

ASPECTOS MORFOLOGICOS Y MOLECULARES (ITS-rDNA) EN ESPECIES DEL GENERO *Ulocladium* DE SUELOS DESERTICOS: ENFASIS EN EL GRUPO *U. atrum*.

(Morphological and molecular aspects (ITSrDNA) in species of genus *Ulocladium* collected from desertic soils: Emphasis in *U. atrum* group)

E. Vásquez *, E. Piontelli ** & F.González***

*Universidad de Valparaíso, Facultad de Farmacia,

** Escuela de Medicina, Cátedra de Micología,

*** Escuela de Medicina, Cátedra de Biología Molecular.
Casilla 92 V, Valparaíso, Chile.

Palabras clave: *Ulocladium* spp. *U. atrum* grupo, morfología, biología molecular.

Key words: *Ulocladium* spp. *U. atrum* group, morphology, molecular biology.

RESUMEN

En este estudio, se empleó la morfología y la biología molecular como herramientas taxonómicas, para corroborar su aplicabilidad en 38 cepas del género *Ulocladium* Preuss, obtenidas de zonas cercanas al Salar de Atacama, entre altitudes de 2.200 a 4.500 m.s.n.m y clasificadas morfológicamente con anterioridad a nuestra investigación bajo la nominación de: *U.alternariae*, *U.atrum*, *U.botrytis*, *U.chartarum*, *U.consortiale* y *U.tuberculatum*. En todas ellas se aplicaron 2 protocolos: **a)** extracción de DNA, amplificación con 2 partidores para ITS, y digestión con las enzimas *HinfI* y *Rsa I* para ver su aplicabilidad en la separación de las especies, y **b)** para los representantes del taxon *U.atrum* (especie dominante), se analizó la conidiogénesis de 15 cepas en cultivo con agar papa zanahoria, en fases tempranas y tardías de su crecimiento, según lo descrito por Simmons (1998), que considera a esta especie como un grupo posible de separar en cuatro nuevos taxa.

En los estudios del genotipo, la electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de digestión, no presentaron patrones de migración que permitieran distinguir molecularmente las 6 especies en estudio ni separar a los integrantes del grupo *U.atrum*, pero los análisis morfológicos de este grupo, representaron ecotipos con ciertas características distintivas, con una población de dimensiones conidiales más reducidas, globosas a subglobosas en sus formas juveniles y tardías, además ciertos integrantes pueden considerarse como nuevos morfotipos.

Dentro del grupo, *U.atrum* s.str., fue representado mayoritariamente, una cepa correspondió a *U. multiforme* y otra se consideró fuera del grupo (*U. chartarum*).

ABSTRACT

Morphology and molecular biology were used in this paper as taxonomic tools to corroborate their application in 38 strains of the genus *Ulocladium* Preuss, collected from 2,200 to 4,500 m. high-sites near to the Salar of Atacama and which had been morphologically classified previous to our research under the names of: *U. alternariae*, *U. atrum*, *U. botrytis*, *U. chartarum*, *U. consortiale* and *U. tuberculatum*. Two protocols were employed in all of them :**a)** DNA extraction, amplification with 2 primers for the ITS and digestion through *HinfI* and *Rsa I* enzymes to detect its application in the separation of species and **b)** in the case of the *U. atrum* taxon representation (dominant species), the conidiogenesis of 15 strains under an agar potato carrot culture was analysed, in the early and late stages of their growth as described by Simmons (1998), who considers this species a liable group to be subdivided into four new taxa.

As to the genotype studies, the electrophoresis of digestion products in polyacrilamide gel did not reveal any migration patterns that made it possible to distinguish in a molecular form the 6 species under survey nor separate

the elements of the *U. atrum* group, yet morphological analysis of the latter did represent ecotypes having certain distinct characteristics, with a population showing more reduced conidial dimensions, globose to subglobose shapes in their juvenile and late stages together with the fact that some of their components may be considered as new morphotypes. Within the group, *U. atrum* s. str. had the major representation, a strain corresponding to *U. multifforme* while the other was thought to be outside the group (*U. chartarum*).

INTRODUCCION

En los estudios taxonómicos fúngicos, la morfología es la herramienta fundamental en la identificación de géneros y especies, sin embargo, suelen presentarse casos donde las similitudes del fenotipo no permiten una correcta identificación de los taxa. En las 2 últimas décadas, las técnicas moleculares como RFLP y PCR, han permitido analizar sitios polimórficos del genotipo entre los que destacan las secuencias de transcripción interna (ITSrDNA), transformándose en una herramienta de gran utilidad en la filogenia y la delimitación de especies en estos microorganismos.

En investigaciones sobre hongos queratino-fílicos de suelos desérticos del norte chileno, Piontelli *et al.* (2002), observaron entre los 2.200 y 4.500 m de altura, una dominancia de las especies fúngicas del género *Ulocladium* (23,3 %) y en particular de *U. atrum* (13,1 %). Debido a que las especies del género presentan ciertas similitudes morfológicas al crecer en cultivos, se propuso realizar nuevos estudios de su fenotipo y genotipo, principalmente en la especie *U. atrum*, que permitieran una mejor delimitación o corroboraran las determinaciones basadas en la morfología.

El género *Ulocladium* se considera como un taxa anamórfico que se incluye dentro del Phylum *Asco-mycota* afín al Orden *Pleosporales*, Familia *Pleosporaceae*.

Es un género filamentosos cuyos integrantes son mayoritariamente de vida saprofítica, algunos débiles patógenos oportunistas en vegetales y animales (Simmons, 1990; De Hoog *et al.*, 2000). Su distribución cosmopolita le permite colonizar diversos hábitats tanto naturales, como antrópicos: es un habitante común del suelo, plantas muertas, alimentos en descomposición y derivados celulósicos. Como dematiáceo, está adaptado para resistir alta radiación UV, soportar amplitudes térmicas y muy baja humedad, en un hábitat principalmente desértico (Christensen, 1981; Piontelli *et al.*, 2002).

El género está compuesto por varias especies dentro de las cuales se encuentra *U. atrum*, que representa

una de las más comunes. Simmons (1998), en un estudio reciente en cepas del hemisferio norte, considera esta especie como un grupo de fenotipos o complex que puede subdividirse en cuatro especies: *U. dauci*, *U. curcubitae*, *U. multifforme* y *U. atrum*. Esta clasificación se basa principalmente en los aspectos conidiogénicos en estadios tempranos de desarrollo (1 a 3 días de cultivo). Después de 7 días las cepas igualan su morfología y ya no es posible identificarlas como especies separadas y sólo se identifican como *U. atrum* grupo. En el presente trabajo se contrastó morfológica y genéticamente los cambios en las especies chilenas, que probablemente podrían representar ecotipos diferentes debido a su localización geográfica.

Las especies de *Ulocladium* son una potencial fuente de moléculas bioactivas donde *U. atrum* en particular, junto a *Alternaria*, *Epicoccum* y *Scytilidium*, se consideran biocontroladores de *Botrytis* sp, un hongo fitopatógeno que afecta a más de doscientas especies frutales especialmente *Vitis vinifera* (Köhl *et al.*, 1995).

Algunas de las características morfológicas de *Ulocladium* spp. son compartidas por *Alternaria*, un género genéticamente similar, por lo que su distinción microscópica se dificulta por el amplio espectro de su morfología conidial (Hoog & Horré, 2002), debido a lo cual en el pasado ambos se incluyeron erróneamente dentro del mismo género (Simmons, 1967). Para dar solución a estos problemas, se han empleado en las dos últimas décadas, técnicas moleculares que permiten estudios comparativos de la variabilidad de secuencias de ácidos nucleicos, aportando nuevas herramientas para la identificación y estudios evolutivos de estos microorganismos (Mendoza, 1998; Pryor & Gilbertson, 2000; Craus, *et al.*, 2001; Weir & Blackwell, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Hoog & Horré, 2002).

