

Notas micológicas XI: *Tritirachium oryzae*, *Paecilomyces formosus* y alcances en la Sección *Fumigati* de *Aspergillus* con énfasis en el complejo *Aspergillus viridinutans*

(*Micological notes XI: Tritirachium oryzae, Paecilomyces formosus, and extent in the Section Fumigati with emphasis in the Aspergillus viridinutans complex*)

Eduardo Piontelli, L,^{1*} Rodrigo Cruz, C² & José Amaro, S³

^{1,2}Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina,

³Cátedra de Micología. Casilla 92V. Valparaíso

Universidad de Chile, Facultad de Medicina.

Laboratorio de Micología.

*Autor para correspondencia: eduardopiontelli@hotmail.com

RESUMEN

En estas notas micológicas, se comentan los aspectos taxonómicos, ecológicos fisiológicos y moleculares de 2 especies fúngicas filamentosas oportunistas en humanos tales como: *Tritirachium oryzae* y *Paecilomyces formosus*, poco conocidas en su distribución en Chile. Al mismo tiempo se aportan datos recientes de la literatura referentes a la distribución y patología de los nuevos integrantes de la sección *Fumigati* de *Aspergillus*, con énfasis en el complejo *A. viridinutans*, un grupo de especie morfológicamente similares y generalmente oportunista en humanos y animales, las cuales no han sido bien definidas en la últimas décadas.

Tritirachium oryzae (Vincent) de Hoog. Studies in Mycology 1:12(1972)

=*Beauveria oryzae* Vincens: 122 (1910)

=*Beauveria brumptii* Langeron & Lichaa: 133 (1934)

=*Spirotrichum purpureum* Saito: 1 (1939)

=*Spirotrichum musae* J.F.H. Beyma, Antonie van Leeuwenhoek 6: 288 (1940)

=*Tritirachium purpureum* Saito ex J.F.H. Beyma, Antonie van Leeuwenhoek 8: 118 (1942)

=*Tritirachium roseum* J.F.H. Beyma, Antonie van Leeuwenhoek 8: 119 (1942)

=*Tritirachium violaceum* Tatarenko: 90 (1952)

El género *Tritirachium* Limber (sp. tipo *T. dependens* Limber), contiene principalmente especies anamórficas clasificadas históricamente en la absoleta clase hyphomycetes, posteriormente ubicadas en *incertae sedis* dentro de los **Pezizomycotina (Ascomycota)**, con 3 especies comúnmente aceptadas (van Beyma 1942; de

ABSTRACT

In these notes, taxonomic, ecological, physiological and molecular aspects are discussed of two opportunistic filamentous fungal species in humans, such as *Tritirachium oryzae* and *Paecilomyces formosus*, little known in its distribution in Chile. While recent literature data concerning the distribution and pathology of the new members of the *Aspergillus* section *Fumigati* contribute, emphasizing the complex *A. viridinutans*, a group of morphologically similar species and generally opportunistic in humans and animals did, which have not been well defined in recent decades.

Hoog 1972; Kirk *et al.* 2008). La especie tipo, obtenida desde raíces muertas de *Yucca treculeana* Carrière, desde Cuba, fue separada de *Verticillium* por Limber (1940), y su nueva nominación genérica se basó en la similitud de su conidióforo geniculado al raquis del trigo (*Triticum*). El género estuvo integrado por otras especies, muchas de ellas actualmente en sinonimia o incluidas en los **Clavicipitaceae** (MacLeod 1954; de Hoog 1972; Kirk *et al.* 2008) y aparentemente, solo se reconocen en la actualidad 6, dos de ellas aún no determinadas (Schell *et al.*, 2011). Estos últimos autores mediante biología molecular con multigenes y 14 aislados, confirmaron que sus linajes no tenían relación con las **Clavicipitaceae** u otros **Ascomycota**, sino con los **Pucciniomycotina** en **Basidiomycota** (en los nuevos taxos: **Tritirachiomycetes, Tritirachiales Tritirachiaceae**), los cuales presentan hifas multinucleadas, poro septal simple, conidióforos subhialinos a dematiaceos, con células conidiógenas simpodiales subhialinas a dematiaceas que se presentan en racimos o desordenadas, con conidios sobre un elongado raquis.

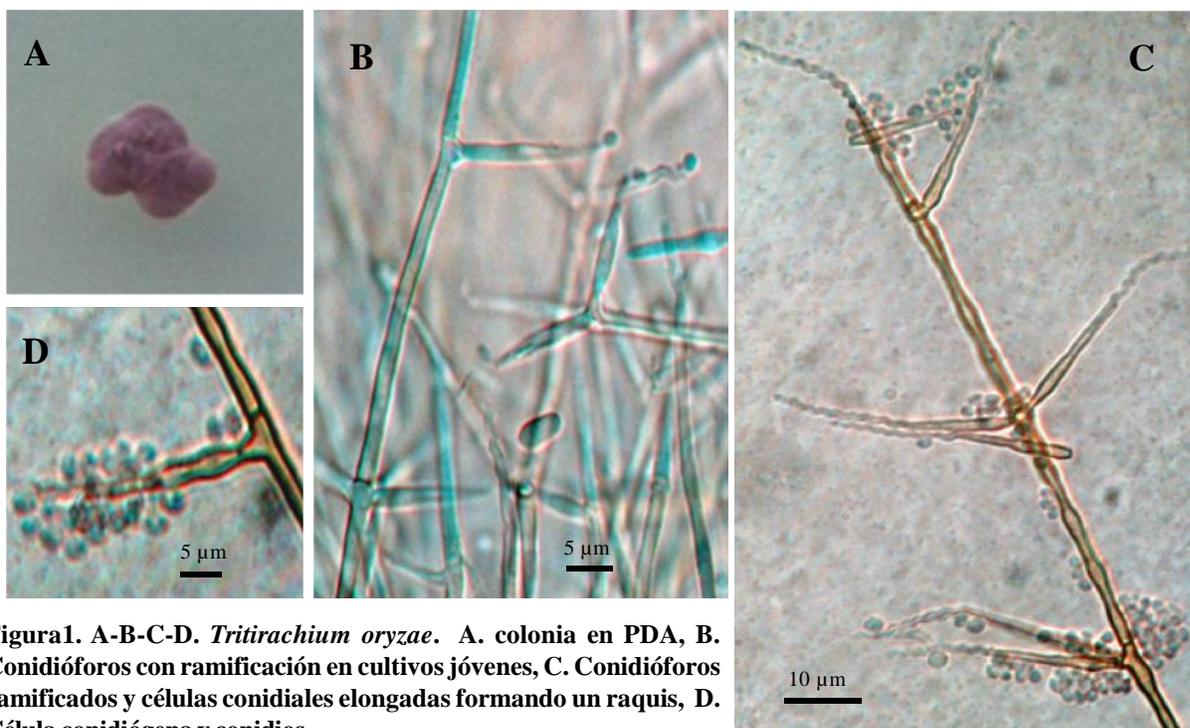


Figura 1. A-B-C-D. *Tritirachium oryzae*. A. colonia en PDA, B. Conidióforos con ramificación en cultivos jóvenes, C. Conidióforos ramificados y células conidiales elongadas formando un raquis, D. Célula conidiógena y conidios.

Teleomorfo desconocido y no descrito en ninguna especie. Shell *et al.* (2011), comentan que la sola identificación con criterios morfológicos es problemática en el taxon y que sus análisis filogenéticos no soportan la circunscripción existente de algunas especies. Reintroducen *T.roseum* por ser su exotipo claramente diferente de los aislados de *T. oryzae*. Concluyen además que la cepa, NRRL 2312, *T. album* Limber (= *Engyodontium álbum* (Limber) de Hoog), muestra por las secuencias de ITS que es un miembro de las **Clavicipitaceae** en congruencia con su clasificación (de Hoog 1972), mientras las secuencias del exotipo de *Tritirachium cinnamomeum*, considerado un miembro de *Nodulisporium* (Xylariales, Ascomycota), indican que pertenece al género *Tritirachium* (de Hoog 1972), Hugues *et al.* (2012), al estudiar molecularmente una especie morfológicamente similar a *Nodulisporium* (*N.cylindroconium*), previamente descrita como '*Tritirachium* sp.', observaron que se agrupaba cerca de *Tritirachium* en los **Pucciniomycotina**, sin embargo, debido a su diferente conidiogénesis, propusieron, el nuevo género ***Paratritirachium***.

Basándose en características macro y microscópicas, las especies más comunes como, *T. dependens* y *T. oryzae*, pueden separarse rápidamente debido a que el primero presenta tonos cafésos y conidióforos frecuentemente ramificados; cada rama termina en un racimo de células conidiógenas simpodiales. Mientras *T. oryzae* tiene colonias generalmente en tonos vináceo-púrpura y conidioforos que se ramifican raramente (van Beyma, 1942, de Hoog 1972, Limber 1940, Mehrotra and Basu 1967). Sin embargo, puede encontrarse una

sobreposición de algunas características morfológicas entre *T. dependens* y *T. cinnamomeum* o entre *T. oryzae* / *T. roseum*, y los conidios de algunas de estas 4 cepas, son bastante similares en tamaño (Schell *et al.* 2011), lo que puede erróneamente colocar el aislado en cualquiera de los 2 grupos.

