



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

**“ESTABLECIMIENTO DE UN CEPARIO DE HONGOS
MICROMICETOS SILVESTRES DEL ESTADO DE MICHOACAN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER ES TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

MARINA ARREDONDO SANTOYO

ASESOR:

D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

MORELIA, MICHOACAN, FEBRERO DE 2009



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS DEL CENTRO MULTIDICIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO BAJO LA ASESORIA DEL D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

DEDICATORIA

Dedico la presente a todos aquellos que amo y que me aman, que han estado conmigo siempre y me han entregado su tiempo, su espacio, su comprensión, apoyo y su corazón, y que en algún momento robo un espacio dentro de sus pensamientos.

Mamá, esta va por ti... Por toda tu entrega y por todo tu amor, esta tesis es el resultado de mucho esfuerzo y dedicación, que no hubiese logrado esto si tú no estuvieras al pie del cañón.

A toda la gente que me estima y que ha estado conmigo cuando los necesito y cuando me necesitan, que me han ayudado a levantarme en momentos trágicos, a los que me dieron un fuerte abrazo, y un buen consejo, con los que hemos reído, llorado y soñado, a los que me acompañan siempre en este viaje.

A los que confiaron en mí y creyeron en esto, los que deseaban junto conmigo que este sueño se cumpliera y que disfrutaran igual que yo el fin de la meta.

A los que están y no se han ido por que sueñan y anhelan conmigo. Y también a los que se han ido y dejaron huella en el camino.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Porque soy creyente de ti, gracias por traerme aquí y atender a mis plegarias, por permitirme tener esta vida y por rodearme de esta gente, tú sabias que esto pasaría y por eso me dejas aquí.

A MI MADRE, MARINA SANTOYO FIGUEROA: No existe palabra alguna que pueda agradecer todo lo que tú has hecho porque me quedo corta. Eres la persona más noble, humilde, entregada, cariñosa... GRACIAS gorda, por tus desvelos, por tu trabajo, por tu cansancio, por darme todo lo que estuvo a tu alcance y hasta lo que no se podía me lo diste, ¿cómo agradecer tu amor desmedido? No tengo más, estoy aquí y soy tuya soy el resultado de algo que tu formaste, diste molde y guiaste como mejor pudiste. Mil gracias por los valores que me diste, gracias por amarme tanto, yo también te amo, no te dejare sola nunca, te llevo en mi mente y en mi corazón.

A MI PADRE, RAMÓN ARREDONDO BARRIGA: GRACIAS por la educación que me diste, sé que tu corazón siempre quiso que yo estuviera bien, que fuera feliz. Gracias por darme la vida, por trabajar duro para que nada me faltara.

A MIS HERMANOS; LIN, NENA, LULÚ, MAYRA: Por todos sus consejos, por su apego y compañía por que siempre han estado conmigo, y por que juntos hemos vencido mil barreras, somos un buen equipo y hemos sacado la casta. Gracias por quererme tanto.

A MIS AMIGAS: Por los buenos momentos y experiencias, por seguir conmigo en este camino, por todos sus consejos, porque unidas hemos visto la evolución de nuestras vidas, porque siempre están allí cuando las necesito; por los cafés, las lagrimas y risas que juntas compartimos.

AL D.C. GERARDO VAZQUEZ MARRUFO: Por permitirme realizar este proyecto, por creer en mí, por su confianza, por su apoyo, por sus consejos, porque más que mi asesor lo considero mi amigo.

A LA D.C. SOLEDAD VAZQUEZ GARCIDUEÑAS, AL D.C. CARLOS CORTES PEGAGOS Y AL D.C. HORACIO CANO CAMACHO: Por las atenciones y buena disposición que tuvieron conmigo durante este proceso.

INDICE GENERAL

	Pagina
INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
I.- INTRODUCCION.....	1
I.1. Aspectos taxonómicos y ecológicos del reino Fungi	1
I.2. Aplicaciones biotecnológicas del reino Fungi.....	3
I.3. Importancia de la estructuración de ceparios fúngicos.....	5
I.4 Unidad Ribosomal de hongos, aplicaciones al estudio de hongos filamentosos.....	12
II.- JUSTIFICACION.....	15
III.- HIPOTESIS.....	16
IV.- OBJETIVOS.....	16
IV.1. Objetivo General.....	16
IV.2. Objetivos particulares.....	17
V.- MATERIALES Y METODOS.....	18

V.1. Colecta.....	18
V.2. Medios de cultivo.....	18
V.2.1. Medio completo PDA.....	18
V.3. Aislamiento de Micelio Vegetativo.....	18
V.4. Técnicas de Preservación a largo Plazo del Micelio Vegetativo....	18
V.4.1. Preservación en agua a temperatura ambiente.....	19
V.4.2. Criopreservación (-80°C).....	20
V.5. Análisis genético molecular.....	20
V.5.1. Extracción de ADN.....	20
V.5.2. Reacciones de amplificación por PCR.....	21
V.5.3. Genclean.....	22
V.5.4. Secuenciación de los productos de amplificación obtenidos.....	22
V.5.4.1. PCR de secuenciación.....	22
V.5.4.2. Purificación del producto de PCR de secuenciación.....	23
V.6. Análisis de secuencias obtenidas.....	23
VI.- RESULTADOS	24
VI.1. Obtención de cultivos axénicos.....	24
VI.2. Supervivencia de las cepas a los métodos de conservación empleados.....	30
VI.2.1. Preservación en agua a temperatura ambiente.....	30
VI.2.2. Criopreservación (-80°C).....	30
VI.3. Aislamiento y preservación de ADN de alto peso molecular.....	39
VI.4. Amplificación por PCR de la región ITS de los aislados de estudio.....	40
VI.5. Tipificación genético molecular de los aislados de estudio.....	41

VI.5.1 Búsqueda de identidad en el GenBank.....	41
VI.6. Dendogramas obtenidos a partir de la región ITS de los aislados de estudio.....	58
VII. DISCUSIÓN	81
VIII. CONCLUSIONES	93
IX. REFERENCIAS	94
X. ANEXOS	105

INDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pagina
1	Linaje fúngico.....	1
2	Progreso de un cultivo fúngico a través de una colección de recursos genéticos.....	7
3	Estructura de la unidad ribosomal (UR) en los hongos.....	13
4	Cultivos axénicos.....	25
5	Grafico ilustrativo de la preservación en agua a temperatura ambiente.....	38
6	Grafico ilustrativo de la criopreservación a -80°C.....	38
7	ADN de los aislados obtenidos.....	39
8	Patrones de amplificación mediante PCR de la región ITS de distintos aislados.....	40
9	Patrón de agrupamiento del aislado 214CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el banco de genes.....	58
10	Patrón de agrupamiento del aislado 234 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	59
11	Patrón de agrupamiento del aislado 48 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	60
12	Patrón de agrupamiento del aislado 89 CMU con los taxa seleccionados de la queda en el GenBank.....	60
13	Patrón de agrupamiento de los aislados 39 CMU, 27 CMU y 12 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank....	61
14	Patrón de agrupamiento de los aislado 27 CMU y 39 CMU con las taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	62
15	Patrón de agrupamiento del aislado 12 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	63
16	Patrón de agrupamiento de los aislados 10 CMU, 54 CMU, 55	

	CMU, 83 CMU, 95 CMU, 201 CMU, 208 CMU, 216 CMU, 219 CMU, 226 CMU, 238 CMU, 243 CMU y 244 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	64
17	Patrón de agrupamiento de los aislados 10 CMU, 208 CMU, 216 CMU, 243 CMU y 244CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	66
18	Patrón de agrupamiento de los aislados 95 CMU, 83 CMU y 219 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank....	67
19	Patrón de agrupamiento de los aislados 54 CMU, 55 CMU, 201 CMU, 226 CMU, 238 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	68
20	Patrón de agrupamiento del aislados 96 CMU, con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	68
21	Patrón de agrupamiento del aislado 26 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	69
22	Patrón de agrupamiento del aislado 30 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	70
23	Patrón de agrupamiento del aislado 233 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	70
24	Patrón de agrupamiento del aislado 59 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	71
25	Patrón de agrupamiento de los aislados 29 CMU, 56 CMU, 57 CMU, 198 CMU, 245 CMU, 316 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	72
26	Patrón de agrupamiento de los aislados 57 CMU, 198 CMU, 245 CMU, 316 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	73
27	Patrón de agrupamiento del aislados 56 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	74
28	Patrón de agrupamiento del aislados 29 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	75

29	Patrón de agrupamiento de los aislados 1 CMU, 4 CMU, 8 CMU, 14 CMU, 16 CMU, 19 CMU, 21 CMU, 23 CMU, 25 CMU, 34 CMU, 43 CMU, 44 CMU, 51 CMU, 66 CMU, 90 CMU, 181 CMU, 183 CMU, 196 CMU, 218 CMU, 222 CMU, 231-M CMU, 231-A CMU, 235 CMU, 236 CMU y 239 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	76
30	Patrón de agrupamiento de los aislados 1 CMU, 4 CMU, 8 CMU, 21 CMU, 23 CMU, 44 CMU, 51 CMU, 66 CMU, 181 CMU, 183 CMU, 218 CMU, 231-M CMU, 231-A CMU, 235 CMU, 236 CMU y 239 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	78
31	Patrón de agrupamiento de los aislados 14 CMU, 16 CMU, 18 CMU, 19 CMU, 25 CMU, 34 CMU, 43 CMU, 90 CMU, 196 CMU y 222 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	79
32	Patrón de agrupamiento del os aislados 81 CMU y 2000 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank.....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pagina
I	Ejemplos de micotecnología postmoderna.....	4
II	Ventajas, desventajas y métodos de preservación a largo plazo para hongos.....	8
III	Sobrevivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación.....	31
IV	Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio.....	43

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Aspectos taxonómicos y ecológicos del reino Fungi

En la actualidad el linaje fúngico muestra que existen 10 grupos bien diferenciados (Fig. 1) entre los que se encuentran los grupos bien conocidos como los Basidiomycetes y Ascomycetes, así como otros no tan conocidos como los Glomeromycetes, los Zygomycetes, los Blastocladiomycetes, los Chytridiomycetes y los Neocalimastigomycetes, *Olpidium brassicae*, Microsporidia y *Rozella spp.* (<http://www.tolweb.org/Fungi/2377>).

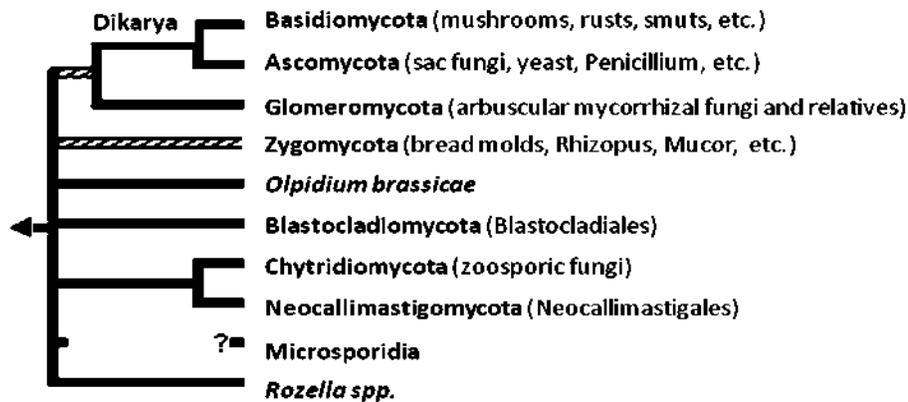


Figura 1. Linaje fúngico. Filogenia modificada por James et al., 2006a, 2006b; Liu et al., 2006; Seif et al., 2005; Steenkamp et al., 2006.

Se han descrito menos de 100 mil especies de hongos, sin embargo, algunas estimaciones de números totales sugieren que pueden existir 1.5 millones de especies.

Con base en el tamaño relativo de las estructuras de reproducción sexual, los hongos pueden clasificarse en dos grandes grupos. Por una parte están los macromicetos u hongos macroscópicos, cuya característica distintiva es la producción de estructuras reproductivas (esporóforos, esporocarpos, carpóforos y/o cuerpos fructíferos) visibles al ojo humano y que pueden ser colectados con la

mano (Chang, 1993; Arnolds, 1995). Por otra parte están los micromicetos u hongos microscópicos, los cuales son organismos que presentan estructuras pequeñas de reproducción sexual, las cuáles suelen ser microscópicas, no visibles al ojo humano. Esta división es artificial ya que no tiene ningún significado taxonómico o filogenético, sin embargo, desde el punto de vista ecológico y taxonómico tradicional, existe una diferencia fundamental entre ambos grupos. Los macromicetos han sido estudiados de manera tradicional en ecología y taxonomía buscando esporocarpos como indicadores de la presencia de ciertas especies en determinados ecosistemas y analizando las características morfológicas de estos para realizar la identificación a nivel de especie. En el caso de los micromicetos, estos han sido estudiados mediante técnicas de aislamiento y cultivo axénico para poder obtener las estructuras reproductivas en el laboratorio y facilitar la identificación a nivel de especie. No obstante, con las herramientas actuales de la biología molecular, la generación de huellas genéticas ha podido trascender esa diferencia en estudios ecológicos y taxonómicos. Aunque los conceptos de micromicetos y macromicetos siguen siendo empleados con gran frecuencia. Mientras que en el grupo de los macromicetos podemos ubicar principalmente a especies de la división Basidiomycota, en el grupo de los micromicetos encontramos a especies dentro de Zygomycota, Ascomycota, Chitridiomycota y las formas asexuales.

Dentro de sus variados habitats naturales, los hongos son generalmente los organismos primarios de descomposición. Muchas especies son de vida libre saprofita (usuarios del carbón fijado por otros organismos) en sustratos arbolados, suelos, superficies de hojas, excremento de animales y exudados de animales muertos. Las grandes cavidades de los árboles vivos degradadas por hongos degradadores de madera proporcionan los habitats para la generación de una variedad de animales.

Sin embargo, muchos otros hongos son biotrofos y en este papel un número de grupos forman asociaciones simbióticas con plantas (incluyendo algas) animales (especialmente artrópodos) y procariotes. Ejemplos de líquenes, son las micorrizas y endófitos de hojas y vástagos. Aunque los líquenes puedan parecer

poco frecuentes en ciudades contaminadas pueden formar parte de la vegetación dominante en ambientes nórdicos, en donde más del 80% de las plantas que allí se encuentran son micorrizas. Los endófitos de la hoja y del vástago son un descubrimiento más reciente, y algunos de estos hongos pueden proteger de herbívoros a las plantas que habitan, incluso influyen el florecimiento y en otros aspectos de la biología reproductiva de la planta.

Los hongos desempeñan funciones vitales para los ecosistemas particularmente para los bosques de todo el mundo. Entre los hongos del suelo se ha documentado que las especies micorrícicas pueden afectar la composición de las comunidades de plantas a través de los beneficios que proveen a estas (e. g. Grime et al., 1987; van der Heijden et al., 1998; Klironomos et al., 200). También se encuentra bien documentada la capacidad del micelio de los hongos filamentosos, particularmente los micorrícicos para determinar la estructura del suelo en ambientes boscosos (Rilling y Mummey, 2006).

I.2. Aplicaciones biotecnológicas del reino Fungi

Los hongos han sido utilizados por el hombre en procesos que pueden ser considerados biotecnológicos desde hace cientos y miles de años. Así, las bebidas y comidas fermentadas han sido parte de la dieta humana desde la antigüedad y en dichos procesos de fermentación, los hongos filamentosos y levaduriformes tienen un papel fundamental. En épocas más recientes, diversas especies de hongos filamentosos han sido empleados para la obtención de antibióticos y otras sustancias con actividad farmacológica, los ejemplos más tradicionales son la obtención de penicilinas a partir de *Penicillin Chysogenum* y de cefalosporinas a partir de *Cephalosporium acremontiun*. Por otro lado la obtención de enzimas con aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica es otra de las aplicaciones biotecnológicas más conocidas de los hongos filamaentosos. Algunos ejemplos son la producción de amilasas por parte de diversas especies de *Arpergillus*, de celulasas producidas por *Trichoderma viride* y de lacasas producidas por *Trametes vercicolor* (Bennett 1998). Otro aspecto de la

biotecnología fúngica tradicional es la producción de ácidos orgánicos por especies del género *Aspergillus*. En los últimos 20 años las posibilidades tecnológicas derivadas del uso de hongos se han empleado considerablemente a partir del desarrollo de la biología molecular, en lo que se ha denominado micotecnología post moderna (ver tabla I).

Tabla I. Ejemplos de micotecnología postmoderna

DESARROLLO	EJEMPLOS
Expresión de genes heterólogos	Hongos, plantas, mamíferos
Amplificación de genes homólogos	Síntesis de antibióticos, enzimas
Manipulación de rutas secundarias	Nuevos compuestos semisintéticos Antibióticos; antibióticos híbridos
Gran escala genómica	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Neurospora Crassa</i> <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Phytophthora infestans</i>
Chips de ADN	Ensayos ADN de alta densidad para la investigación de la expresión de genes
Explotación de la diversidad fúngica para nuevos productos farmacéuticos	Muestreo ambiental Investigaciones basadas en DNA genómico

(Bennett 1998)

Diversas especies de hongos filamentosos han mostrado capacidad para transformar y/o mineralizar una gama amplia de compuestos orgánicos contaminantes y en la mayoría de los casos han sido implicadas enzimas ligninolíticas (Pointing 2001; Rabinovich et al., 2004; Singleton 1994; Singleton 201; Van Hemme et al., 2003). Un caso particular de este tipo de compuestos orgánicos contaminantes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) los cuales se encuentran comúnmente como componentes del petróleo y sus derivados y se generan como producto de la combustión de combustibles fósiles. Entre las especies de hongos filamentosos capaces de degradar HAP's se han

reportado a *Penicillium simplicissimum*, *Cylothyrin sp* y *Psilocybe sp* con la capacidad para transformar pireno, antraceno, fenantreno y benzopireno (Da Silva et al., 2003, 2004; Hammel et al., 1991). Por otra parte se ha documentado la capacidad de *Penicillium sp*, *Trichoderma viride*, *Alternaria tenuis* y *Aspergillus terreus* para degradar fenantreno (Chávez-Gómez et al., 2003). Adicionalmente se ha documentado la capacidad de degradación de HPA's por parte de varias especies de basidiomicetes y algunos Deuteromycetes. Otros contaminantes orgánicos como algunos derivados del benceno y del tolueno, clorofenoles, trinitrotolueno y diversos tipos de pesticidas también pueden ser degradados por hongos filamentosos (Tortella et al., 2005). Por todo lo anterior, el uso de hongos en proyectos o programas de bioremediación es una de las aplicaciones biotecnológicas que mas futuro tienen.

I.3. Importancia de la estructuración de ceparios fúngicos

Desde principios de la década de los noventa, en el siglo pasado, se iniciaron los esfuerzos para la conservación de microorganismos, incluidos los hongos filamentosos. Entre las prioridades establecidas en aquel entonces, algunas de las cuales siguen siendo vigentes, incluían la clarificación del concepto de especie, el desarrollo de inventarios y bancos de información, énfasis en el desarrollo de técnicas de conservación *in situ* y de preservación del habitat, estudios de Sistemática de especies "clave" en los ecosistemas, el desarrollo de técnicas para la detección específica en sustratos naturales, la identificación rápida de aislados silvestres, la búsqueda de métodos de aislamiento, cultivo y preservación a largo plazo y el estudio de especies con potencial aplicación biotecnológica, incluidos aquellos utilizados como recurso alimenticio. (UNEP/UNDP, 1992; WRI/IUCN/UNEP, 1992; Bull y col., 1992; Hawksworth y Ritchie, 1993).

De los hongos descritos actualmente solo una minoría han sido crecidos en medios de cultivo por lo que solo el 10% de las especies descritas, se mantiene en algunas de las colecciones de hongos del mundo. El Centro de Datos Mundiales

Para Microorganismos lista 262 centros de recursos genéticos en todo el mundo que guardan hongos (Ryan y Smith, 2004). Estas colecciones mantienen 375 052 cepas fúngicas las cuales están catalogadas con 23 807 nombres.

En 1998 una reunión mundial de biotecnología auspiciada por la OCD (OECD por sus siglas en inglés, *Organization for Economic Cooperation and Development*) concluyó que era importante dar un apoyo sustancial a los Centros de Recursos Biológicos como elementos clave de la infraestructura científica y tecnológica de las ciencias de la vida y la biotecnología. Las colecciones de hongos forman una parte importante de estos centros. Algunas de las funciones que cumple una colección de hongos filamentosos pueden ser (Ryan y Smith, 2004):

- i) Preservación y provisión de recursos biológicos con fines de investigación científica, industrial, agrícola, ambiental y médica, así como el desarrollo de nuevas aplicaciones.
- ii) Diseño de investigación y el desarrollo de estos recursos biológicos
- iii) Conservación de la biodiversidad.
- iv) Repositorios de recursos biológicos para la protección de la propiedad intelectual.
- v) Recursos para la información pública y formulación de políticas.

Recientemente se han generado esquemas de trabajo que pretenden ser guías estandarizadas internacionales para la estructuración de ceparios de hongos, dichas guías buscan optimizar el proceso de guardado o preservación y proponen pruebas para asegurar que el material genético que es guardado, es el que está siendo “resucitado” (Fig. 2).

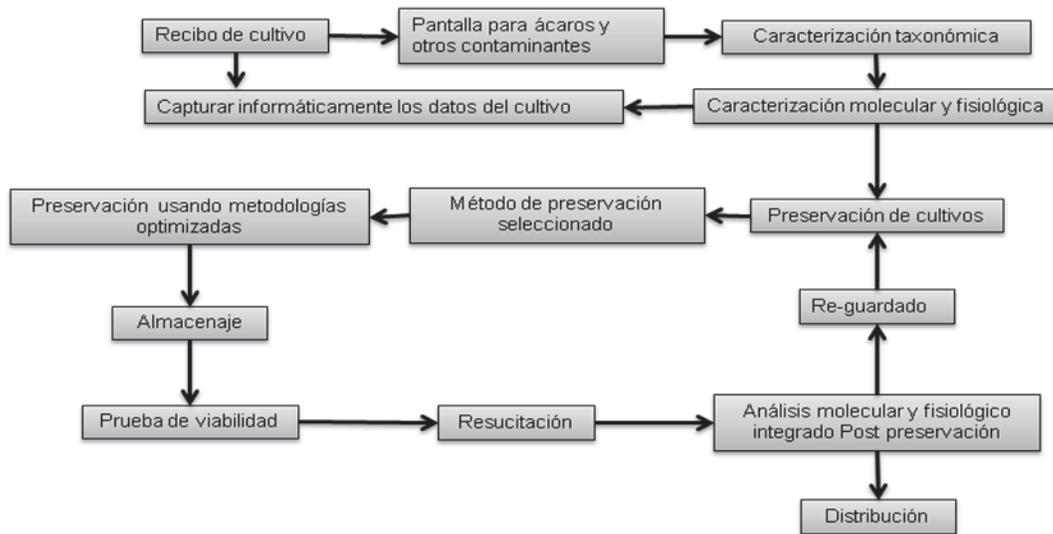


Figura 2. Progreso de un cultivo fúngico a través de una colección de recursos genéticos. (Ryan y Smith, 2004).

La primera colección de hongos filamentosos fue formada por Frantisek Krat en la Universidad Técnica de Alemania en Praga, establecida en 1890. Existe una gran diversidad de métodos descritos en la literatura para la preservación de hongos, ningún método de preservación en particular funciona para todos los grupos de hongos.

Hay métodos básicos que pueden ser aplicados cuando se cuenta con poca infraestructura y recursos económicos como el cultivo continuo o transferencia seriada (Smith y Onions, 1994), el guardado en aceite (Smith, Ryan y Day 2001), en agua (Burdsall 1994), en arena o suelo (Smith et al., 2001) o en sílica gel (Smith et al., 2001). Aunque estos métodos son en un principio baratos y sencillos de aplicar, en algunos casos el tiempo de guardado no se extiende más allá de las 3 semanas y la estabilidad a largo plazo es baja o inexistente. Por lo anterior, la mayoría de los ceparios utilizan al menos dos técnicas de guardado a largo plazo. Las más empleadas en ese sentido son la liofilización y la criopreservación en la fase de vapor de nitrógeno líquido (Smith y Ryan, 2004), para los cuales se requieren condiciones particulares de infraestructura y equipamiento. (Ver tabla I).

Tabla II. Ventajas, desventajas y métodos de preservación a largo plazo para hongos

Preservación	Ventajas	Desventajas	Tiempo de almacenaje
Cultivo continuo o transferencia serial	Bajo costo a corto plazo Método sencillo	Requiere poco tiempo para volver a resembrar Riesgo de contaminación	De 2 semanas a 1 año
Almacenaje en agua	Bajo costo a corto plazo Método sencillo	Deterioración del cultivo Riesgo de contaminación Variación de la cepa	Hasta 2 años
Almacenaje en aceite	Bajo costo a corto plazo Método sencillo	Deterioración del cultivo Riesgo de contaminación Variación de la cepa	Hasta 10 años
Almacenaje en arena o suelo	Bajo costo a corto plazo Método sencillo	Degeneración del cultivo por humedad en muestras saturadas Variación de la cepa	Hasta 10 años
Almacenaje en silica gel	Bajo costo Método sencillo	Efectos tóxicos de la silica gel Solo disponible para algunos hongos que esporulan	Hasta 25 años
Liofilización (freeze-drying)	Largo tiempo de almacenaje Fácil almacenaje y distribución en ampollitas	Método complejo Consume mucho tiempo Equipo costoso No disponible para hongos que no esporulan	Mayor de 50 años
Criopreservación (mecánica Deep-freeze)	Método sencillo Reduce posible deterioración de cultivos	Equipo costoso Se debe garantizar el suministro de energía eléctrica Algunos crioprotectores pueden ser tóxicos	Mayor de 40 años
Criopreservación (nitrógeno líquido)	Adecuado para la mayoría de los hongos La metodología puede ser optimizada para géneros individuales Reduce posible deterioración de cultivos	Equipo costoso Garantizar los niveles de enfriamiento requeridos Garantizar el suministro de nitrógeno líquido Los crioprotectores pueden ser tóxicos para algunos hongos.	Potencialmente indefinido

(Ryan y Smith, 2004)

La preservación en agua tiene numerosas ventajas: la viabilidad del cultivo o las velocidades del crecimiento no se encuentran influenciadas significativamente, los aislados pueden ser guardados más tiempo; la estabilidad genética es más grande, el método además de fácil, rápido y barato requiere poco espacio.

La preservación en agua de cultivos de hongos no es un concepto nuevo, Castellani (1939) describió la técnica básica cuando estudió varias rutas para evitar el pleomorfismo de hongos patógenos humanos. Figueiredo (1967) y Figueiredo y Pimentel (1970) preservaron la patogenicidad de 22 hongos patógenos de plantas usando una técnica de guardado en agua. Boesewinkel (1976) guardó exitosamente 53 cultivos preservando Ascomicetos, Basidiomycetos, Deuteromycetos y otros grupos de 1968 ó 1969 hasta enero de 1975; además también guardó exitosamente más de 650 plantas patógenas y hongos saprófitos en agua estéril donde todas mantuvieron su viabilidad. Ellis (1979) trabajó con un grupo de hongos que no sobrevivieron a la liofilización, conservando la viabilidad de estos hongos con un guardado en agua. Richter y Bruhn (1989) reportaron que los cultivos de Basidiomycetes ectomicorrícicos y cultivos de hongos saprófitos sobrevivieron guardados a bajas temperaturas en agua estéril. Marx y Daniel (1976) reportaron el guardado de 64 especies fúngicas, de las cuales 14 especies eran hongos ectomicorrícicos en agua destilada estéril (Burdshall et al., 1994).

La liofilización (en inglés también denominada como *Freeze- Drying*) se utiliza comúnmente en hongos de esporulación asexual, particularmente Ascomycetes y sus formas asexuales. El método involucra el congelamiento de los especímenes y su secado posterior en estado congelado mediante la sublimación del hielo a presión reducida (Smith, 1983). El secado debe de evitar la fase líquida por lo que debe realizarse a temperaturas por debajo de -15°C hasta que el agua del cultivo es reducida a menos del 5%. Durante el proceso pueden ocurrir daños celulares principalmente en la estructura de las membranas por lo que algunas sustancias protectoras pueden ser añadidas al medio de cultivo. Una vez preservados de esta manera, los cultivos son fáciles de manejar y ocupan un

espacio relativamente pequeño manteniendo los cultivos hasta por 40 años o más (Smith y Onions, 1994).

La criopreservación de hongos fue descrita por primera vez por Hwang en 1960. Como cualquier otro método de preservación, la criopreservación presenta ventajas y desventajas. La desventaja principal puede considerarse el hecho de que los enfriadores de velocidad controlada y los ultracongeladores son relativamente caros. En el caso de que se use nitrógeno líquido la disponibilidad y el costo de esta sustancia representa un problema adicional. El método estándar de criopreservación involucra un enfriamiento controlado a una velocidad de -1°C por minuto comúnmente en presencia de un crioprotector como el glicerol, la trealosa o el DMSO (Smith et al., 2001). La aplicación de una velocidad de enfriamiento controlada con crioprotectores disminuye considerablemente los riesgos de daño celular por congelamiento, el cual puede ser el resultado de la interacción de diversos factores como la ruptura celular por el hielo o efectos de concentración. Estos últimos incluyen cambios de pH causados por la precipitación de reguladores, gases disueltos, concentración de electrolitos, cristalización intracelular de vida a la pérdida de agua de hidratación de las macromoléculas (Ryan, Smith. 2004). El daño a la membrana puede deberse a efectos de solución pero también ser causado por el hielo. Se ha reportado la criopreservación exitosa de distintas especies de hongos principalmente dentro del grupo de los basidiomycetes entre los que se incluyen *Cantharellus cibarius* (Danell y Flygh 2002) *Volvariella volvacea* (Chen 1999), Basidiomycetes tropicales de madera (Croan et al. 1999) y hongos de pudrición blanca (Stoychev et al., 1998).

Recientemente (Ryan et al. 2000) se ha elaborado una clave para la toma de decisiones para la selección del método de guardado más apropiado, la cual incorpora criterios científicos logísticos y económicos. Este protocolo puede ser de gran ayuda cuando se desea iniciar una colección de hongos y este trabajo fue de utilidad en la toma de decisiones.

La selección de las técnicas de preservación de un hongo filamentoso no solamente depende del éxito del método para recuperar vivas a las especies y cepas de interés sino también del tipo uso que se le da al organismo, así como del tiempo y recursos disponibles. La colección de cultivos debe ser capaz de garantizar que un organismo este correctamente nombrado, ya que la utilización de un organismo nombrado incorrectamente puede conducir a la invalidación de la investigación de resultados sobresalientes. (Smith D. Chang y col., 1993).

El objetivo de la preservación es mantener la pureza, la viabilidad, la capacidad de esporulación y la integridad genómica de una cepa, evitando la selección de variantes dentro de una población y disminuyendo las posibilidades del deterioro de una cepa (Smith y Ryan, 2004).

Diversos trabajos han reportado cambios fisiológicos o genéticos en cepas de hongos que han sido recuperadas después de un proceso de preservación. Por ejemplo, cepas supuestamente idénticas de *Trichoderma* obtenidas de diferentes laboratorios muestran huellas genéticas generadas por PCR diferentes (Kuhls, et al., 1995). Un aislado de *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* que se mantuvo durante 12 años, no mostró los mismos patrones de huella genética mediante PCR que otros aislados de la misma especie (Kelly et al., 1994). En el caso de *Agaricus bisporus* se han documentado anomalías cromosómicas y polimorfismos en patrones genéticos de RFLP, asociados supuestamente a la degeneración del micelio guardado (Horgen et al., 1996). Adicionalmente se han reportado cambios fisiológicos en *Metarhizium anisopliae* (Ryan et al., 2003) y en *Penicillium expansum* (Santos et al., 2002). Réplicas de un mismo aislado de *M. anisopliae* mostraron patrones de PCR distintos atribuidos a técnicas de preservación no optimizadas (Ryan et al., 2001). El mantenimiento de la integridad fisiológica puede ser evaluado mediante el análisis de características de cultivo o velocidades de crecimiento pero también puede incluir producción de metabolitos secundarios y estudio de actividades enzimáticas. Ningún centro de recursos genéticos puede garantizar la conservación total de características genómicas pero debe ser capaz de optimizar los protocolos para asegurarse en reducir

sustancialmente las posibilidades de deterioro de una cepa durante el guardado o preservación.

Como se mencionó con anterioridad, una de las principales precauciones que se deben de tomar al establecer un cepario de hongos, es la de garantizar que la cepa que fue guardada bajo una clave determinada es la misma que se está recuperando y no una cepa contaminante. En ese sentido, las huellas genéticas representan una herramienta para la tipificación de aislados posibilitando la identificación inequívoca de una especie. No obstante, existen diferentes tipos de regiones genéticas que pueden ser utilizadas, la mayoría de estas generadas mediante ensayos de amplificación por PCR. En este trabajo, se propone la utilización de la región ITS de la Unidad Ribosomal como marcador genético de cepas silvestres destinadas a formar un cepario local o regional. Por esta razón, a continuación se detalla la localización y ventajas para la utilización de dicha región genética.

I.4. Unidad Ribosomal de hongos, aplicaciones al estudio de hongos filamentosos.