En la micología, ha sido de gran utilidad el estudio de distintos sectores de DNA entre los que destacan los ITS, las IGS (espaciadores intergenéticos), y los genes que codifican para el factor de elongación, las subunidades de quitinasa, las proteínas Beta-tubulina, calmodulina y la enzima ácido norsolínico reductasa, entre otros (Liu *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2000; Chaverri, *et al.*, 2001; Mata *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001). Por ello se propuso a las ITSrDNA como blanco de estudio en las especies de este género. Sin embargo, los investigadores no han logrado su diferenciación total, debido a que sus secuencias nucleotídicas son casi idénticas (Slippers *et al.*, 2000; Bakkeren *et al.*, 2000). Pese a ello consideramos que las cepas chilenas pueden presentar cierta particularidad debido a su localización geográfica y ambiente ecológico.

Esta investigación tiene como objetivo distinguir morfológica y genéticamente las especies del grupo *U. atrum* y en lo posible confirmar molecularmente, en todos

no han logrado su diferenciación total, debido a que sus secuencias nucleotídicas son casi idénticas (Slippers *et al.*, 2000; Bakkeren *et al.*, 2000). Pese a ello consideramos que las cepas chilenas pueden presentar cierta particularidad debido a su localización geográfica y ambiente ecológico.

Esta investigación tiene como objetivo distinguir morfológica y genéticamente las especies del grupo *U. atrum* y en lo posible confirmar molecularmente, en todos los integrantes del género analizados, la anterior clasificación fenotípica.

MATERIALES Y METODOS

1.- Obtención de las cepas.

Se emplearon 38 cepas del género *Ulocladium* colectadas desde suelos cercanos al salar de Atacama y San Pedro de Atacama en el año 2000, entre altitudes de 2.200 a 4.500 m de altura, clasificadas y mantenidas en el cepario del Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso (Piontelli *et al.*, 2002) (Tabla 1).

2.- Análisis morfológico de las especies del grupo *U. atrum*

a) Cultivo.

Basándose en el trabajo de Simmons (1998), se consideraron aspectos morfológicos del crecimiento conidial de 15 cepas pertenecientes al grupo *U. atrum*, las que se cultivaron en placas de Petri de 5 cm de diámetro por siete días, en condiciones estandarizadas de crecimiento, en agar papa zanahoria (APZ), a temperatura ambiente (20–23 °C) y un ciclo lumínico natural de aproximadamente 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, durante 7 días.

b) Aspectos morfológicos

A partir de cada cepa, se realizaron preparaciones teñidas con lactofenol y azul de algodón al tercer y séptimo días, registrándose entre los conidios más frecuentes (mínimo 30) su largo, ancho, tipo de septación, forma y presencia de cadenas.

Para el análisis de distribución de patrones de desarrollo juvenil y maduro de los conidios se consideraron tres patrones de forma, como se muestran en la Figura 1: (1) esferoides (globosos y subglobosos), (2) elipsoides (incluye a todos aquellos conidios de forma elíptica y subelíptica) y (3) obpiriformes.

c) Presencia de conidios en cadena en el grupo *U. atrum*

Se observó por luz transmitida bajo el objetivo de 10x del microscopio, la presencia o ausencia de cadenas cortas (dos o tres conidios), tanto a los 3 como a

Tabla 1: Listado de las cepas de *Ulocladium* empleadas y sus altitudes de aislamiento.

Especies	No.	Altura (m)
<i>U. atrum</i>	1	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	2	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	3	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	4	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	5	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	6	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	7	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	8	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	9	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	10	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	12	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	13	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	14	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	15	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	16	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	17	2.000 – 3.000
<i>U. chartarum</i>	18	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	19	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	20	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	21	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	22	3.000 – 4.000
<i>U. atrum</i>	23	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	24	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	25	2.000 – 3.000
<i>U. consortiale</i>	26	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	27	2.000 – 3.000
<i>U. atrum</i>	28	sobre 4000
<i>U. atrum</i>	29	2.000 – 3.000
<i>U. alternariae</i>	30	2.000 – 3.000
<i>U. botrytis</i>	31	2.000 – 3.000
<i>U. botrytis</i>	32	2.000 – 3.000
<i>U. tuberculatum</i>	33	3.000 – 4.000
<i>U. tuberculatum</i>	34	2.000 – 3.000
<i>U. tuberculatum</i>	35	2.000 – 3.000
<i>U. botrytis</i>	36	2.000 – 3.000
<i>U. botrytis</i>	37	2.000 – 3.000
<i>U. tuberculatum</i>	38	2.000 – 3.000

los 7 días para cada una de las cepas. Para valorar su ausencia o presencia se observaron 10 campos diferentes del cultivo. La presencia de cadenas de conidios en 1 ó 2 campos se consideró como accidental y negativo y sobre los 3 campos, positivo.

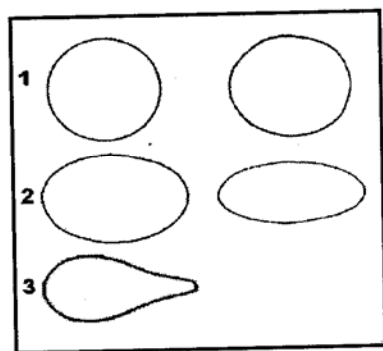


Figura 1 : Morfología de los conidios del grupo *U. atrum*

d) Tratamiento estadístico

Para analizar los resultados de la morfometría de conidios juveniles y maduros se aplicó el test de Student (95% de confianza).

3.- Análisis genético

a) Extracción de DNA

Se seleccionaron métodos de aislamiento de DNA, en base a la factibilidad de entregar mayor cantidad e integridad de este ácido nucleico para cada cepa (Chiocchetti et al., 1999; Liu et al., 2000; Jaeger et al., 2002). Se evaluó el rendimiento de la extracción y la concentración de proteínas contaminantes midiendo las absorbancias a 260 y 280 nm y por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%. El método escogido, denominado en este trabajo como Liu modificado, aplica el siguiente tratamiento a cada muestra: maceración por 10 min a temperatura ambiente en un mortero estéril con 500 µL de una solución de lisis compuesta por: Tris-HCl 400 mM de pH 8,0 (para inhibir la actividad de las DNasas nativas), ácido etilendiaminotetraacético (E.D.T.A.) 60 mM (para quelar cationes divalentes requeridos por las DNasas), NaCl 150 mM (para estabilizar los ácidos nucleicos) y para solubilizar y denaturar tanto membranas como proteínas, el detergente aniónico dodecilsulfosuccinato de sodio (SDS) al 1%.

Luego de la homogeneización se adicionaron 150 µL de una solución de pH 8,0 compuesta de 11% ácido acético glacial, y 60% de acetato de sodio 5M. Se llevó a cabo agitación en vórtex por 10 segundos y se centrifugó a 12.000 r.p.m. por 1 min.

El sobrenadante es transferido a un nuevo tubo estéril agregando un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 12.000 r.p.m. por dos minutos descartándose el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se efectuó una última centrifugación, esta vez a 10.000 r.p.m. por 1 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó al aire por 5 min. Finalmente el DNA fue resuspen-

dido en 50 µL de solución TE-PCR (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM de pH 8,0).

Para determinar la concentración de DNA y la relación DNA/proteínas, se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 260 nm y 280 nm de diluciones 1:10 y 1:100 de cada extracto.

b) PCR

Las secuencias completas de las ITSrDNA (580 -600 pb) de *U.alternariae*, *U.atrum*, *U.botrytis* y *U.chartarum*, fueron obtenidas en un banco de genes (Tabla 2) (Pryor & Gillbertson, 2000) y comparadas empleando el software DNAssist versión 1.02, mediante el cual se determinó la zona más variable entre ellas constituyéndose en el blanco de amplificación (156 - 158 pb). Para amplificar esta zona, se diseñaron dos partidores específicos cuyas secuencias se detallan en la Tabla 3.

Amplificaciones mediante PCR: 5 µL de extracto purificado se combinaron con 0,2 mM de cada dideoxinucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), MgCl 25 mM, una unidad de la enzima termorresistente taq polimerasa, tampón, agua y 10 µM de cada primer. Finalmente las muestras fueron cubiertas con aceite mineral para evitar su evaporación.