Las especies de *Tritirachium* no son muy comunes e integran una pequeña parte de la biota fúngica. Es un género relacionado con *Beauveria*, *Engyodontium* y *Aphanocladium* (De Hoog 1972-1973; Gams *et al.* 1984). Sus especies parecen ser saprotrofas, en ambientes diversos así como patógenas de insectos (Pakshir, *et al.*, 2013). Incluso se ha detectado una especie en ambientes marinos (*T. album*) (Wiese *et al.* 2011), mientras *T. oryzae*, se presenta en suelo, aire, vegetación y ambientes internos (Samson 2009), no existe información relacionada a la inhalación de sus conidios y los posibles efectos tóxicos o alérgicos. Se ha detectado en superficies mediante métodos de impresión y muestras de aire cultivables (aparato de Anderson u otros por impacto), sin embargo, como sus esporas no tienen una distintiva morfología en las muestras obtenidas por impacto, se caracterizan como «otros conidios sin color». Se aísla con cierta frecuencia desde papel, yute, textiles, adhesivos, y papeles murales. Su habitat natural es el suelo y material vegetal en descomposición, sin embargo, debido a su capacidad de crecer lentamente a 37°C, (Fig. 1A), raramente se ha reportado en infecciones oportunistas de la cornea (Rodríguez & Laibson 1975), dermatomicosis del cuero cabelludo (Morales *et al.* 2010), así como en onicomycosis Naseri, *et al.*, 2013). No hay mucha información sobre la

capacidad patogénica de los miembros de esta nueva familia **Tritiraciaceae**, salvo la capacidad de *T. album* de producir una serina proteasa. En general las proteasas ejecutan una larga variedad de funciones ya sea a nivel celular como a nivel de órganos, para producir un sistema de cascada, como hemostasis e inflamación y ser responsables de procesos complejos en la fisiología de la célula como también en producir anormales condiciones patofisiológicas (Rao *et al.* 1998).

Nuestro aislado proviene de una muestra de expectoración de una mujer de 48 años, con antecedentes de EPOC y descompensaciones frecuentes durante el último año. Por presentar imágenes radiológicas de probable sobreinfección atípica, se solicitó cultivo de expectoración (positivo) y luego lavado broncoalveolar (en este último no hubo desarrollo del hongo), por lo que se interpretó como una contaminación ambiental.

T. oryzae (*T. roseum* es muy semejante), tiene colonias de colores vináceos-lila pálido (Fig. 1A). El reverso tiene una coloración que varía del rojo café pálido a café rojizo oscuro; olor ausente. El micelio produce conidióforos que tienen ramas laterales con puntas que terminan en zigzag, característicos en el género. Conidioforos y células conidiógenas dematiáceas para todos los aislados, caracterizadas por un fértil y elongado raquis; conidios hialinos (ocasionalmente subhialinos), unicelulares, esféricos a elipsoidales, 2.1–3.3 x 1.6–2.6 µm (media 2.5 x 2.1 µm).

Los conidios de las diferentes especies son también hialinos (ocasionalmente subhialinos), unicelulares y sus medidas son las siguientes: *T. dependens* (holotipo) 2.7–4.0 x 2.2–3.3 µm (media 3.2 x 2.5); *T. dependens* (cultivo) 2.9–4.1 x 1.8–3.2 µm (media 3.3 x 3.2); *T. cinnamomeum* 3.6–5.4 x 2.4–3.4 µm (media 4.2 x 2.9); *T. sp.* (CBS 265.96) 2.4–4.2 x 1.9–3.3 µm (media 3.6 x 2.8); *T. oryzae* 2.1–3.3 x 1.6–2.6 µm (media 2.5 x 2.1). Las dificultades en identificar los aislados basándonos solo en la morfología, se complican por la falta de aislados de las varias especies, mientras *T. oryzae* es la única especie bien representada en las colecciones de cultivos.

Nuestro aislado no difiere mayormente de la descripción de de Hoog (1972), sin embargo, nos interesó su crecimiento lento a 37°C (6–7 mm en 10 días en MEA), colonias de un color violeta pálido (Fig. 1A) y un reverso café vináceo, micelio hialino a cafésoso en el tiempo, con conidióforos angostos de color café, lisos (2–3 µm), con células conidiógenas que se presentan en la parte más apical, dispuestas solitarias a ambos lados y a veces en pequeños racimos de 2–3, en forma verticilada, dilatadas en su base y adelgazándose hacia el ápice formando un raquis geniculado de 25–30 x 1 µm, (Fig. 1D), pero algunos bastante más largos y que presentan en ambos lados conidios hialinos, lisos, de paredes delgadas, subglobosos a elipsoidales, 2–3 (-3,3) x 1,5–3 µm (Fig. 1C). Clamidosporas ausentes. Teleomorfo ausente después de 30 días.

Schell *et al.* (2011), en sus observaciones con el microscopio electrónico de transmisión revelaron la presencia de un poro simple, uniperforado, con ausencia de doliporos y cuerpos Woronin en las hifas de *T. euginum* (una característica de los **Basidiomycetes** en la subdivisión **Pucciniomycotina**).

El diagnóstico molecular de *T. oryzae* puede confirmarse por secuencias de PCR de los espacios de transcripción interna de los genes de DNAr. In vitro los test de susceptibilidad han demostrado su sensibilidad al itraconazol y posaconazol (Naseri *et al.* 2013). Shell *et al.* (2011), en la descripción de los integrantes de la nueva clase **Tritirachiomycetes**, analizaron las regiones de 4 genes (las largas subunidades nucleares, las pequeñas subunidades nucleares, DNA, espacios de regiones de transcripción interna, incluyendo las subunidades 5.8S del DNAr, las subunidades de DNAr y el factor de translación de elongación 1. Además de datos de secuencias adicionales de DNA-directo, RNA polimerasa subunidad II para algunas especies.

Wyk *et al.* (2000), comentan que uno de los métodos fáciles de reconocer, la conidiogénesis simpodial, es siguiendo el brote hacia afuera de un primer conidio apical, donde la célula conidiógena rápidamente se extiende hacia un nuevo punto de crecimiento justo atrás y a un lado del primer conidio, formando un nuevo ápex, el cual se convierte en un nuevo conidio y así sucesivamente hasta repetirse muchas veces en algunos taxos, quedando los conidios adheridos sin ser desplazados por el renovado crecimiento del conidióforo. En estos taxos después de una conidiogénesis repetida, la célula se alarga y presenta una larga cadena de conidios a su alrededor. Cuando los conidios se han desprendido se aprecia la apariencia de un raquis como en *Tritirachium* y *Acrodontium* (Hughes, 1953; de Hoog, 1972; Carmichael *et al.*, 1980; van Wyk *et al.*, 2000)

La nueva especie *Tritirachium egenum* otro biotrófico micosimbionte, fue encontrado creciendo en asociación con *Penicillium rugulosum* (Beguin, 2010), destacándose que entre los hongos micosimbiontes la estrategia nutricional que presenta *T. egenum* es nueva, debido a que no vive en estrecha asociación con el citoplasma de su hospedador. A pesar de no ser un micosimbionte haustorial ni de contacto (los 2 grupos en que se clasifican los endosimbiontes), su estrecha asociación se basa en la utilización de sideróforos, una asociación interfúngica que no ha sido reportada.

Toome & Aime (2011), mencionan que las 6 especies de *Tritirachium* conocidas, son todas anamórficas y se desconoce su estado sexual. La especie tipo *T. dependens* Limber, fue descrita desde raíces muertas de *Yucca treculeana* en Cuba (Limber 1940); la misma especie, fue encontrada subsecuentemente en la pared de un sótano en Bélgica (Beguin 2010; Schell *et al.* 2011). Mientras el rol específico de las especies de *Tritirachium* en el ambiente no se conocen, hay evidencias que *T. dependens* es una

especie potencialmente asociada a las especies de *Penicillium* por la dependencia de ciertos micronutrientes. Dos especies; *T. oryzae* (Vincens) de Hoog y *T. roseum* J.F.H. Beyma, se han aislado como saprotrofos (decomponedores), desde varios ambientes internos, pero también de alguna infecciones superficiales en humanos (Moraes *et al.* 2010; Rodrigues & Laibson, 1975). *Tritirachium cinnamomeum* J.F.H. Beyma, es representado solo por un espécimen, aislado de una mosca en Holanda. Las 2 especies remanentes recientemente identificadas necesitan futuros estudios (Schell *et al.* 2011). La biología de los miembros de este grupo fúngico es aún poco conocida y la importancia sobre su potencial médico se ha estudiado con ciertos detalles.

Según Shell *et al.* (2011), la descripción de *T. eukenum* no parece ser diferente de la descripción de *T. dependens*. Sus análisis de las regiones ITS, muestran que es idéntico a las secuencias de ITS del holotipo, y concluyen que la especie es un sinónimo obligado de *T. dependens*. Historicamente, *T. dependens* y *T. oryzae*, se pueden separar rápidamente mediante caracteres macro-microscópicos.

