

## PCR: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS

V. LLORENS<sup>1</sup>, M.P. MARTÍN<sup>2</sup> y E. HIDALGO<sup>1</sup>

1.- Dept. Química (Bioquímica y Biología Molecular), Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de Lleida, Rovira Roure, 177. 25191 Lleida.

2.- Dept. Biologia Vegetal (Botànica), Fac. Biologia, Univ. Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona.

**ABSTRACT. PCR: a new tool for the study of ectomycorrhizal fungi.** PCR (Polymerase Chain Reaction) is a simple technique that allows the specific amplification of particular regions of the genome of living organisms to facilitate their study. In the last few years, this and other complementary techniques have opened the field of the molecular mycology, whose applications in detection, identification and classification of fungi are increasing every day. In this article, the first of a series dealing with the Molecular Techniques that can be used in Mycology, we explain the basic principles of both the PCR and two other complementary techniques commonly used for the molecular analysis of the amplified regions: RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) and sequencing (determination of the primary structure of the nucleic acids).

**Key words:** DNA, PCR, RFLP, molecular techniques, fungi, ectomycorrhiza

**RESUMEN.** La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica sencilla que permite sacar copias (amplificar) de una determinada región del genoma de los seres vivos con el fin de facilitar su estudio. Esta y otras técnicas complementarias se han abierto, en los últimos años, al ámbito de la micología molecular, cuyas aplicaciones a nivel de detección, identificación y clasificación de hongos se incrementan día a día. En este primer artículo de una serie dedicada a las técnicas moleculares aplicables en Micología, se exponen los principios básicos, tanto de la PCR como de las otras dos técnicas complementarias que se utilizan habitualmente para el análisis molecular de las regiones amplificadas: los RFLPs (polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción) y la secuenciación (determinación de la estructura primaria de los ácidos nucleicos).

**Palabras clave:** DNA, PCR, RFLP, técnicas moleculares, hongos, ectomicorizas

### INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas terrestres, numerosos hongos establecen relación con las raíces de individuos de especies de interés forestal. Una de las asociaciones más importantes en los bosques templados son las micorizas y, en particular, las ectomicorizas. Entre ellas, destacan las que establecen muchos Basidiomicetes con diversas especies de *Abies*, *Pseudotsuga*, *Picea*, *Pinus* y *Quercus*. En los estudios de las micorizas (sistemáticos, evolutivos, poblacionales y de comunidades), una meta fundamental es la identificación de la especie fúngica que forma parte de la micoriza. Tradicionalmente, la identificación de hongos ectomicorrícicos se ha llevado a cabo basándose en las características morfológicas ya sea de los carpóforos, ya de las ectomicorizas. Esto presenta la ventaja de que un investigador especializado puede identificar los "tipos" ectomicorrícicos rápidamente. Sin embargo, la observación microscópica de determinados aspectos ectomicorrícicos (forma, color, estructura del manto) no permite atribuir los morfotipos micorrícicos a especies concretas de forma definitiva, por lo que sólo pueden clasificarse en categorías; además, los caracteres estudiados resultan modificados por la especie forestal con que se establece la asociación, dependen del medio ambiente (humedad en el terreno y tipo de sustrato) y del criterio del investigador. También debemos considerar que la disponibilidad de los carpóforos está sujeta a la periodicidad y estacionalidad de la fructificación, y se puede establecer una correlación directa entre la diversidad de la comunidad superficial (basada en los carpóforos) y la comunidad subterránea (basada en las ectomicorizas) o, de acuerdo con la expresión inglesa "*aboveground community*" vs. "*belowground community*". Las modernas técnicas moleculares no presentan estos problemas, porque el material objeto del análisis, el DNA, es totalmente independiente de la variación ambiental

o del hospedante. Entre estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), desarrollada por Kary Mullis en 1985, ha proporcionado una nueva y apasionante dimensión al estudio de hongos.