Las PCR se efectuaron bajo el siguiente programa de amplificación: denaturación inicial (3' a 94 °C) seguido de 30 ciclos de denaturación (30'' a 94 °C), alineamiento (30'' a 55 °C) y extensión (30'' a 72 °C). La reacción concluye con una extensión final (7' a 72 °C).

c) Observación de la amplificación

Cinco µL de cada muestra amplificada se corrieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE 1x a 100 volts por 40 - 50' y se observó el tamaño de los productos amplificados en un transiluminador con lámpara U.V. de emisión a 302 nm.

d) RFLP

Las secuencias de los productos de PCR de las distintas especies de *Ulocladium* fueron comparadas

Tabla 2. Número de acceso a las secuencias ITSrDNA analizadas en este trabajo

Especie fungica	Número de acceso
<i>U. alternariae</i>	AF229485
<i>U. atrum</i>	AF229486
<i>U. botrytis</i>	AF229487
<i>U. chartarum</i>	AF229488

empleando el software DNAssist versión 1.02. Mediante este programa se generaron los mapas de restricción de cada enzima y se designaron las enzimas Hinf I (sitio de corte: G /ANTC, N: A, C, G ó T) y Rsa I (sitio de corte: GT /AC) debido a que son las que generarían fragmentos de distinto tamaño en todas las especies del género.

Primero se realizaron digestiones con sólo una endonucleasa. Para ello cada producto amplificado de cepas de *Ulocladium* se trató de la siguiente manera: 10 µL del producto amplificado fueron introducidos en un tubo libre de DNasa con 1,5 µL de buffer suministrado por el fabricante (para Rsa I: tampón tris - acetato 33 mM y pH 9,0, acetato de potasio 66 mM y 0,1 mg/mL de BSA; para Hinf I: tampón tris - HCl 10 mM y pH 8,5, cloruro de magnesio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM), más 2,5 unidades de endonucleasa, y se completa un volumen final de 15µL con agua bidestilada estéril (para digestiones con Rsa I) y agua más 0,15µL de BSA (10µg/µL) para digestiones con Hinf I. Las muestras se incubaron a 37 °C por 1,5 h, luego fueron enfriadas y se corrió electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones denaturantes (Urea 7M en TBE 0,5%).

Debido a que ambas enzimas presentan compatibilidad de tampón, fue posible emplearlas simultáneamente sin modificar los componentes del tampón. Para realizar digestiones con ambas enzimas, las reacciones se llevaron a cabo del siguiente modo: 10 µL del producto amplificado más 1,5 µL de tampón de Hinf I, 2,5 unidades de cada nucleasa, 0,6 µL de agua bidestilada estéril y 0,15 µL de BSA (10 µg/µL). El procedimiento continúa de manera idéntica a la digestión con una sola enzima.

d) Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Para visualizar las diferencias de los productos de RFLP se empleó electroforesis en gel de poliacrilamida ya que la trama de sus polímeros presenta un nivel de entrecruzamiento mucho mayor que el gel de agarosa y por lo tanto es más efectivo para separar fragmentos de DNA de menor tamaño.

Cada electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo del siguiente modo: a 5µL de los productos de RFLP se agregaron 3 µL de tampón de carga denaturante (2x) y se denaturó a 90 °C por 5'. Inmediatamente las muestras fueron cargadas en el gel en tampón TBE al 0,5%. La electroforesis se efectuó a 50 °C y 75 watts por 1h. Una vez finalizada, el gel se lavó con agua destilada, se fijó con etanol al 10% por 5', el DNA se redujo con HNO₃ al 1% por 5', se tñió con nitrato de plata al 0,2% por 30', se reveló con carbonato de sodio al 3% más 1,5mL de formaldehído hasta la aparición de las bandas y se detuvo la reacción de revelado con ácido acético al 10% por 5'. Cada paso fue precedido de lavado con agua destilada.

Tabla 3. Secuencia de partidores

Partidor	Secuencia nucleotídica
UITSu	(5') AGG GAT CAT TAC ACA ATA TGA AAG (3')
UITsd	(5') TTA CTG ACG CTG ATT GCA ATT AC (3')

RESULTADOS

1.- Estudio morfológico en el grupo *U. atrum*

Las características de los conidios más frecuentes de las 15 cepas estudiadas cuantificadas por forma, largo, ancho y número de septos longitudinales y transversales, se muestran en la tabla 4. La relación largo/ancho (L/A) promedio para cada cepa, constituye una medida de la tendencia a la esfericidad. Esta tendencia es mayor a medida que la L/A se acerca a 1,0 e indica el grado de esfericidad de los integrantes del grupo *U. atrum*. Estos resultados revelan que, en estadios tempranos los conidios tienen fundamentalmente formas elipsoides y obpiriformes (presentan mayor número de septos y mayor relación L/A). Ambas variables disminuyen casi sin excepción a los siete días de cultivo, debido a un aumento de la tendencia a la esfericidad, característica del grupo en edad adulta (Figura 2).

La microscopía de los conidios indica que 13 de las cepas estudiadas correspondieron a las especies *U. atrum sensu stricto*, aunque con una morfometría de menores dimensiones a las indicadas por la literatura, además 2 de ellas presentaron conidios predominantemente globosos a subglobosos (cepa 10 y 23), lisos a levemente rugosos en sus estadios juveniles y maduros, con una superficie brillante bajo la lupa estereoscópica (mientras en las demás era opaca). De las cepas restantes, una correspondió a *U. multiforme* y una fuera del grupo (*U. chartarum*). En la Figura 3, recuadros 1 y 2 se destacan las formas conidiales reconocidas.

Las muestras analizadas se dividen claramente en dos grupos en base al índice de esfericidad, determinado por el porcentaje de conidios esferoides presentes a los tres días de cultivo.

La mitad de las cepas (Grupo 1), presentaron conidios esferoides a subglobosos, en cantidades que oscilaron desde el 7 al 49% del total examinado y las otras 7 cepas (Grupo 2) en porcentajes mayores, desde un 51 al 91% (Tabla 4). A pesar que las formas elipsoidales se observaron, éstas fueron mayoritarias sólo en algunos integrantes del Grupo 1 como se muestra en las fotografías (Figura 4a) salvo en la cepa 5 que las presentó mayoritariamente y las cepas 3, 7 y 24 que prácticamente pre-

Tabla 4: mediciones realizadas a los conidios de *U. atrum* a los 3 y 7 días de cultivo ($\pm 0,5 \mu\text{m}$)

Cepas	Día de obs.	Ancho promedio (μm)	Largo promedio (μm)	Septos horizontales	Relación largo/ancho (μm)	% conidios esferoides a los 3 días de cultivo
GRUPO 1	01 3	11,35	20,90	1-3	1,84	32
	01 7	12,95	16,75	1-3	1,29	48
	02 3	10,45	21,45	1-3	2,05	29
	02 7	12,75	17,10	1-2	1,34	36
	03 3	11,95	17,55	1-2	1,49	46
	03 7	12,65	15,35	1-2	1,21	60
	05 3	10,20	19,75	1-3	1,94	7
	05 7	12,81	15,52	1-3	1,21	66
	07 3	13,61	19,89	1-2	1,46	46
	07 7	13,50	15,50	1-2	1,15	67
	21 3	11,30	16,95	1-2	1,50	36
	21 7	12,30	16,00	1-2	1,30	64
GRUPO 2	24 3	13,40	17,05	1-2	1,27	49
	24 7	13,25	14,95	1-2	1,13	83
	04 3	11,50	17,94	1-3	1,56	64
	04 7	13,10	16,95	1-2	1,29	49
	10 3	15,50	16,10	1-2	1,04	91
	10 7	14,20	15,50	1-2	1,09	90
	19 3	13,85	21,80	1-3	1,57	51
	19 7	14,05	19,20	1-3	1,37	55
	20 3	13,94	18,53	1-3	1,33	56
	20 7	14,26	18,71	1-2	1,50	37
	23 3	12,30	14,90	1-4	1,21	72
	23 7	12,50	14,20	1-2	1,14	92
	25 3	14,90	18,95	1-4	1,27	86
	25 7	13,70	16,50	1-2	1,20	64
	29 3	13,86	16,46	1-2	1,19	61
	29 7	14,00	16,80	1-2	1,20	63

sentaron una proporción casi igual de elípticas y subglobosas. Además la rugosidad de las paredes de los conidios fue siempre bastante conspicua en los estados tempranos del crecimiento en ambos grupos acentuándose en el tiempo, pero presentando también variaciones, especialmente en las cepas 10 y 23 que en los primeros días fueron prácticamente lisas o poco rugosas y las cepas 19 y 24 fueron muy rugosas a tuberculadas desde sus inicios.