T. dependens tiene colonias de color en tonos bronceados y sus conidióforos se ramifican frecuentemente y cada rama termina en un racimo verticilado de células conidiógenas simpodiales, mientras la colonia de *T. oryzae* tiene colores en tonos vináceos -púrpura y los conidióforos se ramifican solo raramente (van Beyma, 1942; de Hoog 1972; Limber 1940; Mehrotra & Basu 1967). Además los conidios de *T. dependens* (IHEM 3497), *T. cinnamomeum* y *T. sp.* (CBS 265.96), son más grandes que los de *T. oryzae*, *T. roseum* y *Tritirachium sp.* (CBS 473.93), permitiendo presuntivamente colocar los aislados en uno de estos 2 grupos, sin embargo existe cierta sobreposición de algunas características morfológicas entre *T. dependens* y *T. cinnamomeum* y entre *T. oryzae* y *T. roseum*.

Paecilomyces formosus (Sakag., May. Inoue & Tada) Houbraeken & Samson, *comb. nov.* MycoBank MB512562;

Basionimo. *Monilia formosa* Sakag., May. Inoue & Tada, Zentralbl. Bakteriologie, 2. Abt. 100: 302. 1939.

= *Paecilomyces maximus* C. Ram, Nova Hedwigia 16: 306. 1968.

= *Paecilomyces lecythidis* C. Ram (as *lecythisii*), Nova Hedwigia 16: 307. 1968.

Este hongo presenta colonias de rápido crecimiento en MEA a 25°C, que cubre la mayor parte de la placa en 7 días, de color café pálido y borde blancos (Fig. 2A), reverso café; en MEA a 37°C, menor crecimiento, 50-60 mm en 7 días. Conidióforos ramificados en forma irregular, desordenados, hialinos a levemente cafésosos, filídes en forma de frasco que terminan en un *collula* delgada, 14-

22µm de largo (Fig. 2D). Conidios variables, elipsoidales a cilíndricos, oliva-café, todos con una base trunca 3,2-5,5(-8) x 2-3(-3,5)µm (Fig. 2D recuadro). Clamidosporas abundantes, redondas a piriformes, pigmentadas de color café pálido a oscuro, de paredes gruesas, sobre un corto o largo pedúnculo, muy abundantes en el agar y en la base del micelio aéreo (Fig. 2B-C). En CREA escaso desarrollo pero con producción de ácido bajo la colonia. Temperatura máxima 41-42°C, Al contrario que *P. variotii s. st.* no crece a 45°C.

En la descripción de las clamidosporas en el trabajo de Houbraeken & Samson, (2009), estos autores no presentan una fotografía ni datos de su alta o baja frecuencia en los cultivos. Como nuestra cepa, presentó una enorme producción de estas estructuras que dominaron los cultivos en PDAY MEA sobre la presencia del anamorfo, esta situación, nos hizo dudar si realmente correspondía a esta especie u otra semejante. Por lo cual se envió al CBS para un estudio de biología molecular, el cual confirmó esta especie (CBS-.SP 13.002).

Ram (1968), describe 2 spp. *Paecilomyces lecythidis* y *P. maximus*, en base a sus características de cultivo y el largo de sus conidios. Houbraeken & Samson (2009), en un análisis de las especies de *Byssoschlamys* y sus anamorfos en *Paecilomyces* resistentes al calor, redefinen a *Monilia formosa* como *P. formosus* mediante secuencias de ITS y parte de los genes que codifican proteínas (-tubulina y calmodulina), mostrando que *P. formosus* puede consistir en una especie críptica que incluye, *P. formosus*, *P. lecythidis* y *P. maximus*, indistinguibles morfológicamente. Una de las diferencias entre las spp. que pertenecen a la clade '*P. maximus*' y otros miembros de este diverso grupo, es el rápido crecimiento de esta especie a 37°C más que a 30°C. *P. lecythidis* y *P. maximus*, producen similares perfiles de extrolitos, mientras el exotipo de cultivo de *P. formosus* está degenerado y es un débil productor de extrolitos. Debido a esto, los últimos autores proponen que las 2 primeros taxones deben colocarse en sinonimia con *P. formosus*, hasta que se estudien más especies que permitan una mejor delimitación polifásica.

Es fácil confundir por sus similitudes morfológicas *P. variotii* con *P. formosus* y la diferencia mayor es su consistencia en la producción de ácido en CREA y su temperatura (no crece a 45°C). Houbraeken *et al.* (2010), aplicando los datos taxonómicos más recientes, reanalizaron 34 cepas clínicas aisladas y morfológicamente determinadas como *P. variotii* o *P. lilacinum*. Al emplear la biología molecular en su identificación, mediante secuencias intergénicas de las regiones de espacios de transcripción 1 y 2, incluyendo 5.8S DNAr y una parte del gen de la beta tubulina, pudieron observar que solo 14 cepas correspondían a *P. variotii s. st.*, 11 cepas a *P. formosus*, y 1 cepa a *P. dactylethromorphus*. Lo que sugiere que *P. formosus* es frecuente en muestras clínicas tan comúnmente como *P. variotii s. st.* Incluso la susceptibilidad *in vitro* frente a anfotericina B es similar

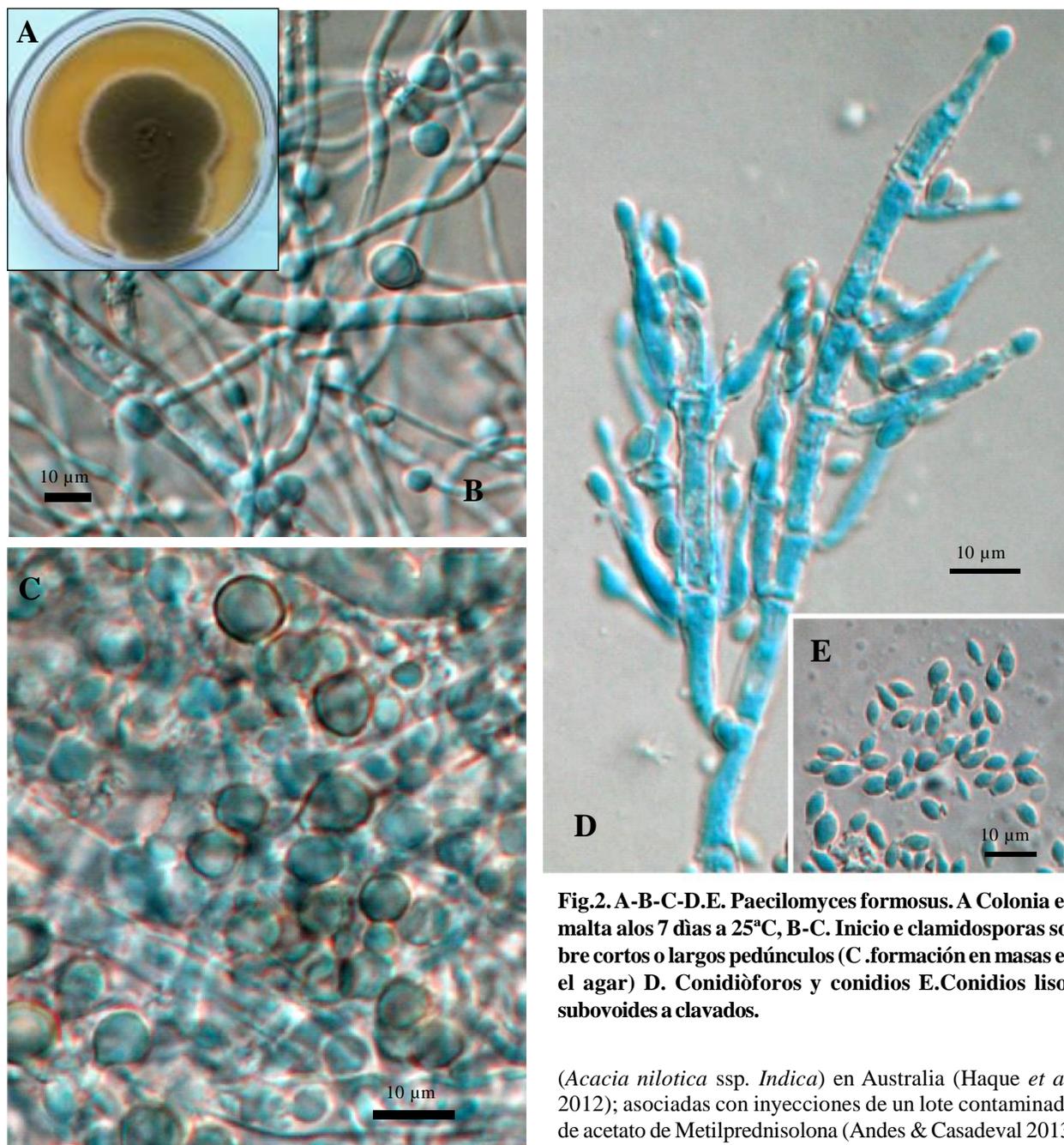


Fig.2. A-B-C-D.E. *Paecilomyces formosus*. A Colonia en malta a los 7 días a 25°C, **B-C.** Inicio e clamidosporas sobre cortos o largos pedúnculos (C. formación en masas en el agar) **D.** Conidióforos y conidios **E.** Conidios lisos subovoideos a clavados.

en estas 3 especies de *Paecilomyces*, mientras *Purpureocillium lilacinus*, *Talaromyces eburneus* y *Hamigera avellanea*, presentan diferentes perfiles de susceptibilidad, siendo activas frente a la flucitosina y el voriconazol. Estos autores destacan la importancia de una correcta identificación a nivel de especie, por su importancia en la terapia antifúngica.