En los hongos, como en otros grupos de eucariotes, las secuencias génicas (DNAr) que codifican para los diferentes RNA ribosomales (RNAr) se encuentran agrupadas en una misma región del genoma de un tamaño de 8-12 kb (Vilgalys, 2007). Esta unidad básica, denominada Unidad Ribosomal (UR), puede encontrarse como una familia de genes que puede incluir hasta 100 copias de secuencias altamente similares, en un arreglo denominado “cabeza con cola” o “cabeza con pie” (Fig. 3). La estructura característica de una UR fúngica consta de los genes 18S, 5.8S y 28S de RNAr separados por regiones interespaciadoras ITS, no codificadoras y entre cada UR se encuentra otra región no codificadora denominada espaciador intergénico (IGS, por sus siglas en inglés) (Vilgalys, 2007). En algunos grupos de hongos (principalmente Basidiomycetes y algunas levaduras Ascomycetes) el gen 5.8S puede encontrarse presente dentro de la UR,

aunque la posición y la dirección de la transcripción de este gen varían entre los diferentes grupos de hongos.

Debido al hecho de combinar genes esenciales conservados con secuencias no codificadoras variables, la UR se ha convertido en una herramienta muy útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de los eucariotes en general y del Reino Fungi en particular.

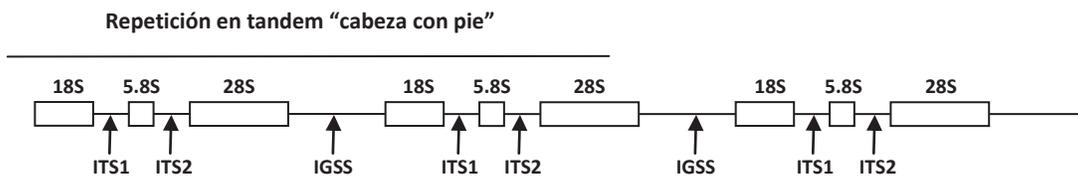


Figura 3. Estructura de la unidad ribosomal en hongos.

En la actualidad existe una amplia batería de oligonucleótidos que permiten la amplificación específica mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de cada una de las regiones que componen la UR de los diferentes grupos de los hongos (White *et al.*, 1990; Borneman y Hartin, 2000; Vilgalys, 2007). Esto facilita considerablemente la secuenciación de cualquier región de interés dentro de la UR. Las características de tamaño y tasa de variación de cada región de la UR determinan las posibilidades de aplicación entre los distintos niveles taxonómicos. Así, mientras que las regiones codificadoras (28S y 18S, principalmente) son empleadas para los estudios filogenéticos y taxonómicos en un amplio rango de categorías taxonómicas, desde phylum hasta especie, las regiones no codificadoras (incluyendo muchas veces al gen 5.8S) se han empleado en rangos taxonómicos más estrechos, para la resolución de relaciones entre especies de un mismo género o entre aislados de una misma especie. Por ejemplo, el gen 18S ha sido utilizado como herramienta en estudios filogenéticos de los grandes grupos del reino Fungi (Bowman *et al.*, 1992; Tehler *et al.*, 2000). Dentro de los grupos que contienen especies relacionadas con la degradación de la madera, la subunidad grande 28S ha sido empleada para

estudios filogenéticos de agaricales (Moncalvo *et al.*, 2000; Moncalvo *et al.*, 2002). La región ITS1-5.8S-ITS2 ha sido empleada para estudiar los patrones de especiación del género *Pleurotus* (Vilgalys y Sun, 1994) y resolver afinidades entre especies cercanas (Zervakis *et al.*, 2004). Otros grupos de hongos lignícolas en los que se ha empleado la región ITS para el estudio de relaciones filogenéticas y taxonómicas es el Basidiomycete *Ganoderma lucidum* y el género de hongos Ascomycetes *Xylaria* (Lee *et al.*, 2000).

Además de su utilidad taxonómica y filogenética, la UR se ha constituido en una región genética de gran importancia para estudios ecológicos. En la actualidad es posible amplificar mediante PCR distintas regiones de la UR para identificar hongos en muestras ambientales (Borneman y Hartin, 2000; Van Elsas *et al.*, 2000; Jumpponen y Johnson, 2005). En particular, el aislamiento de ADN de muestras ambientales y la amplificación mediante PCR ha posibilitado el estudio ecológico-molecular de los hongos degradadores de madera. Así, mediante iniciadores dirigidos a la región ITS1-5.8S-ITS2 se han podido describir las especies de Basidiomycetes y Ascomycetes asociados al proceso de degradación de madera, sin necesidad del aislamiento del micelio en cultivo puro (Jasalavich *et al.*, 2000; Adair *et al.*, 2002; Allmér *et al.*, 2006).

Los estudios taxonómicos y filogenéticos que utilizan regiones de ADN de la UR de los hongos permiten seleccionar nuevas cepas con potencial para la degradación de lignina basándose en las afinidades taxonómicas con cepas ya caracterizadas, asumiendo que aquellas especies taxonómica y filogenéticamente relacionadas poseen capacidades bioquímicas y fisiológicas semejantes, de lo cual existe evidencia para cierto grupo de hongos lignocelulolíticos (Hibbet y Donoghue, 2001). De hecho, la utilización de la región ITS ha permitido identificar el micelio de cepas ligninolíticas aisladas a partir de sustratos naturales (Klonowska *et al.*, 2003; Kamei *et al.*, 2005), incrementando la posibilidad de aislar cepas con alto potencial biotecnológico en áreas naturales.

II. JUSTIFICACION

El Estado de Michoacán se encuentra entre los cinco estados con mayor diversidad biológica dentro de México (Mittermeier y Mittermeier, 1992), en parte debido a su localización geográfica en la zona de transición entre las regiones neártica y neotropical, que genera una gran variedad de tipos de ecosistemas. A la fecha se han desarrollado diversos estudios para incrementar el conocimiento sobre la diversidad de hongos del Estado de Michoacán, principalmente del grupo de los Basidiomicetes. De este grupo existe un trabajo de taxonomía clásica considerable para diversas áreas de esta entidad. Particularmente para la zona de Los Azufres, se cuenta con un inventario que incluye 181 especies de macromicetos y en dicha región se han registrado al menos ocho nuevas especies para el país (Cifuentes y col., 1990). Recientemente se ha publicado una lista sobre las especies de hongos filamentosos descritos para el estado de Michoacán, la cual incluye 608 especies de Basidiomicetes, 68 especies de Ascomicetes y 61 especies de Myxomicetes (actualmente considerados afuera del Reino Fungi) (Gómez-Peralta y Gómez-Reyes, 2005) No obstante, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, es indispensable complementar dicho trabajo de taxonomía clásica con la creación de un banco de germoplasma y de una colección *ex situ* a largo plazo de las estructuras de propagación vegetativa (micelios). De esta manera, se contará no solo con la posibilidad de volver a reintroducir en sus ecosistemas a especies amenazadas de extinción sino a contribuir a la regeneración de dichas áreas naturales. Así mismo, este tipo de colección científica de hongos filamentosos permitirá estudiar características fisiológicas y genéticas que tengan importancia en la obtención de alimentos, sustancias medicinales y enzimas útiles en diversos procesos industriales y de descontaminación de ambientes contaminados. Al mismo tiempo, se estará fortaleciendo la soberanía estatal y nacional sobre la diversidad biológica de los hongos silvestres, al contribuir a evitar el saqueo de la biodiversidad local.

III. HIPÓTESIS

El micelio vegetativo de micromicetos silvestres provenientes de áreas naturales del estado de Michoacán, puede ser conservado *ex situ* en condiciones de baja tensión de oxígeno, sin perder su viabilidad. Las colecciones de aislados de micelio vegetativo así generadas pueden ser un método para la conservación de la diversidad fisiológica y genética de dicho grupo biológico.

Para resolver dicha hipótesis se proponen los siguientes objetivos

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Evaluar técnicas para la preservación *ex situ* de aislados de micelio vegetativo de micromicetos del estado de Michoacán y realizar la caracterización genético molecular de dichos aislados.

IV.2. Objetivos Particulares

- i) Obtener aislados del micelio vegetativo de diferentes especies de micromicetos silvestres del estado de Michoacán.

- ii) Evaluar técnicas de bajo costo para la preservación a mediano y largo plazo del micelio vegetativo de los aislados obtenidos.

- iii) Establecer un banco de DNA de alto peso molecular de las cepas aisladas.

- iv) Generar huellas moleculares y obtener regiones genéticas útiles en estudios ecológicos y taxonómicos de los aislados obtenidos.

- vi) Establecer las bases para la creación de un cepario de micromicetos silvestres del estado de Michoacán.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Colecta

Muestras de diferentes sustratos incluidos suelo, madera y basidiocarpos fueron colectados en diversas localidades del estado de Michoacán entre las que se incluyen las zonas boscosas del municipio de Atécuaro como Puerto Madroño y sus alrededores, Cuto de la Esperanza, la presa gachupina en los Azufres, el Parque Nacional “José Ma. Morelos” ubicado en el Km 23 de la carretera Moleria-Mil Cumbres, así como algunas zonas de Puerto Garnica pertenecientes al Municipio de Charo. Se realizaron visitas continuas durante los meses de máxima precipitación pluvial de la región (agosto-septiembre).

V.2. Medios de cultivo

V.2.1. Medio completo PDA

El medio de agar dextrosa y papa (PDA) se empleó para el mantenimiento y conservación a corto plazo del micelio vegetativo, así como para la generación de inóculos de las cepas de estudio.

Para su preparación se utilizaron 250 g de papa los cuales se hirvieron por 20 min en 1 L de agua destilada, posteriormente se recuperó el extracto acuoso por filtración a través de una gasa, con la finalidad de desechar todos los residuos sólidos. Al filtrado recuperado se le agregaron 20 g de dextrosa y 20 g de agar bacteriológico y se aforó a 1 L con agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C (15 lb/pulg²) por 15 min. El medio comercial (DIFCO®, USA) se preparó agregando 39 g en 1 L de agua destilada y se esterilizó a 121 °C (15lb/pulg²) por 15 minutos de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

V.3. Aislamiento de Micelio Vegetativo

El aislamiento del micelio vegetativo se realizó a partir de muestras de sustrato consistentes en pequeños fragmentos de agar con micelio que fueron colocados en condiciones de esterilidad en cajas de Petri con medio PDA. Las

cajas así inoculadas se incubaron a una temperatura de 28°C en la obscuridad, revisándose cada 24 h para la detección del crecimiento micelial durante un periodo mínimo de 3 semanas.

Aquellas muestras donde se observa crecimiento micelial son resembradas e incubadas nuevamente en las condiciones ya descritas, con la finalidad de obtener un cultivo puro de cada una de las cepas en las que se logra desarrollar el micelio. El proceso de resiembra se repite al menos dos veces, realizando observaciones de las placas visualmente y utilizando tanto microscopio estereoscópico como de luz convencional, para detectar la presencia de bacterias o actinomicetes contaminantes; así como para observar si se encontraban creciendo juntos más de un tipo de micelio.

V.4. Técnicas de Preservación a largo Plazo del Micelio Vegetativo

Para el guardado y conservación a largo plazo de los diferentes aislados de micelio vegetativos obtenidos se probaron dos técnicas a dos temperaturas diferentes; dichas técnicas fueron elegidas debido a su facilidad para el manejo simultáneo de varias muestras y su costo relativamente bajo.

V.4.1. Preservación en agua a temperatura ambiente

En esta técnica se cortan cilindros del medio PDA que incluyen micelio del borde del crecimiento colonial, esto se hace con un saca bocados metálico de 5 mm de diámetro en condiciones de esterilidad. Se guardan entre 8 y 10 cilindros en un tubo con tapón de rosca el cual contiene $\frac{3}{4}$ partes del tubo con agua destilada estéril (el agua contenida en el tubo es previamente esterilizada a 121°C y 15 lb/pulg² por 15 minutos, dos veces), nuevamente en condiciones de esterilidad.

Los tubos se cierran y etiquetan perfectamente para guardarse a temperatura ambiente. Estos se preparan por duplicado. Para recuperar un cultivo se toma un cilindro en condiciones de esterilidad y se coloca en un medio de cultivo fresco a las condiciones de incubación descritas anteriormente.

4.2. Criopreservación

Para la realización de esta técnica primero se permite el crecimiento del micelio en placas de medio PDA, se cortan cilindros del cultivo fresco que incluyen al micelio creciendo en fase logarítmica con un sacabocados de 5 mm de diámetro, se toman de 7 a 8 cilindros y se colocan en un criovial de 2 ml nuevo y estéril, se adicionan 1.5 ml de glicerol (previamente esterilizado a 121°C y 15 lb-/pulg² dos veces), se cierra el criovial, todo esto en condiciones de esterilidad.

Los tubos se etiquetan perfectamente para guardarse a -80°C en un ultracongelador NUAIRE Ultra-Low Temperature Laboratory Freezer The Glacier -86°C, USA. Para recuperar el cultivo se toma un cilindro previamente guardado y se coloca en medio de cultivo fresco el cual se incuba bajo las condiciones anteriormente descritas. Todo el procedimiento se realiza bajo condiciones de esterilidad.

V.5. Análisis Genético Molecular

IV.5.1. Extracción de ADN

La obtención de ADN de alto peso molecular se realiza a partir de micelio vegetativo proveniente de cepas inoculadas en medio PDA. El micelio se cosecha utilizando una espátula estéril y se lleva a un mortero, se congela con nitrógeno líquido y se macera hasta obtener un polvo fino. La muestra pulverizada se transfiere a un microtubo de 1.5 ml y se le agregan 500 µl de regulador de lisis que contiene Tris HCl pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.0 100 mM, NaCl 20 mM, y SDS al 2 %. Después se agita en vortex por 5 min, se incuba a 60 °C por 30 min, se añaden 500 µl de fenol pH 8.0 y se agita en vortex por 5 min. La emulsión se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min en microcentrifuga (Eppendorf 5415D), se recupera la fase acuosa transfiriéndola a un microtubo de 1.5 ml estéril, se añade un volumen de fenol cloroformo y se agita en vortex un par de minutos, nuevamente se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min en microcentrifuga (Eppendorf 5415D) y se extrae la fase acuosa transfiriéndola a otro tubo de 1.5 ml estéril. El ARN se elimina por digestión enzimática con RNAsa 10 mg/ml; se agregan 2 µl de RNAsa

a la fase acuosa con ADN y se incuba por 30 min a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, el ADN se precipita añadiendo el mismo volumen de isopropanol frío, se agita suavemente y se incuba a -20 °C por 1 h o toda la noche. La muestra se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min y se elimina el sobrenadante por decantación, la pastilla se lava con 250 µl de etanol al 70 %, se descarta el etanol, y para eliminar el exceso del mismo se seca a temperatura ambiente por 15 min. Para finalizar, se resuspende la pastilla en 25 µl de agua destilada desionizada estéril.

Para conocer la calidad del ADN obtenido se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (concentración final de 1 µg/mL), en regulador TAE (solución de trabajo: Tris 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial 1.2 µL/mL, pH de 8.0) a 100 V (Sambrook y Russel, 2001). El ADN obtenido se almacena a -20 °C para un uso posterior.

V.5.2. Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación por PCR de las muestras de ADN del tejido fúngico se realizan en un volumen total de 25 µl. Para todas las regiones genéticas amplificadas la composición de la mezcla de amplificación es la misma: Regulador para PCR 10 x, agua desionizada estéril (11.5 µl), 1.0 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada uno de los deoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200 mM de cada primer (ITS1/ITS4, White et al., 1999) y 2.0 U de enzima *Taq* polimerasa. Para las reacciones de amplificación se utilizan 30 ng de ADN. Las condiciones de amplificación son las mismas para todas las regiones genéticas: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min; 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 50 °C 30 s y 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C durante 4 min. La reacción de amplificación se realiza en un Palm-CyclerTM Gradient thermal cycling (R Corbett life science, USA). Los productos de amplificación obtenidos se analizan en geles de agarosa al 2 % (concentración final de 2 µg/mL) (Sambrook y Rusell, 2001). Los oligonucleótidos empleados para amplificar la región ITS amplifican por completo la región ITS1, el gen 5.8S y la región ITS2.

V.5.3. Genclean

La extracción y limpieza de los productos de PCR a partir un gel de agarosa al 2 % (concentración final 0.5 $\mu\text{g/ml}$) se lleva a cabo con el kit QIAEX® II de acuerdo a las instrucciones del proveedor, las cuales se describen brevemente a continuación. Del gel de agarosa se extrae la banda deseada con una navaja esterilizada para ser colocada en un microtubo de 1.5 ml donde se agregan 400 μl de regulador QX1 y 15 μl QIAEX II, se incuba a 50 °C por 10 min se agita en vortex cada 2 min. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga por 30 s a 12000 rpm, se descarta el sobrenadante y la pastilla se lava con el buffer QX1 agregando 500 μl y resuspendiendo hasta obtener una mezcla homogénea. Se repite la centrifugación por 30 s, se desecha el sobrenadante y se lava dos veces con 500 μl de regulador PE repitiendo el paso anterior. La pastilla se seca a temperatura ambiente por 20 min y se resuspende en 20 μl de H₂O destilada estéril. El producto purificado obtenido se utiliza en la reacción de PCR de secuenciación.

V.5.4. Secuenciación de los productos de amplificación obtenidos

a) PCR de secuenciación

Para la PCR de secuenciación se utiliza el Kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, en un microtubo de 0.2 ml se prepara la siguiente mezcla de reacción: 6.0 μl de Terminator Reaction PreMix (2.5X), 20 ng (5.0 μl) de ADN templado, 6.0 pmol (1.0 μl) de oligonucleótido y 3.0 μl de agua desionizada para llevar la reacción a un volumen final de 15 μl . Después de mezclar se centrifuga 30 s y se realiza la reacción de PCR bajo los siguientes parámetros: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min; 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 50 °C 30 s y 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C durante 4 min. La reacción se lleva a cabo en un Palm-Cycler™ Gradient thermal cycling (R Corbett life science, USA).

b) Purificación del producto de PCR de secuenciación

Esta técnica se aplica transfiriendo el producto de amplificación a un microtubo de 1.5 ml agregando 2 μ l de EDTA (125 mM), 2 μ l de acetato de sodio (3 M, pH 4.8), 50 μ l de etanol (100 %), se mezcla suavemente (vortex), se incuba 30 min a -20 °C, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 30 min a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y se adicionan 250 μ l de etanol al 70 % mezclando suavemente, se lleva a centrifugación por 15 min a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y la pastilla se seca en un ultracondensador (LABCONCO, Kansas City, USA) por 7 min a 35 °C, una vez terminado el tiempo se resuspende en 15 μ l de formamida HD. La secuenciación del producto obtenido se realiza en un secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

V.6. Análisis de las secuencias obtenidas

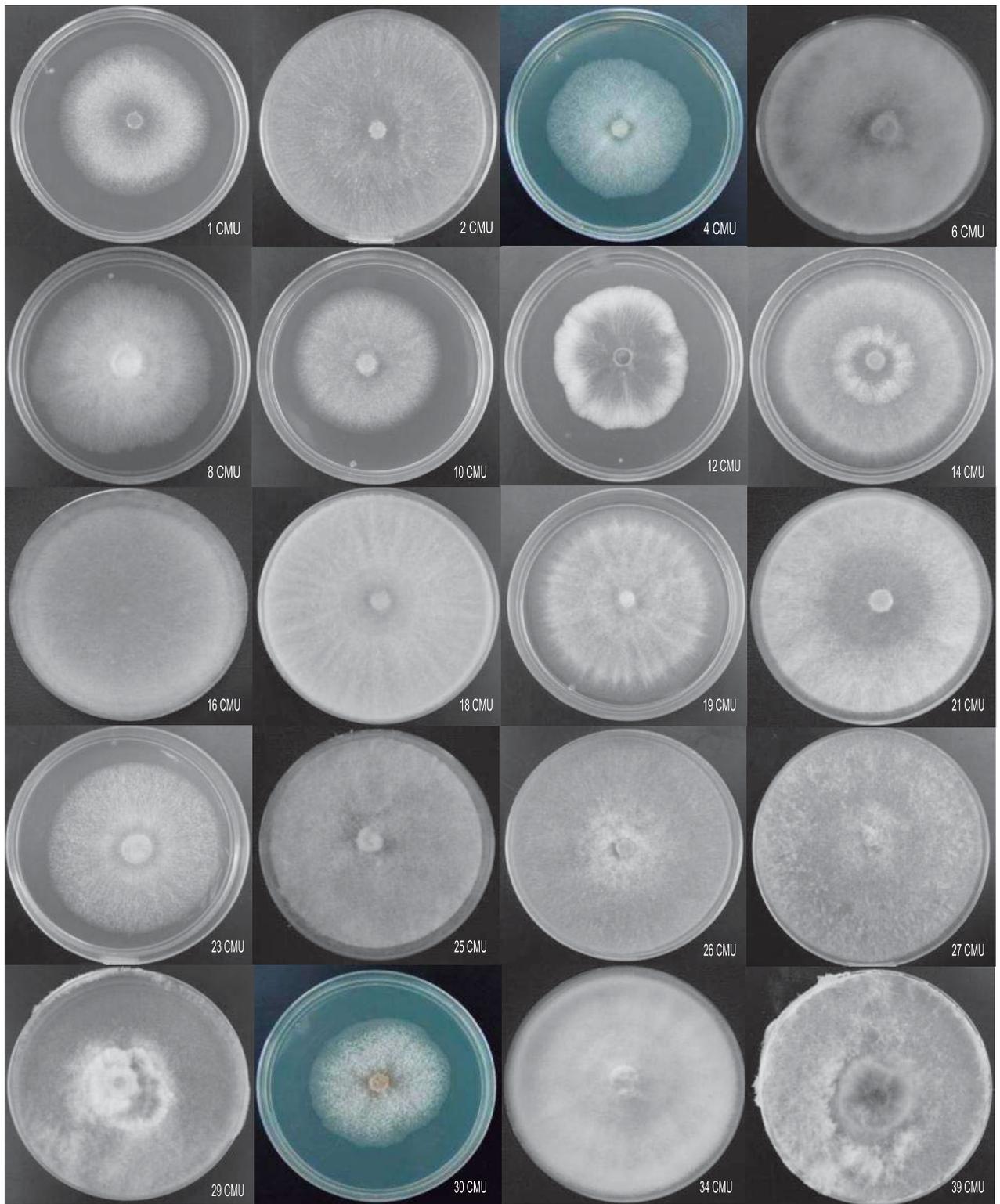
Con la finalidad de identificar cada una de las secuencias que se obtienen, se realiza una búsqueda de identidad por comparación con las secuencias depositadas en el GenBank. Se utiliza el software de comparación entre secuencias BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en el sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). Se seleccionan las secuencias que presentan la mayor identidad con cada una de las secuencias obtenidas en el presente trabajo y se realiza un alineamiento múltiple empleando el algoritmo ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) editando las secuencias para la optimización del alineamiento mediante el programa BioEdit (Hall, 1999). A partir del alineamiento múltiple generado se construyen dendogramas empleando el paquete MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Para todas las secuencias se utiliza el algoritmo de Jukes-Cantor para el cálculo de las distancias genéticas y los dendogramas se generan mediante el criterio de agrupamiento UPGMA.

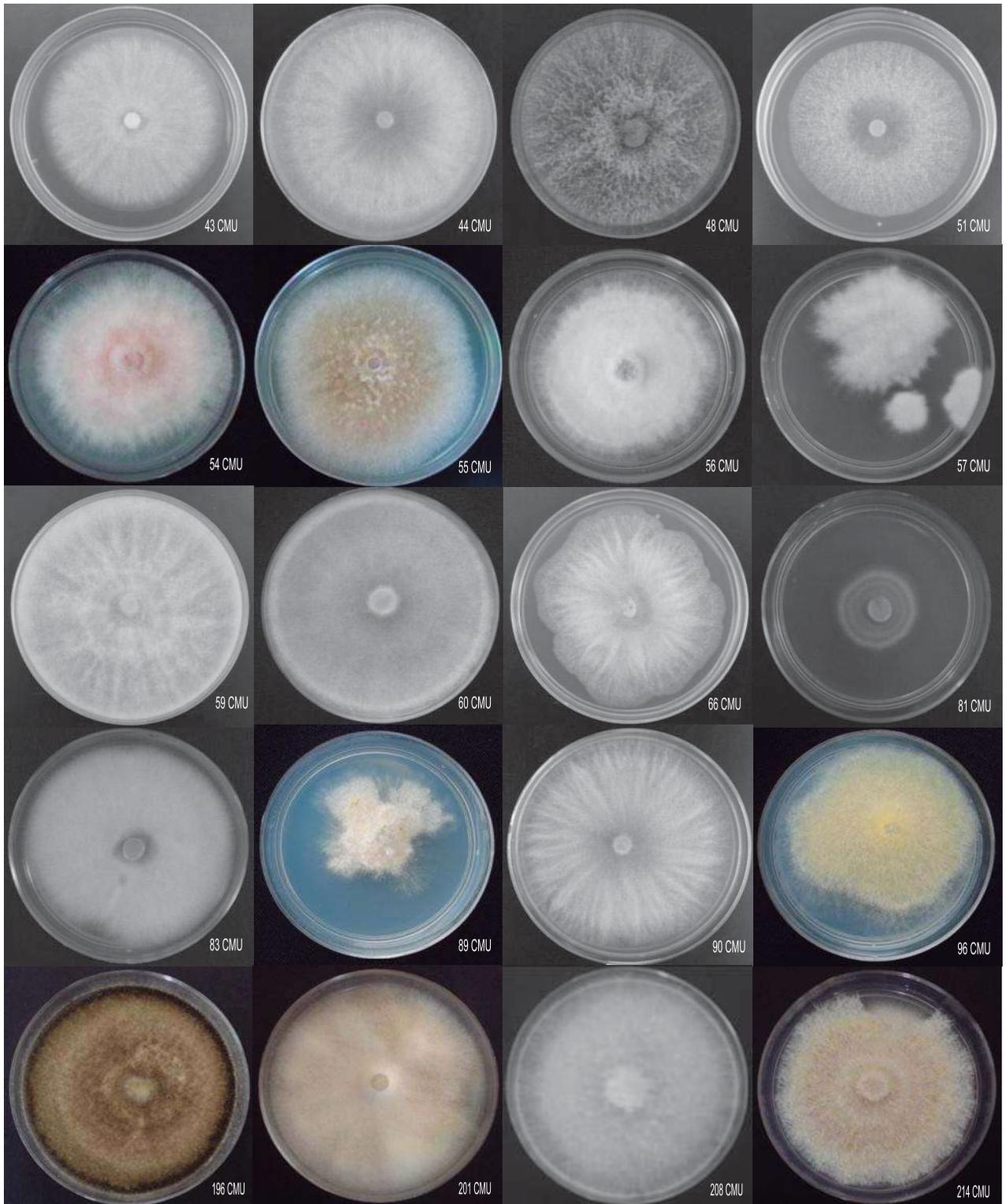
VI.RESULTADOS

VI.1 Obtención de cultivos axénicos

En total se obtuvieron 58 aislados de micelio vegetativo en cultivo axénico, comúnmente después de tres a cuatro resiembras. Las características macroscópicas (coloniales) de los aislados fueron muy diversas, la gran mayoría de estos presentaban un aspecto algodonoso y de color blanco tanto con bordes regulares (Fig. 4; aislados 1, 2, 4, 6, 10, 14, 16, 18, 21, 28, 25, 26, 27, 29, 34, 43, 44, 51, 59, 61, 83,) como con bordes irregulares (Fig. 4; aislados, 8, 12, 19, 57, 66, 99). Algunos aislados mostraban micelio aéreo y abundante (Fig. 4; aislados 12, 29, 39, 48, 96, 208, 234) y en el caso del 29, 39, 234 se pudo observar que al cabo de pocos días de incubación desbordaba la caja (Fig. 4). Algunos de estos micelios exhibieron anillos de conidiación (Fig. 4; aislado 14, 18, 59).

Se observaron también aislados con características muy peculiares con tonalidades; naranja (Fig. 4; aislado 30), rosadas (Fig. 4; aislados 54, 56, 81, 208 y 226), verdes (Fig. 4; aislados 48 y 233), arena (Fig. 4; aislados 56, 89, 201, 214 y 219), lila (Fig. 4; aislados 208, 216 y 243), café (Fig. 4; aislados 55 y 196), amarilla (Fig. 4; aislado 96) la mayoría de estas con bordes irregulares (Fig. 4; aislados 54, 55, 56, 89, 96, 201, 214, 216, 219, 226 y 233) y otros más con bordes regulares (Fig. 4; aislados 48, 81, 196 y 208). En el caso de estos micelios con tonalidades específicas, éstas se fueron intensificando conforme se desarrollaba el hongo; algunos de estos aislados exhiben un micelio algodonoso abundante (Fig. 4; aislados 48, 54, 55, 56, 96, 201, 208, 243), otros micelio algodonoso poco abundante (Fig. 4; aislados 89, 214, 216 y 219) y en algunos aislados el micelio aéreo fue escaso, muy pegado a la superficie del medio de cultivo (Fig. 4; aislados 81, 196, 226 y 233).





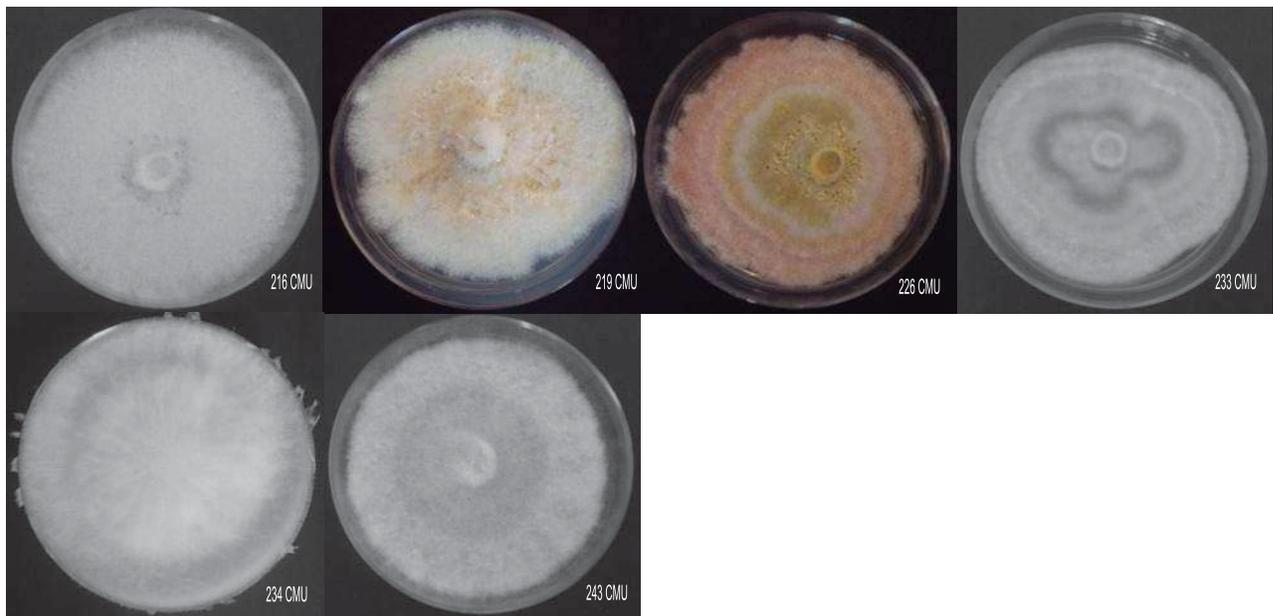


Figura 4. Cultivos axénicos. Medio PDA incubadas a 28°C

Se pudo notar que ciertos aislados después de un periodo de incubación aproximado de 4 días produjeron una secreción viscosa transparente (Fig. 4; aislados 96, 219 y 226).

Un porcentaje mayoritario de lo aislados creció relativamente rápido, llenado la caja en un tiempo promedio de 3 días (Fig. 4; aislados 2, 6, 14, 16, 18, 21, 25, 26, 27, 29, 34, 39, 44, 59, 60 y 234), aunque hubo algunos aislados que tardaron más tiempo en crecer (5 a 10 días) (Fig. 4; aislados 12, 30, 54, 56, 57, 81, 89, 96, 214, 219, 226 y 233).