El cambio en puntos porcentuales de la población de conidios esferoides fue evaluado y el gráfico se muestra en la Figura 5. El Grupo 1 (en la Figura corresponde al estrato inferior) es estadísticamente distinto del Grupo 2 (estrato superior) con $p < 0,05$.

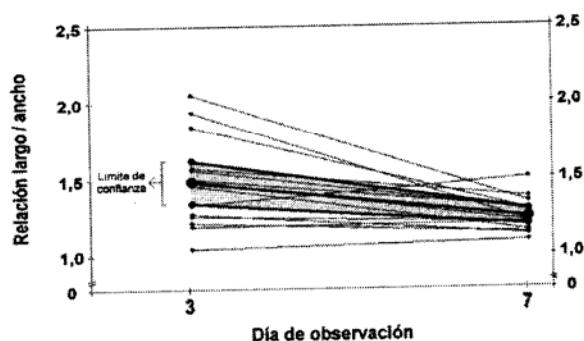


Figura 2: Relación largo/ancho promedio a los 3 y 7 días de cultivo. El área sombreada (delimitada por promedio $\pm t_{95}$ x desviación estándar) refleja la tendencia esferoide de los conidios al aumentar los días de cultivo.

2.- Estudio genético inter-especies

Luego de ensayar los cinco protocolos de extracción de DNA fúngico previamente descritos en cuatro cepas de hongos, se comparó la concentración de DNA, su relación DNA/proteínas (Figura 6) y la integridad del DNA extraído. El método de Liu modificado no sólo entrega mayor cantidad de DNA al medio, sino una mejor relación DNA/proteínas. Por lo cual se empleó para la extracción de DNA en las restantes 34 cepas de *Ulocladium*.

Los productos de amplificación obtenidos experimentalmente fueron del tamaño esperado (158-160 pb) para *U. atrum*, *U. botrytis*, *U. chartarum*, *U. tuberculatum* y *U. consortiale* (Figura 7). Sin embargo, en la especie *U. alternariae* se ha descrito la presencia de un indel de 32 pb que experimentalmente no fue observado. Para diferenciar las otras especies, se llevaron a cabo digestiones con las enzimas de restricción Hinf I y Rsa I. El complemento entre las digestiones individuales y conjuntas de Hinf I y Rsa I, no permitió generar segmentos de distinto tamaño para todas las especies, apreciables en

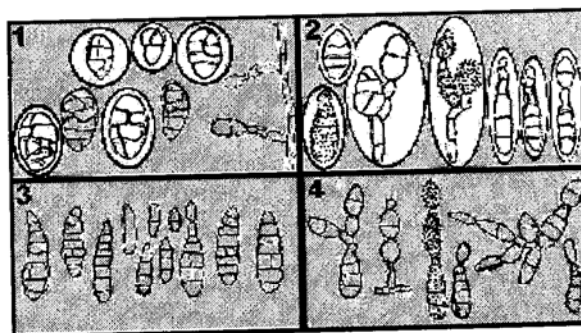


Figura 3.- Conidios juveniles del grupo *U. atrum* descritos por Simmons(1998). *U. atrum* (1), *U. multifforme* (2), *U. curcubitae* (3), *U. dauci* (4). En blanco los conidios reconocidos en las cepas analizadas.

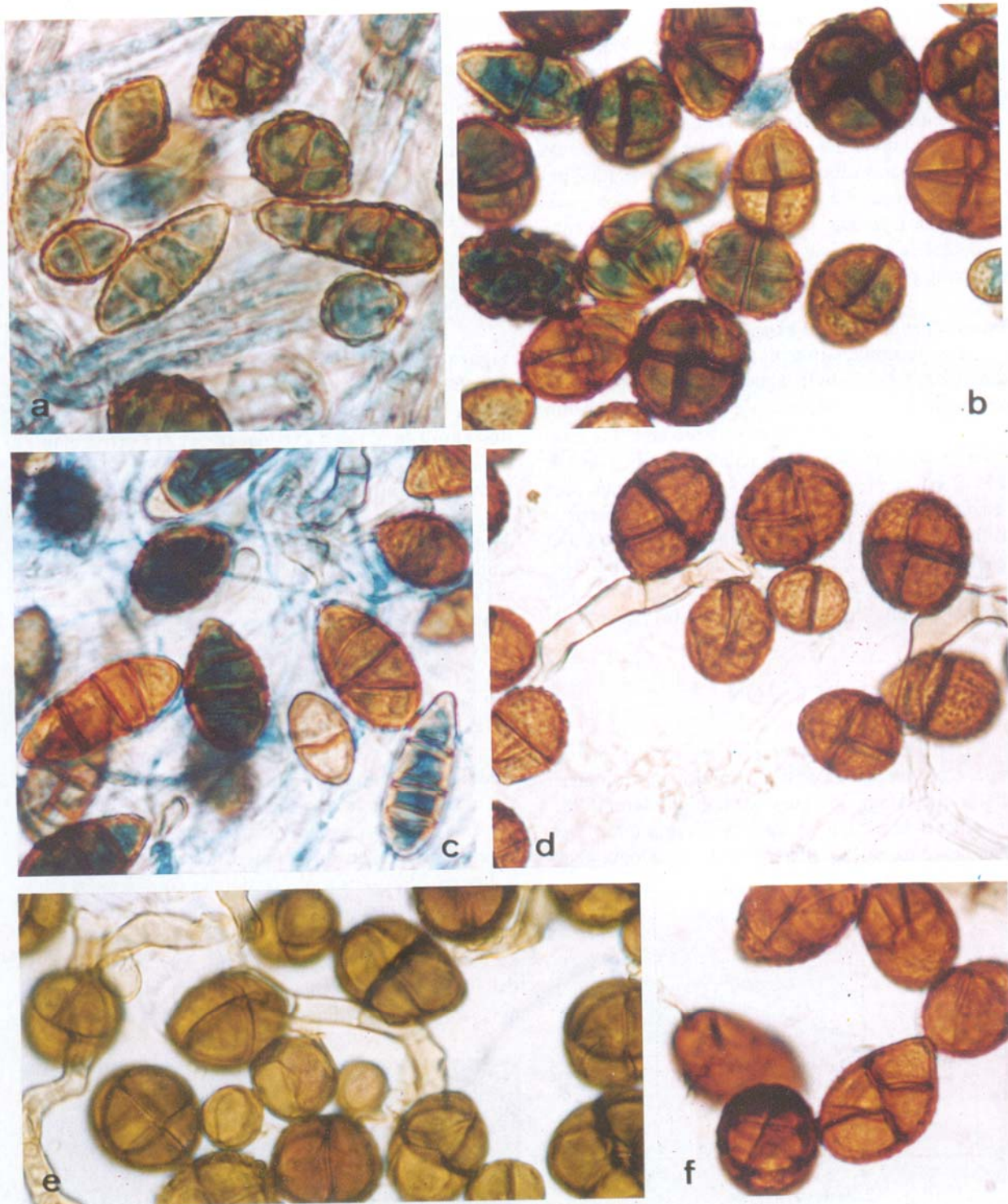


Figura 4.- a.- *U. atrum* (3 días), conidios elipsoidales con septos transversales y horizontales. b.- *U. atrum* (7 días) conidios esferoides a subglobosos con septos cruciados. c.- *U. multifforme* (3 días), conidios elipsoidales con septos horizontales. d.- *U. multifforme* (7 días), conidios subglobosos con septos cruciados. e.- Cepa grupo *U. atrum* (7 días), variante brillante, ecotipo con conidios esferoides a subglobosos, mayoritariamente lisos. f.- *U. chartarum* (7 días), conidios formando cadenas cortas. Todas las fotografías 1000x.

un PAGE. Los resultados obtenidos para las distintas digestiones practicadas con Hinf I indican que los productos de amplificación no presentaron sitios de reconocimiento para esta enzima, ya que los fragmentos generados son idénticos a los originales (Figura 8). Al digerir con Rsa I, se obtuvo dos fragmentos de los tamaños esperados. Al llevar a cabo doble digestión, se obtuvo patrones de migración electroforéticos iguales a los generados con Rsa I ya que, como se señaló anteriormente, los productos de amplificación no presentan sitios de reconocimiento para la enzima Hinf I (Figura 9).