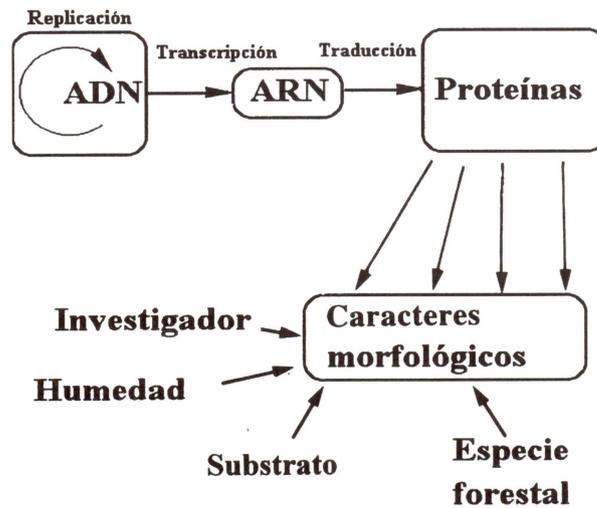
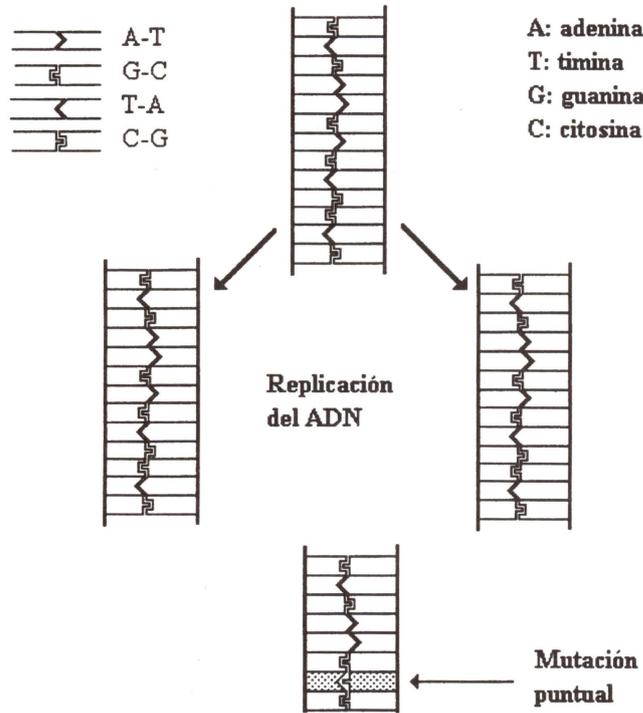
La PCR permite la amplificación de ciertas regiones de DNA *in vitro* (en condiciones controladas), a partir de muy pequeñas cantidades del DNA del hongo, que puede proceder, tanto de cultivos como de carpóforos, micelios o micorrizas. Los fragmentos de DNA amplificados por PCR pueden ser analizados mediante una serie de técnicas moleculares complementarias, que permiten establecer patrones únicos y estables, propios de cada organismo ectomicorrícico, y diferenciar así organismos muy próximos entre sí. Por otro lado, estas técnicas también están siendo utilizadas en sistemática de hongos, ya que permiten deducir relaciones filogenéticas. El desarrollo de estas técnicas ha permitido, en el estudio de diversas ectomicorrizas, discriminar especies próximas e, incluso identificar individuos, al analizar poblaciones y comunidades.

En este trabajo, el primero de una serie dedicada a las técnicas moleculares que se están incorporando al estudio de los hongos, en general, y, en particular, a la evaluación de procesos de inoculación (instalación y seguimiento de la especie inoculada) y a la detección de hongos competidores en programas de inoculación, vamos a comentar los aspectos teóricos de la técnica de la PCR. También daremos algunos datos sobre algunas de las técnicas complementarias para el análisis de los productos amplificados mediante PCR. La técnica de la amplificación de DNA por PCR reproduce *in vitro* el proceso de autocopía (replicación) del DNA que se produce de forma natural en el interior de las células. Para comprender dicha técnica, es necesario estar familiarizado con la estructura molecular del DNA y conocer los aspectos fundamentales del proceso de su replicación. Recomendamos consultar un manual general de Genética, Bioquímica o Biología Molecular, por ejemplo, SUZUKI *et al* (1994), para ampliar los aspectos principales de la estructura y la replicación del DNA resumidos a continuación:

## DNA

El DNA es un polímero de gran tamaño constituido por cuatro elementos básicos, los nucleótidos, cada uno de los cuales es el resultado de la unión de una molécula de desoxiribosa (un azúcar), de otra de ácido fosfórico y una de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina y timina). Los nucleótidos se unen entre sí mediante enlaces fosfodiéster, y pueden llegar a formar largas cadenas. El orden en el que se encuentran situados los nucleótidos (secuencia nucleotídica) a lo largo de las cadenas es la forma en que se halla escrita la información genética del DNA, y se suele indicar utilizando la inicial de la base nitrogenada que da nombre a cada nucleótido: A, C, G y T (Fig. 1). En 1954, Watson y Crick describieron la estructura molecular del DNA que corresponde a una hélice constituida por dos de estas cadenas, unidas entre sí por enlaces débiles (puentes de hidrógeno). Las dos cadenas de una misma molécula de DNA contienen información complementaria: la secuencia de una de las cadenas nos indica la secuencia de la otra, debido a que sólo es posible establecer parejas tipo A-T o C-G. Además, ambas cadenas están asociadas en forma antiparalela, enfrentándose el extremo 5' (carbono en posición 5 del azúcar) del primer nucleótido de una de ellas, con el extremo 3' del filamento complementario.

La replicación del DNA (autocopía) es un proceso (Fig. 1) por el cual, a partir de un doble filamento de DNA, se obtienen dos dobles cadenas idénticas entre sí e idénticas a la molécula que ha servido de molde. El mecanismo es semiconservativo, ya que la doble cadena original se desdobra en dos filamentos simples, que son copiados fielmente gracias a la complementariedad de bases, mediante unos enzimas denominados polimerasas de DNA. Estos enzimas copian la molécula original (DNA molde) en sentido 5'→3' a partir del extremo 3'-OH libre de un pequeño segmento de DNA, unido al molde, que se denomina cebador y de los nucleótidos trifosfato libres (dNTPs). Las polimerasas de DNA requieren  $Mg^{++}$  como cofactor. El proceso es tan eficaz, que la probabilidad de error (mutación) es de  $10^{-9}$  nucleótidos. Según la doctrina básica de la Biología Molecular, el DNA dirige la síntesis de las proteínas mediante unos complejos procesos denominados transcripción y traducción. Los caracteres morfológicos de los hongos (tanto los macroscópicos como los microscópicos), que sirven de base para las claves de identificación tradicionales, dependen del funcionamiento de las proteínas sintetizadas de acuerdo con la información contenida en el genoma, si bien su expresión está matizadas por condiciones ambientales como la humedad, el tipo de nutrientes o el sustrato (Fig. 2).



**Fig. 1.** - Estructura y replicación del ADN (arriba). **Fig. 2.**- Representación gráfica del flujo de información genética y de los procesos implicados en él. Se observa que los caracteres morfológicos vienen determinados por la expresión del genoma (a través de las proteínas) y modulados por efecto del medio ambiente (abajo).

## LA AMPLIFICACIÓN DEL DNA

La técnica de la PCR se basa en provocar la elaboración de copias de determinadas regiones del genoma (totalidad del DNA de un individuo), que se denominan secuencias diana. Este proceso se denomina amplificación. El principio de esta técnica se muestra gráficamente en la Fig. 3, e incluye tres etapas caracterizadas, cada una de ellas, por una temperatura determinada.

a.- DESNATURALIZACIÓN DEL DNA.- Separación, a alta temperatura (superior a los 90°C), de las dos cadenas de la doble hélice. El aumento de la temperatura intensifica la agitación de las moléculas, con lo que éstas se rompen por sus enlaces más débiles (los puentes de hidrógeno) con lo que se separan las dos cadenas de la doble hélice. En un DNA totalmente desnaturalizado todas las cadenas son simples.

b.- HIBRIDACIÓN DE LOS INICIADORES.- Los iniciadores ("primers") son pequeñas cadenas de DNA de cadena simple (típicamente de unos 15 a 30 nucleótidos) que han sido diseñados para unirse por complementariedad de bases a determinadas zonas del genoma. Este proceso se denomina hibridación. Normalmente se utilizan dos iniciadores que se hibridan a los extremos de la secuencia diana y que son complementarios, cada uno de ellos, a uno de los dos filamentos. La hibridación se lleva a cabo disminuyendo rápidamente la temperatura de la mezcla. Al disminuir la temperatura, las cadenas complementarias tenderían a reasociarse, pero debido a la elevada concentración de los iniciadores añadidos a la mezcla de la reacción, la formación de complejos DNA-molde e iniciadores se ve favorecida respecto a la reasociación de las cadenas sencillas. La temperatura a la que se realiza la hibridación depende de la longitud y secuencia de los iniciadores. De estos últimos depende la especificidad de la ampliación.