Varios de los aislados presentaron características particulares durante su desarrollo. Por ejemplo, el aislado 12 exhibía un crecimiento vigoroso al cabo de un día de incubación mostrando un micelio blanco y algodonoso que se extendía sobre el medio de cultivo pero en seguida comenzaba a formar el micelio aéreo y abundante como se muestra en la imagen (Fig. 4), disminuyendo su velocidad de crecimiento. Una característica específica de los aislados 19 y 89 es que durante el crecimiento del micelio vegetativo este no solo se extiende a través del medio

de cultivo sobre la superficie del mismo, sino que también se podían observar hifas penetrando al medio de cultivo (Fig. 4). En el caso del aislado 30, aparte de la tonalidad naranja, es un aislado que mantenía su crecimiento lento y muy al ras del medio, con hifas abundantes y delgadas, formando aglomerados miceliares, con apariencia de pequeños copos de nieve. El aislado 54 mostró al inicio de su desarrollo un micelio blanco y algodonoso, pero después de 3 a 4 días de incubación comenzaba a tomar la tonalidad rosada característica, manteniendo una masa micelial abundante. El aislado 55 comenzaba su desarrollo con un micelio blanco y conforme pasaba el periodo de incubación adquiría la tonalidad café, formando aglomerados pequeños dándole apariencia “carnosa” en el centro de la caja (Fig. 4). En el caso del aislado 81, el micelio poco abundante crecía con la misma tonalidad desde un principio, extendiéndose al ras del medio de cultivo; este micelio era muy compacto ya que al momento de desprenderlo del medio se mantenía unido como una película viscosa difícil de separar. El aislado 89 concentraba su crecimiento en el centro de la placa, extendiéndose de manera lenta e irregular a través del medio. El aislado 96 fue un micelio fuertemente adherido al medio de cultivo, que a pesar de ser algodonoso sus hifas eran rígidas y viscosas, difíciles de separar; en el caso de este aislado incluso fue complicado tomar inóculos del micelio con el método utilizado con los demás aislados, puesto que no se cortaba fácilmente como los demás micelios. El micelio del aislado 196 inicialmente tenía una tonalidad blanca, incluso llegaba a llenar la caja de Petri con una tenue tonalidad café; en poco tiempo (24 h de incubación adicionales) exhibía la tonalidad café intensa que se muestra en la imagen (Fig. 4). El aislado 214 creció lentamente exhibiendo hifas gruesas y separadas que al final daban al micelio una apariencia de corteza de tronco por el relieve característico que muestra, incrementando su tonalidad en el centro de la placa (Fig. 4). El aislado 216, al igual que el aislado 30, creció lentamente mostrando un micelio poco abundante y al ras de la superficie del medio de cultivo, con aglomerados miceliales; las características de desarrollo fueron muy semejantes entre ambos, solo que en este caso el micelio presentaba una tonalidad lila. El aislado 219 es uno de los que tuvieron un periodo de crecimiento prolongado, ya que tardó

alrededor de 10 días en llenar la caja de cultivo por completo. Dicho aislado presentó un micelio abundante, muy compacto y poco algodonoso, destacándose por la presencia de tonalidades cafés intensas en distintos sitios, principalmente en el centro de la placa, y por la producción de una secreción viscosa en forma de gotas. Los aislados 226 y 233 tuvieron un crecimiento lento, tardando aproximadamente 8 días en llenar el medio de cultivo, éstos desde un principio exhibieron la tonalidad que se muestra en la imagen (Fig. 4), el micelio fue poco abundante, creciendo al ras de superficie del medio de cultivo. En el caso del aislado 266 las tonalidades fueron incrementándose de amarillo marrón a rosa, destacándose la secreción que produjo a los 5 días de incubación.

Todos estos aislados fueron conservados para conformar el cepario bajo los métodos de preservación que se describieron en la sección de Materiales y Métodos.

VI.2 Supervivencia de las cepas a los métodos de conservación empleados.

VI.2.1 Conservación en agua a temperatura ambiente.

Un 83.3 % de los aislados estudiados fue capaz de sobrevivir a la conservación en agua después de 12 meses, el 63.1% después de 15 meses y el 81.8 % después de 33 meses. A los 12 meses el 2% sobrevivió a la conservación en agua pero presentó contaminación bacteriana, al igual que el 10% a los 15 meses y 7.5% a los 33 meses. En general, el 17.1% no sobrevivió a la conservación en agua a temperatura ambiente (Tabla III).

VI.2.2 Criopreservación (-80°C)

Del total de aislados estudiados, un 86.95% sobrevivió a la criopreservación después de 1 mes, el 100% después de 5 meses, el 80% después de 8 meses, el 86.6% después de 12 meses, el 73.3 % después de 15 meses y el 73.3% después de 33 meses. Al igual que en caso de la conservación en agua a temperatura ambiente, hubo aislados que sobrevivieron a la criopreservación pero presentaron contaminación bacteriana. Al mes de guardados, el 13.04% de los aislados sobrevivió presentando contaminación, a los 8 meses el 20%, a los 12 meses el 12.82%, a los 15 meses el 12.3% y a los 33 meses el 4.1%. En general el 5.5% de los aislados no sobrevivió a la criopreservación (Tabla III).

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación.

Aislado	Criopreservación (-80° C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
1				+	+ ^C	+	+		+
2				+	+	+	+		+ ^C
3				+	+	+	-		
4				+	+	+	+		+
5	+			+	+	+	+		+
6	+			+	+	+	+		+
7	+			+	+ ^C	+	+	+	+
8				+	+	+	+		+
9				+	+	+	-		
10	+			+	+	+ ^C	+	+	+
11	+			+ ^C	-	+	+		+
12	+				+	+			
13	+				+	+			
14			+	+ ^C	+	+	+		+
15			+ ^C	+ ^C	+	+	+		+
16			+	+	+	-	+		+
17			+		+				
18 A			+		+	+			+
18 B						+			
19			+		+	+			+
20			+		+	+			+
21	+				+	+			+
22				+ ^C	-		-	+	+

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación. (Continuación)

Aislado	Criopreservación (-80 C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
23	+			+	+		+		+
24				+ ^C	+	+	+		+
25			+	+	+	+	+		+
26	+	+			+	+			+
27				+	+	+	+		+
28	+ ^C			+ ^C	+ ^C		+		+
29	+		+	+	+	+	+		+
30			+		+	+			+
31					+	+			+
32	+				+	+			+
33	+				+	+			+
34	+				-	+			+
35					+	+			+
36					+				
37				+	+		+		
38				+	+	+	+		
39				+	+	+	+		
40				+	+	+	+		
41				+	+	+	+		
42					+				
43				+	+		+		
44				+	+		+		
45									

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación. (Continuación)

Aislado	Criopreservación (-80 C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
46				+	+	+	-		
47	+				+		-		
48				+	+	+	+		
49	+			+	+	+	+		
50			+		-			-	
51				+	+	+	+		
52	+				+	+			
53				+	+ ^C	+	-		
54					-	+		+	
55				+ ^C	+ ^C	+ ^C	+		+ ^C
56				+ ^C	+	+	-		+
57			+ ^C		+ ^C				+
58				+	-	+	+	+ ^C	+ ^C
59			+		+	+			+
60	+			+	+	+	+		+
61					+ ^C	+ ^C			+
62					-	+		+	+
63				+	-		-	+	+
64					+	+			+
65					+	+			+
66					+				+
67	+				-	+		+	+
68					+	+			-

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación. (Continuación)

Aislado	Criopreservación (-80 C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
69					+	+			+
70			+		-			+	-
71	+ ^C		+ ^C	+ ^C	+ ^C		-	-	-
72	+ ^C		+ ^C	+ ^C			-		-
73					+	+			+
74				-			-		-
75			+		+	+			+
76					+			+	+
77				+	-	+	+	+	
78				+	-		+	-	
79			+	+	+	+	+		
80					+				+
81					+	+			
82					+	+			
83				+ ^C	+	+	-		
84					+	+			+
85					+	+			+
86			+		+ ^C	+			+
87					+	+			+
88			+		+	+	-		-
89					+	+			
90					+	+			+
91				+ ^C	+ ^C		+	+ ^C	-

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación. (Continuación)

Aislado	Criopreservación (-80 C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
92					-			-	+
93					-			-	+
94					-	+		+	+
95				+	+	+	+		+ ^C
96				+	+ ^C	+	-		+
97		+		+	+	+	+	+	+
98									
99					+ ^C				
132					+				
133					+				
134					+				
141					+				
142					+				
149				+	+		+		
150					+ ^C				
151					+	+			
180				+			+		
181				+			+		
182				+			+		
183				+			+		
196				+			+		
197				+			+		
199				+			+		

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación. (Continuación)

Aislado	Criopreservación (-80 C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
200				+			+		
201				+			+		
202				+			+		
204				+			+		
207				+			+		
208				+			+		
210				+			+		
212				+			+		
213				+			+		
214				+			+		
215				+			+		
216				+			+		
217				+			+		
218				+			+		
219				+			+		
220				+			+		
221				+			+		
222				+			+		
225				+			+		
226				+			+		
230				+			+		
231				+			+		
232				+			+		

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Tabla III. Supervivencia de los aislados de estudio bajo distintos métodos de preservación. (Continuación)

Aislado	Criopreservación (-80 C)						Temperatura Ambiente		
	M e s e s						M e s e s		
	1	5	8	12	15	33	12	15	33
233				+			+		
234				+			+		
235				+			+		
236				+			+		
237				+			+		
238				+			+		
239				+			+		
240				+			+		
241				+			+		
242				+			+		
243				+			+		
244				+			+		
245				+			+		

^a las tiempos de supervivencia se especifican en meses.

Códigos: +, si presentó crecimiento; -, no presentó crecimiento, C, cultivo contaminado

Preservación en agua a temperatura ambiente

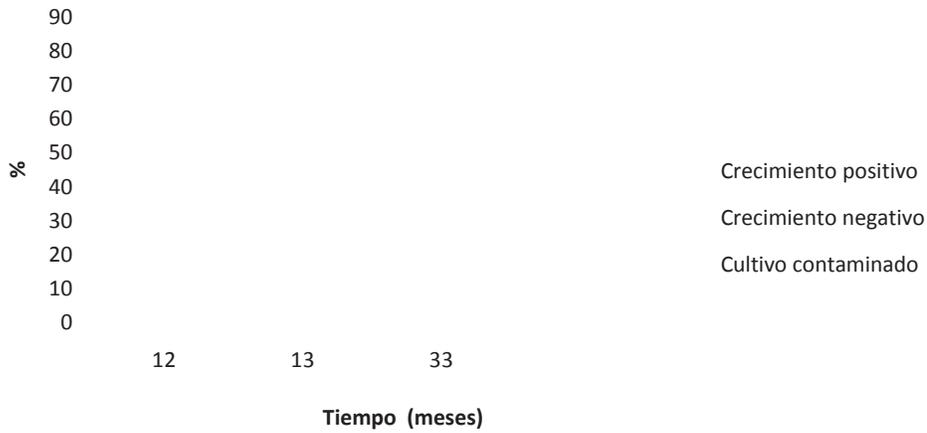


Figura 5. Gráfico que muestra el resumen de los resultados de la preservación en agua a temperatura ambiente.

Criopreservación a -80°C

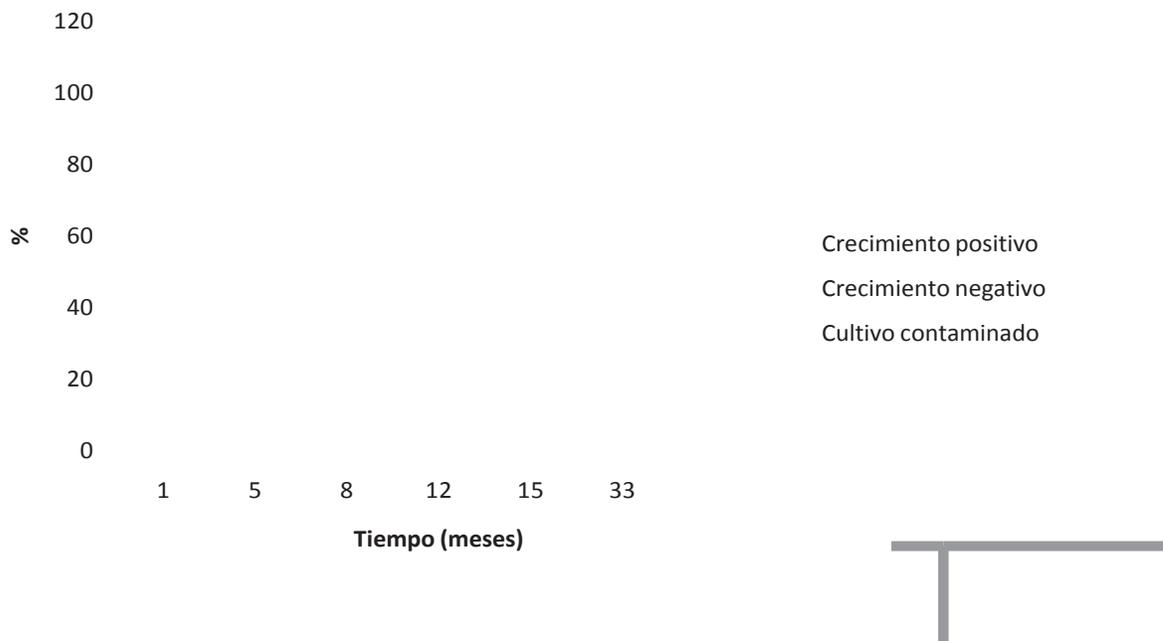


Figura 6. Gráfico que muestra el resumen de los resultados de la criopreservación a -80°C.

VI.3 Aislamiento y preservación de ADN de alto peso molecular

De todos los aislados de interés se obtuvo ADN de alto peso molecular. En general, la mayor parte del ADN obtenido fue de un tamaño igual o superior a las 20 kb (Fig. 7). También fueron evidentes las diferencias en los rendimientos ya que de algunas muestras se obtuvieron más de 5 μg (Fig. 7, carriles 7, 8, 9, 10, 11 y 12), Mientras que en otras muestras los rendimientos fueron más bajos, obteniéndose 1 μg o menos en total (Fig. 7; carriles 13, 14, 15 y 16). Aunque algunas muestras de ADN mostraron degradación, estas contenían un alto porcentaje de ADN de alto peso molecular (Fig. 7; carriles 7, 8, 9, 10, 11 y 12), por lo que se consideraron útiles para los ensayos de PCR. Todas las muestras de ADN se conservaron como complemento del cepario.

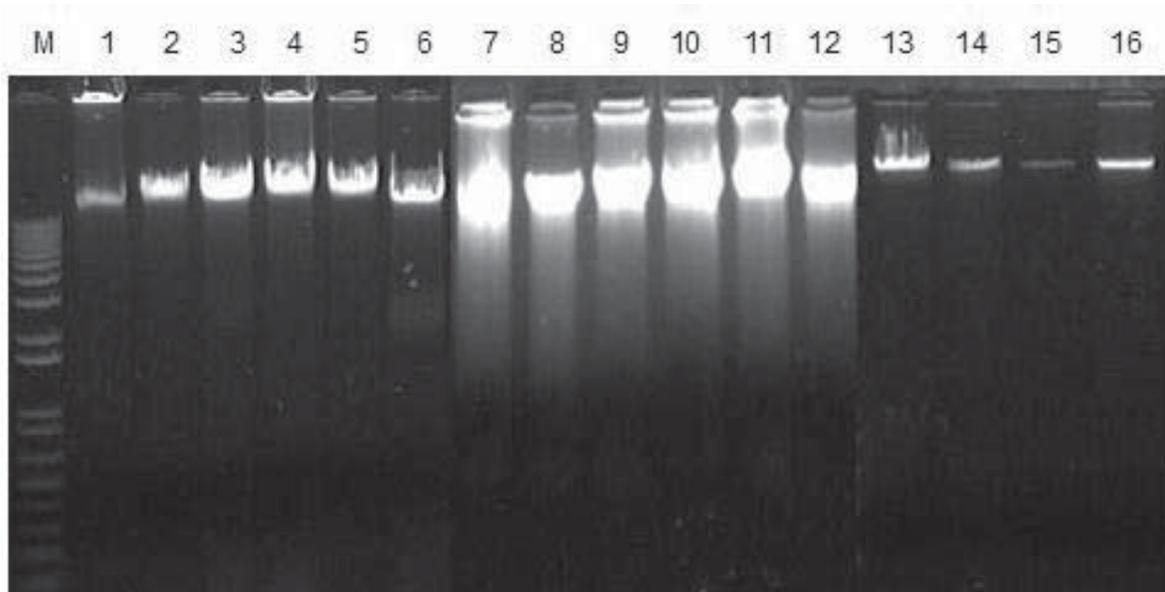


Figura 7. ADN de los aislados obtenidos. Carriles: 1, 201; 2, 208; 3, 214; 4, 216; 5, 218; 6, 219; 7, 96; 8, 57; 9, 89; 10, 55; 11, 54; 12, 238; 13, 233; 14, 234; 15, 245; 16, 200. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M, marcador de peso molecular, 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA).

VI. 4 Amplificación por PCR de la región ITS de los aislados de estudio

A partir del ADN obtenido se amplificó la región ITS de la Unidad Ribosomal, obteniéndose una sola banda de amplificación de dicha región, el tamaño de las bandas para todas las muestras osciló entre 500 pb y 650 pb (Fig.8).

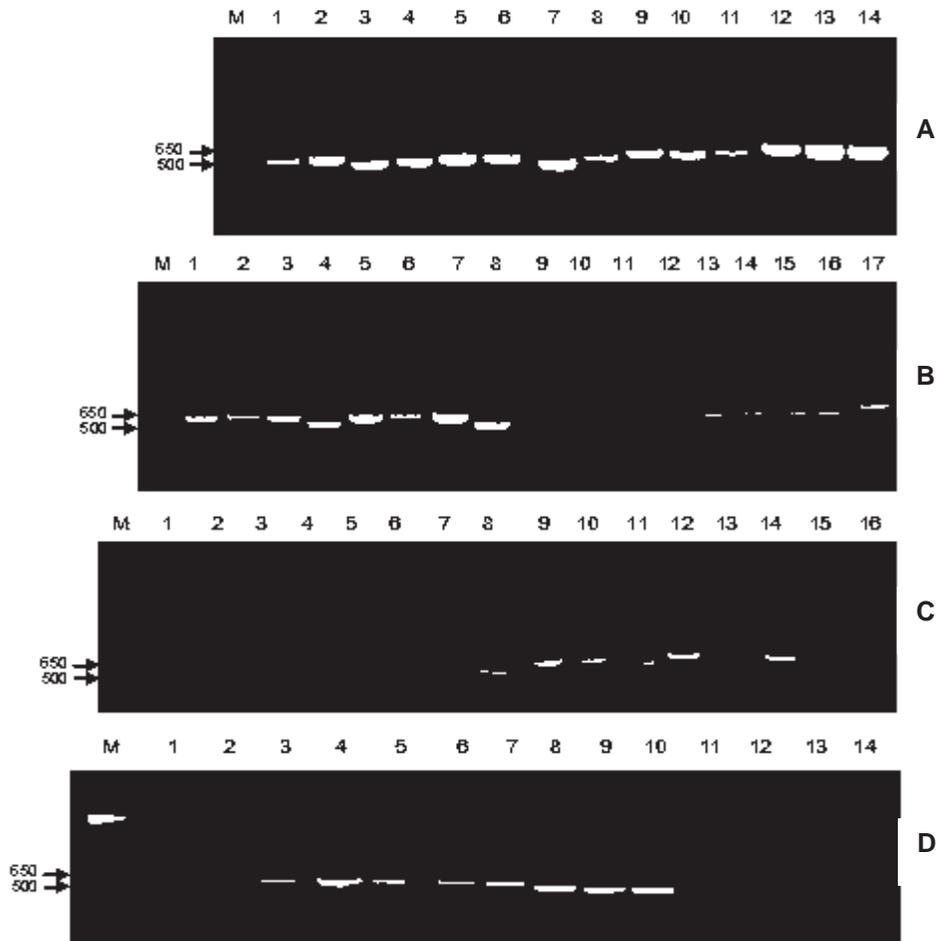


Figura 8. Patrones de amplificación mediante PCR de la región ITS de distintos aislados. Panel **A**, Carriles: 1, 66; 2, 90; 3, 30; 4, 48; 5, 43; 6, 26; 7, 216; 8, 226; 9, 231; 10, 34; 11, 25; 12, 245; 13, 1; 14, 51. Panel **B**, Carriles: 1, 244; 2, 27; 3, 39; 4, 57; 5, 89; 6, 55; 7, 54; 8, 238; 9, 29; 10, 44; 11, 16; 12, 14; 13, 10; 14, 8; 15, 4; 16, 218; 17, 219. Panel **C**, Carriles: 1, 56; 2, 59; 3, 81; 4, 83; 5, 95; 6, 196; 7, 198; 8, 222; 9, 234; 10, 236; 11, 239; 12, 316; 13, 235; 14, 231-M; 15, 33; 16, 2. Panel **D**, Carriles: 1, 12; 2, 18; 3, 19; 4, 23; 5, 181; 6, 183; 7, 201; 8, 208; 9, 214; 10, 21; 11, 243; 12, 233; 13, 2000; 14, 96. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M, marcador de peso molecular, 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA).

VI.5 Tipificación genético molecular de los aislados de estudio

VI.5. 1 Búsqueda de identidad en el GenBank

De los productos de amplificación generados se obtuvieron las secuencias correspondientes, todas las secuencias incluyeron por completo a la región ITS1, al gen 5.8S y a la región ITS2 de la Unidad Ribosomal. El tamaño fue semejante para todas las secuencias, encontrándose variaciones entre 500 y 600 pb (Anexos). Las secuencias obtenidas se utilizaron para realizar una búsqueda en el banco de genes, empleando el algoritmo BLAST, como se describió en Materiales y Métodos.

De los resultados de la búsqueda BLAST se seleccionaron entre 3 y 5 taxa (secuencia) del Gen Bank que presentaron la mayor identidad con cada una de las secuencias de los aislados de estudio. El criterio de selección de los taxa del banco de genes para ser utilizados en un posterior análisis de agrupamiento consistió en incluir aquellas secuencias que tuvieran los valores máximos de identidad al comparar arriba del 90% de la secuencia de estudio y cuyo valor de E resultado del análisis de búsqueda fuera cero o cercano a cero. No obstante, en algunos casos, debido al resultado de la búsqueda fue necesario incluir secuencias del banco de genes de las cuales se había comparado entre el 81 % y el 86% de nucleótidos con la secuencia de estudio (ver los casos de los aislados 234, 10 y 66 en la Tabla IV). Del análisis BLAST de algunas de las secuencias de estudio solo se seleccionaron una o dos taxa, ya en estos casos se compartían resultados de identidad con otras de las secuencias de estudio, por lo que no era necesario incluir taxa previamente seleccionados (ver en la Tabla IV, el caso de los aislados 201, 216, 196 y 236).

En general los resultados de la búsqueda BLAST de las secuencias de todos los aislados de estudio fue muy preciso. La extensión de las regiones ITS comparadas varió entre 430 y 570 pb. Aun en los casos de las secuencias que se comparó abajo del 90% de la su extensión las identidades encontradas variación

entre el 89% y el 80% (Tabla IV, Aislados 234, 10, 19, 66 y 81). Los valores de E generados de la búsqueda también le dieron respaldo a los taxa seleccionados del banco de genes, ya que esos fueron cercanos a cero o cero. En este caso, los máximos valores de E encontrados fueron para la búsqueda realizada con la secuencia del aislado 66 con un valor fijo de $4e^{-57}$ para todos los taxa con los cuales se comparó, seguido del aislado 26, cuyos valores oscilaron entre $7e^{-61}$ y $5e^{-67}$.

Al realizar la búsqueda BLAST en el Gen Bank con las secuencias obtenidas se encontró que del total de aislados estudiados, más del 43% pertenecía al género *Hypocrea* y sus anamorfos del género *Trichoderma*, (Tabla IV; aislado 1, 4, 8, 14, 16, 18, 19, 21, 23, 34, 25, 43, 44, 51, 66, 90, 181, 183, 196, 218, 222, 231-A, 231-M, 239, 235), el 20% presentaron identidad con especies de los géneros *Fusarium* y *Gibberella* (Tabla IV; aislado 10, 54, 55, 83, 201, 208, 216, 219, 226, 238, 244, 243) y el 10% al género *Pestalotiopsis* (Tabla IV; aislado 29, 56, 57, 198, 245), siendo estos tres géneros los más representados dentro del cepario.

Los demás aislados se relacionaron específicamente entre los géneros *Bionectria* y *Gliocladium*, (Tabla IV; aislado 214), *Diaporthe* y *Phomopsis* (Tabla IV; aislado 48), *Didymella* y *Phoma* (Tabla IV; aislado 89), *Botryosphaeria* y *Lasiodiplodia* (Tabla IV; aislados 89, 39), *Diplodia* y *Sphaeropsis* (Tabla IV; aislado 12), *Aspergillus* (Tabla IV; aislado 219), *Mucor* y *Rhizomucor* (Tabla IV; aislado 96), *Neurospora* (Tabla IV; aislado 26), *Nigrospora* (Tabla IV; aislado 30), *Penicillium* y *Eupenicillium* (Tabla IV; aislado 233), *Ampelomyces*, *Epicoccum*, *Sphaeriothyrium*, y *Cerebella* (Tabla IV; aislado 59), entre otros.

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio.

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
214 CMU		
<i>Bionectria ochroleuca</i> (EU589152.1)	236/250 (94%)	7e ⁻¹⁰⁴
<i>Gliocladium penicillioides</i> (AF048733.1)	236/250 (94%)	7e ⁻¹⁰⁴
<i>Bionectria oblongispora</i> (AF358248.1)	235/250 (94%)	3e ⁻¹⁰²
<i>Bionectria pseudocholeuca</i> (AF358238.1)	235/250 (94%)	3e ⁻¹⁰²
234 CMU		
<i>Infundibulicybe gibba</i> (DQ490635)	535/561 (95%)	0.0
<i>Ampulloclitocybe clavipes</i> (AB301607)	535/585 (91%)	0.0
<i>Clitocybe lateritia</i> (U66431)	528/590 (89%)	0.0
<i>Lepista fibrosissima</i> (AY995148)	469/572 (81%)	9e ⁻¹²⁶
<i>Leucopaxillus tricolor</i> (EU819413)	477/588 (81%)	2e ⁻¹²²
<i>Clitocybe subditopoda</i> (EU669216)	476/587 (81%)	2e ⁻¹²²
<i>Clitocybe nebularis</i> (DQ486691)	477/588 (81%)	2e ⁻¹²²
<i>Collybia cirrhata</i> (AF274382)	386/461 (83%)	3e ⁻¹¹⁵
48 CMU		
<i>Diaporthe helianthi</i> (AJ312353.1)	514/516 (99%)	0.0
<i>Diaporthe ambigua</i> (DQ286274.1)	500/502 (99%)	0.0
<i>Phomopsis longicolla</i> (EU650789.1)	507/534 (94%)	0.0
<i>Diaporthe melonis</i> (AB105147.1)	488/507 (96%)	0.0
<i>Diaporthe phasealorum</i> (EU196746)	509/532 (95%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
89 CMU		
<i>Didymella bryoniae</i> (AB266846)	479/484 (98%)	0.0
<i>Didymella cucurbitacearum</i> (AY293804)	478/484 (98%)	0.0
<i>Phoma medicaginis</i> (DQ026014)	475/484 (98%)	0.0
<i>Phoma exigua</i> (DQ384612)	472/482 (97%)	0.0
27 CMU		
<i>Lasiodiplodia crassispora</i> (EU918710)	469/476 (98%)	0.0
<i>Lasiodiplodia plurivora</i> (EF445362)	469/476 (98%)	0.0
<i>Botryosphaeria rhodina</i> (DQ233597)	469/476 (98%)	0.0
<i>Lasiodiplodia parva</i> (EF622084)	467/474 (98%)	0.0
39 CMU		
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (FJ150695)	498/505 (98%)	0.0
<i>Botryosphaeria rhodina</i> (EF564146)	498/505 (98%)	0.0
<i>Ascomycete sp.</i> (AY753995)	496/503 (98%)	0.0
<i>Lasiodiplodia parva</i> (EF622084)	496/504 (98%)	0.0
12 CMU		
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (EU220447)	433/454 (95%)	0.0
<i>Diplodia pinea</i> (EF445342)	434/456 (95%)	0.0
<i>Botryosphaeria obtusa</i> (AY259096)	434/457 (94%)	0.0
<i>Diplodia scrobiculata</i> (EU220438)	434/458 (94%)	0.0
<i>Diplodia seriata</i> (EF445317)	432/456 (94%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
10 CMU		
<i>Gibberella thapsina</i> (EF152433)	388/457 (84%)	2e-121
<i>Fusarium dlamirii</i> (X94177)	387/457 (84%)	3e-120
<i>Fusarium nygamai</i> (X94174)	385/454 (84%)	1e-119
54 CMU		
<i>Fusarium sp.</i> (EU818693)	475/482 (98%)	0.0
<i>Hypocreales sp.</i> (EF060487)	470/480 (97%)	0.0
<i>Pseudofusarium purpureum</i> (EU301058)	464/484 (95%)	0.0
<i>Fusarium chlamyosporum</i> (EU556725)	463/484 (95%)	0.0
<i>Sordariomycete sp.</i> (EU680483)	428/445 (96%)	0.0
55 CMU		
<i>Fusarium sp.</i> (EU818693)	475/482 (98%)	0.0
<i>Hypocreales sp.</i> (EF060487)	470/480 (97%)	0.0
<i>Pseudofusarium purpureum</i> (EU301058)	464/484 (95%)	0.0
<i>Fusarium chlamyosporum</i> (EU556725)	463/484 (95%)	0.0
<i>Sordariomycete sp.</i> (EU680483)	428/445 (96%)	0.0
<i>Fusarium tumidum</i> (AF006349)	434/465 (93%)	0.0
83 CMU		
<i>Fusarium chlamyosporum</i> (AB369435)	499/500 (99%)	0.0
<i>Fusarium incarnatum</i> (AB369432)	497/498 (99%)	0.0
<i>Fusarium equiseti</i> (EU287811)	491/491 (100%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
201 CMU		
<i>Fusarium tricinctum</i> (FJ233196)	301/311 (96%)	3e ⁻¹⁴³
<i>Gibberella avenacea</i> (AY787703)	301/311 (96%)	3e ⁻¹⁴³
208 CMU		
<i>Gibberella moniliformis</i> (EU835475)	471/474 (99%)	0.0
<i>Fusarium proliferatum</i> (EU272509)	471/474 (99%)	0.0
<i>Gibberella moniliformis</i> (EU314989)	471/474 (99%)	0.0
216 CMU		
<i>Fusarium oxysporum</i> (FJ233193)	473/474 (99%)	0.0
219 CMU		
<i>Fusarium incarnatum</i> (AB369432)	488/489 (99%)	0.0
<i>Gibberella zeae</i> (EF158024)	479/489 (97%)	0.0
226 CMU		
<i>Fusarium chlamydosporum</i> (EU556725)	499/501 (99%)	0.0
<i>Pseudofusarium purpureum</i> (EU301058)	468/469 (99%)	0.0
<i>Fusarium beomiforme</i> (X94178.)	471/502 (93%)	0.0
238 CMU		
<i>Fusarium</i> sp. (U61695)	475/476 (99%)	0.0
<i>Fusarium lateritium</i> (AF310981)	459/488 (94%)	0.0
<i>Fusarium equiseti</i> (EU016679)	456/485 (94%)	0.0
<i>Fusarium redolens</i> (X94169)	455/487 (93%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
243 CMU		
<i>Fusarium oxysporum</i> (FJ233193)	467/467 (100%)	0.0
<i>Fungal sp.</i> (EU563521)	467/467 (100%)	0.0
244 CMU		
<i>Fusarium subglutinans</i> (EU091040)	496/497 (99%)	0.0
<i>Fusarium napiforme</i> (DQ297555)	495/496 (99%)	0.0
<i>Gibberella fujikuroi</i> (AY188916)	496/497 (99%)	0.0
<i>Gibberella sacchari</i> (AF455450)	495/496 (99%)	0.0
<i>Fusarium sacchari</i> (X94168)	495/496 (99%)	0.0
96 CMU		
<i>Mucor hiemalis</i> (FJ025198)	536/576 (93%)	0.0
<i>Mucor hiemalis</i> (AY243949)	536/576 (93%)	0.0
<i>Mucor racemosus</i> (AF176659)	530/573 (92%)	0.0
<i>Mucor circinelloides</i> (AJ878535)	510/550 (92%)	0.0
<i>Rhizomucor variabilis</i> (EF583638)	525/579 (90%)	0.0
26 CMU		
<i>Neurospora sitophila</i> (AF388926)	141/141 (100%)	5e ⁻⁶⁷
<i>Neurospora intermedia</i> (EF197071)	140/141 (99%)	2e ⁻⁶⁵
<i>Neurospora tetrasperma</i> (AY577556)	140/141 (99%)	2e ⁻⁶⁵
<i>Neurospora crassa</i> (AY681193)	140/141 (99%)	2e ⁻⁶⁵
<i>Neurospora bonaerensis</i> (AY681177)	138/141 (97%)	7e ⁻⁶¹