3.- Estudio genético en el grupo *U. atrum*

Los resultados obtenidos con las dos enzimas de restricción, tanto individualmente como en conjunto, no generaron distintos patrones de migración electroforéticos. Al digerir con Hinf I no se generaron los fragmentos esperados, puesto que el segmento blanco de 158 pb de la ITS-1 no presentó sitios de reconocimiento para esta enzima (Figura 11). Los patrones electroforéticos de los fragmentos obtenidos por digestión con Rsa I fueron iguales para todas las cepas del grupo *U. atrum* e idénticos a los obtenidos con doble digestión (Figura 12). Por ello no fue posible diferenciar las especies dentro del grupo.

DISCUSION

La posibilidad de subdividir mediante su fenotipo al grupo *U. atrum* s.l. en base a cambios morfológicos conidiales en el tiempo, fue sugerida por Simmons (1998), para establecer la naturaleza dual de *U. curcubitae* que presenta conidios en fase juvenil con morfología alter-

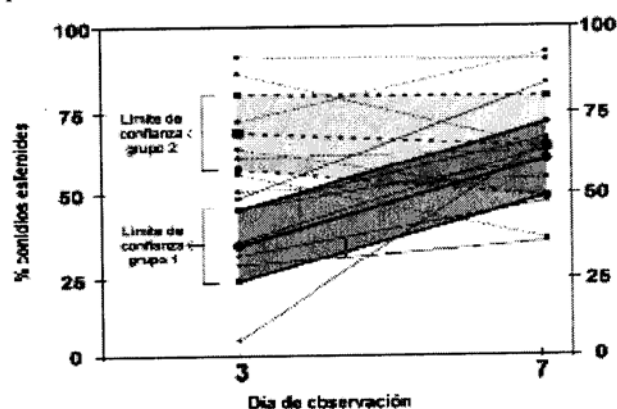


Figura 5. Frecuencia de conidios esféricos a los tres y siete días de cultivo en las cepas del grupo *U. atrum*. El Grupo 1 (inferior) lo constituyen las cepas con índice de esfericidad menor al 50%, el Grupo 2 (superior), aquellas cuyo índice de esfericidad es mayor al 50%. Las bandas para cada uno de los grupos está delimitada por promedio $\pm t_{95}$ x desviación estándar $p < 0,05$.

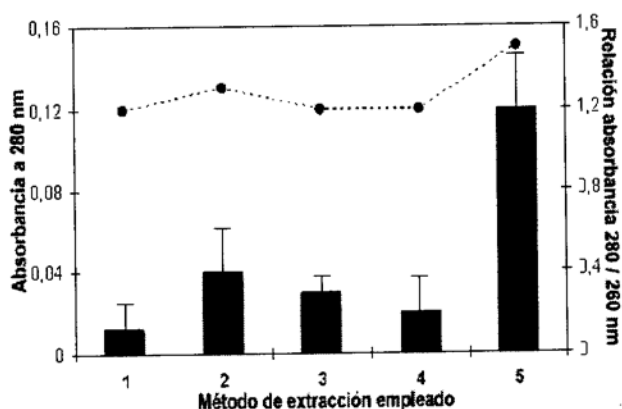


Figura 6.- Comparación del rendimiento en la extracción de DNA fúngico (barras y eje izquierdo) y la relación DNA/proteínas (puntos y eje derecho). Métodos empleados para extraer DNA: (1) extracción en caliente, (2) proteinasa K, (3) fenol-cloroformo, (4) extracción rápida y (5) Liu modificado.

narioide y una fase madura muy semejante a las poblaciones que integran el grupo *U. atrum*, cuya característica principal es la producción abundante de conidios prácticamente esféricos, oscuros, densamente ornamentados en sus paredes y con septos cruciados que le confieren un aspecto sarciniforme. Los resultados obtenidos con las 15 cepas seleccionadas y anteriormente clasificadas dentro del grupo *U. atrum* por morfología tradicional, siguiendo la metodología basada en 2 tiempos de maduración conidial, permitió evidenciar algunas características que en cierta medida difieren de lo observado por este autor en la subdivisión del grupo en 4 especies. En el análisis de las formas juveniles en cultivos de hasta 3 días en APZ, las formas conidiales consideradas como esféricas a subglobosas, presentaron 2 diferentes comportamientos cuantitativos (Grupos 1 y 2) sobre el total de conidios observados y medidos. Por ende, las cepas del Grupo 2, no presentaron la gran dominancia de formas conidiales ampliamente elípticas con septos trans-

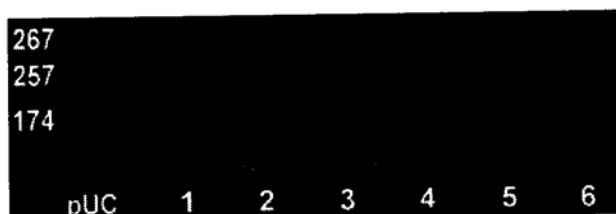


Figura 7.- Gel de agarosa al 2% de productos PCR. Segmentos de ITS-1 de 156 – 158 pares de bases de una cepa de cada especie en estudio. (1) *U. atrum*, (2) *U. botrytis*, (3) *U. chartarum*, (4) *U. tuberculatum*, (5) *U. consortiale* y (6) *U. alternariae*. Marcador de PM, pUC 18.

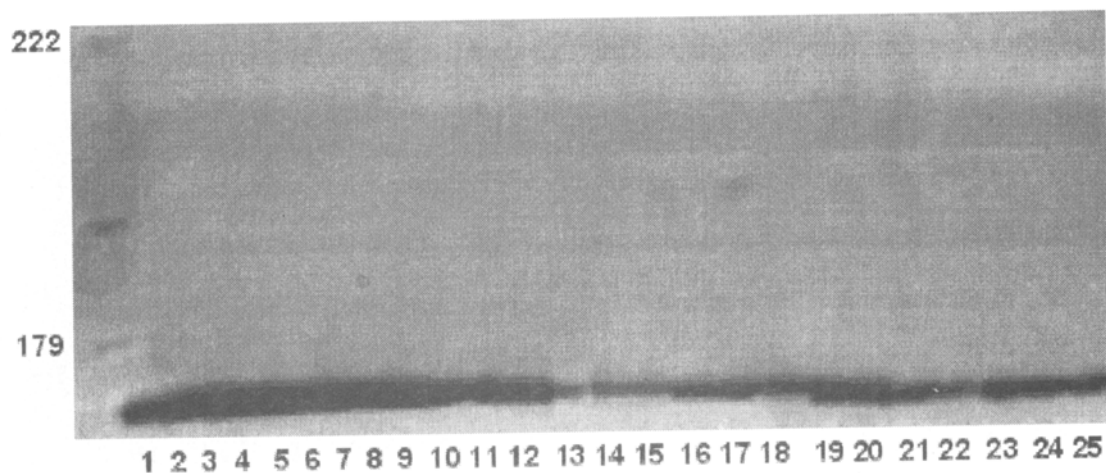


Figura 8: PAGE denaturante al 6% de los productos PCR digeridos con Hinf I, de 25 cepas de *Ulocladium*: (1 – 8) *U. atrum*, (9 – 15) *U. chartarum*, (16 – 19) *U. tuberculatum*, (20 – 23) *U. botrytis*, (24) *U. alternariae* y (25) *U. consortiale*. Marcador de PM pGEM ®