P. formosus se ha aislado desde suelos tropicales y madera, áire, esponjas y el hombre (médula ósea y sangre), en el áire en los dormitorios (Denmark) y en las macetas de plantas de *Senseviera trifasciata* (Dinamarca), desde acacia

(*Acacia nilotica* ssp. *Indica*) en Australia (Haque *et al.* 2012); asociadas con inyecciones de un lote contaminado de acetato de Metilprednisolona (Andes & Casadeval 2013. Nuestro aislamiento, se obtuvo de una muestra de áire en Santiago.

Khan *et al.*, 2012), identificaron una cepa endófito CSH6H de *Paecilomyces formosus* LHL10 en pepino, bajo estrés de salinidad, aplicando análisis filogenético de secuencias similares de ITS. Los resultados revelaron que las interacciones mutualísticas de las fitohormonas secretadas por los hongos endofíticos, pueden mejorar el crecimiento de las plantas y aliviar el efecto adverso del estrés salino pudiendo en el futuro ser usadas para aumentar la productividad agrícola bajo estas condiciones. Al mismo tiempo, descubrieron que los aislados endófitos

de *P. formosus*, producen giberelinas e indol ácido acético. *Byssochlamys* y las relacionadas cepas de *Paecilomyces* se presentan comunmente y se han aislado previamente de varios tipos de alimentos, tales como los pasteurizados y alimentos que contienen sorbatos. La taxonomía de *P. variotii* y especies relacionadas se ha investigado mediante métodos polifásicos con resultados que indican que *Paecilomyces sensu stricto*, incluye nueve especies, cinco de las cuales forman un teleomorfo. *B. fulva*, *B. lagunculariae*, *B. nivea*, *B. spectabilis* y *B. zollerniae*, mientras cuatro son asexuales, llamadas: *P. brunneolus*, *P. divaricatus*, *P. formosus* y *P. dactylethromorphus*. Cada especie, tiene perfiles específicos de extrolitos, además de conocerse sus potenciales en la producción de micotoxinas en cada especie. *Byssochlamys nivea*, produce la micotoxina patulina y el ácido bissoclamico, así como el inmunosupresor ácido micofenólico. Algunas cepas de *P. dactylethromorphus* producen patulina y brefeldina A, mientras *B. spectabilis* (anamorfo= *P. variotii* s.s.) producen viriditoxina. (Houbraken et al., 2013).

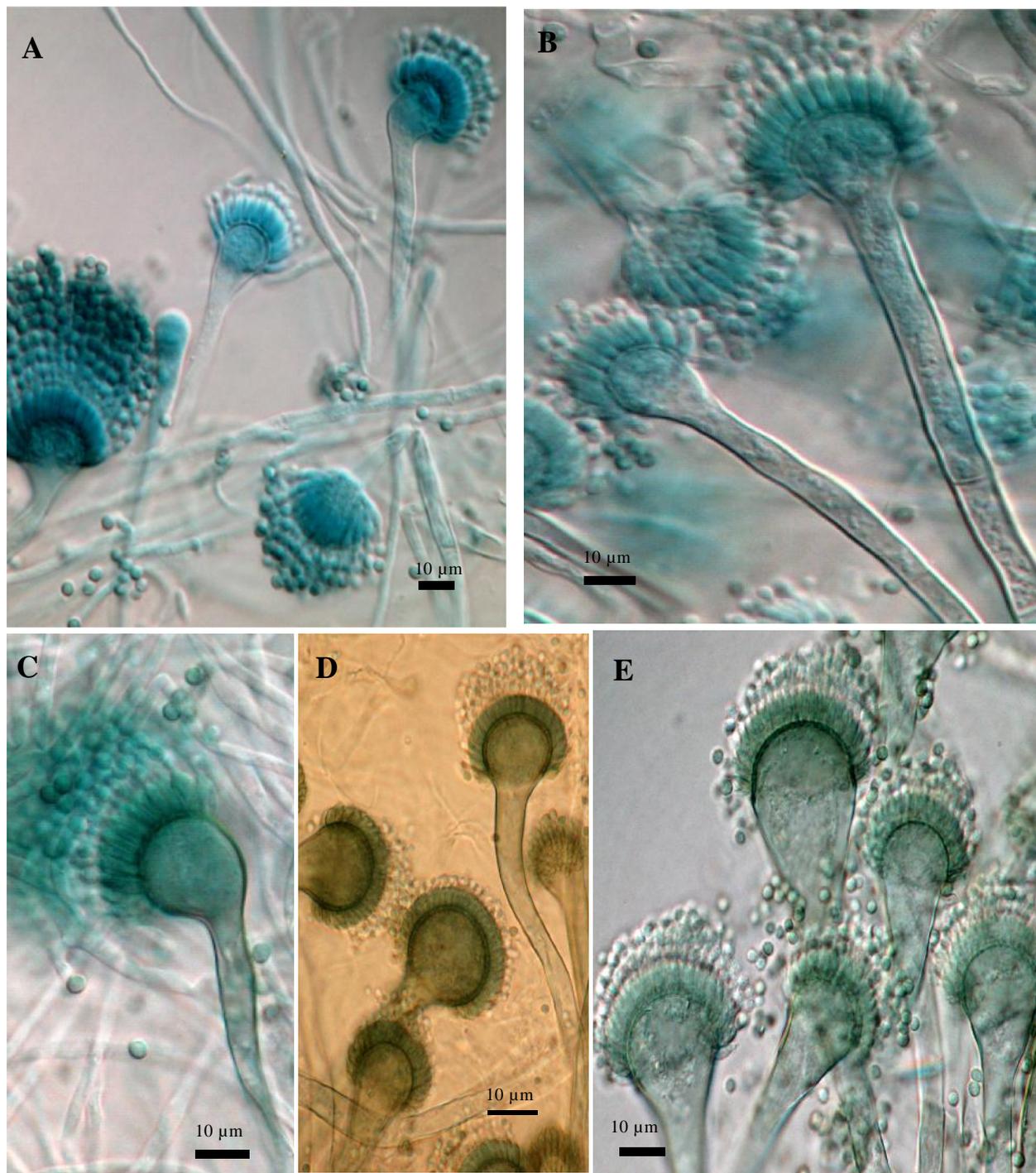
La Sección *Fumigati* de *Aspergillus* con énfasis en el complejo *Aspergillus viridinutans*

La Sección *Fumigati* del género *Aspergillus*, es una de las más abundantes en especies de todas las secciones del género, incluye integrantes de amplia importancia en medicina, farmacología, biotecnología, alimentos, así como en la ecología de los suelos (Balajee et al, 2005; Samson et al, 2006-2007; Domsh et al, 2007; Hong et al, 2008; Hubka et al, 2012). Muchas de sus especies muestran altos niveles de variabilidad intraespecífica y sobreposición de sus estructuras morfológicas, además de sus estrechos parentescos filogenéticos que a menudo se consideran como especies crípticas. Numerosos acercamientos se han propuesto para la taxonomía de esta sección, ya sea en sus estados heterotálicos como homotálicos los cuales se describen en la literatura bajo complejas definiciones de especies (Hong et al., 2005-2008; Samson et al, 2007; Hubka et al, 2012-2013).

Es indudable que esta sección puede incluir aún en el tiempo un indeterminado número de especies o complejos de especies, acorde al aumento del número de aislados clínicos o ambientales analizados en diversas regiones del mundo, sujetos a las variadas presiones ambientales de sus particulares nichos ecológicos. Es una carrera en el tiempo donde los estudios morfológicos y fisiológicos se han sumado a la biología molecular en un campo que esta última ha permitido aumentar el número de integrantes en esta sección a niveles no pensados en el pasado, revolucionado las ciencias y los conceptos de lo que consideramos una especie biológica en Eucariontes. (Taylor et al., 2000; Leslie & Bowden, 2008; Stielow et al, 2011)

Debido a la dominancia de las especies heterotálicas como *A. fumigatus* en los casos de aspergilosis, los datos morfofisiológicos siguen siendo los más empleados en el diagnóstico a nivel de especie en la sección *Fumigati* en los laboratorios de casi todo el mundo, aún en conocimiento de las limitantes, debido a las semejanzas de su fenotipo, con especies estrechamente relacionadas y su limitada utilidad para inferir relaciones filogenéticas entre los integrantes de esta sección (Geiser et al, 1998). Estas situaciones, hacen necesario recurrir para su acercamiento a datos auxiliares fisiológicos (temperatura y crecimiento en medios de cultivos, asimilaciones, extrolitos, etc.) así como la ayuda de la biología molecular. Por el contrario, la inducción de estructuras sexuales, en las especies heterotálicas, en especial las ascosporas, presentan datos muy informativos que han permitido mediante cruza-mientos sistemático de tipos parentales opuestos, descubrir nuevas especies como es el caso del teleomorfo de *A. fumigatus* (= *Neosartorya fumigata*) (O. Gorman et al., 2009), como también en *A. lentulus*, que posee un ciclo sexual funcional recientemente descubierto (Swilaiman et al. 2013), con producción de cleistotecios y ascosporas resistentes al calor, las cuales se producen después de 3 semanas de incubación a 25°C. No podemos dejar de mencionar que existe una amplia variación en la fertilidad de los aislados de esta especie en dependencia del compañero de cruzamiento, similar a las observaciones reportadas en *A. fumigatus* por O'Gorman et al, (2009). Sin embargo, los aislados de *A. lentulus* no se cruzaron con las cepas fértiles de *A. fumigatus*, lo que demuestra un aislamiento reproductivo entre estas especies hermanas. Este nuevo descubrimiento tiene implicaciones significativas en el manejo de la resistencia a drogas y el control de la aspergilosis invasiva en este emergente patógeno.