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
30 CMU		
<i>Nigrospora sp</i> (EU714386)	485/489 (99%)	0.0
<i>Sordariomycete sp.</i> (EF687956)	480/483 (99%)	0.0
<i>Nigrospora oryzae</i> (EU272486)	477/490 (97%)	0.0
<i>Fusarium sp.</i> (DQ993637)	477/492 (96%)	0.0
<i>Xylariales sp.</i> (AB255262)	474/490 (96%)	0.0
233 CMU		
<i>Penicillium janthinellum</i> (DQ888733)	534/544 (98%)	0.0
<i>Penicillium ochrochloron</i> (AF033441)	527/544 (96%)	0.0
<i>Eupenicillium reticulisporum</i> (AF033437)	528/546 (96%)	0.0
<i>Penicillium simplicissimum</i> (AF033440)	525/543 (96%)	0.0
<i>Penicillium rolfsii</i> (AF033439)	524/544 (96%)	0.0
59 CMU		
<i>Ampelomyces humuli</i> (AF455485.1)	482/504 (95%)	0.0
<i>Epicoccum nigrum</i> (EU232716.2)	483/506 (95%)	0.0
<i>Sphaeriothyrium filicinum</i> (EU552164.1)	483/507 (95%)	0.0
<i>Cerebella andropogonis</i> (AJ306620.1)	478/506 (94%)	0.0
29 CMU		
<i>Pestalotiopsis clavispora</i> (EF119336)	509/512 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis paeoniicola</i> (EU400221)	505/509 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis oxyanthi</i> (FJ233194)	503/507 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis virgatula</i> (AY924282)	503/507 (99%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
56 CMU		
<i>Pestalotiopsis maculiformans</i> (EU552147)	544/551 (98%)	0.0
<i>Pestalotiopsis funerea</i> (EF055197)	544/552 (98%)	0.0
<i>Pestalotiopsis caudata</i> (EF055188)	543/551 (98%)	0.0
<i>Pestalotiopsis funereoides</i> (AY838893)	540/548 (98%)	0.0
<i>Pestalotiopsis yunnanensis</i> (AY526872)	529/537 (98%)	0.0
57 CMU		
<i>Pestalotiopsis neglecta</i> (EF055210)	517/519 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis lespedezae</i> (EF055205)	517/519 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis heterocornis</i> (EF055198)	517/519 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis disseminata</i> (EF055196)	517/519 (99%)	0.0
198 CMU		
<i>Pestalotiopsis neglecta</i> (EF055210)	544/549 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis lespedezae</i> (EF055200)	544/549 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> (EF055219)	543/549 (98%)	0.0
<i>Pestalotiopsis olivacea</i> (EF055215)	543/549 (98%)	0.0
<i>Pestalotia lawsoniae voucher</i> (AY687872)	541/546 (99%)	0.0
245 CMU		
<i>Pestalotiopsis neglecta</i> (EF055210)	497/526 (94%)	0.0
<i>Pestalotiopsis lespedezae</i> (EF055205)	497/526 (94%)	0.0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> (EF055221)	496/526 (94%)	0.0
<i>Pestalotiopsis olivacea</i> (EF055215)	496/526 (94%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
316 CMU		
<i>Pestalotia algeriensis</i> (EF055186)	545/548 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis cryptomeriae</i> (AY687299)	544/548 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis microspora</i> (EU935587)	544/549 (99%)	0.0
<i>Pestalotiopsis cocculi</i> (EF055194)	544/549 (99%)	0.0
<i>Monochaetia camelliae</i> (AY682948)	540/549 (98%)	0.0
1 CMU		
<i>Trichoderma viride</i> (EU280129.1)	545/545 (100%)	0.0
<i>Hypocrea lixii</i> (EF488145.1)	545/545 (100%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (EU280131.1)	544/545 (99%)	0.0
<i>Trichoderma ovalisporum</i> (EU280118.1)	544/545 (99%)	0.0
<i>Trichoderma viride</i> (DQ841734.1)	541/541 (100%)	0.0
4 CMU		
<i>Trichophyton rubrum</i> (EU622275)	343/350 (98%)	$2e^{-169}$
<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488161)	343/351 (97%)	$9e^{-168}$
<i>Hypocrea lixii</i> (EF488145)	343/352 (97%)	$1e^{-166}$
<i>Trichoderma atroviride</i> (FJ441613)	342/351 (97%)	$4e^{-166}$
<i>Trichoderma viride</i> (EU520246)	342/351 (97%)	$4e^{-166}$

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
8 CMU		
<i>Trichoderma viride</i> (EU732725)	550/551 (99%)	0.0
<i>Trichoderma atroviride</i> (EU280133)	550/551 (99%)	0.0
<i>T.harzianum</i> (Z48811)	550/551 (99%)	0.0
<i>T.koningii</i> (Z95495)	550/551 (99%)	0.0
14 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (EF596951.1)	555/555 (100%)	0.0
<i>Trichoderma inhamatum</i> (AY154955.1)	555/555 (100%)	0.0
<i>Trichoderma atroviride</i> (EF442080.1)	555/556 (99%)	0.0
<i>Trichoderma citrinoviride</i> (EF442076.1)	555/556 (99%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AJ230664.1)	555/556 (99%)	0.0
16 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (AY605753.1)	547/547 (100%)	0.0
<i>Trichoderma aureoviride</i> (EU816400.1)	546/547 (99%)	0.0
<i>Trichoderma piluliferum</i> (EU520051.1)	546/547 (99%)	0.0
<i>Sordariomycete sp.</i> (EU680555.1)	546/548 (99%)	0.0
18 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (EF596952.1)	366/368 (99%)	0.0
<i>Sordariomycete sp.</i> (EU680555.1)	363/364 (99%)	0.0
<i>Trichoderma inhamatum</i> (AM889223.1)	363/364 (99%)	0.0
<i>Hypocreales sp</i> (AY315397.1)	363/364 (99%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AF469188.1)	363/364 (99%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
19 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (EU821780)	355/424 (83%)	5e ⁻¹³²
<i>Trichoderma viride</i> (EU520122)	354/424 (83%)	2e ⁻¹³⁰
<i>Trichoderma inhamatum</i> (AF057602)	322/374 (86%)	5e ⁻¹²⁷
21 CMU		
<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488141.1)	561/564 (99%)	0.0
<i>Hypocrea lixii</i> (EF488145.1)	559/562 (99%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (EU280141.1)	555/558 (99%)	0.0
<i>Trichoderma ovalisporum</i> (EU280118.1)	554/557 (99%)	0.0
25 CMU		
<i>Trichoderma tomentosum</i> (EF488143.1)	516/529 (97%)	0.0
<i>Hypocrea lixii</i> (AY605754.1)	513/530 (96%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AY027784.1)	513/531 (96%)	0.0
23 CMU		
<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488141)	561/564 (99%)	0.0
<i>Hypocrea lixii</i> (EF488145)	559/563 (99%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (EF488150)	555/559 (99%)	0.0
<i>Trichoderma ovalisporum</i> (EU280118)	554/558 (99%)	0.0
<i>Hypocrea koningii</i> (FJ430783)	554/559 (99%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
34 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (EF593402)	568/577 (98%)	0.0
<i>Trichoderma atroviride</i> (EF442080)	564/573 (98%)	0.0
<i>Trichoderma citrinoviride</i> (EF442076)	563/574 (98%)	0.0
<i>Trichoderma inhamatum</i> (AF362101)	557/566 (98%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AF443912)	556/565 (98%)	0.0
43 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (AY605753.1)	555/556 (99%)	0.0
<i>Trichoderma aureoviride</i> (EU816400.1)	554/556 (99%)	0.0
<i>Trichoderma piluliferum</i> (EU520051.1)	554/556 (99%)	0.0
<i>Sordariomycete sp.</i> (EU680555.1)	554/557 (99%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AY154949.1)	554/557 (99%)	0.0
44 CMU		
<i>Hypocrea viridescens strain</i> (EU280104.1)	541/541 (100%)	0.0
<i>Trichoderma viride D isolate</i> (AY665699.1)	541/541 (100%)	0.0
<i>Trichoderma koningii</i> (AF218790.1)	541/541 (100%)	0.0
<i>T.harzianum</i> (Z68190.1)	541/542 (99%)	0.0
<i>H.rufa</i> (X93987.1)	540/541 (99%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
51 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (EF488145.1)	269/276 (97%)	7e ⁻¹³⁴
<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488141.1)	267/274 (97%)	9e ⁻¹³³
<i>Trichoderma atroviride</i> (EU595035.1)	269/277 (97%)	3e ⁻¹³²
<i>Trichoderma viride</i> (EU732725.1)	269/277 (97%)	3e ⁻¹³²
<i>Rhizopus stolonifer</i> (EU520188.1)	269/277 (97%)	3e ⁻¹³²
66 CMU		
<i>Hypocrea rufa strain</i> (EU709768.1)	207/244 (84%)	4e ⁻⁵⁷
<i>Hypocrea koningii</i> (EU722404.1)	207/244 (84%)	4e ⁻⁵⁷
<i>Trichophyton rubrum</i> (EU622275.1)	207/244 (84%)	4e ⁻⁵⁷
<i>Trichoderma ovalisporum</i> (EU280118.1)	207/244 (84%)	4e ⁻⁵⁷
90 CMU		
<i>Hypocrea lixii</i> (EU280091.1)	557/557 (100%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AF443913.1)	556/557 (99%)	0.0
<i>Trichoderma inhamatum</i> (AY154955.1)	556/558 (99%)	0.0
<i>Trichoderma atroviride</i> (EF442080.1)	556/559 (99%)	0.0
<i>Trichoderma citrinoviride</i> (EF442076.1)	556/559 (99%)	0.0
181 CMU		
<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488154.1)	552/554 (99%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (EU280108.1)	551/554 (99%)	0.0
<i>Hypocrea rufa</i> (AJ230685.1)	551/554 (99%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
183 CMU		
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (EU280141.1)	492/505 (97%)	0.0
<i>Hypocrea koningii</i> (EU280128.1)	492/505 (97%)	0.0
<i>Hypocrea koningii</i> (AM498469.1)	492/505 (97%)	0.0
<i>Trichoderma intricatum</i> (EU264002.1)	492/505 (97%)	0.0
196 CMU		
<i>Trichoderma tomentosum</i> (EU280081.1)	544/559 (97%)	0.0
218 CMU		
<i>Hypocrea rufa</i> (DQ838531.1)	526/536 (98%)	0.0
<i>Hypocrea viridescens</i> (EF488149.1)	542/561 (96%)	0.0
<i>Hypocrea viridescens</i> (DQ677651.1)	541/560 (96%)	0.0
222 CMU		
<i>Trichoderma tomentosum</i> (EU280083.1)	503/531 (94%)	0.0
<i>Hypocrea lixii</i> (EU280077.1)	498/533 (93%)	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i> (AY027780.1)	498/533 (93%)	0.0
<i>Trichoderma velutinum</i> (EF596953.1)	500/538 (92%)	0.0
231-A CMU		
<i>Hypocrea viridescens</i> (EU280104.1)	531/535 (99%)	0.0
<i>Trichoderma cf. viridescens</i> (EF070711.1)	531/535 (99%)	0.0
<i>Trichoderma viride</i> (AY665699.1)	531/535 (99%)	0.0
<i>T.harzianum</i> (Z68190.1)	531/536 (99%)	0.0
<i>Hypocrea vinosa</i> (DQ315447.1)	530/536 (98%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
231-M CMU		
<i>Hypocrea viridescens strain</i> (EF488149.1)	509/539 (94%)	0.0
<i>Trichoderma cf. viridescens</i> (EF070711.1)	510/541 (94%)	0.0
<i>Trichoderma viride</i> (AY665699.1)	510/541 (94%)	0.0
<i>T.koningii</i> (X93984.1)	510/541 (94%)	0.0
235 CMU		
<i>Hypocrea viridescens</i> (EF488156)	556/558 (99%)	0.0
<i>Trichoderma viride</i> (AY665698)	556/558 (99%)	0.0
<i>Trichoderma koningii</i> (AF218790)	554/556 (99%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (FJ430784)	554/559 (99%)	0.0
<i>T.harzianum</i> (Z68190)	549/552 (99%)	0.0
236 CMU		
<i>Hypocrea muroiana</i> (Z95925.1)	539/545 (98%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (EU520090.1)	539/551 (97%)	0.0
239 CMU		
<i>Hypocrea koningii</i> (AJ301990.1)	556/557 (99%)	0.0
<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488141.1)	561/565 (99%)	0.0
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (DQ379015.1)	555/557 (99%)	0.0
<i>Hypocrea lixii</i> (EF488145.1)	558/562 (99%)	0.0
<i>Hypocrea viridescens</i> (EF488156.1)	555/558 (99%)	0.0

Tabla IV. Resultados de la búsqueda BLAST en el Gen Bank empleando la secuencia de la región ITS de los aislados de estudio (Continuación).

TAXA	SITIOS IDENTICOS	VALOR DE E
81 CMU		
<i>Umbelopsis ramanniana</i> (AB193533)	571/587 (97%)	0.0
<i>Umbelopsis autotrophica</i> (DQ516528)	505/525 (96%)	0.0
<i>Mortierella turficola</i> (AJ878784)	356/443 (80%)	0.0
<i>Umbelopsis isabellina</i> (AY805542)	207/227 (91%)	0.0
2000 CMU		
<i>Mortierella humilis</i> (AJ878778)	534/535 (99%)	0.0
<i>Mortierella verticillata</i> (AY997063)	494/495 (99%)	0.0

VI. 6 Dendogramas obtenidos a partir de la región ITS de los aislados de estudio

Con la finalidad de tener una idea más precisa de las afinidades taxonómicas de los distintos aislados de estudio se realizó un análisis de agrupamiento en el que se incluyó cada una de las secuencias de la región ITS obtenidas en el presente trabajo y las de los taxa seleccionados mediante la búsqueda BLAST. Como se describió anteriormente, el análisis de agrupamiento involucró inicialmente un alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas y la posterior construcción de los árboles o dendogramas respectivos. Aquellas secuencias de nuestros aislados de estudio cuya búsqueda BLAST encontró identidades con los mismos taxa o especies del mismo género fueron analizadas de manera conjunta. Por otra parte, en algunos casos fue necesario realizar un análisis más de agrupamiento con la finalidad de intentar definir mejor las afinidades taxonómicas de algunos de los aislados.

El patrón de agrupamiento generado para al aislado 214 CMU muestra que dicho aislado tiene una relación estrecha con especies del género *Bionectria* y el taxón anamorfo *Gliocladium penicillioides*. Por lo anterior, es factible afirmar que el aislado 214 CMU puede ser una especie del género *Bionectria* o de sus anamorfos relacionados, posiblemente una especie de la que todavía no existe secuencia ITS en el GenBank (Fig. 9).

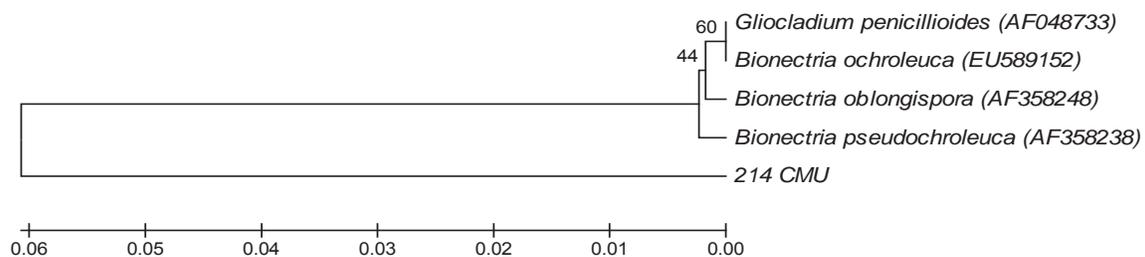


Figura 9. Patrón de agrupamiento del aislado 214CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el banco de genes (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El patrón de agrupamiento generado para el aislado 234 CMU indica que la secuencia forma parte de una rama con géneros dentro de la división Basidiomycota como *Collybia*, *Lepista*, *Clitocybe*, *Infundibulicybe* y *Ampulloclitocybe*. El árbol generado muestra dos grupos bien definidos en los que los valores bootstrap son de 99 y 100 (Fig. 10), ubicando al aislado 234 CMU junto con las especies *Infundibulicybe gibba*, *Clitocybe lateritia*, *Ampulloclitocybe clavipes*, siendo las dos primeras las más cercanas a nuestro aislado de estudio.

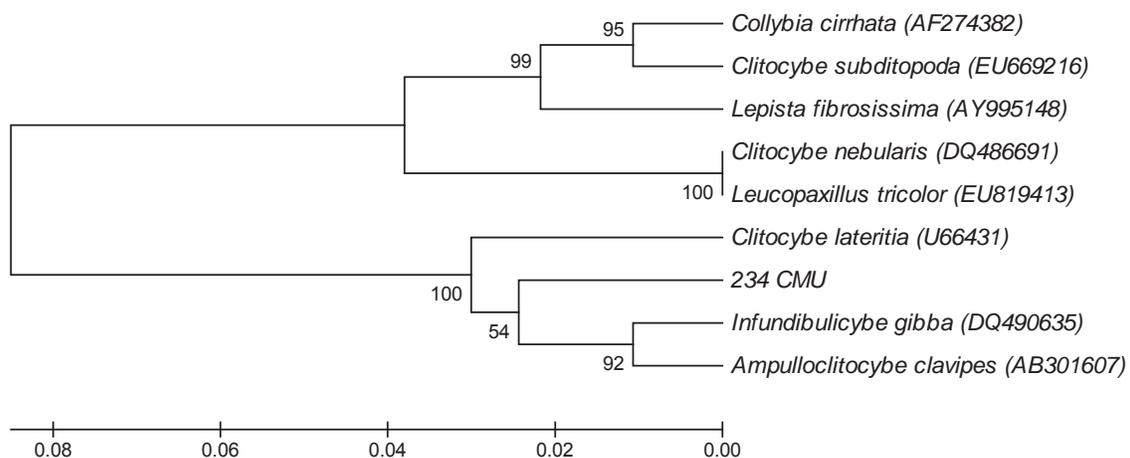


Figura 10. Patrón de agrupamiento del aislado 234 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

Con respecto al aislado 48 CMU, el dendograma generado revela que la secuencia ITS está estrechamente relacionada con especies del género *Diaporthe* y la forma asexual *Phomopsis longicolla* relacionada a éste (Fig. 11). En particular, el aislado aparece en una rama definida con un bootstrap de 100 con respecto a los otros tres taxa incluidos, junto con *Diaporthe helianthi* y *Diaporthe ambigua*, en la que los tres taxa no se definen con claridad (Fig. 11), por lo que es muy posible que el aislado 48 se una variación geográfica de cualquiera de estas especies.

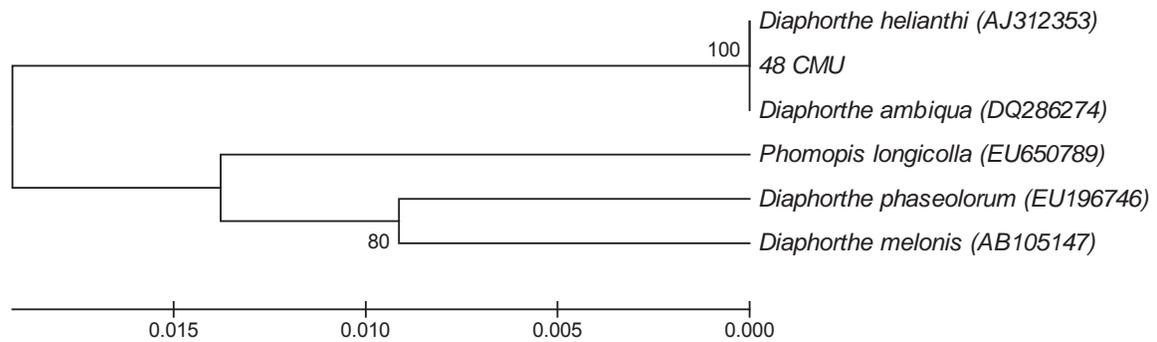


Figura 11. Patrón de agrupamiento del aislado 48 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El aislado 89 CMU se agrupó con *Didymella bryoniae* y *Didymella cucurbitacearum* al polarizar el árbol con *Phoma medicaginis* y *Phoma exigua*, las cuales también aparecieron en la búsqueda BLAST (Fig. 12). Muy probablemente nuestro aislado sea *D. bryoniae*, de acuerdo al patrón de agrupamiento generado y debido a los altos valores bootstrap que definen a las ramas terminales.

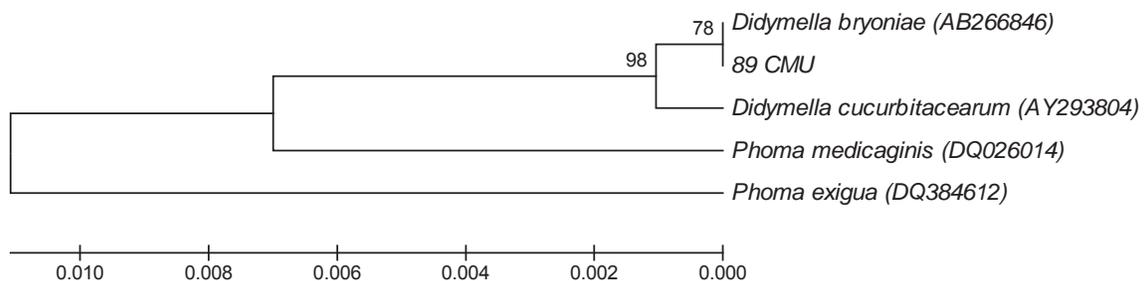


Figura 12. Patrón de agrupamiento del aislado 89 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

Debido a los resultados de la búsqueda BLAST, los aislados 12 CMU, 27 CMU y 39 CMU fueron analizados de manera conjunta. El dendograma generado muestra a los aislados 39 CMU y 27 CMU en ramas terminales junto con *Botryosphaeria rhodina* y los anamorfos del género *Lasiodiplodia* relacionados con dicha especie (Fig. 13). En una rama aparte se agruparon *Botryosphaeria obtusa* con su anamorfo *Diplodia seriata* y otras formas asexuales de dicho género y *Sphaeropsis sapinea*, también anamorfo relacionado; todos estos taxa aparecieron en la búsqueda BLAST del aislado 12 CMU. Debido a que el aislado 12 CMU polarizaba el árbol y presentaba una mayor distancia con respecto a las secuencias del resto de taxa analizados, se construyó otro patrón de agrupamiento en el cual se eliminó la secuencia de dicho aislado, con la finalidad de intentar resolver mejor las ramas terminales en las que aparecían los aislados 27 CMU y 39 CMU.

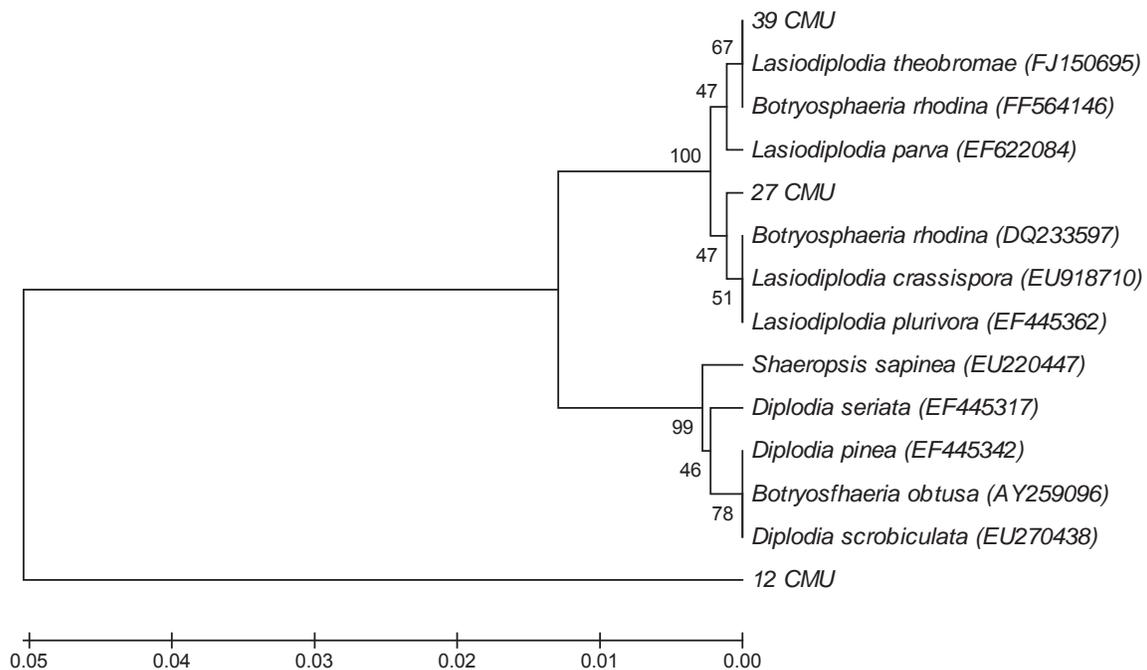


Figura 13. Patrón de agrupamiento de los aislados 39 CMU, 27 CMU y 12 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El nuevo patrón de agrupamiento generado no mostró una mejor resolución de los aislados de interés (Fig. 14), aunque el valor bootstrap que separa las ramas principales mostró un ligero incremento con respecto al árbol anterior, pasando de 47 a 57. Estos resultados permiten afirmar que los aislados 27 CMU y 39 CMU pertenecen a la especie *B. rhodina* o a algún estado anamórfico de ésta, en particular el aislado 39 CMU podría ser el estado anamórfico *L. theobromae* (Fig. 14).

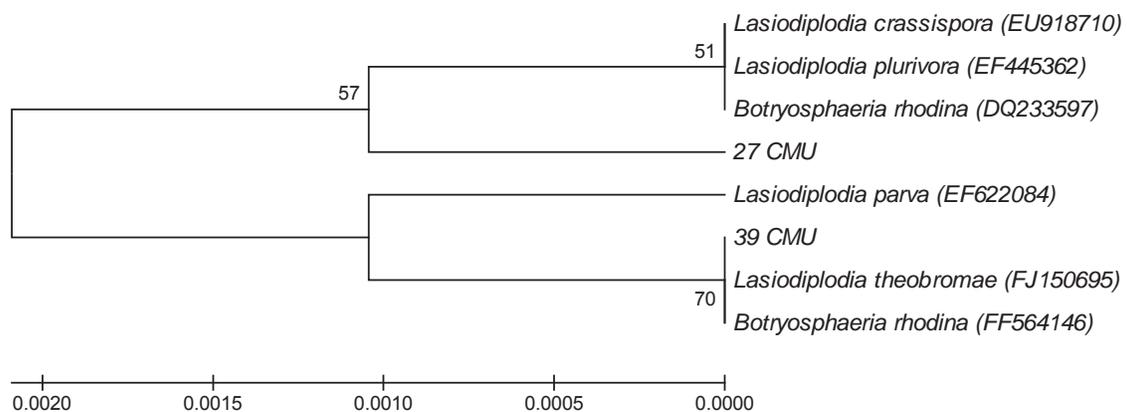


Figura 14. Patrón de agrupamiento de los aislado 27 CMU y 39 CMU con las taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

Al agrupar al aislado 12 CMU con los taxa afines obtenidos de la búsqueda BLAST, puede notarse que éste sigue polarizando el árbol, colocándose en una rama separada del grupo en el cual se encuentra *B. obtusa* y su anamorfo *D.serjata* con las otras dos especies de *Diplodia* y *Sphaeropsis sapinea* (Fig. 15). En este caso el aislado 12 CMU solo puede definirse como relacionado con taxa anamórficos de *B. obtusa*, posiblemente perteneciente a una especie de la cual no hay secuencia ITS depositada actualmente en el GenBank.

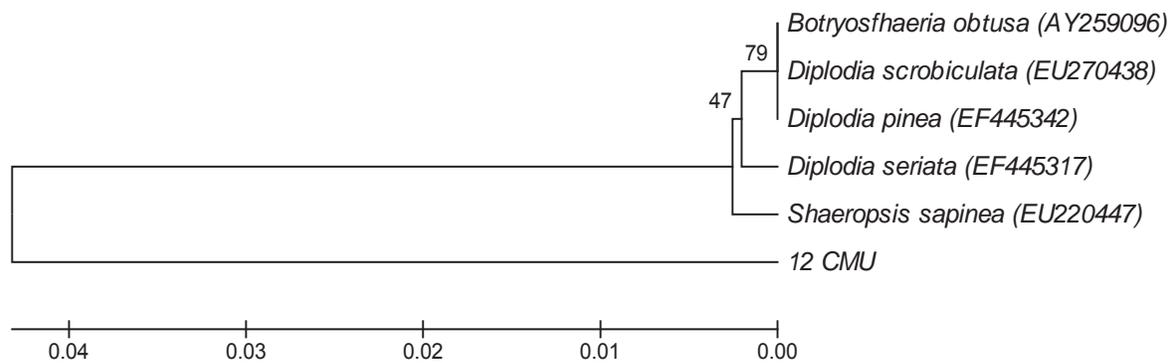


Figura 15. Patrón de agrupamiento del aislado 12 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El patrón de agrupamiento generado para los aislados 10 CMU, 54 CMU, 55 CMU, 83 CMU, 95 CMU, 201 CMU, 208 CMU, 216 CMU, 219 CMU, 226 CMU, 238 CMU, 243 CMU y 244CMU muestra que estos tienen una estrecha relación con especies del género ascomycete *Gibberella* y sus formas asexuales del género *Fusarium* (Fig. 16). En el árbol también se encuentra un taxa con el nombre de *Pseudofusarium purpureum*, el cual se incluyó por que apareció en la búsqueda BLAST, sin embargo *Pseudofusarium* en la actualidad es considerado un sinónimo obsoleto del género *Fusarium*. En el patrón de agrupamiento obtenido se observan dos grandes ramas principales y al aislado 10 CMU polarizando el árbol por lo que se generó un segundo dendograma en el cual se incluía al aislado 10 CMU y los taxa del BLAST que presentaron identidad con este junto con otros aislados del cepario, para ver como se modificaba la topología.

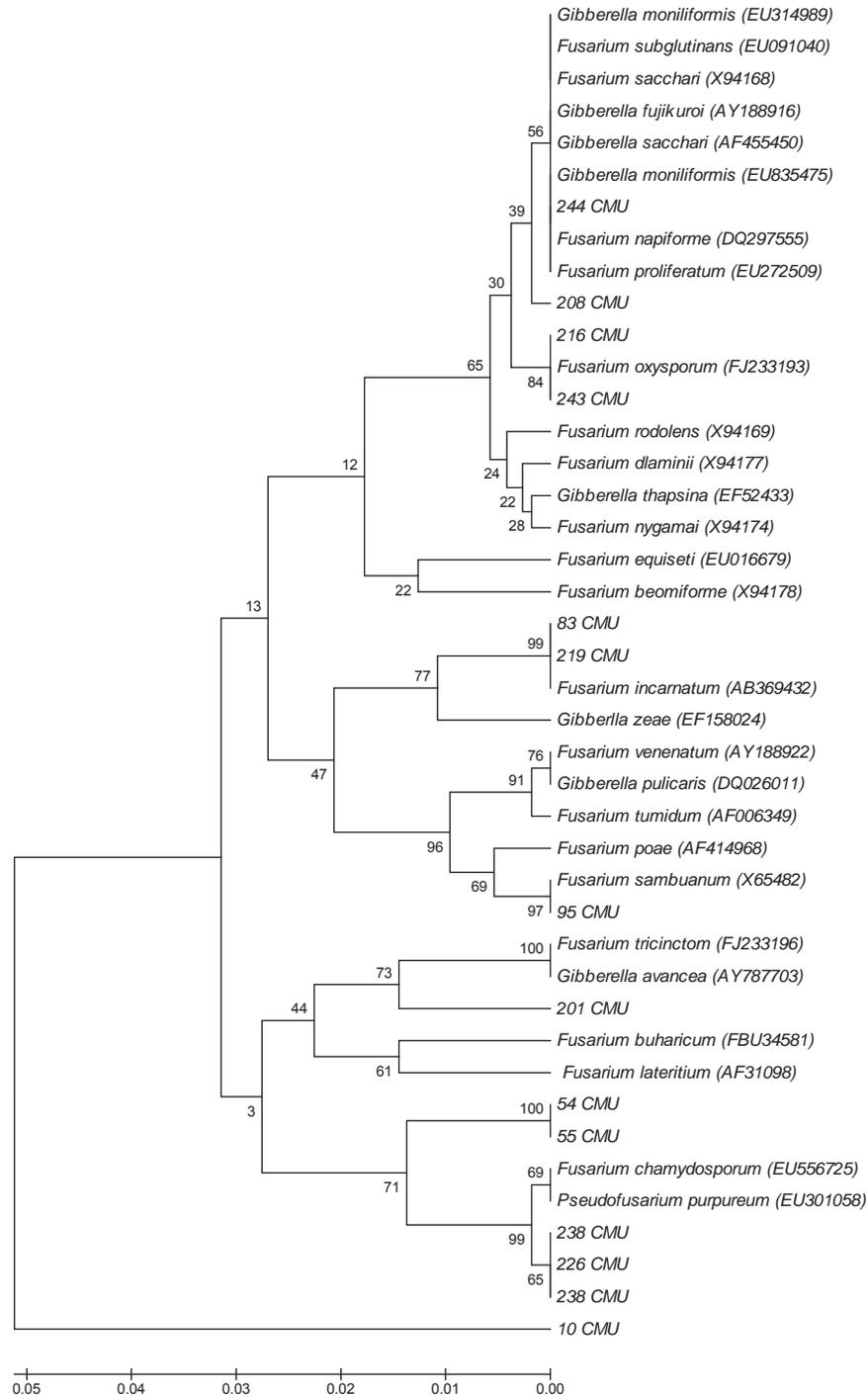


Figura 16. Patrón de agrupamiento de los aislados 10 CMU, 54 CMU, 55 CMU, 83 CMU, 95 CMU, 201 CMU, 208 CMU, 216 CMU, 219 CMU, 226 CMU, 238 CMU, 243 CMU y 244 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

En el dendograma generado con los aislados 10 CMU, 208 CMU, 216 CMU, 243 CMU y 244 CMU (Fig. 17) se observa como el aislado 216 CMU y 243 CMU se separan en una sola rama con un bootstrap de 99 presentando identidad con *Fusarium oxysporum* tratándose probablemente de aislados geográficos de esta especie. El aislado 244 CMU se relaciona con las especies *Gibberella fujikuroi*, *Gibberella moniliformis* y *Gibberella sacchari*, junto con los anamorfos *Fusarium subglutinans*, *Fusarium sachari*, *Fusarium napiforme* y *Fusarium proliferatum* siendo estos dos últimos taxa aquellos entre los que se encuentra el aislado analizado; separándose de este grupo con un bootstrap de 76 se encuentra el aislado 208 CMU el cual únicamente puede definirse a nivel de género asociándose con alguna especie de *Gibberella* o algún anamorfo de la cual probablemente no exista secuencia ITS depositada en el GenBank. Finalmente, el aislado 10 CMU se separa por completo del resto de taxa, polarizando de el árbol pero generando distancias genéticas muy cortas entre este y las especies de *Gibberella* relacionadas, probablemente éste aislado representa una secuencia ITS de una especie del género *Gibberella* que no está depositada en el GenBank.