c.- EXTENSIÓN DE INICIADORES.- Mediante la acción de una polimerasa de DNA, se consigue que el extremo 3'-OH de cada iniciador aumente su longitud utilizando como molde el DNA original y, como materiales de construcción, los cuatro nucleótidos trifosfato. Desde 1989 se utiliza, para esta etapa, una polimerasa que proviene de la arqueobacteria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq*-polimerasa) capaz de soportar una y otra vez las altas temperaturas necesarias para la desnaturalización, lo que evita tener que añadir nueva polimerasa en cada ciclo de la amplificación. Por esta razón, la polimerización se realiza a 72°C, que es la temperatura óptima de funcionamiento de la *Taq*-polimerasa. En esta etapa, es crítica la concentración de  $Mg^{++}$ , un catión decisivo para el correcto funcionamiento de la enzima.

Esta serie de etapas o ciclo elemental se repite sucesivamente entre 20 y 40 veces (MITCHEL *et al.* 1995). Para ello, es necesario disponer de un gran exceso de nucleótidos trifosfato y de iniciadores, en comparación con el de moléculas molde. El gran poder de la PCR reside en que los productos obtenidos (amplímeros), pueden actuar a su vez como molde en los siguientes ciclos. Así, al finalizar el proceso, tendremos las dos cadenas iniciales del DNA cebador inicial y muchos millones de moléculas idénticas a la secuencia diana, ya que el producto de la amplificación, se habrá acumulado de forma exponencial ( $2^n$ ), tal y como se indica en el Cuadro I. Este proceso ha sido automatizado mediante la utilización de un bloque termostático (termociclador), que permite alcanzar las temperaturas características muy de forma rápida y controlada.