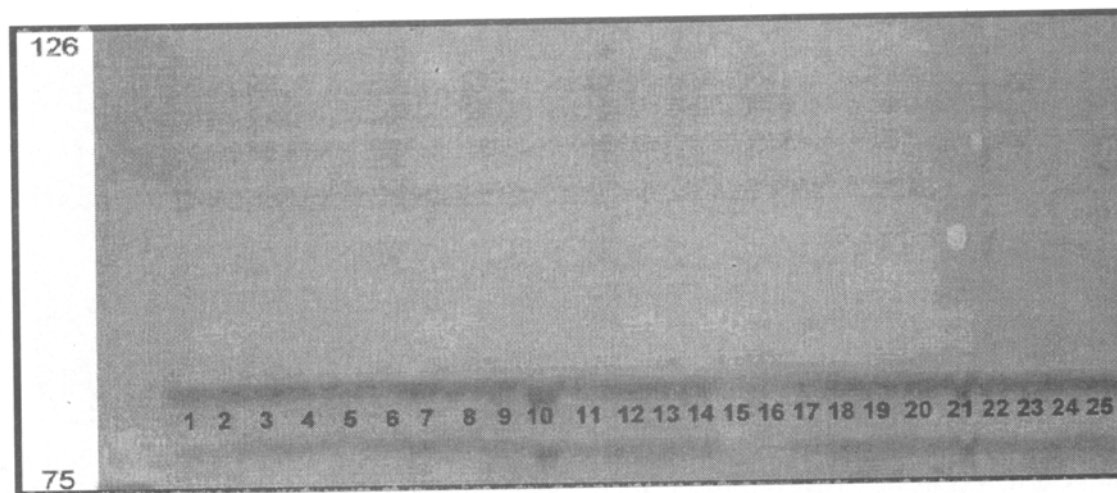


Figura 9: PAGE denaturante al 6% de los productos PCR digeridos con Rsa I de 25 cepas de *Ulocladium*: (1 – 8) *U. atrum*, (9 – 15) *U. chartarum*, (16 – 19) *U. tuberculatum*, (20 – 23) *U. botrytis*, (24) *U. alternariae* y (25) *U. consortiale*. Marcador de PM pGEM ®

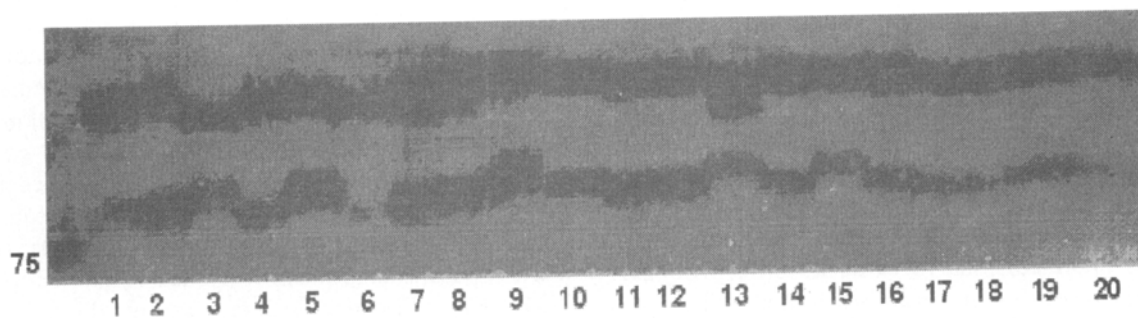


Figura 10: PAGE denaturante al 6% de especies del género *Ulocladium*. Digestión con Rsa I: (1,2) *U. atrum*, (3,4) *U. chartarum*, (5,6) *U. botrytis*, (7,8) *U. tuberculatum*, (9) *U. consortiale*, (10) *U. alternariae*. Doble digestión (Hinf I y Rsa I): (11, 12) *U. atrum*, (13, 14) *U. chartarum*, (15, 16) *U. botrytis*, (17, 18) *U. tuberculatum*, (19) *U. consortiale*, (20) *U. alternariae*. Marcador de PM pGEM ®.

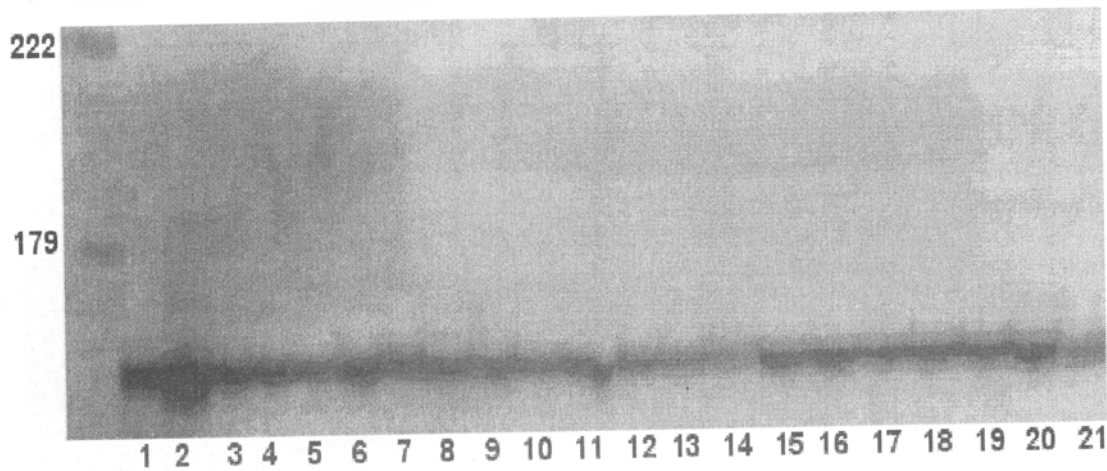


Figura 11: PAGE denaturante al 6%. Digestión de los productos PCR de 158 pb con la enzima Hinf I para las 21 cepas de *U. atrum* analizadas. Marcador de PM pGEM®

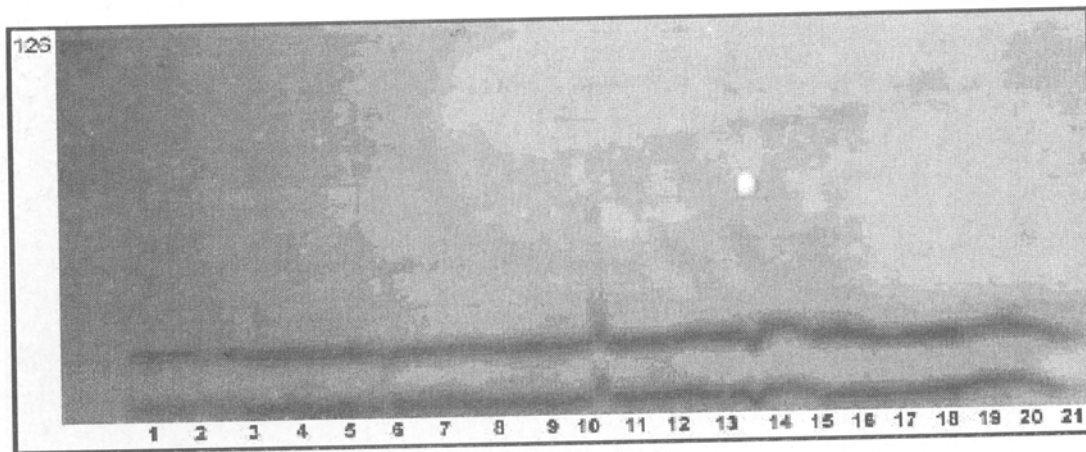


Figura 12: PAGE denaturante al 6% de fragmentos obtenidos por doble digestión (Hinf I más Rsa I) de los productos PCR de 158 pb de todas las cepas de las *U. atrum* en este estudio. Marcador de PM pGEM®

versales y longitudinales que describe este autor para la mayoría de los 4 integrantes del grupo en sus estados tempranos de desarrollo (Figura 3). Esta particular tendencia temprana a la esfericidad mantenida hasta la madurez, puede atribuirse a una expresión génica adquirida que permite la activación temprana de su morfogénesis en un ambiente considerado extremo y con limitados substratos orgánicos disponibles. Esta adaptación, que puede considerarse favorable en este hábitat desértico, permitiría una reducción de su ciclo de crecimiento, suprimiendo en cierta medida en la comunidad, las formas conidiales intermedias en favor de la forma redonda, mejor adaptada a la dispersión aérea a estas altitudes. Esta adaptación, se aprecia también en las menores dimensiones de los conidios en relación a la especie tipo. Esta temprana diferenciación morfológica puede considerarse como una ventaja que contribuye en el éxito y en la dominancia de esta especie sobre las otras en los dife-

rentes escalones altitudinales desérticos.