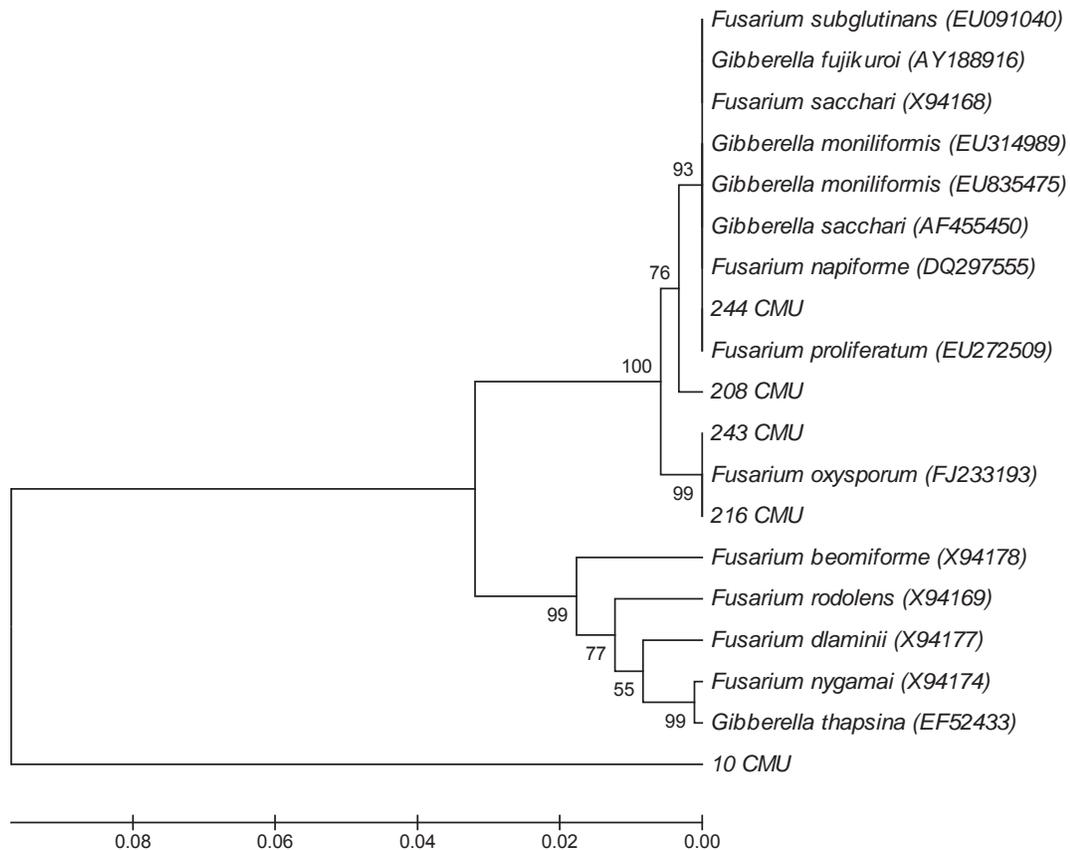


Figura 17. Patrón de agrupamiento de los aislados 10 CMU, 208 CMU, 216 CMU, 243 CMU y 244CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

En el segundo agrupamiento alternativo generado con una de las ramas de la Figura 17 aparecen los aislados 95 CMU, 83 CMU y 219 CMU (Fig. 18). En éste se observa como el aislado 95 CMU se separa con un bootstrap de 100 de un grupo de especies entre las que se encuentran *Gibberella pulicaris* y varios anamorfos de *Fusarium*. En lo que respecto al aislado 219 CMU, es muy probable que sea *Fusarium incarnatum* puesto que se agrupa únicamente con dicha especie separándose en una rama terminal con un bootstrap de 97, de esta misma rama el aislado 83 CMU se separa de esta rama con un bootstrap de 99.

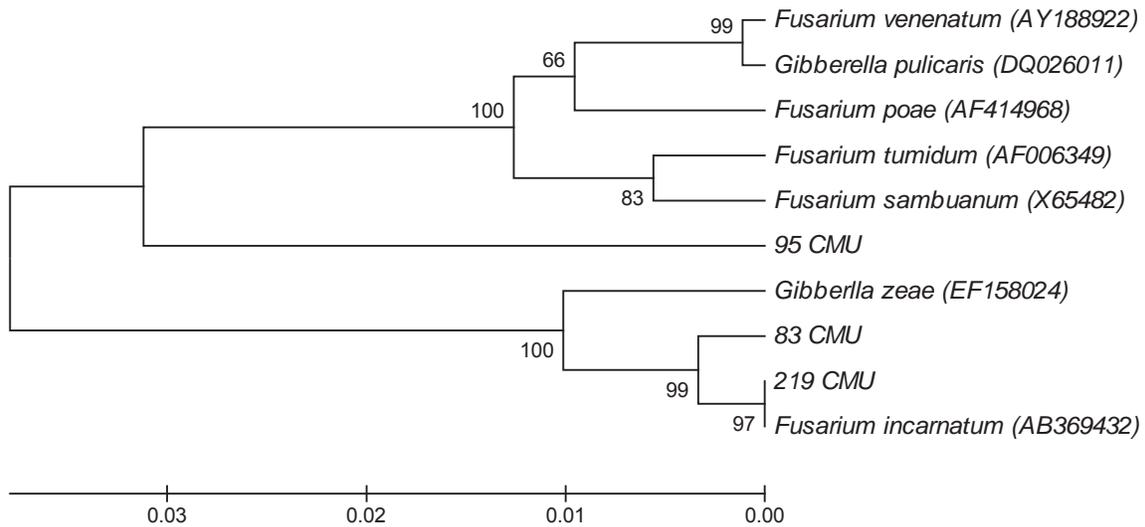


Figura 18. Patrón de agrupamiento de los aislados 95 CMU, 83 CMU y 219 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

En el dendrograma que agrupa a los aislados 54 CMU, 55 CMU, 201 CMU, 226 CMU, 238 CMU muestra que todos menos el aislado 201 se agrupan con las secuencias ITS de los taxa *Fusarium chlamydosporum* y *Pseudofusarium purpureum* (Fig. 19). Como se mencionó con anterioridad, *P. purpureum* es un sinónimo obsoleto de *F. chlamydosporum*, por lo anterior y dado el alto valor bootstrap de esta rama, es muy probable que todos estos aislados sean variedades de dicho anamorfo. El aislado 201 se agrupa con *Gibberella avenacea* y el anamorfo relacionado *Fusarium tricinctum* con un bootstrap de 66, por lo que este aislado muy probablemente pertenece a un estado asexual de *G. avenacea*.

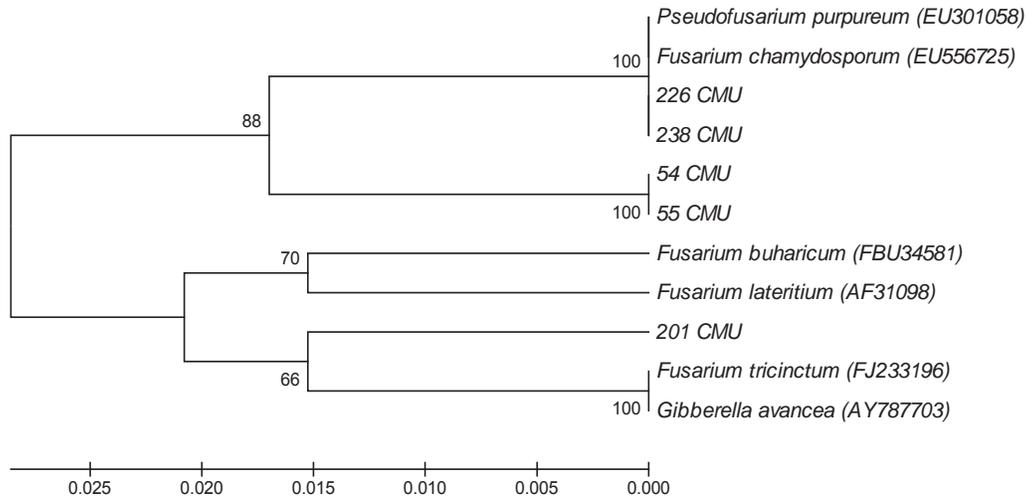


Figura 19. Patrón de agrupamiento de los aislados 54 CMU, 55 CMU, 201 CMU, 226 CMU, 238 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

Con relación al aislado 96 CMU el dendrograma generado hace evidente que este pertenece al género *Mucor* y que está estrechamente relacionado con *Mucor circinelloides* y *Mucor hiemalis*, pudiendo ser un aislado geográfico de cualquiera de estas dos especies (Fig. 20).

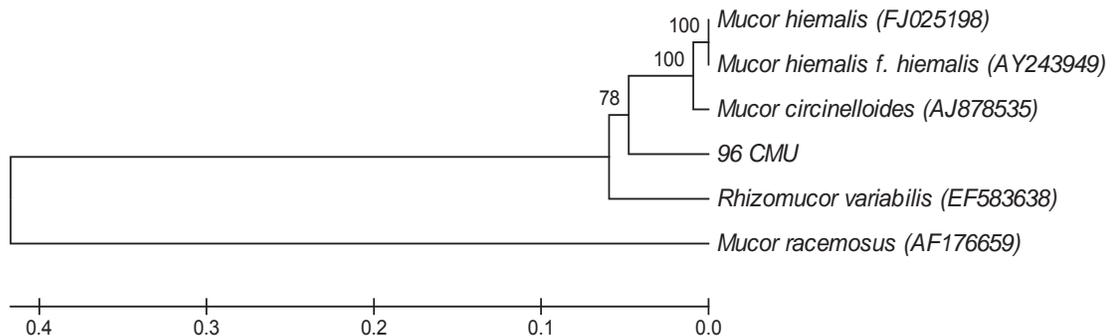


Figura 20. Patrón de agrupamiento del aislados 96 CMU, con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El árbol que se genera con la secuencia ITS del aislado 26 CMU (Fig. 21) muestra que este pertenece al género *Neurospora*, relacionándose particularmente con las especies *N. bonaerensis*, *N. intermedia*, *N. tetrasperma*, *N. crassa* y *N. sitophila*, con la cual se agrupa separados del resto de taxa incluidos. Dado el valor tan bajo de la distancia genética y el valor bootstrap de 73 es posible el aislado 26 sea un aislado geográfico de *N. sitophila*.

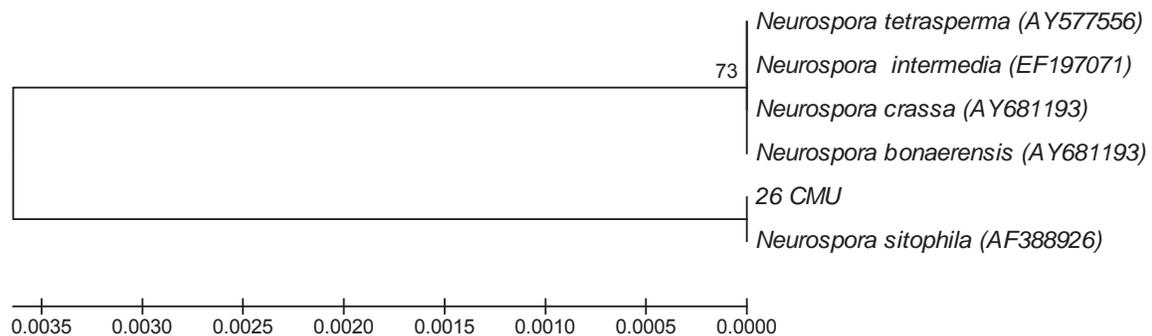


Figura 21. Patrón de agrupamiento del aislado 26 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El patrón de agrupamiento del aislado 30 CMU fue generado principalmente con taxa que no están definidos a nivel de especie y aún a nivel de género, debido a los resultados de la búsqueda BLAST. Dichos taxa son la clase *Sordariomycetes*, el Orden *Xylariales*, perteneciente a dicha clase y el género *Nigrospora* perteneciente a la Clase *Sordariomycetes*. Adicionalmente, se incluye una taxa del género *Fusarium* (Fig. 22). Debido al nivel taxonómico de los taxa incluidos y a la posición del aislado 30 dentro del patrón de agrupamiento, lo único que podemos definir de éste es que es un *Sordariomycete*.

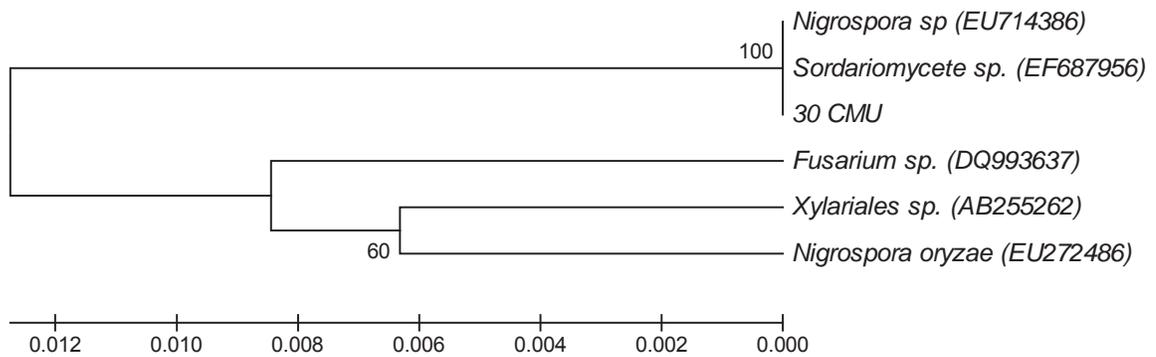


Figura 22. Patrón de agrupamiento del aislado 30 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El aislado 233 CMU se relaciona con los géneros *Penicillium* y *Eupenicillium* encontrándose las especies *P. ochrochloron*, *P. simplicissimum*, *P. rolfsii*, *P. janthinellum* y *E. reticulisporum* (Fig. 23). El aislado 233 CMU se grupa en una rama terminal con *P. janthinellum* con bootstrap de 58, por lo que es muy factible que sea un aislado geográfico de dicha especie.

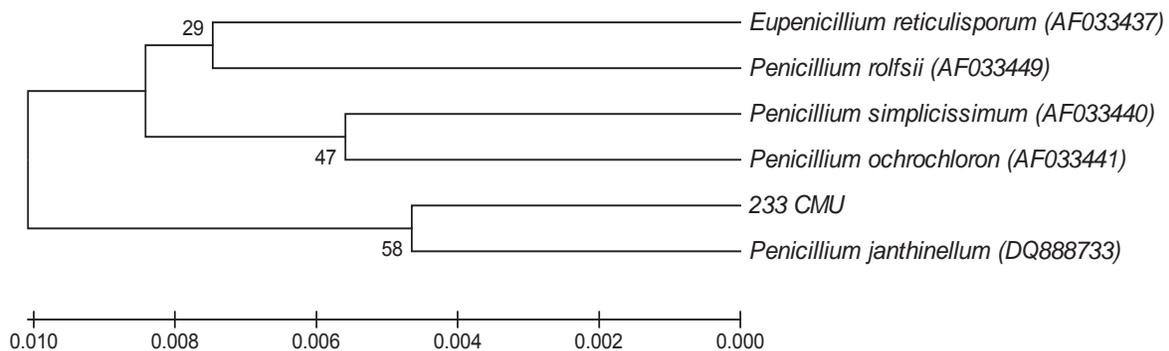


Figura 23. Patrón de agrupamiento del aislado 233 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El aislado 59 CMU aparece relacionado con especies de diversos géneros, entre las que se encuentran *Ampelomyces humuli*, *Epicoccum nigrum*, *Sphaeriothyrium filicinum*, *Cerebella andropogonis*, y *Glonium pusillum*, agrupándose con ésta última con un valor bootstrap de 100 (Fig. 24), por lo que es muy factible que sea un aislado geográfico de dicha especie.

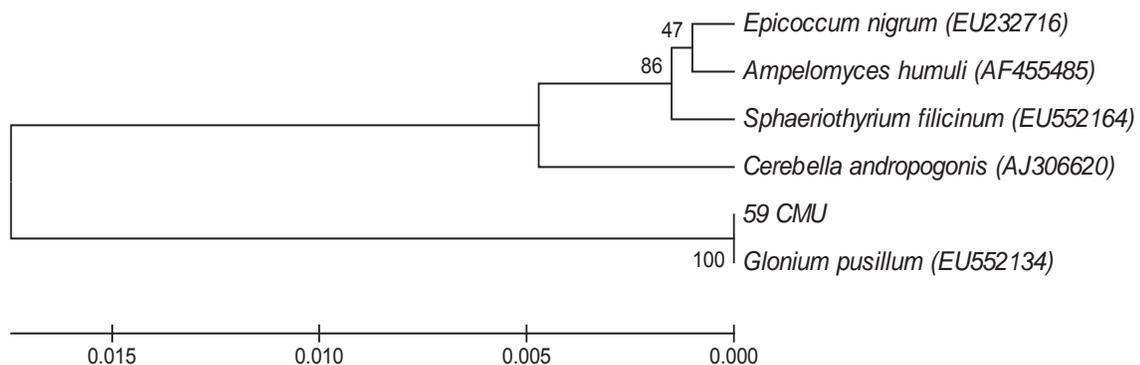


Figura 24. Patrón de agrupamiento del aislado 59 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El dendograma que agrupa a los aislados 29 CMU, 56 CMU, 57 CMU, 198 CMU, 245 CMU, 316 CMU muestra un relación taxonómica con varias especies del género *Pestalotiopsis* además de *Monochaetia chamelliae* (Fig. 25). De él se derivan de tres ramas principales las cuales se analizaron por separado para intentar resolver mejor las ramas terminales.

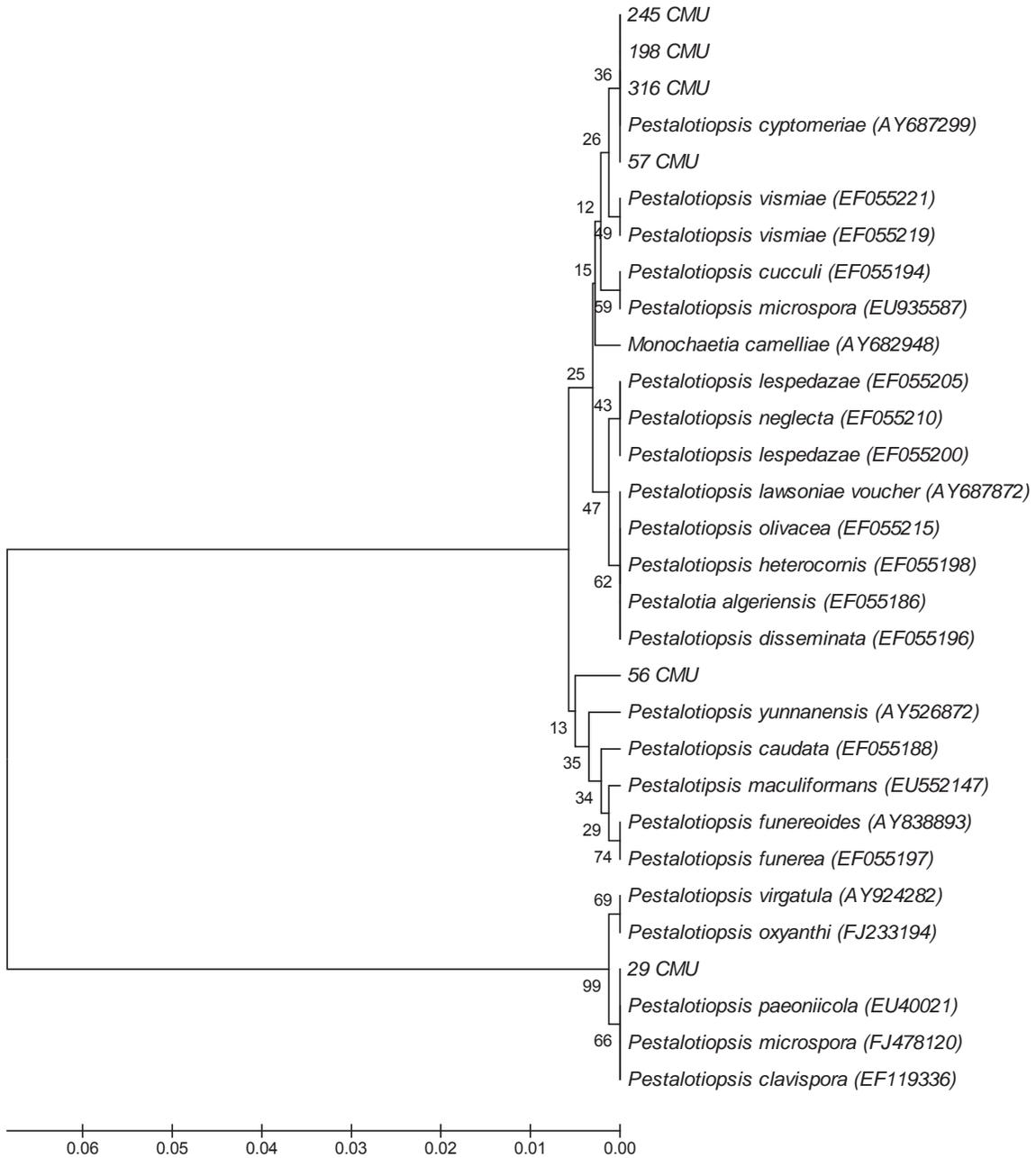


Figura 25. Patrón de agrupamiento de los aislados 29 CMU, 56 CMU, 57 CMU, 198 CMU, 245 CMU, 316 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

Al realizar el agrupamiento de los aislados 57 CMU, 198 CMU, 245 CMU, 316 CMU, se observa cómo *P. cyptomeriae* se separa de dichos aislados en relación al árbol de la figura 26, pero continúa siendo el taxon más relacionado con éstos. Eso indica que todos los aislados antes mencionados son variedades de la misma especie, posiblemente *P. cyptomeriae*, aunque también puede tratarse de una especie cuya secuencia ITS no se encuentra depositada en el GenBank.

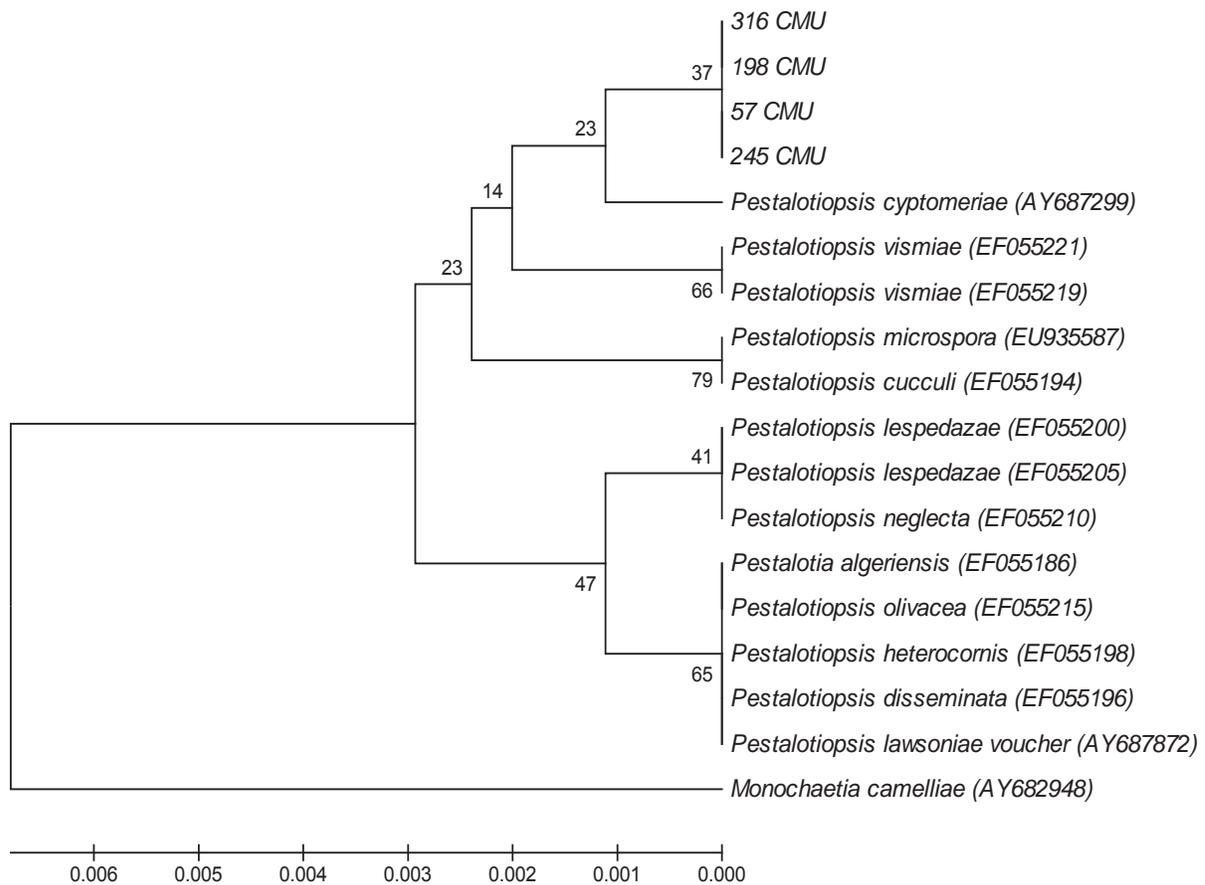


Figura 26. Patrón de agrupamiento de los aislados 57 CMU, 198 CMU, 245 CMU, 316 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El dendograma generado del aislado 56 CMU con los taxa afines según la búsqueda BLAST muestra a dicho aislado separado de *P. funereoides*, *P. funérea*, *P. maculiformans*, *P.yunnanensis* y *P. caudata* (Fig. 27) por lo que no se puede indicar con precisión que especie dentro del género *Pestalotiopsis* puede ser éste aislado.

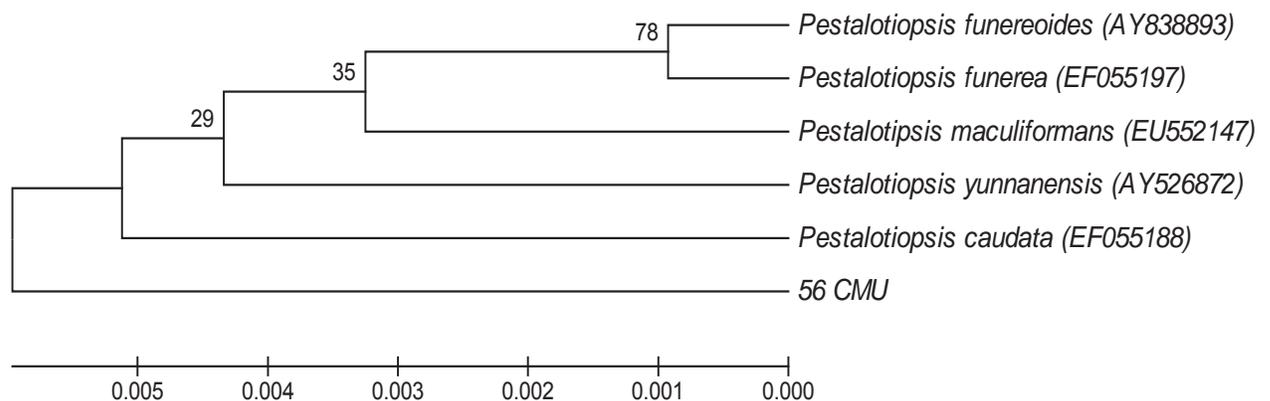


Figura 27. Patrón de agrupamiento del aislados 56 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

En el dendograma de la Figura 28 se observa al aislado 29 CMU agrupado junto con *P. paeoniicola* y *P. microspora*, pudiendo ser un aislado geográfico de cualquiera de éstas dos especies.

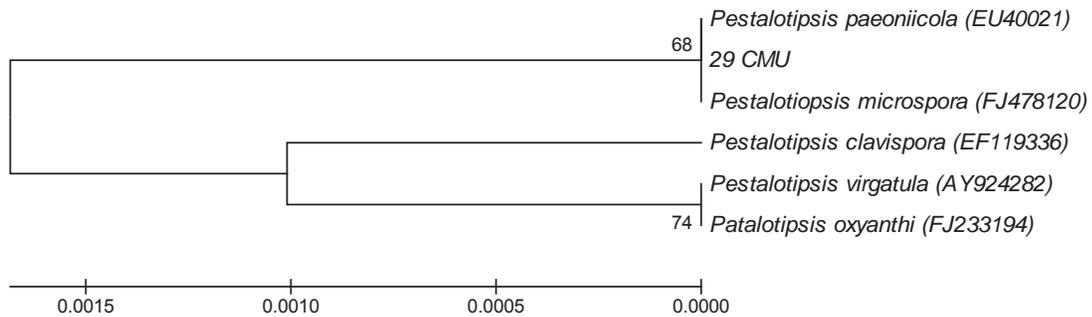


Figura 28. Patrón de agrupamiento del aislados 29 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El dendrograma con mayor número de aislados dentro del análisis realizado muestra una relación estrecha de éstos con varias especies del género *Hypocrea* y sus anamorfos relacionados del género *Trichoderma* (Fig. 29). En este patrón de agrupamiento se observa el aislado 66 CMU polariza el árbol separándose del resto de taxa incluidos. También es evidente la falta de resolución de la mayoría de las ramas terminales, en las cuáles se agrupan varios taxa. Se decidió dividir el árbol en dos partes que nos permiten hacer más claro el patrón de agrupamiento de los aislados de estudio con las especies correspondientes.

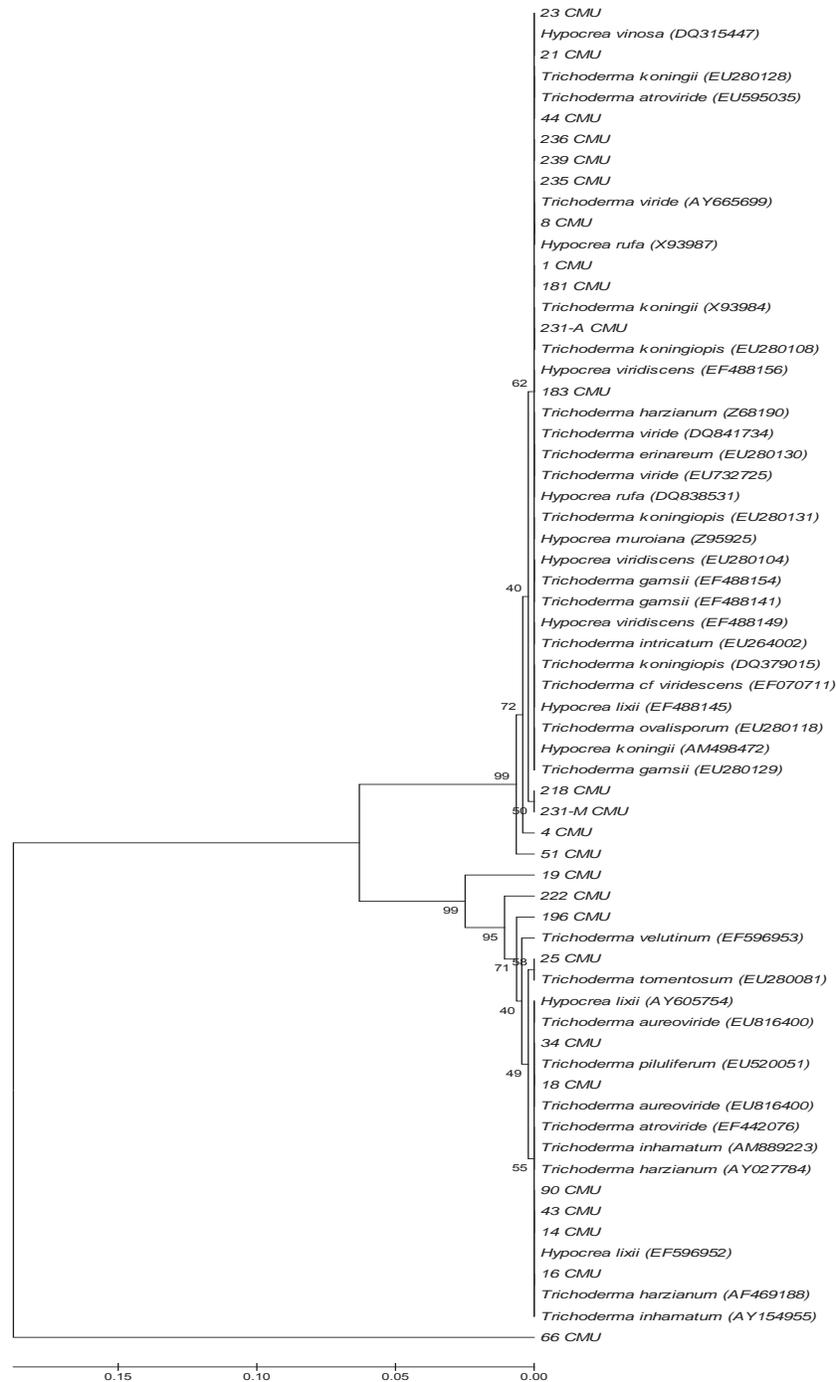


Figura 29. Patrón de agrupamiento de los aislados 1 CMU, 4 CMU, 8 CMU, 14 CMU, 16 CMU, 19 CMU, 21 CMU, 23 CMU, 25 CMU, 34 CMU, 43 CMU, 44 CMU, 51 CMU, 66 CMU, 90 CMU, 181 CMU, 183 CMU, 196 CMU, 218 CMU, 222 CMU, 231-M CMU, 231-A CMU, 235 CMU, 236 CMU y 239 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

El dendograma de la figura 30 muestra como el aislado 66 CMU polariza el árbol separándose del resto de taxa incluidos, los aislados 231-M CMU y 218 CMU se agrupan en una sola rama terminal en la cual no se ubica ninguno de los taxa generados por el Genbank, el aislado 4 CMU se separa en una sola rama al igual que al aislado 51 CMU por lo que estos micelios representan los menos definidos dentro del complejo *Hypocrea/Trichoderma* con el que se relacionan. Por otra parte se puede notar que los aislados 236 CMU, 1 CMU, 239 CMU, 181 CMU, 23 CMU, 8 CMU, 21 CMU, 235 CMU, 183 CMU, 44 CMU y 231-A CMU se agrupan en una rama muy amplia con algunos aislados geográficos de las especies *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. gamsii*, *T. koningiopsis*, además de *T. inhamatum*, *T. viride*, *T. ovalisporum* y los teleomorfos *H. lixii*, *H. viridiscens*, *H. vinosa*, *H. koningii*, *H. rufa*, es una rama poco definida, por lo que es difícil precisar a cuál de esas formas pueden pertenecer los aislados en cuestión.