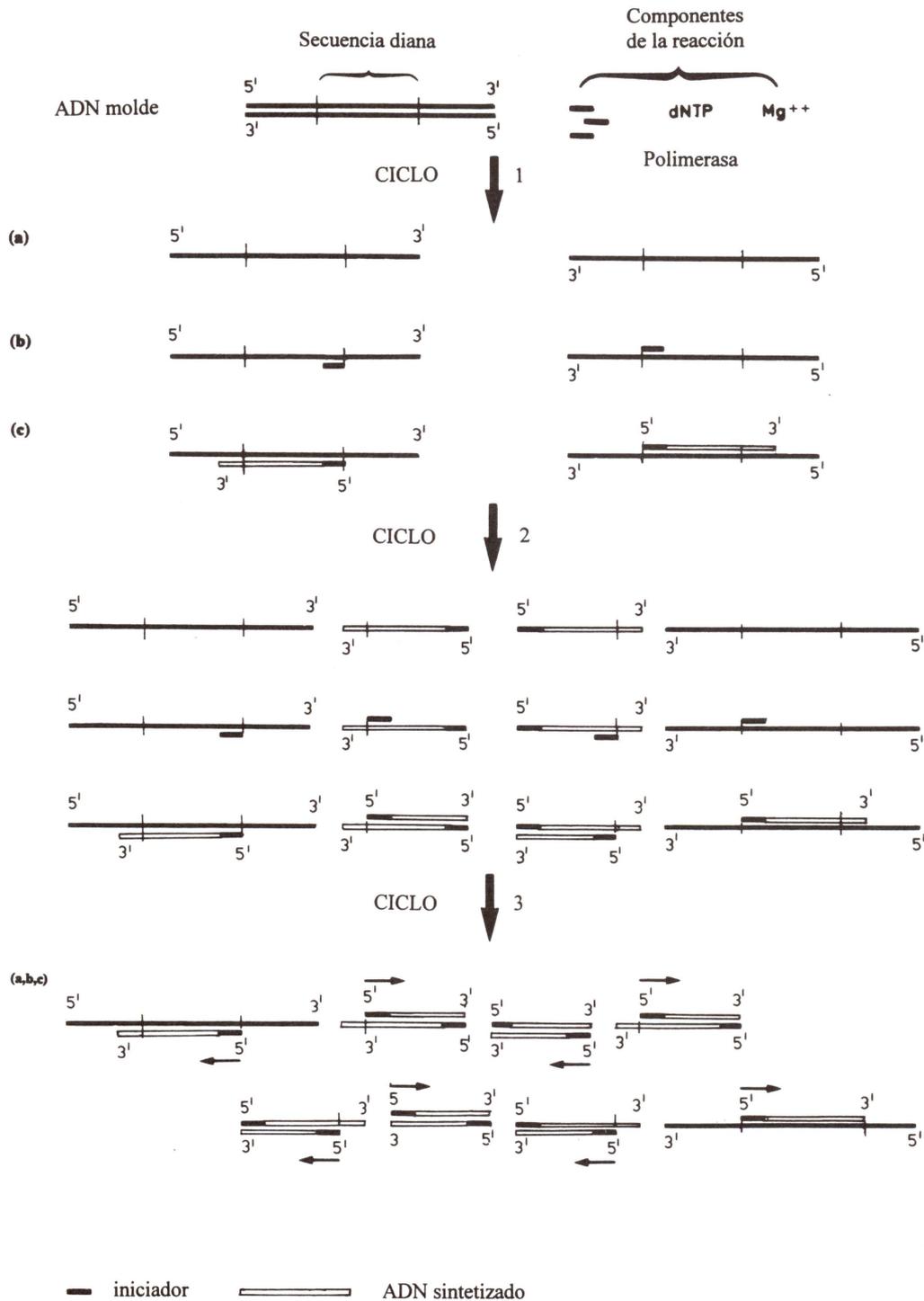
## REGIONES DIANA DE LA AMPLIFICACIÓN

El conocimiento molecular del genoma, no sólo en los hongos, sino en todo tipo de organismos, hace que las secuencias diana potenciales sean cada vez más abundantes y puedan ser utilizadas para resolver problemas cada vez más específicos. Actualmente, todas las secuencias que se conocen se recogen en bancos internacionales de secuencias y se pueden conseguir accediendo a al banco, por ejemplo, por Internet. Uno de estos bancos es el del EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Cambridge, U.K.).

Según el nivel taxonómico que se esté analizando, y según el problema concreto que se plantee, se examinarán unas regiones u otras (Fig. 4). En general, las regiones diana tienen que cumplir una serie de características:

a.- Ser polimórficas: es decir, que en los distintos táxones que se intenta caracterizar, deben tener distintas secuencias de nucleótidos.

b.- Estar localizadas entre regiones conocidas a nivel molecular, ya que se requiere la utilización de dos iniciadores cuya secuencia nucleotídica sea complementaria de los extremos 5' y 3' de la región diana.



**Fig. 3.-** Reacción de amplificación por PCR: a) desnaturalización del ADN, b) hibridación de los iniciadores y c) extensión de los iniciadores. [MARTÍN, 1995; basado en TAYLOR (1991) y REHN & REED (1993)].

c.- Tener un tamaño adecuado. Por una parte, cuanto mayor sea el tamaño de la región diana, más probabilidades tiene de ser polimórfica para taxones próximos, pero también será más probable que la polimerasa pueda cometer errores al copiarla (recordemos que, aunque la tasa de mutación es de  $1/10^9$ , estamos haciendo millones de copias). Además, la polimerasa se muestra mucho más eficaz en copias cortas. Habitualmente, se utilizan regiones de entre 500 y 1000 pares de bases.

Para poder seleccionar regiones polimórficas, conviene detenerse primero en la organización del DNA

## ORGANIZACIÓN DEL DNA

El genoma de los hongos como el de la mayoría de los organismos, está organizado en unidades de información (genes), que se pueden transcribir, y cuya traducción a proteínas (que, en general, son enzimas que catalizan reacciones del metabolismo) afecta a la expresión de los caracteres morfológicos (Fig. 5). Estas unidades están separadas entre sí por regiones que no se transcriben y/o no se traducen, llamadas regiones intergénicas o regiones no transcritas. Las mutaciones (errores o modificaciones que se producen durante la replicación del DNA) se producen al azar en una baja proporción (alrededor de  $1/10^9$ ). Sin embargo, debido a la estructura del DNA, no todas las mutaciones tienen la misma trascendencia para la supervivencia del organismo portador. Si afectan a algún gen, tendrán efecto sobre las reacciones vitales o caracteres que vengán determinadas por él, por lo que es fácil que sean inviábiles o negativas, por lo que serán eliminadas por la selección natural. Sin embargo, las que se produzcan en regiones intergénicas pueden mantenerse, ya que no afectan a los caracteres del individuo. De esta forma, individuos muy alejados filogenéticamente pueden tener casi la misma secuencia nucleotídica en sus genes, mientras que las regiones intergénicas pueden ser muy diversas. Así pues, en muchos casos, la amplificación se centra en regiones intergénicas, que son muy polimórficas y que se localizan entre genes de secuencia nucleotídica conocida y muy conservada.