Dentro de las cepas consideradas como cultivos representativos en los estudios de *U. atrum* por Simmons (1967), todas corresponden a aislamientos efectuados en distintas zonas de USA y sus dimensiones conidiales maduras de tipo esferoide o subglobosas, miden entre 15 a 22 (-25) μm de diámetro, con medias de 16 -18,8 μm (L/A =1,0-1,3). La cepa más característica de *U. atrum* (EGS 30-188), que Simmons (1990) comenta brevemente, fue recibida por este autor desde un aislamiento de naranjas en Georgia (USA) y representa el estándar considerado para futuras identificaciones de la especie en cultivo. En sus estados juveniles los conidios son ampliamente elipsoides y lisos y miden 30-32 x 15-20 μm , sin embargo, los conidios esféricos que pueden producirse al mismo tiempo, son levemente rugosos ("punctulate"), sin el desarrollo de la verrucosidad típica de las esporas maduras, con medidas de 20-23 μm y con

1 o 2 septos diamétricos cruzados en ángulo recto uno con otro; con el tiempo se reducen a medidas inferiores tales como 17-18 μm en diámetro. Hay un cierto vacío en lo referente a las formas esferoides o subglobosas juveniles (1-3 días) en el trabajo de Simmons (1998), cuando se refiere a *U. atrum*. A pesar que no las incluye en sus 2 figuras (Fig. 1-2 pág. 1534), comenta su presencia aludiendo que, cuando se producen, estas son prácticamente poco rugosas, pero no dice en que proporción pueden estar presentes. Esta situación marcó el principal punto diferencial con nuestras cepas andinas.

Las diferencias con las cepas chilenas considerando los anchos y largos promedios de 30 mediciones presentaron cifras en general más pequeñas, siempre mayores en los primeros días y disminuyendo en la madurez (Tabla 4).

Lo observado en las 15 cepas, denota que a pesar que la mayoría corresponde a *U. atrum* s. str. (Figura 4 a-b), existe un buen grado de polimorfismo en el grupo que puede asociarse a mutación, por la alta proporción de rayos UV presentes en estas altitudes o debido a la compatibilidad vegetativa entre las cepas en su hábitat (heterocariosis). La presencia de 2 cepas (cepa 10 y 23) con conidios lisos a levemente rugosos en sus estadios juveniles y maduros, con superficie brillante bajo la lupa estereoscópica, puede atribuirse a variaciones estables (Figura 4 e). Esta característica se observó en otras cepas no incluidas en el grupo 1 y 2 y bien puede corresponder a una nueva segregación dentro del grupo. Esta es una situación que Simmons (1998) comenta y puede tener valor para nuevas delimitaciones en la interpretación de la múltiple morfología conidial del grupo *U. atrum*.

Las otras variaciones dentro del grupo se observaron en la cepa 5 donde todas sus características conidiales juveniles y maduras se relacionaron en buena forma con *U. multifforme* (Figura 4 c-d) así como la cepa 2 que puede considerarse como cercana a *U. multifforme*, pero presentó una relación largo y ancho levemente superior a 1,3 y un porcentaje de conidios esferoides menor que en la cepa 5. La cepa 19 que también presentó una relación largo ancho de 1,37, puede ser considerada una variante.

Unas de las cepas que presentó conidios en cadena en todas sus fases de crecimiento se excluyó de las 14 cepas analizadas por corresponder a *U. chartarum* (Figura 4 f).

El estudio genético de género y del grupo se llevó a cabo analizando una secuencia del rDNA ya que su análisis se ha constituido en una herramienta útil en la sistemática moderna y ha sido utilizado para establecer relaciones filogenéticas en muchos grupos de hongos (Miyamoto & Cracraft, 1991). En el estudio de taxas

fúngicos a nivel de especies, la región más variable de las ITS es la zona más comúnmente usada (White et al., 1990; Morales et al., 1991; Kusaba & Tsuge, 1995; Khashnobish & Shearer, 1996). Por esta razón, en el presente trabajo se empleó como blanco genético una zona de la ITS que debería cumplir con esta condición: los primeros 160 nucleótidos de ITS-1. Sin embargo, la variabilidad de las ITSrDNA entre especies es de apenas 2 – 10% (Pryor & Gilbertson, 2000), lo que dificulta encontrar zonas de reconocimiento para enzimas de restricción que permitan su discriminación. La tarea se dificulta aun más al intentar discriminar las especies del grupo *U. atrum* descritas por Simmons (1998), ya que dentro de una especie la variabilidad estimada es de alrededor de un 2% (Pryor & Gilbertson, 2000).

El sector de ITS analizado (158 – 160 pb) de las distintas especies del género, no presentó los fragmentos que permitirían apreciar variabilidad suficiente, como para ser empleados en estudios de diferenciación de las especies chilenas. La enzima Hinf I, no generó fragmentos de distinto tamaño a partir de los productos de amplificación puesto que no detectó la secuencia del sitio de corte (G / ANTC, con N = A, C, G ó T), por lo que se obtuvo idénticos patrones de migración electroforéticos de los supuestos productos de digestión. En lo que respecta a las digestiones realizadas con la enzima Rsa I, las secuencias presentan el sitio de reconocimiento, aunque no permite distinguir las especies pues los patrones de migración electroforéticos no revelaron las diferencias esperadas.

Es probable que las condiciones medioambientales desérticas donde fueron aisladas las cepas, sean distintas a las zonas geográficas de las cepas cuyas ITS han sido secuenciadas y publicadas (Pryor & Gilbertson, 2000).

Estos resultados sugieren que no es conveniente basar todo un estudio taxonómico en secuencias publicadas en bancos de genes, pues hay estudios que ponen en duda su contenido o secuencias (Hoog & Horré, 2002). Es probable que las secuencias de las ITSrDNA de las cepas chilenas no sean homólogas a las publicadas, y éste sea el motivo de los resultados obtenidos. Por ello, se propone llevar a cabo la secuenciación de las ITS de al menos una cepa de cada especie. De este modo, no sólo se comprobará si estas cepas presentan efectivamente un ecotipo particular, sino que se estimará la factibilidad de diferenciación y si ello es posible, escoger una o más enzimas de restricción que generen un patrón adecuado para llevar a cabo este objetivo.

Debido a que es arduo y costoso secuenciar la ITSrDNA de cada cepa en búsqueda de variabilidad en el

grupo *U. atrum*, se propone a futuro llevar a cabo ampliación aleatoria de polimorfismo de DNA (RAPD-PCR), ya que luego de separar grupos potenciales en base a sus características morfológicas se puede llevar a cabo esta técnica que ha demostrado su eficiencia en otros géneros como *Alternaria* (Roberts et al., 2000). Como las 15 cepas analizadas están fuertemente relacionadas y conforman además un número adecuadamente alto de aislados, es posible que el análisis de patrones de fragmentos por RAPD revele certeramente la variabilidad genética existente entre estas cepas (Kusaba & Tsuge, 1995).

En lo que respecta al estudio genético inter-especies, la primera especie que se esperaba distinguir era *U. alternariae*, pues se ha descrito un indel de 23 pb en la posición 60 de la ITS-1 (Pryor & Gilbertson, 2000), pero el fragmento amplificado presentó un tamaño de 160 pb y no de 183 pb. Sin embargo, Morales et al. (1995), no mencionan este indel y afirman que la secuencia ITS de esta especie es prácticamente idéntica a las de *U. atrum* y *U. botrytis*. Esto explicaría la no diferenciación de ambas especies, sin embargo, al ser distintas a las ITS de *U. chartarum*, *U. consortiale* y *U. tuberculatum*, se esperaba lograr su diferenciación, no obstante, este objetivo no se pudo cumplir.