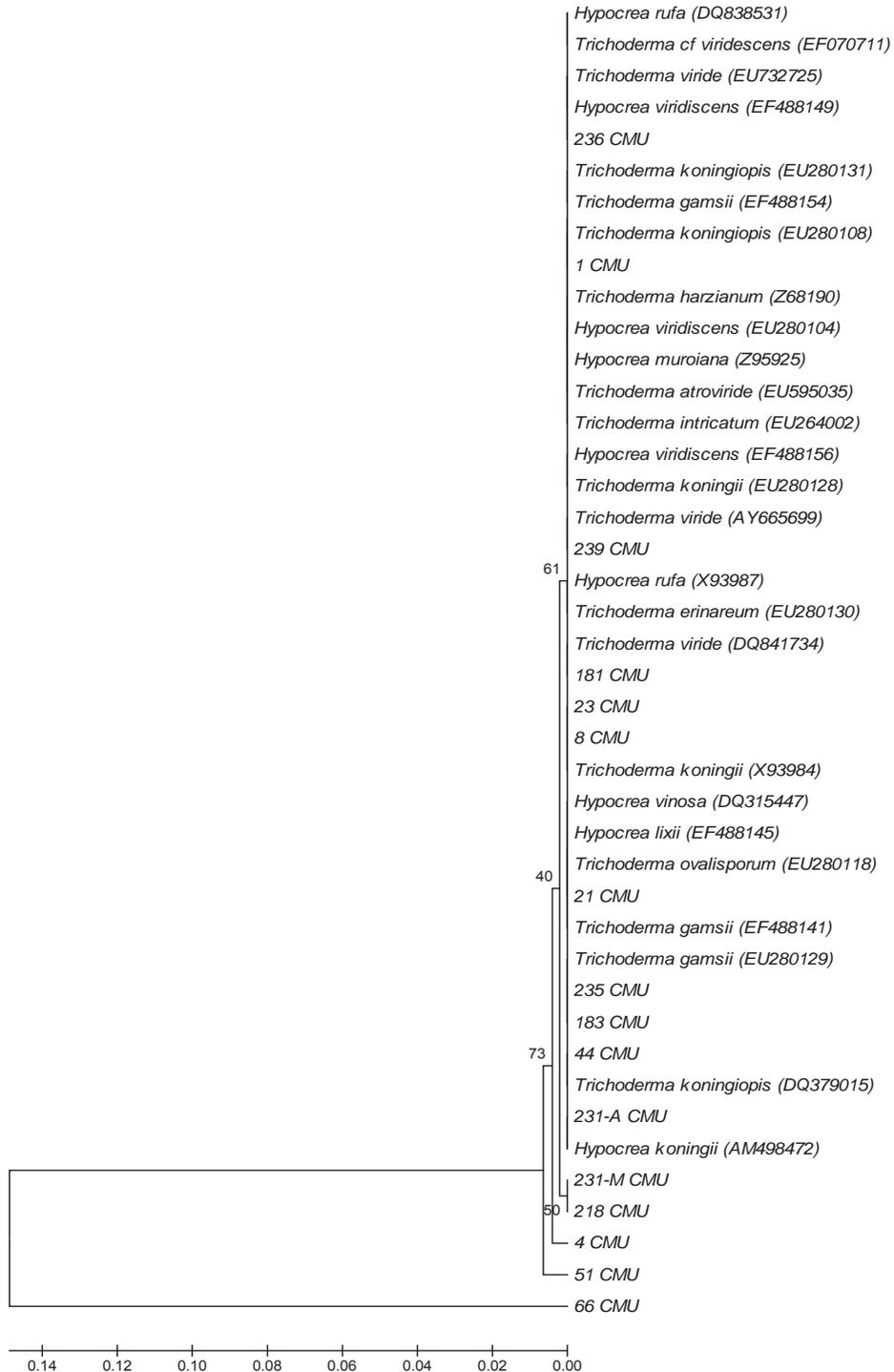


Figura 30. Patrón de agrupamiento de los aislados 1 CMU, 4 CMU, 8 CMU, 21 CMU, 23 CMU, 44 CMU, 51 CMU, 66 CMU, 181 CMU, 183 CMU, 218 CMU, 231-M CMU, 231-A CMU, 235 CMU, 236 CMU y 239 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

En el patrón de agrupamiento de la figura 31 se observa a los aislados 196 CMU, 34 CMU, y 19 CMU separándose del resto de taxa involucrados, generando con esto una mayor incertidumbre respecto a su posición en el complejo *Hypocrea/Trichoderma*. Por su parte, el aislado 25 CMU aparece agrupado con *T. tomentosum* en una sola rama terminal lo cual indica que muy probablemente a este corresponda nuestro aislado en estudio, de esta rama se separa con un bootstrap de 37 el aislado 222 CMU quedando poco definido. Mientras que los aislados 14 CMU y 18 CMU se agrupan con aislados geográficos de *T. atroviride*, *T. inhamatum*, *T. harzianum* y y el teleomorfo *H. lixii*; probablemente nuestros aislados sean una forma asexual de éste último taxa. . Por último, los aislados 16 CMU, 43 CMU y 90 CMU aparecen junto con algunos aislados geográficos de *T. aureoviride*, *T. piluliferum* y *T. inhamatum*.

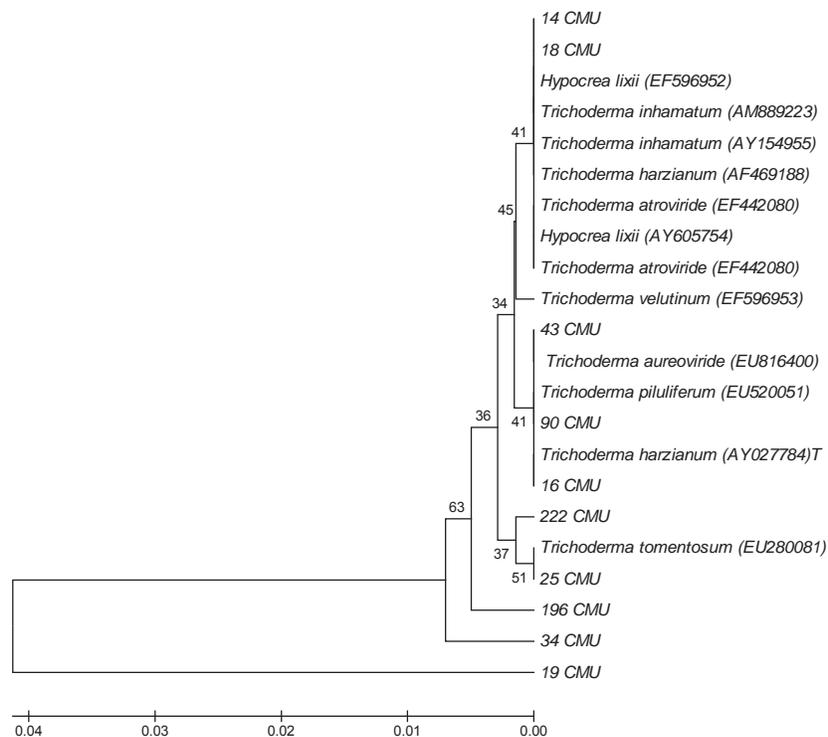


Figura 31. Patrón de agrupamiento de los aislados 14 CMU, 16 CMU, 18 CMU, 19 CMU, 25 CMU, 34 CMU, 43 CMU, 90 CMU, 196 CMU y 222 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

En el dendograma que agrupa a los aislados 81 CMU y 2000 CMU se observa que *Umbelopsis isabellina* polariza el árbol en dos ramas principales muy bien definidas con un valor bootstrap de 100 (Fig. 32). En una de éstas el aislado 81 CMU aparece en una rama terminal agrupado con *Umbelopsis ramanniana*, con un valor bootstrap de 92, indicando que dicho aislado debe ser una variedad geográfica de la especie antes mencionada. En la otra rama se asocia con un valor bootstrap de 100 al aislado 2000 CMU con las especies *Mortierella humilis* y *Mortierella verticillata* pudiendo ser una variedad de cualquiera de éstas.

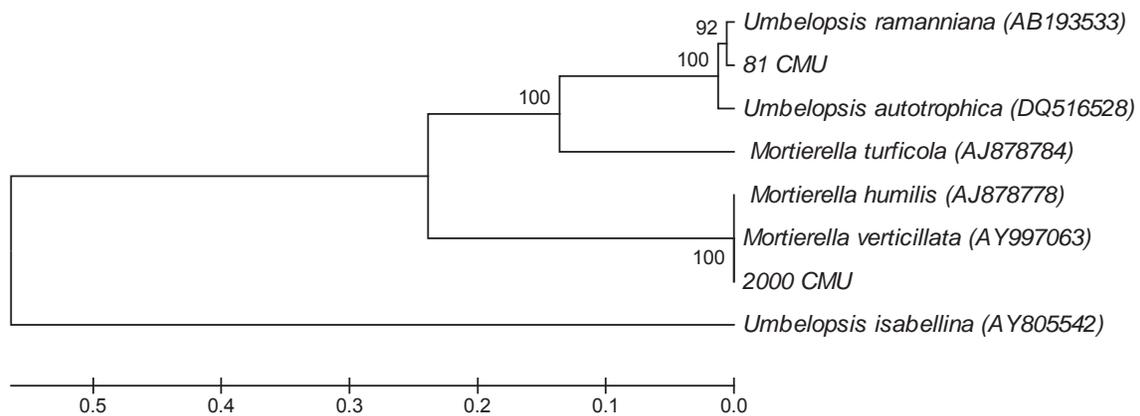


Figura 32. Patrón de agrupamiento de los aislados 81 CMU y 2000 CMU con los taxa seleccionados de la búsqueda en el GenBank (ver Tabla IV). El patrón de agrupamiento se realizó calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Jukes-Cantor y generando la topología mediante el criterio UPGMA, empleando el paquete MEGA 3.1.

VII. DISCUSIÓN

El guardado en agua es uno de los métodos de preservación más baratos y con buenos resultados de sobrevivencia para el caso de hongos filamentosos. Hongos dentro de Ascomycota y sus anamorfos, así como dentro de Zygomycota han sobrevivido bien en agua destilada en periodos de dos a cinco años (Smith y Onions, 1994). En el presente trabajo se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia ligeramente superiores al 80% de las cepas conservadas en agua a temperatura ambiente a los 12 y 33 meses posteriores al guardado, el cual es un valor cercano a los reportados en la literatura para hongos filamentosos. Así, estudios previos sobre la conservación de hongos filamentosos en agua han documentado valores de sobrevivencia del 93% (McGinnis et al., 1974) en un periodo de 12 a 60 meses de guardado. Se han reportado también sobrevivencias del 100% en especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma* preservadas por dos años en agua destilada (Bueno y Gallardo, 1998). Otros reportes han documentado la recuperación exitosa de hongos filamentosos preservados en agua en periodos largos; Qiangqiang et al (1998) encontraron una viabilidad del 89% al conservar 78 aislados durante 12 años mientras que Hartung de Capriles et al (1989) revivieron exitosamente 90% de cepas guardadas durante 20 años. En algunas cepas la sobrevivencia parece no estar relacionada con el tiempo de guardado, ya que se ha reportado una sobrevivencia del 100% para organismos guardados durante un año y del 96% para los que han permanecido en agua entre los 16 y los 20 años, con un mínimo de 83% para aquellos guardados entre 6 y 10 años (Borman et al., 2006). La sobrevivencia en agua por periodos tan prolongados parece estar relacionada con la especie y el estado fisiológico de la cepa (Borman et al., 2006). Las diferencias en los porcentajes de sobrevivencia del presente trabajo y los reportados en la literatura pueden deberse a diferentes circunstancias, incluidos los medios de cultivo empleados para el crecimiento y la recuperación de los aislados, las temperaturas de crecimiento y las características de los recipientes empleados para el guardado. Por ejemplo, mientras que en este

trabajo se utilizó medio PDA para el proceso de crecimiento para el guardado y la recuperación de los micelios, en otros trabajos se han empleado medios como el Sobouraud (Bueno y Gallardo, 1998) o bien agar de glucosa y peptona (Borman et al., 2006). En este trabajo la temperatura de incubación para la recuperación de los aislados fue de 28 °C mientras que en trabajos previos con especies de Ascomycetes relacionadas a este la temperatura de recuperación fue de 30 °C. A los 13 meses el porcentaje de recuperación fue considerablemente bajo, ya que se obtuvo un valor apenas mayor del 60%. Las razones para esta baja de recuperación a los 13 meses se desconocen pero puede especularse respecto a la necesidad de estandarización en los protocolos de recuperación respecto a la preparación de medios de cultivo, campanas de flujo laminar e incubadoras para la obtención de resultados más homogéneos de recuperación.

No obstante que la preservación en agua es un método barato, fácil de implementar y que asegura la preservación de la viabilidad a mediano (meses a pocos años) y largo plazo (más de 10 y hasta 20 años) para una gran variedad de cepas y especies de hongos filamentosos, se han reportado variaciones fisiológicas al emplear este método de preservación (Borneman et al., 2006), lo cual puede ser indeseable en cepa de importancia biotecnológica. Por lo anterior, comúnmente el guardado con agua suele combinarse, cuando los recursos y la capacidad de trabajo lo permiten, con otro método que asegure una mayor estabilidad fisiológica y genética, como la preservación a bajas temperaturas.

En relación a la sobrevivencia de los aislados de estudio a la preservación a -80 °C, los mayores porcentajes se presentaron al mes y a los 5 meses de guardado con 86 % y 100%, respectivamente. La sobrevivencia no varió en los ensayos de 15 y 33 meses, siendo de 73.3 %. Pasarell y McGinnis reportaron que de 1, 474 de aislados de hongos filamentosos, levaduras y actinomicetes, el 97.7% lograron sobrevivir al guardado a -70 °C en periodos de guardado que oscilaron entre 6 meses y 13 años. La preservación de hongos filamentosos dermatofitos patógenos de humano a -70 °C parece ser un método óptimo para el guardado, ya que se han documentado una sobrevivencia del 100% para 200

cepas distintas pertenecientes a 21 especies, que permanecieron almacenadas en periodos de una semana a dos años (Baker y Jeffries, 2006). También se ha reportado una recuperación del 100% en hongos filamentosos Basidiomycetes, Ascomycetes, Zygomycetes y aislados mitospóricos (asexuales) después de ser guardados durante 10 años a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kitamoto et al., 2002).

Al igual que en el caso de los resultados de la preservación en agua, el bajo porcentaje de sobrevivencia observado en el presente trabajo en relación a los datos encontrados en la literatura pueden tener diferentes explicaciones. Algunas de estas explicaciones serían semejantes a las expuestas anteriormente en relación al medio de cultivo empleado y las temperaturas de recuperación. En el caso de la preservación a baja temperatura también es importante considerar la posible influencia del protocolo de congelamiento para el guardado así como el protocolo de descongelamiento. En la mayoría de reportes en los que se documenta la preservación de hongos a baja temperatura suele utilizarse un protocolo de congelamiento en el cual se va bajando la temperatura del micelio a una velocidad constante mediante el empleo de una máquina de enfriamiento, mientras que en el presente trabajo los micelios se congelaron primero a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual es un proceso que puede causar mayor riesgo de muerte celular por falta de tiempo para la adaptación del micelio a la baja temperatura e influir en la sobrevivencia. No obstante, Kitamoto et al. (2002) ensayan un protocolo de enfriamiento igual al aplicado en el presente trabajo así como un protocolo de descongelamiento súbito, y obtienen una sobrevivencia del 100%, por lo que deben de plantearse hipótesis alternativas para explicar el bajo porcentaje de sobrevivencia obtenido en el presente trabajo.

En el presente trabajo se planteo el objetivo de estructurar un cepario en el cual se conservara *ex situ* el micelio vegetativo de distintas especies de hongos silvestres aisladas en el estado de Michoacán. Así, se reporta en este estudio el guardado de 150 micelios de distintas especies de hongos filamentosos, principalmente del grupo Ascomycota. Además de sus funciones ecológicas, los micelios de las especies aquí caracterizadas constituyen una potencial

herramienta para su utilización biotecnológica. A continuación se describen algunos de los géneros de las especies caracterizadas durante el desarrollo de este proyecto.

El aislado *Infundibulicybe (Clitocybe) gibba* es el único representante de la división Basidiomycota obtenido en el presente trabajo. Esta especie pertenece al orden Agaricales, dentro de la familia *Tricholomataceae* y esta reportada como comestible (Kuo, 2008). El género *Clitocybe* al cual es adscrito originalmente esta especie se considera que es polifilético con bas en estudios de filogenia molecular de la región 28S de la Unidad Ribosomal (Moncalvo et al., 2000). Las especies dentro de este género pueden tener aplicaciones biotecnológicas debido a la producción de enzimas proteolíticas y de sustancias con actividad farmacológica (Kim et al., 2008).

De los 58 micelios aquí analizados, 26 corresponden a individuos dentro del género *Trichoderma*. El Género *Trichoderma* fue propuesto por Person en 1794 con 4 especies, Rifai en 1969 agrega 9 especies más; posteriormente, Bisset eleva algunas de las especies agregadas por Rifai a rango de sección, agrupándolas en 4 secciones: *Lonibrechiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Hypocreanum*. Las especies del género *Trichoderma* inicialmente se clasificaron como “hongos imperfectos” dentro del la subdivisión Deuteromycota, ya que no se les conocía su fase sexual. Las primeras clasificaciones taxonómicas de género *Trichoderma* se basaron fundamentalmente en las características morfológicas de las especies (crecimiento rápido, esporulación abundante, conidias verdes y conidióforos mal definidos). Estas se reproducen clonalmente mediante un ciclo de vida asexual en el que se alternan micelio y esporas o conidias. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Las conidias poseen un solo núcleo haploide, son ovoides, de color verde (excepcionalmente hialinos) y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fialides. En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación se producen otro tipo de estructuras de resistencia denominadas

clamidosporas. Crecen a un ritmo rápido en cultivo con la producción de numerosas esporas de color verde, característica de este género, utilizan un amplio rango de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno, entre los que se encuentran monosacáridos, disacáridos (Danielson y Davey 1973), polisacáridos complejos, purinas, pirimidinas y aminoácidos (Tye, 1973), taninos condensados y catequiinas (Arrieta-Escobar, 1982).

El género *Trichoderma* constituye un número diverso de especies de hongos saprofitos, comúnmente establecidos en el suelo sobre madera en descomposición y restos de plantas (Jensen y Wolffhechel, 1995; Smith, 1995), la presencia de varias especies difiere entre hábitat y están influidas por las condiciones ambientales. Estas se pueden encontrar en el aire, partes aéreas de plantas, pero especialmente en suelos, incluyendo humus forestales (Samuels, 1996).

Con el uso de marcadores moleculares, fundamentalmente la secuencia de la región ITS, se han ido redefiniendo o confirmando tanto secciones completas como especies dentro del género (Lieckfeldt et al., 1998). Por ejemplo, la inclusión en el género *Trichoderma* de *Gliocladium virens* ha sido aceptada sólo después de ser determinada mediante el análisis de secuencias de ITS (Rehner y Samuels, 1994).

En la actualidad muchas especies del género *Trichoderma* han sido utilizadas como agentes de biocontrol en una gran variedad de enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos. Esta utilidad deriva de las características que poseen las especies de dicho género, como son su ubicuidad, la facilidad para ser aisladas y cultivadas, además crecen rápido en un gran número de sustratos y no atacan plantas superiores (Papavizas et al. 1982). Adicionalmente, las especies del género *Trichoderma* pueden desarrollarse en un ambiente poco favorable para otros microorganismos, debido a que presentan una resistencia natural frente a muchos compuestos tóxicos, incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas como el DDT y compuestos fenólicos. Esta resistencia a compuestos tóxicos está asociada a la presencia de sistemas de transporte ABC

(ATP-binding cassette) en cepas de *Trichoderma*, el cual permite el transporte de diferentes sustancias a través de la membrana hacia el exterior de la célula, y la sobreexpresión de genes ABC hace que disminuya la acumulación de sustancias tóxicas dentro de la célula.

Fue en 1932 que Weindling sugirió el uso de *Trichoderma* como antagonista de hongos fitopatógenos, al observar y describir en detalle el micoparasitismo de *T. lignorum* hacia *Rhizoctonia solani*; desde entonces se han hecho un gran número de experimentos de control biológico utilizando especies de *Trichoderma*. En la actualidad se comercializan con este fin cepas de *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, principalmente.

Existen en el mercado diferentes productos de *Trichoderma* que se comercializan para diferentes cultivos, como es RootShield, para el control de enfermedades en tomate y pepino; Trieco, para el control de fitopatógenos en café, cítricos, uvas, chile, algodón y tabaco; TRICHODEX 20SP, para el control de *B. cinerea* en uva, así como también para el control de enfermedades en tomate y pepino producidos en invernaderos comerciales.

Se han descrito tres tipos de mecanismos por medio de los cuales hongos del género *Trichoderma* interaccionan con el agente infeccioso, y estos incluyen la liberación de metabolitos antibióticos, como son las enzimas hidrolíticas que atacan a la pared celular, la competición directa por los nutrientes y el espacio disponibles, así como el micoparasitismo. Es importante mencionar que estos mecanismos no actúan de manera aislada, sino que interaccionan de manera sinérgica obteniendo como resultado una mayor eficacia en la eliminación del fitopatógeno. Además de la capacidad de *Trichoderma* para atacar o inhibir directamente el crecimiento de fitopatógenos también pueden inducir en las plantas, tanto sistémica como localmente, resistencia contra un amplio número de enfermedades que son causadas por fitopatógenos incluidos bacterias, hongos y virus.

Algunos miembros del género *Trichoderma* han mostrado capacidad de convertir la celulosa en glucosa, mediante la secreción de enzimas denominadas endoglucanasas, exoglucanasas y celobiosas. La mayoría de los estudios se han enfocado a las especies *T. viride*, *T. reesei* y *T. harzianum*, las cuales se han modificado genéticamente con el fin de obtener altos niveles en la producción de esas enzimas a nivel industrial, con el fin de degradar celulosa en descomposición. La glucosa resultante en la despolimerización de la celulosa puede tener amplios usos, como son en la industria farmacéutica, en la industria papelera y también puede ser utilizada como una fuente de glucosa en la alimentación animal, entre otras aplicaciones.

Las especies del género *Botryosphaeria* causan síntomas de distintas enfermedades en un gran número de plantas leñosas y no leñosas, en combinación con condiciones ambientales que inducen estrés (Eldridge, 1961; Buchanan 1967; Punithalingam). La taxonomía de las especies de este género se ha basado tradicionalmente en la morfología de los estados anamórficos, el cual es el estado más comúnmente encontrado en la naturaleza. Sin embargo, muchas de las características morfológicas empleadas en la delimitación taxonómica se comparten entre taxa aparentemente bien diferenciados. Por ejemplo, algunas formas anamórficas de géneros relacionados dentro de la familia Botryosphaeraceae presentan conidias con una morfología y un tamaño similares. Recientemente se ha utilizado la comparación de secuencias de ADN para resolver taxa a nivel de especie.

Uno de los aspectos biotecnológicos potenciales de las especies del género *Botryosphaeria* es la producción de lacasas extracelulares, enzimas que pueden atacar los anillos fenólicos de la lignina y de compuestos tóxicos. Recientemente se ha estudiado la actividad de lacasa del aislado silvestre de *Botryosphaeria rhodina* (MAMB05) al inducirse con alcohol veratrílico empleando el colorante polimérico Poly R-479 como sustrato (Barbosa *et al.*, 1996). Se ha documentado que dicho aislado produce dos lacasas extracelulares de manera constitutiva, PPO-I y PPO-II, las cuales incrementan su actividad hasta 100 y 25 veces,

respectivamente, en presencia de alcohol veratrílico (Vasconcelos *et al.*, 2000; Dekker y Barbosa, 2001). Este último estudio mostró que ambas lacasas incrementaba de 4 a 5 veces su actividad en cultivos aerados con respecto a cultivos sin aeración. El efecto inductor de la actividad de lacasa extracelular ocasionado por el alcohol veratrílico ha sido recientemente reportado para seis aislados silvestres de *B. rhodina* obtenidos en Brasil (Saldaña *et al.*, 2007). También se ha evaluado en dicho aislado el efecto de las fuentes de carbono (Dekker *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003) y nitrógeno (Dekker *et al.*, 2007) sobre la actividad de lacasa constitutiva e inducida con alcohol veratrílico, así como el efecto que el fungicida imazaquin, del grupo de las imidazolinonas, tiene sobre dicha actividad (Rezende *et al.*, 2005).

Las especies del género *Pestalotiopsis* se consideran fitopatógenos causando enfermedades en una gran variedad de plantas (Hyde and Fröhlich, 1995; Swart *et al.*, 1999; Hopkins and McQuilken, 2000; Rivera and Wright, 2000); aunque se ha reportado que algunos aislados son endófitos (Brown *et al.*, 1998; Suryanayaranan *et al.*, 2000; Toofanee and Dulyamode, 2002; Worapong *et al.*, 2002; Wei and Xu, 2004) y otros son saprófitos. *Pestalotiopsis agallochae* de *Excoecaria agallocha* y otros numerosos aislados de *Leucospermum* sp. están reportados como causantes de manchas en hojas (Pal and Purkayastha, 1992; Taylor *et al.*, 2001). *Pestalotiopsis longisetula* ha sido observada como el mayor patógeno que genera lesiones de pudrición en fresas (Howard and Albrechts, 1973) y algunas especies de *P. theae* están descritas como patógenos en la planta de té *Camellia sinensis* (Koh *et al.*, 2001).

Se ha reportado que varios aislados de *Pestalotiopsis* son endófitos de la corteza y agujas de *Pinus armandii* y hojas de especies de *Ribes* (Hu *et al.*, 2007). *Pestalotiopsis* fue establecido por Steyaert (1949). Es un género anamórfico complejo, en el cual la especie puede ser saprofito, patógeno o endófito. (Steyaert, 1949; Suto and Kobayashi, 1993; Strobel *et al.*, 1997, 2000; Rivera and Wright, 2000; Karakaya, 2001; Tagne and Mathur, 2001; Gonthier and Involuta, 2002; Kumar and Hyde, 2004; Sousa *et al.*, 2004). Espinosa-García y

Langenheim (1990) fueron los primeros en reportar a *Pestalotiopsis funerea* como un endófito ecológicamente importante de *Sequoia sempervirens*. Varias especies de *Pestalotiopsis* se han aislado desde entonces como endófitos (Strobel y otros, 1997, 2000; Guo, 2002; Worapong y otros, 2003). Strobel *et al.* (1996) señaló a *Pestalotiopsis microspora* como un endófito de *Taxus wallichianan* y se ha encontrado que este hongo tiene la capacidad de producir el taxol, compuesto eficaz en el tratamiento contra ciertos tipos de cáncer (Qiu *et al.*, 1994). La identificación de especies de *Pestalotiopsis* basada en la morfología es sin embargo, complicada porque hay pocos caracteres morfológicos disponibles para distinguir la taxa a nivel de especie. Los estudios de genética molecular muestran que el género *Pestalotiopsis* es monofilético y que no existe especificidad por la especie hospedera.

Las especies de este complejo *Diaporthe* y *Phomopsis* han sido identificadas como fitopatógenos principalmente de la soya, planta en la que pueden causar decaimiento de semillas, destrozo de la vaina del vástago, y úlcera de vástago. Los hongos en este complejo se consideraban endémicos a las aéreas de producción de soya en el mundo entero, pudiendo causar reducciones en soportes, producción, y calidad de la semilla. Las especies causales de estas enfermedades son *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido) y tres variedades de *Diaporthe phaseolorum* (*D. phaseolorum* es anamorfo de *P. phaseolorum*) *D. phaseolorum* var. *Caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* y *D. phaseolorum* var. *sojae*. *D. phaseolorum* var. *sojae* se acepta como el principal agente causal del destrozo de la vaina del vástago. La especie causante de la úlcera de vástago de la soya en el norte, *D. phaseolorum* var. *Caulivora* primero fue distinguido y nombrado basándose en su patogenicidad, en el hecho de ser homotálico, en la presencia de peritecios y ausencia de picnidios. El agente causal de la úlcera de vástago de la soya en el sur *D. phaseolorum* var. *Meridionalis* está estrechamente vinculado a *D. phaseolorum* var. *Caulivora* pero difiere en la morfología, tolerancia al calor y epidemiología (Zhang *et al.*, 1998).

Las especies de *Gibberella* son patógenos de plantas bastante agresivos, aunque muchos sean más familiares por el nombre de sus anamorfos dentro de *Fusarium*. La síntesis reciente de los análisis filogenéticos, biológicos, y morfológicos de las especies ha revitalizado la taxonomía del género que fue descrito por primera vez hace casi 200 años. Por ejemplo, *Gibberella fujikori* uno de los miembros más estudiados de este género, se considera en la actualidad un complejo de ocho poblaciones de cruzamiento (mating populations) (Britz et al., 1999) con un gran número de linajes asexuales descritos como especies morfológicas distintivas (Nirenberg y O'Donell, 1998). Especies de *Gibberella* que están estrechamente relacionadas se pueden diferenciar en el modo de reproducción, su distribución geográfica, la patogénesis de la planta, la producción de toxinas y de otros metabolitos biológicamente activos. La información en el comportamiento sexual de este grupo de hongos tiene una gran importancia práctica para el desarrollo de estrategias de control de las enfermedades en plantas.

El género *Mucor* incluye especies benéficas las cuales son utilizadas en la industria de la fermentación (Sharifia et al., 2008). Sin embargo, también se presentan especies responsables de distintas infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (De Luca, 2007) y en animales.

En el género *Penicillium* se encuentran especies de relevancia histórica y biotecnológica ya que los primeros antibióticos obtenidos de manera industrial en el siglo XX provinieron de especies de este género. En la actualidad, las especies del género *Penicillium* son empleadas ampliamente en diversos procesos biotecnológicos como la producción de ácido cítrico (Anastassiadis et al., 2008), la producción de enzimas (Gummadi y Kumar, 2005), la obtención de antibióticos (Elander, 2003) y la detoxificación de aguas contaminadas con metales (Ahluwalia et al., 2007).

El uso de la región ITS para la tipificación de los aislados permitió la identificación a nivel de género de todos los micelios de estudio y a nivel de especie con un alto grado de confiabilidad de por lo menos ¿?? Micelios. No

obstante el amplio uso que la región ITS de la Unidad Ribosomal de hongos tiene en filogenia y ecología molecular de hongos, dicha región no ha sido previamente reportada como una herramienta para la generación de huellas moleculares de aislados destinados a la estructuración de un cepario. A la fecha no existen reportes en la literatura que indiquen que un aislado fúngico puede modificar su región ITS, de hecho, la estabilidad dentro de un taxa a nivel de especie es lo que permite las aplicaciones filogenéticas y ecológicas de esta región genética. Por lo anterior, la utilización de la región ITS como herramienta de tipificación de aislados de un cepario es uno de los principales aportes del presente trabajo.