Una de las regiones diana más estudiada, y de la que ya existen numerosos datos de secuencia, es la región del rDNA (DNA que codifica para los RNA ribosómicos). Dichos genes están muy conservados dentro de los hongos, lo cual permite diseñar iniciadores especializados que dirijan su amplificación, incluso a partir de muestras que contengan como impureza DNA de otras procedencias: raíces, algas, parásitos o saprófitos. En particular, la región ITS, formada por las regiones ITS1 e ITS2, representa una secuencia de bases suficientemente variable para comparar entre sí taxones cercanos (SCHAAL & LEARN, 1988; MOLINA *et al.* 1992; DE PRIEST, 1994; HENRION *et al.* 1994; WARD & AKROFI, 1994).

## ANÁLISIS DE LOS AMPLÍMEROS

Existen, básicamente, dos versiones de la técnica de PCR: la PCR dirigida, en la que los iniciadores hibridan en un sólo punto del genoma (o en varios puntos de igual secuencia) y la PCR al azar o RAPDs, en la que se utilizan uno o varios iniciadores de secuencia muy corta (típicamente, unos 6 nucleótidos) que tienen numerosas dianas a lo largo del genoma. El producto de la PCR dirigida pertenece a una sola substancia (muchas moléculas iguales), mientras que en la PCR al azar suelen obtenerse numerosos productos de distinta longitud. En ambos casos, la técnica de análisis es la electroforesis, que se suele realizar en geles de agarosa o poliacrilamida. Esta técnica consiste en separar los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación sometiénolos a un campo eléctrico. Debido a su carácter ácido, todos los fragmentos de DNA se moverán en un campo eléctrico y recorrerán una distancia que está relacionada (de forma semilogarítmica) con su tamaño. La visualización de los amplímeros se realiza tiñendo el gel con bromuro de etidio (EtBr) e iluminándolo con luz ultravioleta. La imagen se puede fotografiar (Fig. 6) o almacenar en programas informáticos adecuados. Los tamaños de los fragmentos se estiman por comparación con fragmentos de DNA de tamaño conocido, los patrones de peso molecular. Típicamente, estos patrones son el DNA del fago  $\lambda$  cortado con el enzima de restricción *Hind*III o patrones artificiales constituídos por fragmentos de DNA que se diferencian entre ellos por 100 or 50 pb, cubriendo toda la amplitud requerida.

El patrón de tamaños de los amplímeros, obtenido mediante RAPDs, es suficiente para identificar algunos hongos ectomicorrícicos. En esos casos se habla de "huellas dactilares" ("fingerprint") de los hongos. En ocasiones, incluso el tamaño de los amplímeros obtenidos mediante PCR dirigida es suficiente para apoyar la resolución de cuestiones sistemáticas. Este es el