Las cepas presentaron mínimas diferencias respecto del patrón general de migración electroforético. Sin embargo, tales diferencias corresponden a indeles de menos de 8 nucleótidos. Estos han sido observados en diversas especies en cuyo estudio se han empleado ITS-1 e ITS-2 como blanco genético (Pryor & Gilbertson, 2000). Por esta razón es preferible considerarlas como variantes y no como especies distintas.

Como consecuencia de estos resultados, para el estudio genético inter-especies se propone el empleo de partidores universales que permitan amplificar la ITSrDNA completa (580 – 600 pb), ya que con UITSu y UITSd se amplifica una zona de la ITS-1 que se supone tiene variabilidad suficiente entre las especies de *Ulocladium*, descartando la región 5,8S ribosomal que va desde la posición 251 a 400, zona que tiene poca o ninguna variabilidad (Pryor & Gilbertson, 2000), sin embargo, se pierde la posibilidad de encontrar polimorfismos en la ITS-2 que corresponde a los últimos 200 nucleótidos de la ITSrDNA.

Encontrar una secuencia adecuada para analizar, es una tarea difícil (White et al., 1990; Adachi et al., 1993). Muchos estudios taxonómicos y filogenéticos que han empleado regiones ITS, no han demostrado suficiente variabilidad en la secuencia como para dilucidar relaciones infragenéricas, por lo que se requieren loci o genes más informativos (Adachi et al., 1993). Por esta razón y basándonos en los resultados obtenidos, se proponen nue-

vos estudios para discriminar entre las especies del género *Ulocladium* mediante el empleo de otras secuencias nucleotídicas, que han demostrado utilidad en la realización de estudios inter-especies en otros taxa, tales como las IGS y los genes que codifican para el factor de elongación, la enzima ácido norsolínico reductasa y las proteínas calmodulina y β -tubulina (Chaverri et al., 2001; Peterson et al., 2001).

El objetivo general del trabajo no se cumplió completamente, puesto que genéticamente no se pudo distinguir las especies del grupo *U. atrum*, ni las integrantes del género.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido descartar como blanco genético a los primeros 160 nucleótidos de la ITSrDNA, sitio sobre el cual se centró el estudio molecular. Por esta razón, los estudios posteriores en cepas chilenas, deberían emplear el sector complementario de la ITS-rDNA, o bien una secuencia genética distinta, como las propuestas en los párrafos anteriores.

CONCLUSIONES

Puede concluirse que las cepas chilenas del grupo *U. atrum* aisladas de la zona cercana al desierto de Atacama, son ecotipos con ciertas características morfológicas distintivas, debido a su adaptación a una flora herbácea y hábitat particular, con una población de dimensiones conidiales más reducidas y un predominio de formas globosas a subglobosas en sus estados juveniles y tardíos. Pero presenta además algunos integrantes cuyas características pueden ser consideradas como nuevos morfotipos debido a la múltiple variabilidad de sus propágulos de dispersión.

Es indiscutible que la biología molecular podrá ayudar en el tiempo con mayores aportes en las delimitaciones de la segregación de los integrantes del grupo *U. atrum*.

El sector de la ITSrDNA estudiado en este trabajo no es un blanco adecuado para el análisis discriminativo entre especies chilenas de *Ulocladium*. Basándonos en la idea anterior, sería conveniente secuenciar la ITSrDNA de al menos una cepa de cada especie del género, para estimar la zona de real variabilidad entre ellas. Debe descartarse el empleo de las secuencias publicadas en el banco de genes, porque no representan a las cepas chilenas.

Se propone realizar estudios con partidores universales de ITS ya que permitirían ampliar un segmento de mayor tamaño aumentando la probabilidad de encontrar polimorfismo, o bien emplear otra secuencia que permita diferenciar entre especies (IGS, factor de elongación, etc.).

REFERENCIAS

- Abeln, E.; De Pagter, M. & Verkley, G. (2000). Phylogeny of *Pezicula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia* 92: 685 – 693
- Adachi, Y.; Watanabe, H.; Tanabe, K.; Dole, N.; Nishimura, S.; Tsuge, T. (1993). Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in Japanese pear phenotype of *Alternaria alternata*. *Applied Environmental Microbiology* 59:3197 – 3205
- Bakkeren, G.; Kronstad, J. & Lévesque, C. (2000). Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in *Ustilaginomycetes*. *Mycologia* 92:510 – 521
- Chiocchetti, A.; Bernardo, I.; Daboussi, M.J.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L.; Langin, T.; Migheli, Q. (1999). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology* 89:1169 – 1175
- Christensen, M. (1981). Species diversity and dominance in fungal communities. in *The fungal community* (Donald, T. Wicklow & George G. Carrol, eds). Marcel Dekker Inc. USA pp:201-232
- Coetzee, M.; Wingfield, B.; Harrington, T.; Dalevi, D.; Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J. (2000). Geographical diversity of *Armillaria mellea* s.s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia* 92: 105 – 113
- Craus, P.; Kang, J. & Braun, U. (2001). A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITSrDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081 – 1101
- Geene, D.; Koenig, G.; Fisher, M.; Taylor, J. (2000). Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 92:406 – 410
- Holland, K. & Holst-Jensen, A. (2000). *Cortinarius* phylogeny and possible taxonomic implications of ITS rDNA sequences. *Mycologia* 92: 694 – 710
- Hoog, G. & Horré, R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* 45: 259 – 276
- Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gemé, J.; Figueras, M.J. (2000). Atlas of clinical fungi. 2nd Edition. CBS/Universitat Rovira i Virgili.
- Jaeger, E.; Carroll, N.; Choudhury, S.; Dunlop, A.; Towler, H.; Matheson, M.; Adamson, P.; Okhravi, N.; Lightman, S. (2000). Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* species in ocular samples using Nested PCR. *J. Cl. Microbiology* 38: 2902 – 2908
- Köhl, J.; Molhoek, W.; van der Plass, C.; Fokkema, N. (1995). Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonist on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* 85:393-401
- Liu, D.; Coloe, S.; Baird, R.; Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical Microbiology* 38: 471
- Lohtander, K.; Källersjö, M.; Moberg, R.; Tehler, A. (2000). The family Physciaceae in Fennoscandia phylogeny inferred from ITS sequences. *Mycologia*, 92: 728 – 735
- Mendoza, L. (1998). Curso de Micología Molecular. Medical Technology Program, Michigan State University.
- Milligan, B.G. (1998). Total DNA isolation. En: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical approach*. Eds. Hoelzel, A.R. Ed IRL, Oxford University Press Inc., New York, United States, pp 29 – 64
- Oliver, C.; Berbee, M.; Shoemaker, R.; Loria, R. (2000). Molecular phylogenetic support from ribosomal DNA sequences for origin of *Helminthosporium* from *Leptosphaeria* – like Loculoascomycete ancestors. *Mycologia* 92: 736 – 746
- Paavonen-Huhtala, J.; Bulat, S.A. & Yli-Mattila, T. (1999). RAPD-PCR, isozyme, rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. *Mycol. Res.* 103: 625 – 634
- Peterson, S.; Ito, Y.; Horn, B.; Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689 – 703
- Piontelli, E.; Toro, M.A.; Giusiano, G.; Vivar, V. (2002). Distribución altitudinal de hongos queratinófilos, epífitos y endófitos en suelos desérticos del norte chileno. *Boletín Micológico* 17: 33 – 49
- Pryor, B. & Gilbertson, R. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mtSSU-rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104: 1312 – 1321
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1998). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States, pp. 3 – 59
- Simmons, E. (1967). *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 70 – 80
- Simmons, E. (1998). Multiple conidium morphology in species of the *Ulocladium* group. *Can. J. Bot.* 76: 1533 – 1539
- Simmons, E. (1990). *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon* 37:79-119
- Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Wingfield, B.; Coutinho, T. (2000). Relationships among *Amylostereum* species associated with siricid woodwasps inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 92: 955 – 963
- Weir, A. & Blackwell, M. (2001). Extraction and PCR amplification of DNA from minute ectoparasitic fungi. *Mycologia* 93: 802 – 806