, G.F. & Polishook, J.D.** (1994). Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia* 86:187-198
- Calduch, M.; Gené, J.; Guarro, J.; Mercado-Sierra, A.; Castañeda-Ruiz, R.** (2002). Hyphomycetes from Nigerian rain forest. *Mycologia* 94: 127-135
- Castañeda Ruiz, R.F.** (1984). Nuevos taxones de Deuteromycotina: *Arnoldiella robusta* gen. et sp. nov., *Roigiella lignicola* gen. et sp. nov., *Sporidesmium pseudolmediae* sp.nov. y *Thozetella havanensis* sp. nov. *Rev.Jardín Bot. Nac. Univ. Havana* 5:57-87
- Castañeda Ruiz, R.F. & Arnold, G.R.W.** (1985). Deuteromycotina de Cuba. I. *Rev.Jardín Bot. Nac. Univ. Havana* 6:47- 67
- Castañeda Ruiz, R.F.; Iturriaga, T.; Minter, D.W.; Saikawa, M.; Vidal, G.; Velásquez-Noa, S.** (2003a). Microfungi from Venezuela. A new species of *Brachydesmiella*, a new combination, and new records. *Mycotaxon* 85:221-229
- Castañeda Ruiz, R.F.; Minter, D.W.; Camino-Vilaró, M.; Saikawa, M.; Velásquez-Noa, S.; Decock, C.** (2003b). *Arachnospora insolita*, a new genus and species, and some other Hyphomycetes from Banao, Sancti Spiritus province, Cuba. *Mycotaxon* 87:385-393
- Constantinescu, O.; Holm, K. & Holm, L.** (1995). Teleomorph-anamorph connection in Ascomycetes: The anamorphs of three species of *Chaetosphaeria*. *Mycol. Res.* 99: 585-592
- Grandi, R.P.; Grandi, A.C. & Delittio, W.B.** (1995). Hyphomycetes sobre folhas em decomposição de *Cadrela fissilis*. *Vell. Hoehnea* 22:27-37
- Grandi, R.P.** (1998). Hyphomycetes de folheda do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Sao Paulo, SP. *Inst De Botânica, Seção de Micología e Liquenologia, Sao Paulo Brasil* (abstract).
- Grandi, R.P.** (2002). Decomposing Hyphomycetes on leaf litter of *Tibuchina pulchra* Cogn. *Revista Brasileira de Botânica* 25:79-87
- Hoehnel, F.von.** (1909). Fragmente zur Mykologie VI. *Sitzungber. Akad. Wiss. (Vien) Math.- naturw.Kl. I* 118:275-452
- Huhndorf, S.M.; Miller, A.N & Fernández, F.A.** (2004). Molecular systematics of the Sordariales: The order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia* 96:368-387
- Katz, B.** (1981). Preliminary results of a leaf litter decomposing microfungi survey. *Acta Amazonica* 11:410-411
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Davis, J.C. & Stalpers, J. A.** (2001). *Dictionary of the fungi* 9th Edition CABI Publishing.
- Mercado Sierra, A.; Holubova-Jechova, V. & Mena Portales, J.** (1997). *Monographie XXIII. Hyphomycetes dematiaceos de Cuba. Enteroblasticos.* Torino, Cuba: Museo Regionale di Scienze Naturali. pp.353-354
- Nag-Raj, T.R.** (1976). Miscellaneous microfungi. I. *Can. J. Bot.* 54:1370-1376
- Paulus, B.; Gadek, P. & Hyde, K.** (2004). Phylogenetic and morphological assessment of five new species of *Thozetella* from Australian rain forest. *Mycologia* 96:1074-1087
- Pascholati, L.F.; Grandi, R., Grandi, A.; Ivo, A.** (2001). Hyphomycetes from leaf litter of *Miconia cabussu* in the Brazilian atlantic rain forest. *Mycotaxon*, 79:201-213
- Pirozynski, K.A.** (1972). Microfungi of Tanzania II. New Hyphomycetes. *CMI papers* 129:40-65
- Pirozynski, K.A. & Hodges, C.S.** (1973). New Hyphomycetes from South Carolina. *Can. J. Bot.* 51: 157-173
- Réblová, M.** (1999). Studies in *Chaetosphaeria* s.l. IV. *Crassochaeta* gen.nov., A new lignicolous genus of the Trichosphaeriaceae. *Mycotaxon* 71:45-67
- Réblová, M.** (2000). The genus *Chaetosphaeria* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 45:149-168
- Réblová, M. & Winka, K.** (2000). Phylogeny of *Chaetosphaeria* and its anamorphs based on morphological and molecular data. *Mycologia* 92:939-954
- Réblová, M. & Winka, K.** (2000). Generic concept and correlations in ascomycetes based on molecular and morphological data: *Lecythothecium duriligni*, gen. Et sp. nov. With a *Sporidesmium* anam., and *Ascolacicola austriaca* sp.nov. *Mycologia* 93:478-493
- Sherwood, M.** (1974). New Hyphomycetes from Guadalupe, F.W.I. *Albosinnema filicola*, *Tetracrium musicola* and *Thozetella calicioides*. *Mycotaxon* 1:117-120
- Siboe, G.M.; Kirk, P.M. & Cannon, P.F.** (1999). New dematiaceous Hyphomycetes from Kenyan rare plant. *Mycotaxon* 73:283-302
- Sivichai, S.; Jones, E.B.G. & Hywel-Jones, N.** (2002). Fungal colonization of wood in a freshwater stream at Tad Ta Phu, Hhao Yai National Park, Thailand. *Fungal diversity* 10:113-129
- Sutton, B.C. & Vole, G.T.** (1983). *Thozetella* (Hyphomycetes): An exercise in diversity. *Trans. Br. myco. Soc.* 81:97-107
- Somrithipol, S.; Garret-Jones, E.B. & Hywel-Jones, L.** (2002). Studies in tropical seed fungi. *Biotec-Mycology Copynght notice* (abstract), Internet.