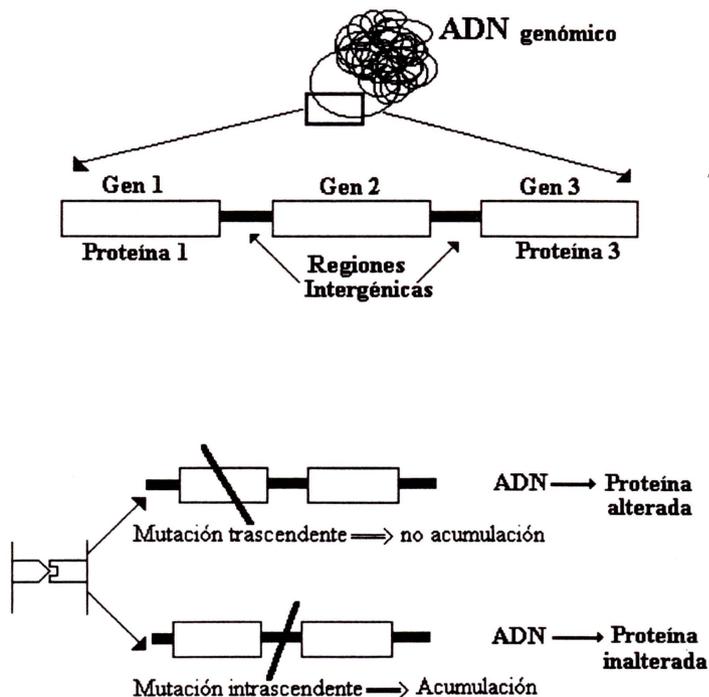
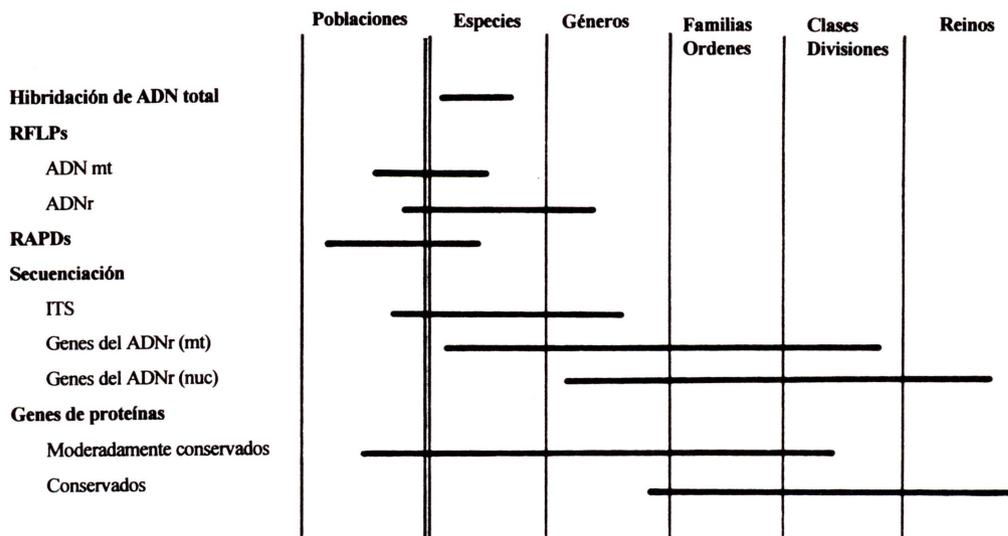


Fig. 4.- Rango de utilización de algunos marcadores moleculares en sistemática de hongos [ Adaptado de BRUNS *et al.* (1991) ] (arriba). Fig. 5.- Esquema de la organización del genoma. (abajo).

caso de las cantareláceas, una familia de difícil clasificación cuando sólo se emplean los caracteres tradicionales (morfológicos, microbiológicos o inmunoquímicos), debido a que éstos son pocos e inconsistentes, y a que existe una considerable variabilidad del aspecto morfológico del carpóforo al nivel intraespecífico (FEIBELMAN *et al.*, 1994). La amplificación de la región completa de los espaciadores transcritos internos con el par de iniciadores ITS1/ITS4 ha permitido discriminar directamente varias especies incluídas en el género *Cantharellus* (FEIBELMAN *et al.*, 1994; LLORENS, 1996). Estos resultados plantean la posibilidad de detectar la presencia de cantarelos a partir del análisis de sus micorrizas, en ausencia de cuerpo fructífero. También permiten plantearse el proyecto de generar marcadores moleculares para el estudio de sus poblaciones.

En los casos en los que el tamaño del fragmento de DNA amplificado por PCR dirigida no permita identificar los hongos al nivel deseado, se puede hacer uso de una amplia batería de técnicas moleculares más precisas. Entre ellas, comentaremos aquí la obtención de patrones de digestión (RFLP) y la obtención de la secuencia nucleotídica completa del amplímero (secuenciación).

### RFLP

Los enzimas de restricción reconocen y digieren secuencias particulares denominadas “dianas de restricción”. Todas las secuencias de reconocimiento son palindrómicas, es decir, ambos filamentos pueden leerse del mismo modo en cada dirección como, por ejemplo, la secuencia 5'...GG↓CC...3' (la flecha indica el punto de digestión por el enzima de restricción *Hae III*).