Si bien es cierto que, *A. fumigatus* sigue siendo el patógeno oportunista dominante y uno entre los más comunes en diversos ambientes (Samson et al., 2007; Klick 2002, Domsch et al, 2007), fue prácticamente la única especie considerada patogénica en humanos y otros animales entre los *Aspergillus* de la sección *Fumigati*. hasta los 2 últimos decenios del siglo 20. En el transcurso del tiempo, nuevas especies con capacidades oportunistas o saprotrofas se descubrieron en la sección, varias de ellas mediante nuevos aislamientos o reidentificaciones de colecciones de cultivos mediante métodos moleculares (Peterson, 1992-2008; Hubka, 2011), Entre ellas podemos mencionar: *Aspergillus fischerianus* (= *Neosartorya fischeri*), *Aspergillus thermomutatus* (= *Neosartorya pseudofischeri*), *A. lentulus*, descrito como patógeno relacionado con *A. fumigatus*, *A. novofumigatus*, *A. udagawae* (= *N. udagawae*) y el complejo *A. viridinutans* (Samson et al, (2006) Balajee et al. 2005a-b -2007; Montenegro et al, 2009; Vinh, et al, 2009; Peláez et al, 2013), *Aspergillus felis* (Barrs et al., 2013; Novakova et al. 2013), *Aspergillus aureolus* y *A. wyomingensis*



Figuras 3. A. *Aspergillus udagawae*, conidióforos derechos y con vesículas en ángulo, ocasionalmente presentes, conidios, **B.** *Aspergillus A. fumigatiaffinis*, conidióforos y conidios. **C.** *Aspergillus felis*, cabeza conidial y conidios, **D-E.** *Aspergillus fumigatus*, conidios y conidióforos, mostrando en D cambios morfológicos en sus vesículas .

(Novakova *et al.* 2013). *Aspergillus waksmanii* y *Aspergillus marvanovae* (Hubka *et al.* 2013).

A. fumigatus es variable en su macro y micro-morfología y no es fácil separarlo de otras especies

relacionadas solo en base a morfología (vea fig. 3 d), sin embargo, como comenta Samson *et al.*, (2006) los conidios y conidióforos de *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis* y *A. novofumigatus*, usualmente poseen vesículas globosas,

mientras *A. fumigatus* se caracteriza por tener usualmente vesículas subclavadas (Fig. 3E). Debido a esta variabilidad fenotípica, los errores en la identificación de las especies dentro de la sección *Fumigati* se han reportado frecuentemente en clínica. *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. thermomutatus*, (= *Neosartorya pseudofischeri*), *A. hiratsukae* (= *N. hiratsukae*) y *A. udagawae* (= *N. udagawae*), se reportan frecuentemente como *A. fumigatus*. Hong *et al.* (2010), revisando 146 cepas de *A. fumigatus* de todo el mundo (que incluyeron más de un 65% de muestras clínicas), un 95.8% fueron identificadas como *A. fumigatus* s. st., 2.1% como *A. lentulus*, y 3 como: *A. viridinutans*, *A. udagawae* y *A. nishimurae* (= *N. nishimurae*), lo que demuestra que la sola morfología o fisiología, no siempre puede llegar a una correcta identificación en *A. fumigatus* (Balajee *et al.*, 2005a-2006- 2009; Serrano *et al.*, 2011).

Muchos aislados hetero y homotáticos de la sección, semejan fuertemente *A. fumigatus*, pero demuestran un crecimiento lento a 37°C o una baja esporulación en los cultivos y no crecen generalmente a 50 °C, pero si a 47°, 45°C o solo hasta 42°C, como es el caso específico de *A. udagawae*, que es capaz de crecer a 10°C pero no puede crecer a más de 42°C y sus conidios necesitan un largo período de incubación para germinar a 37°C. Esto sugiere que son más susceptibles al ataque de los neutrófilos y al peróxido de nitrógeno, lo que disminuye su virulencia y permite apreciar la sutil distinción causada por estas 2 especies. *A. fumigatus*, por el contrario es capaz de crecer hasta 55°C pero no a 10°C, y sus conidios germinan rápidamente (Sugui *et al.*, 2010). Sin embargo, mediante análisis de secuencias de multilocus, estos integrantes pueden semejarse fenotípicamente a varias especies relacionadas con *A. fumigatus*, pero filogenéticamente son distintas.

En el estudio considerado clásico en biología molecular con el empleo de múltiples genes, Yaguchi *et al.* (2007), demostraron que las especies dentro de la sección *Fumigati* aisladas de especímenes clínicos en Japón, pueden ser divididas en 5 clados. El clado **I**: incluye las típicas cepas de *A. fumigatus* y las especies en sinonimia (vea Samson *et al.*, 2007), el clado **II**, incluye *A. lentulus* y *A. fumisynnematus* (Horie *et al.* 1993); el clado **III**, incluye *A. fumigatiaffinis* y *A. novofumigatus*; el clado **IV**, incluye *A. viridinutans* y especies estrechamente relacionadas (Katz *et al.* 1998; Varga *et al.* 2000) y el clado **V**, *A. brevipes*, *A. duricaulis* y *A. unilateralis*. Como es de esperar, la mayoría de las especies integraron el clado **I**, seguido del clado **II** y **IV**. Al mismo tiempo se analizó la correlación entre morfología, máxima temperatura de crecimiento y concentración inhibitoria mínima frente a los agentes antifúngicos, así como su filogenia dentro de la sección *Fumigati*, mientras la microscopía electrónica demostró que la ornamentación de los conidios de los aislados que pertenecen al clado **I** y **V** puede tener una forma lobada-reticulada (Kozakiewicz 1989), los integrantes de la especie

críptica *A. viridinutans*, son intermediarios entre lobado-reticulados y microtuberculados. Todas las cepas en el clado **II** y los 6 aislados variables que se presentaron en el clado **IV**, tienen conidios con ornamentación microtuberculada. Estos autores encontraron además que estas 6 cepas están estrechamente relacionadas con *A. udagawae* (= *N. udagawae*), sin embargo, los cruzamientos entre estas cepas no se presentaron en el tiempo, debido quizás a la dificultad de emplear rutinariamente subcultivos, pero puede también asociarse a que esta especie posea una decreciente habilidad de producir ascomas fértiles, como sucede con *A. fumigatus* (O'Gorman *et al.* 2009). Al mismo tiempo, las máximas temperaturas de crecimientos, también fueron investigadas en los clados **I**, **II**, **III**, **IV** y **V**, las cuales fueron 50 °C, 45 °C, 45 °C, 42 °C y 42 °C, respectivamente, lo que indica que estos datos fisiológicos pueden ser útiles en la clasificación de las especies actuales o por describir dentro de la sección *Fumigati* de *Aspergillus*, como es el caso de las 2 nuevas especies: *Aspergillus waksmanii* y *Aspergillus marvanovae*, que crecen a 47°C (Hubka *et al.*, 2013). Esta misma situación que emplea la temperatura, se corrobora en el trabajo anterior de Balajee *et al.*, (2007).

En referencia a la especie críptica *A. viridinutans*, originalmente denominada solo como *A. viridinutans*, pero integrada por aislados morfológicamente similares, que no fueron bien definidos hasta el principio de este nuevo siglo. Esta especie críptica, fue aislada de excrementos de conejo en Australia (McLennan, *et al.*, 1957) y posteriormente desde varios tipos de suelo, incluyendo los semidesérticos de sud América o los dañados después de la minería del carbón en USA, como también los reportados desde análisis retrospectivos de colecciones de cultivos en varias partes del mundo, (Vargas *et al.*, 2000; Piontelli *et al.* 2000; Eltem *et al.* 2004; Yaguchi *et al.* 2007; Alcazar-Fuoli *et al.* 2008; Giusiano *et al.* 2013 en revision), resaltando que varios de sus integrantes se han aislados como oportunistas en humanos. (Vinh *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Shigeyasu *et al.*, 2012; Peláez *et al.* 2013). Se destaca que la micromorfología del complejo es variable, en relación a sus conidios y sus conidióforos, especialmente en la presencia de sus vesículas en ángulo ('nodding appearance'), una situación que no es exclusiva del complejo como comenta Nováková *et al.*, (2013), debido a que se observa en otros representantes de la sección *Fumigati* como: *A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. marvanovae*, *A. unilateralis*, *A. thermomutatus* (= *Neosartorya pseudofischeri*) y las 2 nuevas especies recientemente descritas *A. brevistipitatus* y *A. conversis* (Nováková *et al.*, (2013). Vargas *et al.* 2000, lo consideró un carácter morfológico distintivo para la identificación de las especies dentro de los *Aspergillus* de la sección *Fumigati*; por el contrario, para Balajee *et al.* (2006), su sola presencia no es un carácter determinante sin la asociación de mayores datos fisiológicos y moleculares. En el complejo *A. viridinutans*, la descripción de sus integrantes en base a

morfología es altamente variable en los aislados presuntivamente asignados. Éstos pueden presentar colonias de crecimiento relativamente rápido en 7 días en CYA25°C y MEA, Todas crecen relativamente bien a 37°C en CREA, salvo *A. viridinutans* s.st. (18-21mm) y en general, no todas producen ácido. Su temperatura máxima oscila entre los 42°C y 45°C.