El otro aporte importante del presente trabajo lo representa el guardado y la identificación de cepas de hongos filamentosos de géneros y aún de especies previamente no estudiados en el estado de Michoacán. De dichos taxa no solamente se cuenta con el micelio vegetativo sino que también se creó un banco de ADN de alto peso molecular, el cual puede ser útil para hacer comparaciones genéticas de las cepas antes y después de ser guardadas, con la finalidad de estudiar posibles cambios genéticos durante el proceso de preservación. Este banco de ADN también puede servir para buscar genes de interés agronómico o biotecnológico sin la necesidad de descongelar a la cepa o utilizar algunas de las muestra guardadas en agua. No obstante, a futuro sería importante evaluar el estado de preservación del ADN guardado para saber si es que esta degradándose o se ha mantenido de alto peso molecular.

Las cepas de hongos filamentosos preservadas durante el presente trabajo representan seguramente una fracción muy pequeña de la diversidad de hongos existente en los distintos ecosistemas terrestres del estado de Michoacán, por lo que ha futuro es necesario ampliar la colección incluyendo otros grupos de hongos, principalmente de la división Basidiomycota, dentro de la cual están descritos una gran variedad de hongos comestibles y medicinales, los cuales producen además una gran variedad de enzimas con aplicaciones industriales. Es de esperarse que los esfuerzos en la construcción de un cepario de esta naturaleza rindan sus frutos a mediano y largo plazo no solo mediante la preservación del germoplasma de un

grupo biológico fundamental para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres, sino también aportando soluciones biotecnológicas regionalmente apropiadas a los distintos problemas ecológicos, alimenticios y de salud más apremiantes en el estado de Michoacán.

VIII. CONCLUSION

- i) Se logró el aislamiento de 150 cepas de hongos filamentosos.
- ii) Se presentó una mayor sobrevivencia de los aislados mediante la técnica de preservación en agua que mediante la técnica de criopreservación.
- iii) Se obtuvieron índices de sobrevivencia menores a los reportados en la literatura para ambos métodos de preservación, lo que indica la necesidad de estandarizar los protocolos de guardado y resucitación.
- iv) Se creó un banco de ADN de alto peso molecular para todos los aislados estudiados.
- v) La región ITS representa un buen marcador genético para la tipificación de aislados silvestres destinados a enriquecer un cepario.
- vi) Se identificaron ¿?? Aislados a nivel de especie y ¿?? A nivel de género.
- vii) Se sentaron las bases para continuar la preservación ex situ de aislados de hongos filamentosos silvestres del estado de Michoacán.

IX.REFERENCIAS

- Adair, S., S. H. Kim y C. Breuil. 2002. A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiological Letters*. (211): 117-122.
- Ahluwalia, S. S., Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol*. (98): 2243-2257.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., Finogenova, T. V. 2008. Citric acid production patent review. *Recent Pat Biotechnol*. (2): 107-123.
- Allmer, J., R. Vasiliauskas, K. Ihrmark, J. Stenlid y A. Dahlberg. 2006. Wood-inhabiting fungal communities in woody debris of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.), as reflected by scopocarps, mycelial isolations and T-RFLP identification. *FEMS Microbiology Ecology*. (55): 57-67.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman. 1997. Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research*. (25): 3389-3402.
- Alves Da Cunha, M. A., M. A. Barroca, E. C. Giese y R. F. H. Dekker. 2003. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *Journal Basic Microbiology*. (43): 385-392.
- Arnolds, E. 1995. Problems in measurements of species diversity of macrofungi. In: *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. Edited by D. Allsopp, R. R. Colwell and D. L. Hawksworth. CAB International and United Nations Environment Programme (UNEP). Cambridge, UK. pp. 337- 353.
- Arrieta-Escobar, A.y Belin, J.M. (1982). Effects of polyphenolic compounds on the Growth and cellulolytic activity of a strain of *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng*. (24): 983-989.
- Barbosa, A. M., Dekker, R.F. H., Hardy, G.E. 1996. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp. Whwn screened on the polymeric dye, poly R-478. *Lett Appl Microbiol*. (23): 93-96
- Baker M. and Jeffries P. 2006. Use of commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophyte fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. (44): 617-618.
- Bennett J.W. *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. 1998. Journal of Biotechnology. (66): 101-107.
- Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water, *Trans. Brit. Mycol. Soc*. 66: 183-185
- Borman A. M., Szekely A., Campbell C. K. and Johnson E. M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*. (161): 361-368.

Borneman, J. y J. Hartin. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. (66): 4356-4360.

Britz H., Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Gordon TJ, Leslie JF. 1999. *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating type population in the *Gibberella fujikori* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1198-1201.

Brown, B.B., Hyde, K.D. and Guest, D.I. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity* (1): 27-51.

Bowman, B. H., J. W. Taylor, A. G. Brownlee, J. Lee, S. D. Lu, y T, J. White, T. 1992. Molecular evolution of the fungi: relationship of the basidiomycetes, ascomycetes and chytridiomycetes. *Molecular Biology and Evolution*. (9): 285-296.

Buchanan T. S. 1967. Diplodia twig blight of pine - important forest insects and diseases of mutual concern to Canada, United States and México. North American Forestry Commission, Canadian Department of Forestry, Ottawa. P. 189-191.

Bueno L. y Gallardo R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*. (15): 166-168.

Bull, A. T., Goodfellow, M. and Slater, J. H. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*. (46): 219- 252.

Burgess, T. T., P. A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. De Beer y M. J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* ssp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*. (98): 423-435.

Burdsall, H. H., Dorworth, E. B. 1994. Preserving cultures of wood decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia* (86): 275-280.

Castellani, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* (42): 225-226.

Chang S.-T. 1993. Mushroom and Mushroom Biology. In: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Edited by Chang Shu-Ting, Buswell a. John and Miles G. Philip. OPA. Amsterdam, Gordon and Breach Science publishers S.A. p.p. 1-11

Chávez-Gómez, B., Quintero, R., Esparza-García, F., Mesta, Howard, A. M., Zavala, F. J., Hernández-Rodríguez, C., Gillén, T., Poggi-Varaldo, H. M., Cortes-Barrera, J., Rodríguez-Vázquez, R. 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pre-grown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technol.* (89): 117-183.

Chen, C. J. 1999. Preservation of *Volvariella volvacea* in culture through cryogenic storage. *Fungal Science* (14): 99-104.

Cifuentes, J., Villegas, M., Pérez-Ramírez, L., Bulnes, M., Corona, V., González, M. R., Jiménez, I., Pompa, A. y Vargas, G. 1990. Observaciones sobre la distribución, hábitat e importancia de los hongos de Los Azufres, Michoacán. *Revista Mexicana de Micología*. (6): 133- 149.

Croan, S. C., Busdsall, H. H. Jr., Rentmeester, R. M. 1999. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia* (91): 908-916.

Danell, E., Flygh, G., 2002. Cyopresevation of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycological research* (106): 1340-1342.

Danielson, R.M. y Davey, C.B. (1973). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* (5): 505-515.

Da Silva, M., Cerniglia, C. E., Pothuluri, J. V., Canhos, V. P., Esposito, E. 2003. Screening filamentous fungi isalated from estuarine sediment for the ability to toxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (19): 399-405.

Da Silva, M., Esposito, E, Joanna, D. M. C., Canhos, V. P., Cerniglia, C. E. 2004. Metabolism of aromatic hydrocarbons by filamnetous fungus *Cylothyrrium* sp. *Chemosphere* (57): 943-952.

De Haertung Capriles C, Mata S, Middelveen M. 1989. Preservation of fingi in water (Castellani): 20 years. *Mycophatologia*, 106: 73-79.

Dekker, R. F. H. y A. M. Basbosa. 2001. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology.* (28): 81-88.

Dekker, R. F. H., A. F. D. Vasconcelos, A. M. Barbosa, E. C. Giese y L. Paccola- Meirelles. 2001. A new role for veratryl alcohol: regulation of síntesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. Influence of carbon source. *Biotechnological Letters.* (23): 1987-1993.

Dekker, R. F. H., A. M. Barbosa, E. C. Giese, D. S. Saulo y L. G. Covizzi. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botriosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology.* (10): 177-185.

De Luca, A. J. 2007. Harmful fingi in both Agriculture and Medicine. *Rev iberoam Micol.* (24): 3-13.

De Wet, J., B. Slippers, O. Preisig, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2008. Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* (46): 116-126.

Elander R. P. 2003. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* (61): 385-392.

Eldridge, K. G. 1961. Significance of *Diplodia pinea* in plantations. *Review of Applied Mycology.* (41): 339.

Ellis, J. J. 1979. Preserving fungus strain in sterile water. *Mycologia* 71: 1072-1075.

Figueredo, M. B. 1967. Estudos sobre aplicacao do metodo de castellani para conseracao de fungos patogenos emplantas. *O. Biol.* (33): 9-15.

Figuereido, M. B., and Pimentel, C. P. V. 1975. Metodos utilizados para conseracao di fungus na micoteca de secao de micología fitopatológica do Intituto Biologico. Summa Phytopathol. (1): 299-302.

Gómez-Peralta, M. y V. M. Gómez-Reyes. 2005. Hongos y Líquenes. En: La Biodiversidad de Michoacán. Villaseñor-Gómez, L. E. (Editora). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad / Secretaria de Urbanismo y Medio Ambiente / Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México, D.F. pp. 64-67.

Gonthier, P. and Nicolotti, G. (2002). First report of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressocyparis leylandii* in Italy. Plant Disease (86):1402.

Grime JP, Mackey JM, Miller SH, Read DJ. 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosm. Nature (328): 420-422.

Gummadi, S. N., Kumar, D. S., 2005. Microbial pectic transeliminases. Biotechnol Lett. (27): 451-458.

Guo, L.D. (2002). *Pestalotiopsis besseyi*, a new record of endophytic fungi from pine in China. Mycosystema (21): 455-456.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. (41): 95-98.

Hammel, K., Green B., Gai, W. Z. 1991. Ring fission of anthracene by eukaryote. Proc. Natl. Acad. Sci. (88): 10605-10608.

Hawksworth, D. L. and Ritchie, J. M. (Editors.) 1993. Biodiversity and Biosystematic Priorities: Microorganisms and Invertebrates. CAB International. Egham, UK.

Hibbett, D. S., Donoghue, J. M. 2001. Analysis of Character Correlations among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. Systematic Biology. (2): 215-242.

Horgen, P., Carvalho D., Sonnenberg, A., Li, A., Van Griensven, L. J. L. D. 1996. Chromosomal abnormalities associated whit strain degradation in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Fungal Genetics and biology. (20): 229-241.

Hopkins, K.E. and McQuilken M.P. (2000). Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. European Journal of Plant Pathology (106): 77-85.

<http://www.tolweb.org/Fungi/2377> (consultada por última vez el 5 de febrero de 2009)

Howard, C.M. and Albregs, E.E. (1973). A strawberry fruit rot caused by *Pestalotia longisetula*. Phytopathology (63): 862-863.

Hu, H.L., Jeewon, R., Zhou, D.Q., Zhou, T.X. and Hyde, K.D. (2007). Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. Fungal Diversity (24): 1-22.

Hwang, S. W. 1960. Long term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology*. (14): 784-788.

Hyde, K.D. and Fröhlich, J. (1995). *Mycosphaerella palmicola* associated with leaf spots of *Cocos nucifera* in Australia Iran Jaya and Papua New Guinea. *Mycological Research* (99): 704-706.

James, T. Y., F. Kauff, C. Schoch, P. B. Matheny, V. Hofstetter, C. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H. T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A. E. Arnold, A. Amtoft, J. E. Stajich, K. Hosaka, G.-H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J. M. Curtis, J. C. Slot, Z. Wang, A. W. Wilson, A. Schüßler, J. E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P. M. Letcher, M. J. Powell, J. W. Taylor, M. M. White, G. W. Griffith, D. R. Davies, R. A. Humber, J. B. Morton, J. Sugiyama, A. Y. Rossman, J. D. Rogers, D. H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R. A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkmann-Kohlmeyer, R. A. Spotts, M. Serdani, P. W. Crous, K. W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W. A. Untereiner, R. Lücking, B. Büdel, D. M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D. Hibbett, F. Lutzoni, D. McLaughlin, J. Spatafora, and R. Vilgalys. 2006a. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443:818-822.

James, T. Y., P. M. Letcher, J. E. Longcore, S. E. Mozley-Standridge, D. Porter, M. J. Powell, G. W. Griffith, and R. Vilgalys. 2006b. A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* (98): 860-871.

Jasalavich, C. A., A. Ostrofsky y J. Jellison. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. p.p. 4725-4734.

Jensen, D.F., Wolffhechel, H. (1995). Biological control: Benefits and risks. (Series: Plant and microbial biotechnology research. m En M.T.H., Heikki y J.m. Lynch (Eds.) *The Use of fungi, particulary Trichoderma spp. And Gliocladium spp., to control root rot and damping off disease* (pp. 177-189). Cambridge: Cambridge University Press.

Jumpponen A. y L. C. Johnson. 2005. Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations a case study from tallgrass prairie. *Mycologia*. p.p. 1177-1194.

Kamei, I., H. Suhara y R. Kondo. 2005. Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin. *Applied Microbiology Biotechnology*. (69): 358-366.

Karakaya, A. (2001). First report of infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. *Plant Disease* (85): 1028.

Kelly, A., Alcala Jimenez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Perez Artes, E. & Jimenez Diaz, R. M. (1994) Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* (84): 1293–1298.

Kim YH, Cho SM, Hyun JW, Ryoo IJ, Choo SJ, Lee S, Seok SK, Hwang JS, Sohn ED, Yun BS, Bae KH, and Yoo ID. 2008. A new antioxidant, clitocybin A, from the culture broth of *Clitocybe aurantica*. *The Journal of Antibiotics* (Tokio). 61: 573-576.

Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S. and Yamanaka K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*. (43): 143-149.

Kliromos JN, 2000. Host specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. In: Bell CR, Brylinski M, Johanson-Green P, eds. *Microbial biosystem: new frontiers*. Proceedings of the 8th International Symposium of microbial ecology Halifax, NS, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 845-851.

Klonowska, A., C. Gaudin, M. Ruzzi, M. C. Colao y T. Tron. 2003. Ribosomal DNA sequence analysis shown that the basidiomycetes C30 belongs to the genus *Trametes*. *Research in Microbiology*. (154): 25-8.

Koh, J.Y., Shin, G.H. and Hur, J.S. (2001). Seasonal occurrence and development of grey blight of tea plants in Korea. *Plant Pathology Journal* (17): 40-44.

Kuhls, K., Liekfeldt E., Borner, T. 1995. PCR fingerprinting used for comparison of ex type strain of *Trichoderma* species deposited in different culture collection. *Microbiological Reserch* (150): 363-371.

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

Kumar, D.S.S. and Hyde, K.D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* (17): 69-90.

Kuo, M. (2008, April). *Infundibulicybe (Clitocybe) gibba*. Retrieved from the *MushroomExpert.Com* Web site: http://www.mushroomexpert.com/infundibulicybe_gibba.html

Lee, J-S., K. S. Ko y H. S. Jung. 2000. Phylogenetic analysis of xilaria based on nuclear ribosomal ITS 1-5. 8S-ITS2 sequences. *FEBS Letters*. (187): 89-93.

Lieckfeldt, E., Kuhls, K., y Muthumeenakshi, S. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: C.P. Kubicek y Harman, G.E. (Eds.) *Molecular taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their teleomorphs* (pp. 35-56). London: Taylor & Francis Ltd.

Liu, Y., M. C. Hodson, and B. D. Hall. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of kingdom *Fungi* inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology* (6):74.

Marx, D. H., and Daniel, W. J. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Canad. J. Microbiol.* (22): 338-341.

Matthias C. Rilling, Daniel L. Mummey. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* (171): 41-53.

McGinnis M. R., Padhye A. A, and Ajello L. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic ascomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology*. (28): 218-222

Mittermeier, R. A. y Mittermeier, C. G. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En: México ante los retos de la biodiversidad. José Sarukhan y Rodolfo Dirzo, compiladores. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D. F. pp. 63- 79.

Moncalvo, J. M., F. M. Lutzoni, S. A. Rehner, J. Jonson y R. Vilgalys. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *System Biology*. (49): 278-305.

Moncalvo, J. M., R. Vilgalys, S. A. Redhead, J. E. Johnson, T. Y. James, A. M. Catherine, V. Hofstetter, S. J. Verduin, E. Larsson, T. J. Baroni, T. R. Greg, S. Jacobsson, H. Clémencon y O. Jr. Miller. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (23): 357-400.

Nirenberg HI and O'Donell K. 1998. New *Fusarium* species and combinatios within *Gibberella fujikori* species complex. *Mycologia*. 90: 434-458.

Pal, A.K and Purkayastha, R.P. (1992). New Parasitic fungi from Indian mangrove. *Journal of Mycopathological Research* (30): 173-176.

Papavizas G. C., Lewis JA & Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* (72): 126-132.

Pasarell L. and McGinnis M. R. 1992. Viability of fungal cultures maintained at -70 °C. *Journal of Clinical Microbiology*. (30): 1000-1004.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation using white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (57): 20-33.

Punithalingam, E. J. M. Waterston. 1970. *Diplodia pinea*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. p. 273.

Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. 1998. Storage of fungi using sterile water or lyophilisation: comparison after 12 years. *Mycoses* (41): 255-257.

Qiu, D.Y., Huang, M.J., Fang, X.H. and Zhu, C. (1994). Isolation of an endophytic fungus associated with *Taxus yunnanensis*. *Mycosystema* (13): 314-316.

Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V., Vasilchenko, L. G. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotic: A reviw. *Appl. Biochem. Microbiol.* (40): 1-17.

Rehner, S. A. And Samuels, G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*. (98): 625-634.

Rezende, M. I., A. M. Barbosa, A. F. D. Vasconcelos, R. Haddad y R. F. H. Dekker. 2005. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and

Botryosphaeria rhodina, cultured on basal medium containing the herbicide, sceptor® (imazaquin). Journal Basic Microbiology. (45): 460-469.

Richter, D. L., and Bruhn, J. N. 1989. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures from cold storage in sterile Water. Canad. J. Microbiol. (35): 1025-1060.

Rilling M. C., Mummey D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist. (171): 41-53.

Rivera, M.C. and Wright, E.R. (2000). First report of azalea petal blight caused by Pestalotiopsis guepini in Argentina. Plant Disease (84): 100.

Ryan, M. J., Smith, D., and Jefries P. 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. World Journal of Microbiology & Biotechnology (16): 183-186.

Ryan, M. J., Jeffries, P., Bridge, P. D., Smith, D. 2001. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. CryoLetter (22): 115-124.

Ryan, M. J., Smith, D. 2003. Preserving a microorganism's capacity to reproduce active biomolecules. In Biological Resource Centres and the Use of Microbes (N. Lima & D. Smith, eds): 197-216. Livraria Minho, Braga, Portugal.

Ryan M. J., Smith D. 2004. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. The British Mycological Society. Mycol. Res. 108(12) (9): 1351-1362.

Saldenha, R. L., Garcia, J. E., Dekker, F. H., Vilas-Boas, L. A., Barbosa, A. M. 2007. Genetic diversity among Botryosphaeria isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme Production. Brazilian Journal of Microbiology. (38): 259-264.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Samuels, G.J. (1996). Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research, 100, 923-935 (el género Trichoderma), (7): 249-260

Santos, I. M., Abrunhosa, L., Venancio, A., Lima, N. 2002. The effect of cultura preservation techniques on patulin and citinin production by Penicillium expansum Link. Letters in Applied Microbiology (35): 272-275.

Seif, E., J. Leigh, Y. Liu, I. Roewer, L. Forget, and B. F. Lang. 2005. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. Nucleic Acids Research 33:734-744.

Sharifia M, Karimi K, Taherzadeh MJ. 2008. Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology. 35:1253-1259.

Singleton, I. 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. J. Chem. Technol. Biotechnol. (59): 9-23.

Singleton, I. 2001. Fungal remediation of soils contaminated with persistent organic pollutant. In fungi in Bioremediation, ed G. M. Gadd, 79- 96. U.K. Cambridge University Press.

Smith, D. 1983. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi. Transactions of the British Mycological Society. (80): 360-363.

Smith, D. 1993. Culture Collections. In: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Edited by Chang Shu-Ting, Buswell a. John and Miles G. Philip. OPA, Amsterdam , Gordon and Breach Science publishers S.A. p.p. 15-33.

Smith, D., Onions, A. H. S. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2nd ed. [IMI Technical Handbooks No.2] CAB International, Walingford.

Smith, D., Ryan, M. J., Day, J. G. 2001. The UKNCC Biological Resource: properties, maintenance and management. United Kingdom National Culture Collection Secretarial, Egham.

Smith, W. H. (1995). Forest occurrence of *Trichoderma* species: Emphasis on potential Organochlorine (Xenobiotic) degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (32): 179-183.

Sousa, M.F., Tavares, R.M., Geros, H. and Lino-Neto, T. (2004). First report of *Hakea sericea* leaf infection caused by *Pestalotiopsis funerea* in Portugal. *Plant Pathology* (53): 535.

Steyaert, R.L. (1949). Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. Et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). *Bulletin Jardin Botanique État Bruxelles* (19): 285-354.

Stoychev, I., Homolka, L., Nerud, F., Lisa, L. 1998. Activity of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strain after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *Necator. Antonie van Leeuwenhoek* (73): 211- 214.

Steenkamp, E. T., J. Wright, and S. L. Baldauf. 2006. The protistan origins of animals and fungi. *Mol. Biol. Evol.* 23:93-106.

Strobel, G.A., Yang, X.S., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S. and Hess, W.M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* (142): 435-440.

Strobel, G.A., Hess, W.M., Li, J.Y., Ford, E., Sidhu, R.S. and Summerell, B. (1997). *Pestalotiopsis guelpinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany* (45): 1073-1082.

Strobel, G.A., Li, J.Y, Ford, E., Worapong, J., Gary, I.B. and Hess, W.M. (2000). *Pestalotiopsis jesteri*, sp.nov. an endophyte from *Fragaria badenii* Wernh., a common plant in the southern highlands of Papua New Guinea. *Mycotaxon* (76): 257-266.

Suryanayaranan, T.S., Senthilarasu, G. and Muruganadam, V. (2000). Endophytic fungi from *Cuscuta reflexa* and its host plants. *Fungal Diversity* (4): 117-123.

Suto, Y. and Kobayashi, T. (1993). Taxonomic studies on the species of *Pestalotiopsis*, parasitic on conifers in Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan* (34): 323-344.

Swart, L., Taylor, J.E., Crous, P.W. and Percival, K. (1999). *Pestalotiopsis* leaf spot disease of Proteaceae in Zimbabwe. *South African Journal of Botany* (65): 239-242.

Tagne, A. and Mathur, S.B. (2001). First report of chlorotic spot of maize caused by *Pestalotiopsis neglecta*. *Plant Pathology* (50): 791.

Taylor, J.E., Crous, P.W. and Palm, M.E. (2001). Foliar and stem fungal pathogens of Proteaceae in Hawaii. *Mycotaxon* (78): 449-490.

Tehler, A., J. S. Farris, D. L. Lipscomb y M. Källersjo. 2000. Phylogenetic analyses of the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia*. (92): 459- 474.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. (24): 4876-4882.

Toofanee, S.B and Dulyamamode, R. (2002). Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Diversity* (11): 169-175.

Tortella, G. R., Diez, M. C., Durán, N. 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutans. *Critical Reviews in Microbiology*, (31): 197-212.

Tye, R.J.; Willets, A.J. 1973. Fungal growth on methanol. *J.Gen. Microbiol.* (77): 1-2, (69): 2418-2420.

UNEP/UNDP. 1992. *World Resources 1992- 1993. A guide to the global environment*. Edited by United Nations Environmental Program (UNEP)/United Nations Development Program (UNDP). Oxford University Press, USA.

Van Elsas, J. D., D. G. Frois, W. A. Keijzer y E. Smit. 2000. Analisis of dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. (43): 133-151.

Van der Heijden M. G. A., Klironomos J. N., Ursic M., Moutoglis P., Streiwolf-Engel R., Boller T, Wiemken A., Sanders I. R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem viability and productivity. *Nature*. (396): 62-72.

Van Hemme, J., Wong, E. T., Dettman, H., Gray, M. R., Pickard M. A. 2003. Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. *App. Environ. Microbiol.* (69): 1320- 1324.

Vasconcelos, A. F. D., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Scarminio, I. S., Rezende, M. I. 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria sp.* In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem.* (35): 1131-1138.

Vilgalys, R. y B. L. Sun. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster musroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (91): 4599-4603.

Vilgalys, R. 2007. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>, accesada por última vez el 4 de febrero de 2009.

Wei, J.G. and Xu, T. (2004). *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. *Fungal Diversity* (15): 247-254

White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, San Diego California, USA. p.p. 315-322.

Worapong, J., Ford, E., Strobel, G. and Hess, W. (2002). UV light induced conversion of *Pestalotiopsis microspora* to biotypes with multiple conidial forms. *Fungal Diversity* (9): 179-193.

Worapong, J., Inthararaungsorn, S., Strobel, G.A. and Hess, W.M. (2003). A new record of *Pestalotiopsis theae*, existing as an endophyte on *Cinnamomum iners* in Thailand. *Mycotaxon* (88): 365-372.

WRI/IUCN/UNEP. *Global Biodiversity Strategy*. 1992. Edited by World Resources Institute (WRI), The World Conservation Union (IUCN) and United Nations Environmental Program (UNEP). USA.

Zervakis, G. I., J. M. Monclava y R. Vilgalys, R. 2004. Molecular phylogeny biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*. (150): 715-726.

Zhang, A. W., Riccioni, L., Pedersen, W. L., Kollipara, K. P., and Hartman, G. L. 1998. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology* (88):1306-1314.

Zhang, J.X., Xu, T. and Ge, Q.X. (2003). Notes on *Pestalotiopsis* from Southern China. *Mycotaxon* 85: 91-99.

X. ANEXOS

SECUENCIAS DE LOS AISLADOS DE ESTUDIO ESCRITAS EN EL SENTIDO

5' → 3'.

- **1 CMU**

ccaatgtgaaccataccaaactgttgccctcggcggggtcacgccccgggtgcgtcgcagccccggaaccaggcgcccggaggga
ccaaccaaactctttctgtagtcccctcggcgagcgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaaaacttcaacaacggatc
tcttggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacatt
gccccgccagatcttgccggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaaccctccgggggtcggcgttggggatcggaacc
cctaagacgggatccccgccccgaaatacagtgccggtctcggcgagcctctcctcgcagtagttgcacaactcgcaccgggagcg
cggcgcgtccacgtccgtaaaacaccaactctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgtgaacttaagcatatcaata

- **4 CMU**

aagatacggggacaacaaccatgtgaccataccaaactgttgccctcggcggggtcacgccccgggtgctcgcagccccggaaccag
gccccggaggaggaccaaccaaactctttctgtagtcccctcggcgagcgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaa
aaccttcaacaacggatctcttggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatc
gaatcttgaacgcacattgcccccccagaattctggcgaggatgcctgtccaaaggcatttcaaccctcgaaccctccgggggtaat
aattgagaatcgggatacccttattataatctcaggccccgaaagcaattgagaagtaagacagagacgtcaccaaacgattat
gaacaaataattacgagagaggcgggctcctacaaatgttaaacacgcactacaaaagaggtagtaaggttgactagagaggtatt
aaagaaattattgctttcaggtaaaagtatagtaa

- **8 CMU**

aaccaatgtgaaccataccaaactgttgccctcggcggggtcacgccccgggtgcgtcgcagccccggaaccaggcgcccggagg
ggaccaaccaaactctttctgtagtcccctcggcgagcgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaaaacttcaacaacg
gatctcttggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgc
acattgcgcccgccagatcttgccggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaaccctccgggggtcggcgttggggacctcg
ggagcccctaagacgggatccccgccccgaaatacagtgccggtctcggcgagcctctcctcgcagtagttgcacaactcgcaccg
ggagcgcggcgcgtccacgtccgtaaaacaccaactctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgtgaacttaagcatatc
aataagcggaggaa

- **10 CMU**

gtgaagtacctatacgttgctcgggagggcgctctgcgcgccataagggacggccggccgcaggaccataaacctgaatatttattgta
acttctgagtttaaaaaacaataaatcaaaactttcaacaacggatctcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcaaatgcgataag
taatgggaattgggaattcaatgaatcatcgaatcttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgcctgttcgagcgtcatt
caaccctcaagccccgggttgggttgggatcgggctgcggttctaccgcccggcccctaaatccgggggcggtctcgcggatcc
attgccccgaactaacacctcgggaactgaaacgcggcgcggccaagccaagaaaccccccaacttctgaatgttgacctcggatcatgtg
ggaataccctcaactaatcatatcaaaagcttgaagaa

- **12 CMU**

aagtagagggggactcggctcgatctcccccttgtgaacatacctctgttcttggcggctcttctgctgcgaggaggccctcgcgggcc
ccccgcgcgcttccgccttaggacctcaaacctcagtcagtaaacgtcgcagctctgagaacaagtaataaaactaaaactttcaaca
cggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattggaattgcagaattcagtaatcatcgaatcttgaac
gcagattgcgccccttgcatccgaggggcatgcctgttcgagcgtcattacaaccccaagctcgttggattggcgccatcctctctg
ggacgcgcttaaagaccttggcgggtggcgttccggccctcaagcacagtagaaaacacctgggttgggagcgggtgaggtcagccc
cggaatacctctcaaggtgtgatcaggttgacctaaagatcccgggtgtagtagacttgattgttttggaaaaaaaaagaagagtggg
a

- **14 CMU**

ccaatgtgaacgttaccaaaactgttgctcggcgggatctctgccccgggtgcgtcgcagccccggaccaaggcggcccgaggacc
aacctaaaactcttattgtataccccctcgcgggtttttataatctgagccttctcggcgcctctcgtaggcgttccgaaaatgaatcaaaacttt
caacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattggaattgcagaattcagtaatcatcgaatc
ttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctgaacccctccggggggtcggcgttgg
ggatcggccctcccttagcgggtggcgtctccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcctgcgcagtagttgcacactcgcac
gggagcgcggcgcgtccacagccgftaaacaccaacttctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaacttaagcata
t

- **16 CMU**

ccaatgtgaacgttaccaaaactgttgctcggcgggatctctgccccgggtgcgtcgcagccccggaccaaggcggcccgaggacc
aaccaaaaactcttttataccccctcgcgggtttttataatctgagccttctcggcgcctctcgtaggcgttccgaaaatgaatcaaaactttca
acaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattggaattgcagaattcagtaatcatcgaatcttt
gaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctgaacccctccggggggtcggcgttggg
gatcggccctgccttggcgggtggcgtctccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcctgcgcagtagttgcacactcgcacgc
gagcgcggcgcgtccacagccgftaaacaccaacttctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaacttaagca

- **18 CMU**

aaccaatgtgaacgttaccaaactgttgctcggcgggatctctgccccgggtgctgagccccggaccaagggcgccccgagg
accaacaaaactcttattgtataccccctcggggtttttataatctgagccttctcggcctctctgtagggcttcgaaaatgaatcaaaa
ctttcaacaacggatctctggttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcga
atctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccnccggggg

- **19 CMU**

tccaaccaatgtgaacgttaccaaactgttgctcggcgggatctctgccccgggtgctgagccccggaccaagggcgccccg
gaggaccaacccaaaactcttattgtataccccctcggggtttttataatctgagccttctcgccccctctgtaggctttcaaaaatgaat
caaaatttcaacaacggatctttgggtctggcatcaataaaaaagncacaaaatgaataagtaagtgaaatgcaaaatcatggaat
catcaaatctttgaacgaccattgcgcccgcagattccggcgggcatgctgacaaaacgtctttcatccctcaacccctccggggg
cgggtgtagtggctcgcccccttagtggggggccacctcaaaaatagtgggggcctccccacctccgcnccgntannantng

- **21 CMU**

ggactaattactccaacccatgtgaacataccaaactgttgctcggcggggtcacgccccgggtgctgagccccggaaccaggcg
cccgccggaggaccaaccaaactctttctgtagtccccctcgggacgtatttctacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaaaa
ttcaacaacggatctctggttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcga
tctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctccggggggtcgcggt
gggatcggaacccctaagacgggatcccgccccgaaatacagtggggtctcgccgagcctctctgagcagtagttgcacaac
tcgacccgggagcgggcgctccacgtccgtaaaacaccaactctgaaatgttgacctcgatcaggtaggaatacccgctgaact
aagcatatcaataagcggaggaa

- **23 CMU**

ggacagattactccaacccatgtgaacataccaaactgttgctcggcggggtcacgccccgggtgctgagccccggaaccaggc
gccccggaggaccaaccaaactctttctgtagtccccctcgggacgtatttctacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaaaa
ctttcaacaacggatctctggttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcga
atctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctccggggggtcgcggt
tgggatcggaacccctaagacgggatcccgccccgaaatacagtggggtctcgccgagcctctctgagcagtagttgcacaac
ctcgacccgggagcgggcgctccacgtccgtaaaacaccaactctgaaatgttgacctcgatcaggtaggaatacccgctgaact
taagcatatcataagcggaggaa