En relación a las especies integrantes (*A. viridinutans* s.st. lo hace solo hasta 42°C y parece ser una especie poco común, solo aislada en Australia), las colonias son de un color verde grisáceo, de esporulación limitada desde abundante micelio aéreo, reverso en CYA incoloro, amarillo a levemente café; cabezas columnares con conidióforos derechos o sinuosos generalmente sobre los 60-100 µm, que nacen del micelio aéreo, a veces con presencia de algunos septos, vesículas clavadas, en forma de frasco a subglobosas, generalmente menores de 20 µm, algunas desviadas notoriamente en ángulo (Fig.3D); conidios globosos a subglobosos, delicadamente rugosos a lisos, 2-3 µm. Vargas *et al.* (2000), detectaron una variabilidad intraespecífica de los integrantes del complejo *A. viridinutans* al emplear técnicas morfológicas, fuentes carbonadas, análisis de restricción de enzimas de mitocondrias, DNA nuclear y secuencias de B-tubulina. Determinaron además, que la distancia genética entre las cepas de *A. viridinutans*, *A. aureoluteus* (= *N. aureola*) y *A. udagawae* (= *N. udagawae*), pertenecen a un mismo grupo, una situación que se confirma también en *A. felis* (Barrs *et al.* 2013).

En cuanto a la patología humana de los *Aspergillus* de esta sección, excluyendo a *A. fumigatus* y en referencia especial al complejo *A. viridinutans*, Vinh *et al.* (2009), demostraron que esta especie puede causar distintas formas de aspergilosis, caracterizada por cronicidad, propensión a la dispersión de manera contagiosa entre diversos planos anatómicos, y un comportamiento refractario frente a los antimicóticos. Por el contrario, la aspergilosis invasora afecta pacientes neutropénicos sometidos a quimioterapia o pacientes trasplantados, actuando típicamente como una enfermedad aguda con predilección por la angioinvasión y la diseminación hematogena. Presentan una respuesta exitosa frente a los antimicóticos, generalmente entre las 6 semanas de tratamiento (Wingard *et al.*, 2008), Sin embargo, las infecciones por el complejo *A. viridinutans* en 2 pacientes con una inmunodeficiencia primaria, sugieren que este fenómeno clínico refleja una inherente estructura patogénica del hongo, más que una manifestación debida a un específico defecto inmune, situación ya demostrada en otra especie relacionada cládicamente como *A. udagawae*, en pacientes con una enfermedad como la granulomatosis crónica o la mielodisplasia (Vihn *et al.*, 2009b.). Esto sugiere diferencias patogénicas entre los subgrupos dentro de la sección *Fumigati* y debido a esto, la identificación genotípica de estos hongos miméticos de

A. fumigatus, pueden tener implicaciones en el curso clínico de la enfermedad así como en su manejo.

Barrs *et al.* (2013), describen en gatos domésticos una rinosinusitis invasiva fúngica y una aspergilosis invasiva diseminada en un perro, así como una nueva especie heterotálica en el complejo *A. viridinutans* que denominan *A. felis* (anamorfo de neosartorya), donde las enfermedades en ambos hospedadores fueron a menudo refractarias a la terapia agresiva clásica antifúngica (Itraconazol, Variconazol). *A. felis* es un hongo heterotálico con un total ciclo reproductivo funcional (sexual) confirmado por análisis de cruzamientos que inducen el teleomorfo en 7-10 días in vitro con germinación de ascosporas, además, tiene la máxima capacidad de crecer hasta 45°C, y a menos de 20°C, lo que lo separa de *A. fumigatus* (> 50°C) y de *A. viridinutans* s. st. y *A. udagawae*, que tiene un límite a los 42°C (Yaguchi *et al.* 2007; Sugui *et al.*, 2010). La rinosinusitis fúngica en gatos domésticos, puede deberse también a varias especies como: *A. fumigatus*, *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. thermomutans* y *A. fumigatiaffinis*, todas con un alto CIM a múltiples antifúngicos (Anfotericina B y Voriconazol). Estas especies, se han descrito también en humanos como resistentes a todos los azoles. (Balaje *et al.* 2009; Alcazar-Fuoli *et al.* 2008; Peláez *et al.* 2013). En contraste, la mayoría de estas especies tienen bajo CIM frente al Posaconazol. Es importante el estudio de más aislados para entender mejor la susceptibilidad in vitro de las diferentes especies dentro de la sección *Fumigati* (Balajee *et al.*, 2009).

Otros casos de aspergilosis invasora se han presentado en pacientes con leucemia por especies crípticas de *Aspergillus*, donde se aisló: *A. novofumigatus* y *Aspergillus viridinutans* (Peláez *et al.* 2013). Shigeyasu *et al.* (2012), describen un primer caso de queratitis causado por *A. viridinutans*, con manifestaciones clínicas distintas a las de *A. fumigatus*, las cuales incluían resistencia clínica a la anfotericina B y el voriconazol, con baja susceptibilidad a otros agentes fúngicos. Barrs *et al.* (2013) y Nováková *et al.* (2013), demostraron que los casos humanos de aspergilosis invasiva diagnosticados como *A. viridinutans* por: Coehlo *et al.* 2011; Yaguchi *et al.* 2007; Alcazar-Fuoli, *et al.* 2008; Vinh *et al.* 2009; Barrs *et al.* 2012-2013; Shigeyasu *et al.* 2012; Peláez *et al.* 2013, entre otros), corresponden a *A. felis*, lo que demuestra el aumento de esta especie en clínica junto a *A. udagawae* (Katz *et al.* 2005; Balajee *et al.* 2006; Vinh *et al.* 2009b; Yaguchi *et al.* 2007; Kano *et al.* 2008; Balajee *et al.* 2009; Posteraro *et al.* 2011; Gyotoku *et al.* 2012; Kano *et al.* 2013).

Desde el punto de vista Molecular, el nivel de discriminación entre las especies de la sección *Fumigati* (y algunas otras secciones del género) es relativamente baja en las ITS, pero se considera el estándar y pueden trabajarse (Serrano *et al.* 2011; Jurjevic *et al.* 2012;

Nováková *et al.*, 2012; Peterson, 2012). Como las ITS no permiten distinguir estos aislados entre sí (Alcazar-Fuoli *et al.* 2008), las secuencias de β -tubulina y calmodulina, o los genes de *rodlet A*, permiten la identificación de todos ellos y en especial pueden diferenciar los aislados atípicos de *A. fumigatus* (Balajee *et al.* 2005- 2007; Hong *et al.* 2005; Samson *et al.* 2007; Vinh *et al.* 2009; Serrano *et al.* 2011), en especial los integrantes del complejo *A. viridinutans*, considerados desde más de una década en la literatura con extremas diferencias en la variación de secuencias de DNA (Katz *et al.* 1998-2005; Vargas *et al.* 2000; Yaguchi *et al.* 2007).

Recientemente, Nováková *et al.* (2013), analizaron el complejo mediante 2 diferentes métodos de identificación: PCR (datos de secuencias de β -tubulina (*benA*) y genes de calmodulina (*caM*), macro y micromorfología (microscopía electrónica óptica y escaner), temperaturas máxima de crecimiento y experimentos de cruzamiento. Estos últimos ensayos, junto a los análisis filogenéticos y morfología de las ascosporas, sugieren la presencia de 5 especies en el complejo *A. viridinutans*: *A. aureolus* (= *Neosartorya aureola*), la única especie homotática. *A. felis*, *A. udagawae* (= *N. udagawae*) y *A. wyomingensis* sp. nov. son heterotáticas, todas con su teleomorfo distinguible. *A. viridinutans* s. st. parece ser una especie muy rara, representada solo por su exotipo de aislamiento, donde su locus MAT1-1 fue amplificado. *A. viridinutans* y *A. aureolus* fueron tipificados en concordancia con las reglas del nuevo código botánico con las descripciones completas de sus 5 integrantes, aportando además una clave dicotómica para este complejo, que reproducimos aquí con mayores datos. Sin embargo, su empleo requiere de cepas compatibles en las especies heterotáticas para su cruzamiento, lo que complica su uso, siendo necesarios siempre recurrir a los datos moleculares (vea : Nováková *et al.*, 2013).