- **25 CMU**

tccaaccaatgtgaacgttaccaaactgttgctcggcgggaactcatgccccgggtgcgtcgcagccccggaccaaggcgccccg
ggaggaccaacaaaaactctttgtataccccctcggggtttttataatctgagcctctcggcgcctctcgtaggcgttcgaaaatgaa
tcaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgat
catcgaatcttgaacgcacattgcgcccgagcttctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaacctcgaacccctccggggggt
cggcgttgggatcggccctctcttgcggggccgtctccgaaatacagtggggtctcggcagcctctctgcgcagtagttgcaca
ctggcatcgggagcgcggcgcgtccacagccgftaaacaccaactttctgaaatgttgacctcgatca

- **26 CMU**

tcccacaaccatcgcgaatcttaccgtacgggtgctcggcgtggcgggtccggaaggccctcgggtcctccggatcctcgggtctcc
cgctcgggaggctgcccgggagtgccgaaactaaactcttgatat

- **27 CMU**

gggcttcggctcgactctcccacccttgtgaacgtacctgtgttggcggctccggccgcaaaggacctcaactccagtcagtaaa
cgcagacgtctgataaacaagtaataaaacttaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcga
taagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacattgcgcccttgattccggggggcatgcctgttcgagcgtc
attacaacctcaagctcgttgaattgggaccgtctcattgcggacgcgcctcaaagacctcggcgggtggcgttcagccctcaagc
gtagtagaatacacctcgttggagcgggtggcgtcggcccggaacctctgaactttctcaaggtgacctcggatcaggtaggg
ataccgctgaact

- **29 CMU**

aaaaatggactagttctactcccaccatgtgaactacctttgtgctcggcagaagttataggtctcttatagctgctcgggtggaccatt
aaactctgttattatgtaatctgagcgtcttatttaataagcaaaaacttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagc
gaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacattgcgccattagattctagtgggcatgcctgt
tcgagcgtcattcaaccctaagcctagcttagtgggaatctactctttattagttgtagttcctgaaatacaacggcggattgtagatcc
tctgagcgtagtaattttctcgtttgttaggtgctataactcccagccgctaaccaccaattttgtggtgacctcggatcaggtaggaat
accgctgaactaagcatatcaataggcggaggaa

- **30 CMU**

tggaactatctcttgtgctcggcgaagctaccgggacctcgcgccccgggcgccccggcggaacaaaactctgttat
cttagtgattatctgagtgcttatttaataagcaaaaacttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcga
taagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacattgcgccattagattctagtgggcatgcctgttcgagcgtc
attcaaccctaagcacagcttattgtggaaacctacggctcgtagttcctcaaagacattggcggagtggtcctctgagcgtg

taatctttatctcgcttctgtaggtgctgccccccggccgtaaaacccccaatcttctggtgacctcgatcaggtaggaataaccgctga
acttaagca

- **34 CMU**

tactccaacccatgtgaacgttaccaaactgtgctcggcgggatctctgccccgggtgctgagccccggaccaaggcggccg
gaggaccaacccaaaactctattgtataccccctcgccggtttttataatctgagcctctcgccgctctcgtaggcttgcgaaatgaat
caaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaaaaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcaaaatcagtgat
catcgaatcttgaacgcacattgcgcccagcattccggcgggatgcctgtccaagcgtcattcaaccctcgaaccctccggggg
tcggcgttgggatcgccctcccttagcgggtggcgtctccaaaatacagtgccggtctgcccagcctctctgagtagttgac
actcgatcgggagcggcgctccacagccgtaaacacccaacttctgaaatgtgacctcgatcaggtaggaataaccgctgaa
cttaagcatatcaataaggcggaggaaa

- **39 CMU**

cgagctccggctcgactctccacccttgtgaacgtacctctgttggcggctccggccgcaaaggacctcaactccagtcagta
aacgcagacgtcgataaacaagtaataaactaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgc
gataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacattgcgccccttgattccggggggcatgcctgttcgagc
gtcattacaaccctcaagctctgttgaattggcaccgtcctcactgaggcgcctcaaagacctcgccggtgctgttcagccctca
agcgtagtagaatacacctcgcttggagcgggtggcgtcggccgagcgaacctctgaactttctcaaggtgacctcgatcaggtga
gggataaccgctgaacttaacatatcaataagaggaggaaa

- **43 CMU**

tccaaacccaatgtgaacgttaccaaactgtgctcggcgggatctctgccccgggtgctgagccccggaccaaggcggccg
gaggaccaacccaaaactctttgtataccccctcgccggtttttataatctgagcctctcgccgctctcgtaggcttgcgaaatgaatca
aaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcat
cgaatcttgaacgcacattgcgcccagcattctggcgggatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaaccctccggggggtcg
gcttggggatcgccctgccttggcgggtggcgtctccgaaatacagtgccggtctgcccagcctctctgagtagttgacact
cgatcgggagcggcgctccacagccgtaaacacccaacttctgaaatgtgacctcgatcaggtaggaataaccgctgaactta
agcatat

- **44 CMU**

tgtgaaccataccaaaactgtgctcggcggggtcacgccccgggtgctgagccccggaaccaggcggccgaggaggaccaa
ccaaactcttctgtagccccctcgccgagcgttattcttacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaaaactttcaacaacggatctctg
gttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacattgcg

cccgccagttattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaaccctccgggggtccggcgtggggatcggaaccct
aagacgggatcccggccccgaaatacagtggcggtctcgccgagcctctcatgcgagtagttgcacaactcgcaccgggagcgcg
gcgcgctccacgtccgtaaaacaccaactctgaaatgtgacctcgatcaggtaggaatacccgctgaacttaagcatatcaataa

- **48 CMU**

cggcgaccagaaaccctttgtgaactatacctatcgttgctcggcgaaggccggcctcccaccgaggcccttgggaacaaggag
cagcccggcgccgccaaccaaactctgtttctagtgaatctctgagtaaaaaacataaatgaatcaaaacttcaacaacggatctc
ttggttctggcatcgatgaagaacgcagcgaatcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattg
cgccctctggtattccggaggcatgcctgtcgagcgtcattcaaccctcaagcctggcttggtgatggggactgctccgagagggagc
aggccctgaaatctagtggcgagctcgccaggaccccgagcgtagtagttatatctcgctccggaaggccctggcggtgccctgccgtaa
accccaactctgaaaattgacctcgatcaggtaggaatacccgctgaacttaagcatatcaataa

- **51 CMU**

tccaaccaatgtgaaccatacctaaactgttgctcggcggggtcacgccccgggtgctgcagccccggaaccaggcgcccgccg
gagggaccaaccaaactctttctgtagtccctcgggacgttattctacagctctgagcaaaaattcaaatgaatcaaaacttcaaca
acggatctctggttctggcatcgatgaanaacgcancgaantgcnataagtaatgtgaattgcanaattcantgaatcatcnaatcttgaa
cnnncattgnncnccacnattnngccggnctgc

- **54 CMU**

aaccctgtgaacatacctttatgttgctcggcggatcagcccgcgccccgtaaaacgggacggccccgaggaaccacaaaactc
tgatttagtgaactctgagctaaaaaacaataaatcaaaacttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcaa
aatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgccccgagttattcggcgggcatgcctgt
cgagcgtcattcaaccctcaagccccgggttgggtggggatcgggcttgaactccagccccggccccgaaatctagtgcggtctcgct
gcagcctcattgcgtagtagtaaacctcgcaactggaacggcgcgcccaagccgtaaaccccccaactctgaaatgttgacctcg
atcaggtcggaataccc

- **55 CMU**

tccaaccctgtgacatacctttatgttgctcggcggatcagcccgcgccccgtaaaacgggacggccccgaggaaccacaaaa
ctctgatttagtgaactctgagctaaaaaacaataaatcaaaacttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcag
caaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgccccgagttattcggcgggcatgcc
tgctcgagcgtcattcaaccctcaagccccgggttgggtt

- **56 CMU**

tgtaacttaccattgttgccctcggcagaagctacctggtaccctacctggaacgacctaccctgtagcgccttaccctggaacggcttacc
ctgtaacggctgcccgtggactaccaaacctctgttattttattgtaactgagcgtctattttaataagtcaaaccttcaacaacggatctctg
gttctggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattggaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcg
cccattagtattctagtgggcatgctgttcgagcgtcattcaacccttaagcttagcttagtggggagcctactgctttgctagcggtagctc
ctgaaatacaacggcggatctgcgatatcctctgagcgtagtaattttatctcgctttgactggagtgagcgtctttagccggtaaaccccc
caattttaatggtgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaacttaagcatatcaataagcggaggaa

- **59 CMU**

gtagactcggcctgctacctctaccctgtctttgagtacctctgttctcctcggcgggtcccccgccattggacaacattcaaacctttg
cagttgcaatcagcgtctgaaaaacataatagttaccacttcaacaacggatctctggttctggcatccatgaagaacgcagcgaatg
ccataagtagtggaattgcagaattccgtaatcctcaatcttgaacgcacattgcccccttggtattccctggggcatgctgttcgagc
gtcattgtacctccagctcgtctgtgtgggtgttctcgcctccgctgtagactcgccttaaaacaattggcagccggcgtattgattc
ggagcgcagtagatctcgcgcttgcactcctaacgacaacctccaaaagtagcttttaccctctgacctcggatcaggtagggatacccg
ctgaacttaagcatatcaataagcggaggaa

- **66 CMU**

ggataggaggcagaacaacccatgtgaacatacaaacctgtgctcggcggggcagccccggcccgatggggcccagaaccag
gccccggaggaggacaaccttttcttctgtagtccccctcgcggacgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaaaatgaagtaaaa
cgttaagaagggaaactctgggtcggggcatcaagaagaaggagcagaaaagggagaagatgtgaaaggcgaatccccgg
accctaagtctactgagggtgatagtagacccccggagaatagagaggatcatctgtgcaaaaatgtattgtgacaccggactcccagc
aaggaagaaataagactcatcgacaaaatctagaaccgataatgaaggaacaaagaaattccggagagaaaacataggaga
aaaaatgaaattaataacaaaaataacataaagcaactcacgagatagccgtatggacgaaacacacactgattgaaccggct
gaaagaaataacgccaacattaataaagatctatattacattaataggctacaacgaacaaaaactctacaacataagaaaagctaa
agacacctaattatcacagcgcgggaggggaaagaaagatagattaaaaaagaacataacaaaaacaaaaaataaataaagctaa
aatagcaatagccaagagacgaaactataaataaaaaacttagaggaaacaaactatagacataaaacatacataaataaaa
agacaataaaaaaataagaacaatacaccaaggtagccaaaaacaaaaacaaaagacatgaaacataaaattagaaataactac
atagatatagaagatgaaacgaataaataacaacaaaaaaaagaacaagaagaacatatcaagaaccagcaaaaagac
aagcctaataaggaagggctcgacacagaacgaataaaagataacaaag

- **81 CMU**

agtctctctgagcttctcccccttgctggttaccgctatgtaattggtgggattaaacatggttaaatttttttagccgtcccagcaaatt
atcttctcttattaaattgaactgaactcattttgagattacataaaaaataatcttttaataacaacttcaacaacggatctctggtctcgcac
gatgaagaacgcagcgaatgcgatacgtaatggaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcactctatggtatt

ccgtagagatgacctgtttcagatcatgaacacctactactataactttttgtgtaatagtgacttgaatgcgctgggtcaatcagccct
ctaaaatggagttctgactgtgattgttttaacagcatgttgccctaataagttcggcagtaatgtgaaatcactggctttttgcttagaat
ctgacagctctgatatacagaatttcgaggtagctgtctctctcaaatgtgatctgaaatcaggtaggattaccgctgaactaa

- **83 CMU**

tccaaccctgtgaacatacctatacgttgctcgccggatcagcccgcgacctgtaaaaaggacggcccggaggaccctaaact
ctgttttagtgaactctgagtaaaacaacaataaatcaaaactttcaacaacggatctctggtctggcatcgatgaagaacgcagc
aaaatgagataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccggcagttctggcgggcatgct
gttcgagcgtcattcaacctcaagctcagctggtgtgggactcgcgtaaccgcttcccaaatcgattggcggtcacgtcgagcttc
catagcgtagtaatacacacctgactggaatcgtcgcggccacgccgtaaaacccaacttctgaatgttgacctcgatcaggtagg
aataccgctgaactaagcatacaataagcggaggaa

- **89 CMU**

cgggctttgcctgccatcttaccatgtctttgagtagcttctgttctcggcgggtcgcccggcattggacaaaactaaacctttgtaatt
gaaatcagcgtctgaaaaaacataatagttacaactttcaacaacggatctctggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgca
taagtagtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccctgtattccatgggcatgctgttcgagcgtc
atgtgacctcaagctctgctgtgtgtgggtgttctcgcctctcgcgcagactcgcctcaaaacgattggcagccggcgtattgctcg
agcgcagtacatctcgcgctttgactcacaacgacgacgtccaaaaagtagcttttactcttgacctcgatcaggtaggatcccg
ctgaactaa

- **90 CMU**

cccaatgtgaacgttaccaaactgttgctcggcgggatctctgcccgggtgctgcgagccccggaccaaggcggccggaggac
caacaaaactttttgataccccctcggggtttttataatcagccttctcggcgcctctcgtaggcgttgcgaaaatgaatcaaaacttt
caacaacggatctctggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatc
ttgaacgcacattgcgcccggcagttctggcgggatgctgtccgagcgtattcaacctgaacctccgggggtcggcgttg
ggatcggccctcccttagcgggtggcctctccgaaatacagtgccggtctcgcgcagcctctctcgcgagtagttgcacactcgcac
gggagcgcggcgcgtccacagccgttaaaccaccaacttctgaaatgttgacctcgatcaggtaggataaccgctgaactaagcata
tca

- **95 CMU**

tccaccctgtgaacatacctttatgttgctcggcgggatcagctgtctctcgggacggcccggcaggaccctaaactctgttttagtga
acttctgagtaaaaaacaataaatcaaaactttcaacaacggatctctggtctggcatcgatgaagaacgcagcaaatgcgataag
taatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccggcagttctggcgggatgctgttcgagcgtcattt

caaccctcaagcccagcttggtggtgggagctgtttatgtaactctcccaaatgagtgggggtcacgtcgagctccatagcataatatttta
 catatcgttactggtaatcctcgcgcccaccccggttaaaccccatcttcagagtggtgacctcagatcgtgtaagaataccctcagaactaag
 catataaataaggcagaagaa

- **96 CMU**

ttgagtagccttcgtctgtatttcttactgtgaactgtttattgtttggcgcttgaggaatgttggttagccatagggataggctagtcaaatgtta
 accgagtcaaagtcaggcttaggcctggtatcctattaattattacaaaagaattcagaattattattgtaacataagcgtaaaaaactata
 aaacaactttaacaacggatctctgttctcgcacatgagaacgtagcaaagtcgataactagtgtgaattgcatattcagtgaatca
 tcgagctttgaacgcatcttgcgctcaatggtattccattgagcacgctgtttcagtatcaaaaacccccacatccacaactgtttgtgaat
 ggaattgagagcttctcggcgtaagctgatctttaaacaattaggcctgaactttgttcttctgcctgaacatttttaataaaaggaatgct
 ctagtaaaaagacttcttctggggcctcccaataaaactctttaaactgatctgaaatcaggcgggattaccgctgaactaagcatatc
 aataa

- **181 CMU**

acccaatgtaaccataccaaactgttcctcggcggggtcacgccccgggtgctgcagccccggaaccaggcgccccggagg
 gaccaaccaacttttctgtagtccccctcgcggacgtatttttacagctctgagcaaaaattcaaatgaatcaaaactttcaacaacgg
 atctcttggttctgcatcgatgagaacgcagcgaatgagataagtaattggaattcagaattcagtgaatcatcgaatcttgaacgca
 cattgcgccccagattctggcgggcatgctgtccgagcgtatttcaaccctcgaacccctcgggggggtcggcgttggggatcggg
 aaccctaagacgggatccccggccccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcctgcgtagtggcacaactcgcaccggg
 agcgcggcggtccacgtccgtaaaacacccaactctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaactaagcatatcaa
 ta

- **183 CMU**

taccaaactgttcctcggcggggtcacgccccgggtgctgcagccccggaaccaggcgccccggaggaccaaccaactctt
 tctgtagtccccctcgcggacgtattttcttacagctctgagcaaaaattcaaatgaatcaaaactttcaacaacggatcttctggttctgcatc
 gatgaagaacgcagcgaatgagataagtaattggaattcagaattcagtgaatcatcgaatcttgaacgcacattgcgccccagta
 ttctggcgggcatgctgtccgagcgtatttcaaccctcgaacccctcgggggggtcggcgttggggatcgggaaccctaagacgggat
 cccggccccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctatgcgtagtggcacaactcacaccgggagcgcggcgctccacg
 tccgtaaaacacccaactctgaaatgttgacctcagaacaggtaggaataccccctgaact

- **196 CMU**

ggataaggaagaacaacccatgtgaacgttaccaaactgttcctcggcggggaactcatgccccgggtgtgctgcagccccggacca
 ggcgccccgggaggaccagcaaaaactctttgtataccccctcgcgggttttttataatctgagccttctcggcctctcgtaggcgttc

gaaaatgaatcaaaactttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaattggaattgcaga
attcagtgaaatcatcgaatcttgaacgcacattgcgcccagctattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccc
tccggggggtcggcgttgggatcggccctctcttggggggcctcctcgaataacagtgggcgtctcggcgcacctctctctcgcgag
agtttgcacactcgcacgggagcggcgctccacagccaataaacacccaattctaaatgttgacttcggatcaggtaggatgatac
ccgtctgaattaacatgaagaaaaaaaaaa

- **198 CMU**

tttccgatatagcggagaatccaccaggtgaactccattgttgcctcggcagaagctgctcggcgcaccttaccttgaacggcctaccc
gtagcgccttaccttgaacggccttacctgtagcggctcgggtgactaccaactctgttattttattgtaattctgagcgtctatttaataa
gtcaaaactttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaattggaattgcagaattcagtg
atcatcgaatcttgaacgcacattgcgcccattagcttctagtgggatgcctgttcgagcgtcattcaacccttaagcctagcttagtgg
gagcctactgctttgctagctgtagctcctgaaatacaacggcggatctcgcgatcctctgagcgtagtaattttatctcgtctttgactggag
tgcagcgtcttagccgctaaatcccctaatttttaattggtgacctcggatcaggtaggaataaccgctgaacttaagcatatcaataa

- **201 CMU**

taccttaattgttgcctcggcggatcagcccgcgcccggtaaaacgggacggcccgcagaggatccaaactcttgccttattgtaactctg
agtaaaacaaacaaataaatacaaaactttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgcgataagtaattg
gaattgcagaattcagtgaaatcatcgaatcttgaacgcacattgcgcccagctattctggcgggcatgcctgttcgagcgtcattcaacc
ctcaagccccgggttgggttggggatc

- **208 CMU**

cataccaattgttgcctcggcggatcagcccgcctcccggtaaaacgggacggcccgcagaggaccctaaactctgttctatatgtaact
tctgagtaaaaccataaataaatacaaaactttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgcgataagta
gtgaattgcagaattcagtgaaatcatcgaatcttgaacgcacattgcgcccagctattctggcgggcatgcctgttcgagcgtcattcaa
ccctcaagccccgggttgggttgggactcgcgagctcaaatcgcgctcccaaatgattggcggcagctcagctccatagcgtagtagta
aaaccctcgtactggaatcgtcggccacggcgttaaacccaactctgaatgttgacctcggatcaggtaggaataaccgctgaact
taagcatatca

- **214 CMU**

tccgccccgcgtaacatacctattgttgcctcggcgggattgccccgggcccctcctgtgccccggatcacgcgcccgcctaggaaactca
actctgtttttttggaatcttctgagtagtttttcaaaataaataaaaactttcaacaacggatctcttggcttggcatcctgaagaaccgag
cgaaatgcgataagtaattggaattgcagaattccgtgcatcatcactcattgaaccccccttgcctccgcccgtcctcgggctgcctcggc
cttcaa

- **216 CMU**

taccacttggtgcctcggcgatcagcccgtcccggtaaaacgggacggcccgcagaggaccctaaactctgttctatatgtaactct
gagtaaaaccataaataaatcaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgataagtaatg
gaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgcctgttcgagcgtcattcaacc
ctcaagcacagctgggtgtggactcgcgtaattcgcgttctcaaaatgattggcggtcacgtcgagcttccatagcgtagtagtaaaacc
ctcgttactgtaatcgtcggccacgcccgtaaaccccaactctgaatgtgacctcggatcaggtaggaatacccgtgaacttaagca
tatcaataa

- **218 CMU**

gggtacgggagatcaaccatgtgaccataccaaactgtgcctcggcggggtcacgccccgggtgcttcgagccccggaaccaggc
gcccgcggaggaccaaccaaactcttctgtagtcccctcgcggacgtatttttacagctctgagcaaaaattcaaatgatacaaaact
ttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgataagtaatgtaattgcagaattcagtgatcatcgaat
ctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctgaaccctcgggggtccggcgtg
gggactcgggaaccctaagacgggatcccggccccgaaatacagtgccggtctcgcagtagcctctcatgagcagtagttgcacaac
tcgtaccgggagcgcggcgtccacgtccgtaaaacacccaactctgaaaagttgacctcggatgaggatgggaatacccgtgaact
ttgtttataataatgggaggaaag

- **219 CMU**

gggcagaggtagatccaaccgggtgacatacctatacgttgctcggcggatcagcccgcgcctgtaaaacgggacggcccgcgcca
ggaccctaaactctgttttagtggaactctgagtaaaacaacaaataaatacaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgat
aagaacgcagcaaaatgataagtaatgtaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctg
gcccggatgcctgttcgagcgtcattcaaccctcaagctcagcttggtgtggactcgcgtaaccgcggtcccaaatcgattggcgg
cacgtcgagcttccatagcgtagtaatacacctcgttactgtaatcgtcgcggccacgcgtaaaaccccaactctgaatgtgacct
cggatcaggtaggaatacccgtgaacttaagcatatcaataagcggaggaa

- **222 CMU**

ttggtacagtgacatccaaccaatgtgaacgtacaaactgtgcctcggcgggaactcatgccccgggtcgtcgcagccccggacca
aggcgcggcggaggaccaaccaaactctttgtatccccctcgcgggtttttataatctgagcctctcggcgcctctcgtaggcgttc
gaaaatgatacaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgataagtaatgtaattgcaga
attcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctgaacccc
tccggggggccggcgtggggatcggcttctctcacggggggccggctccgaaatacattggcgtttctcggcgcagcatctcctgcgca
tagttgacgcttcaactggagagttgctcgtccacagccgtaaaacacttaactgctgaaatgatgacctcatatcaggcttgaatctct
gtctgaacttagtaccactaa

- **226 CMU**

tacctatacgttgccctcggcggatcagcccgcgccccgtaaacgggacggccccgcgaggaccataaacctgaatatttattgtaactt
ctgagtttaaaaaacaaataaatcaaaactttcaacaacggatctcttggtctggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgcgataagtaat
gtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgccccagattctggcgggcatgcctgttcgagcgtcattcaa
ccctaagccccgggttgggtggggatcgggtcgggtctaccgctcccgccccgaaatctagtgggcgtctcgtcgcagcctcc
attgcgtagtagtaaacactcgcaactggaacgcggcgcgccaagcgttaaaccccccaacttctgaatgttgacctcggatcaggtag
gaatacccgctgaacttaagcatatcaataagcggaggaa

- **231-A CMU**

taccaaactgttgccctcggcggggtcacgccccgggtgcgtcgcagccccggaaccaggcgccccgcggagggaaccaacaaactctt
tctgtagtccccctcgggacgttatttcttacagctctgagcaaaaattcaaatgaatacaaaactttcaacaacggatctcttggtctggcatc
gatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgccccagta
ttctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctcgggggtccggcgttggggatcgggaaccctaagacgggat
ccccgccccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcatgcgtagtttgcaactcgcaccgggagcgcggcgctccacg
tccgtaaacacccaacttctgaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaacttaa

- **231-M CMU**

tggacagggacatcaaccatgtgaacataccaaactgttgccctcggcggggtcacgccccgggtgcttcgcagccccggaaccaggc
gccccgcggagggaaccaacaaactcttctgtagtccccctcgggacgttatttcttacagctctgagcaaaaattcaaatgaatacaaaa
ctttcaacaacggatctcttggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcga
atctttgaacgcacattgcgccccagattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctcgggggtccggcgt
tggggatcgggaaccctaagacgggatccccgccccgaaatactttggcgagtttgccgatcctctcatgcgtagtttgcaaacg
tcaaccgagagcgcggtgctccacgtctgaaatacactcgacttaaaaaatggtgacctcgaatcagtaagaatacctccttgaactg
atgattatgaaacattgggagcaatgttat

- **233 CMU**

ccctctgggtccaacctcccaccggtttatcgtaacctgttgctcgggtgggccccgcctcacggcgcggggggcacctgccccggggcc
cgcgccccggaagacaccattgaaactctgtctgaagattgcagctcagcgattaactaaatcagttaaaactttcaacaacggatctcttg
gttccggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagatctttgaacgcacattgcg
ccccctggtattccggggggcatgcctgtccgagcgtcattgtccctcaagcacggctgtgtgtgggtccgccccctcccggggg
cgggccccgaaaggcagcggcgccaccgcgtccggtcctcgcgtagtgggcttgcacccgctctgtaggccggcgccggc
cggcgaccccaatcaatctttcaggttgacctcggatcaagtagggatacccgctgaacttaacatacaataagcagaggaa

- **234 CMU**

tgaagtgagttgttgcctggccctcctggggcatgtgcacgcttgctctcatttaaaccctgtgcacatattgtagacttggatgatcttcaag
gctttcattagcttttggttgaggaattgattagctttcctgtaattcctagctatgtttcctataaccctaagtatgtctatgaatgttattaatg
gccgttaaagcctttaaataataaccactttccaccacggatctctggctctccatccatgaagaaccccgcaaatgcgataagtaat
gtgaattgcagaattccgtgaatcctcaatcttgaacgcccctgctccttggtattccgaggagcatgctgtttgagtgctttaaattctc
aacctctccgtttgttaacaaattgaattggcttgatgggagttgctgcttaagcaagtcggctctttaaattgattagcggaaactt
ttgtgacctcttgggtgataattatctacgccccttgcagtggaagcagttataatggagttcagcttcaactgtccattgacttggagacatt
att

- **235 CMU**

ggctacgggaagacaacccatgtgaacataccaaactgttgcctcggcggggtcacgccccgggtgcgtcgcagccccggaaccagg
cgccccgggagggaccaacaaactcttctgtagtcccctcgcggacgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaatgaatcaaa
acttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattgaattgcagaattcagtgatcatcg
aatcttgaacgcacattgcgcccgccagttctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctccgggggtccggc
gttggggatcgggaacccctaagacgggatcccggccccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcatgagcagtagttgaca
actcgcaccgggagcgcggcgtccacgtccgtaaacacccaacttctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgtgaa
cttaagcatatcaataagcggaggaat

- **236 CMU**

tggacaggaagaccaacccatgtgaacataccaaactgttgcctcggcggggtcacgccccgggtgcgtcgcagccccggaaccagg
cgccccgggagggaccaacaaactcttctgtagtcccctcgcggacgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaatgaatcaaa
acttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattgaattgcagaattcagtgatcatcg
aatcttgaacgcacattgcgcccgccagttctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctccgggggtccggc
gttggggatcgggaacccctaagacgggatcccggccccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcatgagcagtagttgaca
actcgcaccgggagcgcggcgtccacgtccgtaaacacccaacttctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgtgaa
ctttagcatatgaataagcggaggaat

- **235 CMU**

ggctacgggaagacaacccatgtgaacataccaaactgttgcctcggcggggtcacgccccgggtgcgtcgcagccccggaaccagg
cgccccgggagggaccaacaaactcttctgtagtcccctcgcggacgttatttctacagctctgagcaaaaattcaaatgaatcaaa
acttcaacaacggatctcttggcttggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaattgaattgcagaattcagtgatcatcg
aatcttgaacgcacattgcgcccgccagttctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctcgaacccctccgggggtccggc
gttggggatcgggaacccctaagacgggatcccggccccgaaatacagtgggcgtctcgcgcagcctctcatgagcagtagttgaca

actcgcaccgggagcgcgcgctccacgtccgtaaaacacccaacttctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaa
cttaagcatatcaataagcggaggaat

- **238 CMU**

tacctatcgttgccctcggcgatcagcccgcgccccgtaaaacgggacggccccgcgaggaccataaacctgaatatttgaactt
ctgagtttaaaaaacaaataaatcaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgaagaacgcagcaaaatgataagtaat
gtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgttcgagcgtcattcaa
ccctaagccccgggttgggtggggatcgggctcgggttctaccgctccggccccgaaatctagtggggctcgtcgcagcctcc
attgcgtagtagtaaacctcgaactggaacgcggcgcgccaagccgtaaaccccccaacttctgaatgttgacctcggatcaggtag
gaataccgctgaactaa

- **239 CMU**

gggacggggcactccaaccatgtgaaccatacacaactgttgccctcggcggggtcacgccccgggtcgtcgcagccccggaaccag
gccccgcggagggaaccaacaaacttctctgtagtccccctcgcggacgtatttcttacagctctgagcaaaaattcaaaatgaatcaa
aactttcaacaacggatctctgttctggcatcgaagaacgcagcgaatgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatc
gaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgtccgagcgtcattcaaccctgaacccccggggggtcgg
cgtggggatcgggaacccctaagacgggatccccggccccgaaatacagtgccggtctcgcgcagcctctcatgagcagtagttgcac
aactcgcaccgggagcggcgcgctccacgtccgtaaaacacccaacttctgaaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctga
acttaagcatatcaataagcggagga

- **243 CMU**

taccactgttgccctcggcgatcagcccgtccccgtaaaacgggacggccccgcagaggaccctaaactctgtttctatatgtaacttct
gagtaaaaccataaataaatcaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgaagaacgcagcaaaatgataagtaatgt
gaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgttcgagcgtcattcaacc
ctcaagcacagcttgggtgggactcgcgtaattcgcgttccaaattgattggcggtcacgtcagcttccatagcgttagtagtaaaacc
ctcgttactggtaatcgtcgggccacgcccgttaaaccccccaacttctgaatgttgacctcggatcaggtaggaatacccgctgaacttaagca
ta

- **244 CMU**

ccctgtgaacataccaattgttgccctcggcgatcagcccgtccccgtaaaacgggacggccccgcagaggaccctaaactctgtttct
atatgtaacttctgagtaaaaccataaataaatcaaaactttcaacaacggatctctgttctggcatcgaagaacgcagcaaaatgata
gataagtaatgtgaattgcagaattcagtgatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgcagattctggcgggcatgctgttcgagc
gtcattcaaccctcaagcccagcttgggtgggactcgcgagtaaatcgcgttccccaaattgattggcggtcacgtcagcttccatagc

gtagtagaaaaccctcggtactggttaatcgtcgcgccacgccgttaaaccccaacttctgaatgttgacctcggtacaggtaggaataacc
gctgaacttaagcatatcaataaggcggaggaa

- **245 CMU**

gaacttaccatgttgccctggcagaagctgctcggtgaccttacctggaacggcctaccctgtagcgccttacctggaacggcctaccct
gtagcggctccggtggactaccaactctgtatatttattgtaactgagcgtctattttaataagcaaaactttcaacaacggatctctgggt
ctggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttgaacgcacattgcgcc
cattagattctagtgggcatgctgttcgagcgtcattcaacccttaagcctagcttagtggggagcctactgctttgctagctgtagctcct
gaaatacaacggcggatctcgatctcctctgagcgtagtaattttatctcgcttttgactggagttgca

- **316 CMU**

ctactcccaccatgtgaacttaccatgttgccctggcagaagctgctcggtgaccttacctggaacggcctaccctgtagcgcctaccct
ggaacggcctaccctgtagcggctccggtggactaccaactctgtatatttattgtaactgagcgtctattttaataagcaaaactttcaac
aacggatctctgggtctggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtaattgcagaattcagtgatcatcgaatcttga
acgcacattgcgccattagattctagtgggcatgctgttcgagcgtcattcaacccttaagcctagcttagtggggagcctactgctttg
ctagctgtagctcctgaaatacaacggcggatctcgatctcctctgagcgtagtaattttatctcgcttttgactggagttgcagcgtcttagc
cgctaaatcccccaatttttaagggtgacctcgatcaggttaggaatacccgctgaacttaagcatat

- **2000 CMU**

gttgggagagaggcaactcttcccttcacaaatatcaacctatactttaacaacattcgtctgataacatattatgaatataacttaattcaaaat
ataactttcaacaacggatctctggctcgcacatcgatgaagaacgcagcgaatgcgatacgtaatgtgaattgcagaattcagtgatc
atcgaatcttgaacgcattgctctttggtattccgaagagcagctgtttgagatcagtaaacacctcaacctcctctgtttttcaaaag
gaggggtgactgagctatcccaacaacctcaccggtaggcggggcgttgaatgcaggtgcagctggactttatctgagctaaaagc
atatctatttagctcctgcaaacaggattattactattgctgcagctaacataaaggataattgtcctcattgctgactgatgcaggattttacga
cactttatgtgttgaactcgtatctcaaatcaagtaagactaccggcctgaacttaagcatat