- 1.- Cultivos homotáticos**, ascosporas lenticulares (4)4,5-5 μ m, con dos crestas ecuatoriales bien separadas (1-1,5 μ m de ancho), equinuladas a tuberculadas, conidios ampliamente subglobosos, delicadamente rugosos, 2,1-2,8 μ m, crece a 42°C, no a 45°C, CREA 28-43 mm, débil producción de ácido bajo las colonias, Ehrlich negativo..... *A. aureolus* Fennel & Raper
- Cultivos heterotáticos o anamórficos** **2**
- 2.- Colonias en MEA después de 7 días a 25°C < de 35mm**: conidióforos en MEA < 120 μ m, conidios globosos a subglobosos, 2-2,8 μ m, t° máxima 42°C, CREA 18-21 mm, sin producción de ácido, Ehrlich negativo.....
- *A. viridinutans* Ducker & Thrower
- Colonias en MEA > de 35mm**; al menos algunos conidióforos En MEA > de 120 μ m **3**

- 3.- Ascosporas sin crestas ecuatoriales o con pequeñas crestas** < 0,2 μ m, conidios subglobosos, delicadamente rugosos, 1,7-2,8 (-3.3) μ m, t° máxima 42°C, restringida a 45°C, solo algunos aislados (16 mm), CREA 46-50 mm, producción de ácido fuerte o solo bajo la colonia, Ehrlich negativo
- *A. wyomingensis* A. Nováková, Dudová & Hubka
- Ascosporas con 2 crestas ecuatoriales claramente distinguibles** (> 0,5 μ m de ancho)..... **4**
- 4.- Crestas ecuatoriales mas angostas que 1 μ m**, conidios subglobosos a elipsoides, lisos, 2,4-3,2 μ m, t° máxima 42°C, algunos aislamientos crecen lento a 45°C (7mm), CREA 46-50mm, sin producción de ácido en algunos aislados, a muy fuerte producción en otros, Ehrlich negativo.....
- *A. udagawae* Horie, Miyaji & Nishim.
- Crestas ecuatoriales más anchas, que 1 μ m**, conidios ampliamente subglobosos, delicadamente rugosos, 2,3-2,8 μ m, CREA 40-55 mm, sin ácido, Ehrlich negativo a violeta muy pálido... *A. felis* Barrs, van Doorn, Vargas & Samson.

Estos autores pudieron observar otras especies que fueron tipificadas fuera del complejo *A. viridinutans*, aisladas desde terrenos reutilizables después de la minería del carbón (Wiomung U.S.A), tales como: *A. fumigati* *affinis* y *A. lentulus* como también 2 especies hermanas, *A. brevistipitatus* sp. nov. y *A. conversis* sp. nov., muy relacionadas entre sí y entre *A. papuensis* (= *N. papuensis*). Ambas nuevas especies son distantes filogenéticamente de todas las especies anamórficas y se parecen a *A. brevipes*, *A. duricaulis* y *A. unilateralis* en su micromorfología, sin embargo, se distinguen entre ellas, por el lento crecimiento de *A. conversis* en todos los medios estudiados. Como dato interesante, estos autores no encontraron ningún aislado de *A. fumigatus* s. str., usualmente reportado como el dominante en el suelo.

REFERENCIAS

- Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E.; Alastruey-Izquierdo, A.; Cuenca-Estrella, M.; Rodríguez-Tudela, J.L. (2008). *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.*; 52:1244-51. DOI: 10.1128/AAC.00942-07
- Andes, D. & Casadevall, A. (2013). Insights into fungal pathogenesis from the iatrogenic epidemic of *Exserohilum rostratum* fungal meningitis. *Fungal Genet. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.014>
- Balajee, A.; Gribskov, J.; Brandt, M. *et al.*, (2005a). Mistaken Identity: *Neosartorya pseudoüscheri* and Its Anamorph Masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 43:5996-5999
- Balajee, S.A.; Gribskov, J.L.; Hanley, E.; Nickle, D.; Marr, K.A. (2005b). *Aspergillus lentulus* sp nov, a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4:635-632

- Balajee, A.S.; Nickle, D.; Varga, J. & Marr, A.K. (2006). Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of *Aspergillus fumigatus* by Morphotyping. *Eukaryotic*. 5:1705. DOI: 10.1705-1712.
- Balajee, S.A.; Houbraken, J.; Verweij, P.E.; Hong, S.B., Yaguchi, T.; Varga, J. et al. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud. Mycol.* 59:39-46
- Balajee, S.A. et al., (2009). Molecular Identification of *Aspergillus* Species Collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J. Clin. Microbiol.* 47:3138-3141
- Barrs, R.V.; van Doorn, M.T.; Houbraken, J. et al., (2013). *Aspergillus felis* sp. nov., an Emerging Agent of Invasive Aspergillosis in Humans, Cats, and Dogs. *PLOS ONE* 8(6): e64871. doi:10.1371/journal.pone.0064871
- Beguín, H. (2010). *Tritirachium egenum*, a thiamine- and siderophore-auxotrophic fungal species isolated from *Penicillium rugulosum*. *FEMS Microbiology Ecology* 74:165-173
- Beguín, H.; Pyck, N. & Detandt, M. (2012). *Tritirachium*, a hyphomycetous genus belonging to the Basidiomycota. *Nova Hedwigia*, 94:139-152
- Carmichael, J.W.; Kendrick, W.B.; Connors, I.L.; Sigler, L. (1980) Genera of Hyphomycetes. Univ Alberta Press. Edmonton.
- Coelho, D.; Silva, S.; Vale-Silva, L.; Gomes, H. et al. (2011). *Aspergillus viridinutans*: an agent of adult chronic invasive aspergillosis. *Med Mycol* 49:755-759
- de Hoog, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud Mycol* 1:1-41
- de Hoog, G.S. (1973). Additional notes on *Tritirachium*. *Persoonia* 7:437-441
- Del Ponte, Emerson. et al. (2013). Composition of the *Fusarium graminearum* species complex populations in wheat cropping environments in Southern Brazil. *Agricultural Research Service (Abstrat)*.
- Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.H. (2007) Compendium of soil fungi, 2nd edn. IHW-Verlag, Eching
- Eltem, R. et al., (2004). Colonial and Morphological Characteristics of Some *Aspergillus* Fr.:Fr. Species Isolated from Vineyards in Manisa and Üzmir Provinces (Turkey). *Turk J. Bot.* 28:287-29
- Gams, W., de Hoog, S.G. & Samson, R.A. (1984). The Hyphomycete genus *Engyodontium* a link between *Verticillium* and *Aphanocladium*. *Persoonia*. 12:135-147
- Geiser, D. M.; Frisvad, J.C. & Taylor, J. W. (1998). Evolutionary relationships in *Aspergillus* section Fumigati inferred from partial beta-tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia* 90:831-845
- Giusiano, G.; Piontelli, E.; Mangiaterra, M.; Fernández, M.; Cattana, M.E.; Kocsubé, S.; Varga, J. (2014). Biodiversity of species of *Aspergillus* section Fumigati in semi-desert soils in Argentina. (En revisión Fungal Diversity)
- Guarro, J.; Gené, J. & Stchigel, M.A. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol.* 12:454-500
- Gyotoku, H.; Izumikawa, K.; Ikeda, H. et al. (2012) A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol* 50:631-636
- Haque, A. et al. (2012). A preliminary investigation of prickly acacia dieback (*Acacia nilotica* ssp. *indica*). Eighteenth Australasian Weeds Conference.
- Hong, S.B.; Go, S.J.; Shin, H.D. et al. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97:1316-1329
- Hong, S.B.; Shin, H.D.; Frisvad, J.C. et al. (2008). New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section Fumigati. *Antonie Leewenhoek* 93: 87-98
- Hong, S.-B. et al., (2010). Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato based on a new concept of species delimitation. *J. Microbiol.* 48:607-615
- Horie, Y.; Miyaji, M.; Nishimura, K.; Taguchi, H.; Udagawa, S. (1993). *Aspergillus fumisynnematus*, a new species from Venezuelan soil. *Transactions of the Mycological Society Japan* 34:33-37
- Houbraken, J.; Verweij, E.P.; Rijs, J. M. M.J. A.; Borman, M.A. & Samson, R.A. (2010). Identification of *Paecilomyces variotii* in Clinical Samples and Settings. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 2754-2761
- Houbraken, J.; Frisvad, J. & Samson, R.A. (2013). Taxonomic review of food relevant *Paecilomyces variotii* and related species. The ICFM workshop: Food Mycology in a Globalized World, Challenges and Solutions to the Safety of Food, Germany June 3 to 5
- Hubka, V.; Kubatova, A.; Mallatova, N. et al. (2012). Rare and new aetiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular sequencing. *Med. Mycol.* 50:601-610
- Hubka, V.; Peterson, W.S.; Frisvad, C.J. et al. (2013). *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section Fumigati. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:783-789
- Hughes, S. (1953). Conidia conidiophores and classification. *Can. J. Bot.* 31:577-659
- Hugues, B.; Pyck, N. & Detandt, M. (2012). *Tritirachium*, a hyphomycetous genus belonging to the Basidiomycota. *Nova Hedwigia*, 94:139-152
- Jurjevic, Z.; Peterson, S. W. & Horn, B. W. (2012). *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* 3, 59-79
- Kano, R.; Itamoto, K.; Okuda, M.; Inokuma, H.; Hasegawa, A.; Balajee, A. (2008). Isolation of *Aspergillus udagawae* from a fatal case of feline orbital aspergillosis. *Mycoses*. 51:360-361
- Kano, R.; Shibahashi, A.; Fujino, Y. et al. (2013). Two cases of feline orbital aspergillosis due to *Aspergillus udagawae* and *A. viridinutans*. *J. Vet. Med. Sci.* 75:7-10
- Katz, M.E.; McLeon, M.; Burrows, S. & Cheetham, F.B. (1998). Extreme DNA sequence in isolates of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 20:283-288
- Katz, M.E.; Dougall, A.M.; Weeks, K.; Cheetham, B.F. (2005). Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 43:551-555.
- Khan, A.I.; Hamayun, M.; Kang, Sang-Mo, et al. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic

- acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10 Khan et al. BMC Microbiology 12:3
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A.** (2008). Dictionary of the Fungi. 10th ed. Oxon, UK: CAB International. 771 p.
- Klich, M.A.** (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. Mycologia 94:21-27
- Kozakiewicz, Z.** (1989). *Aspergillus* species in stored products. Mycological Papers 161:1-188
- Kwon-Chung, J.K.; Janyce, A. & Sugui, A.-J.** (2009) Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? Trends in Microbiology 17:481-487
- Leslie, J.F. & Bowden, L.** (2008). *Fusarium graminearum*: When species concept collide. Cereal Research Communication 36:609-615
- Limber, D.P.** (1940). A new form genus of the Moniliaceae. Mycologia 32:23-30
- Lonial, S.; Williams, L.; Carrum, G.; Ostrowski, M.; McCarthy, P. Jr.** (1997). *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogeneic bone marrow transplant patient. Bone Marrow Transplant. 19:753-5. PubMed PMID: 9156256
- MacLeod, D.M.** (1954). Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. Can J Bot 32:818-890
- McNeill, J.; Barrie, F.R.; Buck, W.R.; Demoulin, V, et al.,** (2012). International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code): adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Koeltz Scientific Books, Koenigstein
- McLennan, E.I.; Tucker, S.C. & Thrower, L.B.** (1954). New soil fungi from Australian heathland: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spiegazzinia*. Australian Journal of Botany. 2:355-64.
- Montenegro, G.; Puch, S.S.; Jewtuchowicz, V.M.; Piñón, M.V.; Relloso, S, et al.** (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. J. Med. Microbiol. 58:391-395.
- Moraes, R.N.; Ribeiro, M.C.; Nogueira, M.C.; Cunha, K.C.; et al.** (2010). First report of *Tritirachium oryzae* infection of human scalp. Mycopathologia 169:257-259
- Naseri, A.; Fata, A.; Javad, M. & Najafzadeh, M.J.** (2013). First Case of *Tritirachium oryzae* as Agent of Onychomycosis and Its Susceptibility to Antifungal Drugs. Mycopathologia 176:119-122
- Nováková, A, et al.,** (2013). New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (U.S.A.) and revision of *A. viridinutans* complex Fungal Diversity. DOI 10.1007/s13225-013-0262-5
- Nováková, A.; Hubka, V.; Saiz-Jimenez, C. & Kolarik, M.** (2012). *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov., two species in section Usti from Spanish caves. Int J Syst Evol Microbiol 62:2778-2785
- O’Gorman, C.M.; Fuller, H.T.; Dyer, P.S.** (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature 457:471-474
- Pakshir, K.; Rahimi, G.M.; Zomorodian, K. & Reza, G. A.** (2013). Isolation and Molecular Identification of Keratinophilic Fungi from Public Parks Soil in Shiraz, Iran. BioMed. Research International, Article ID 619576, 5 pages, doi:10.1155/2013/619576
- Peláez, T.; Alvarez-Perez, S.; Mellado, E.; Serrano, D.; Valerio, M. et al.** (2013). Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia. J. Med. Microbiol. 62:474-478
- Peterson, S.W.** (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia 100:205-226
- Peterson, S.W.** (1992) *Neosartorya pseudofischeri* sp nov. and its relationship to other species in *Aspergillus* section Fumigati. Mycolog Res 1992; 96:547-554.
- Peterson, S. W.** (2012). *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? Appl Microbiol Biotechnol .95:339-344
- Peterson, W.S.** (2013). Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. Mycologia 2013 105:912-937
- Piontelli, E.** (2000) Notas Micológicas IV: Nuevos registros de hongos mitospóricos de suelos Chilenos. Boletín Micológico 15:93-99
- Posteraro, B.; Mattei, R.; Trivella, F. et al.** (2011). An uncommon *Neosartoria* udagawa fungus a causative agent of severe conical infection. J. Clin. Microbiol. 49:2357-60
- Ram, C.** (1968). Timber-attacking fungi from the state of Maranhao, Brazil; Some new species of *Paecilomyces* and its perfect state *Byssoschlamys*. Westl. VIII. Nova Hedwigia 16:305-314
- Rao, B.M.; Tanksale, M.A.; Ghatge, S.M. & Deshpande, V.V.** (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Molec. Biol. Reviews. Sept. 597-635
- Rodrigues, M.M. & Laibson, P.** (1975). Exogenous corneal ulcer caused by *Tritirachium roseum*. Am.J.Ophthalmol. 80:804-806
- Samson, R.A.; Hong, S.-B. & Frisvald, J.C.** (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. Medical Mycology 44:S133-S148
- Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J** (2007) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. Studies in Mycology 59:147-203
- Samson, R. A.; Houbraken, J.; Varga, J. & Frisvad, J.C.** (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. Persoonia 22:14-27
- Samson, R.A.** (2009). Indoor fungi and climate change. s3-eu-west1.amazonaws.com/aspergillus-conference-eslides/education-overflow/Samson.pdf.
- Schell, A.W.; Lee, G.A. M. & Aime, C.M.** (2011). A new lineage in Pucciniomycotina: class Tritirachiomycetes, order Tritirachiales, family Tritirachiaceae. doi:10.3852/10-333
- Swilaimann, S.S.; O’Gorman, M.C.; Balajee, A.S & Dyer, S.P.** (2013). Discovery of a Sexual Cycle in *Aspergillus lentulus*, a Close Relative of *A. fumigatus*. Eukaryotic Cell. 12 : 962-969
- Serrano, R.; Gusmão, L.; Amorim, A. & Araujo, R.** (2011). Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section Fumigati. BMC Microbiology 11:82-87

- Stielow, B.; Bratek, Z.; Orczán, A.K.I.; Rudnoy, S.; Hensel G, et al.** (2011) Species Delimitation in Taxonomically Difficult Fungi: The Case of *Hymenogaster*. PLOS ONE 6(1):e15614. doi:10.1371/journal.pone.0015614
- Shigeyasu, C.; Yamada, M.; Nakamura, N.; Mizuno, Y.; Sato, T.; Yaguchi, T.** (2012) Keratomycosis caused by *Aspergillus viridinutans*: and *Aspergillus fumigatus*-resembling mold presenting distinct clinical and antifungal susceptibility patterns. Med. Mycol. 50:525-528
- Sugui, A.J.; Vinh C.D. & Nardone, G. et al.,** (2010). *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an Emerging Agent of Aspergillosis: How Different Is It from *Aspergillus fumigatus*? J. Clin. Microbiol. 48:220-228
- Swilaiman, S.S.; O'Gorman, M.C.; Arunmozhi S.; Balajee, S.A.; Dyera, S.P.** (2013). Discovery of a Sexual Cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. Eukaryotic Cell 12:962-969
- Taylor, W.J. et al.** (2000). Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. Fungal Genetics and Biology 31:21-32
- Toome, Merje. & Aime, M.C.** (2011). Tritirachiomycetes. Tritirachiales, Tritirachiaceae. Version 22 November 2011 (under construction). <http://tolweb.org/Tritirachiomycetes/147934/2011.11.22> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Vinh, C.D.; Shea, R. Y.; Jones, A.P. et al.** (2009). Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. Emerg. Inf. Disease. 15:1292-1294
- Vinh, D.C.; Shea, Y.R.; Sugui, J. et al.,** (2009b). Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. Clin. Infect. Dis. 49:102-111
- Van Beyma, Thoe. & Kingma, F.H.** (1942). Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Nederland) VII. Mitteilung. Antonie van Leeuwenhoek 8:105-122.
- van Wyk, P.S.; Wingfield, M.J. & Kendrick, B.** (2000). Analysis of conidiogenesis: helical conidiotaxis in percurrently extending conidiogenous cell. South African J. of Sciences. 96:580-583
- Varga, J.; Tóth, B.; Rigó, K.; Debets, F.; Kozakiewicz, Z.** (2000). Genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. Folia Microbiol (Praha) 45:423-8. DOI:10.1007/BF02817615
- Wiese, J. et al.,** (2011). Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites Mar. Drugs 9:561-585
- Wingard, J.R.; Ribaud, P.; Schlamm, H.T. & Herbrecht, R.** (2008). Changes in causes of death over time after treatment for invasive aspergillosis. Cancer. 112:2309-2312.
- Wyk, S.P. van.; Wingfield, M.J. & Kendrick, B.** (2000). Analysis of conidiogenesis helical conidiotaxis in percurrently extending conidiogenous cell. South African J. of Sci. 96:580-583
- Yaguchi, T.; Horie, Y.; Tanaka, R.; Matsuzawa, T.; Ito, J, et al.** (2007) Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* Section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. Jap. J. Med. Mycol. 48:37-46

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.