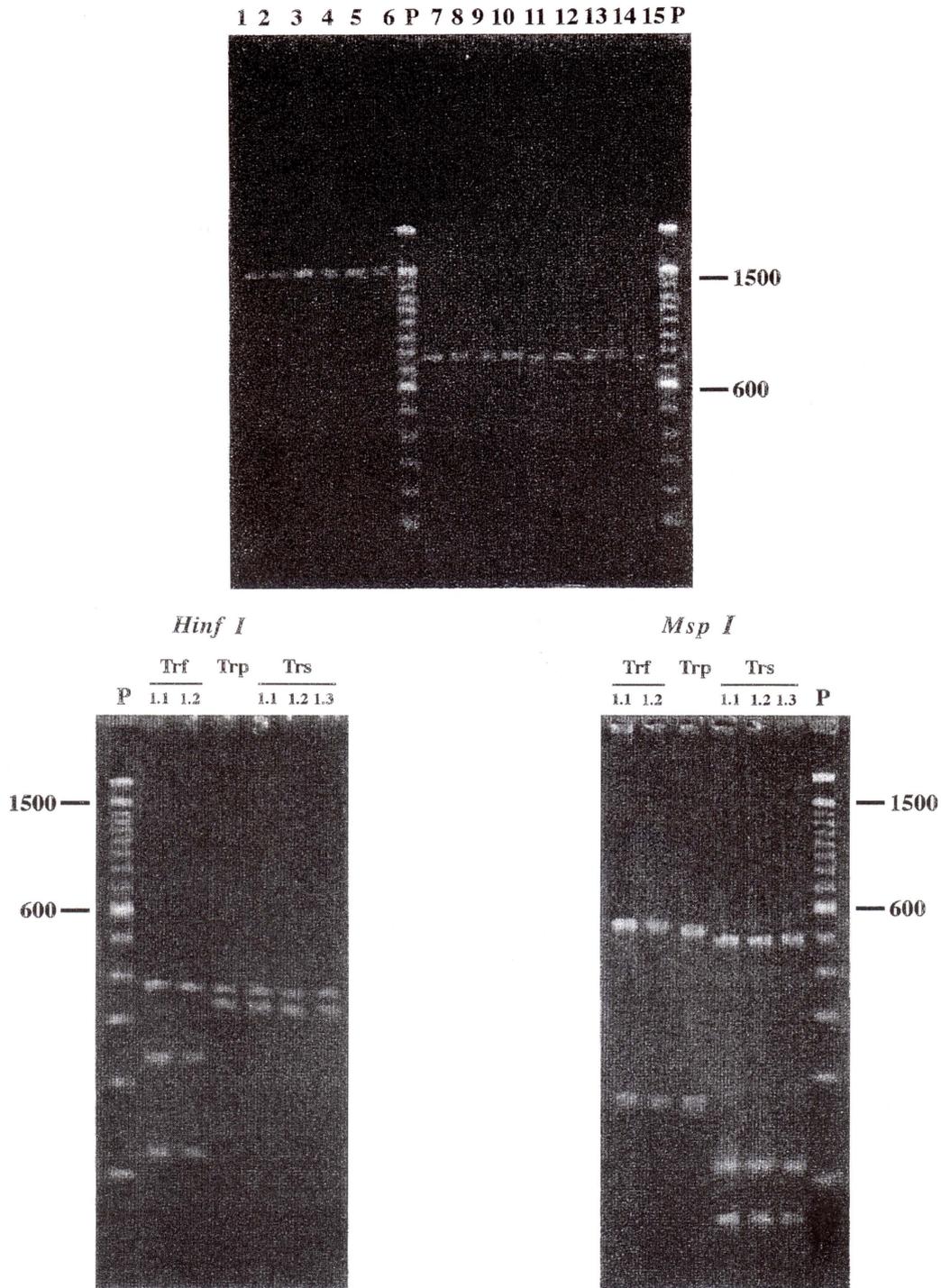
Cuando estas digestiones se realizan sobre una misma región de DNA (en este caso, los amplímeros), se generan patrones de bandas (una serie de bandas de tamaño medible) para cada uno de los enzimas de restricción utilizados. Con este método, se ponen de manifiesto diferencias (polimorfismos) que afectan a las secuencias diana de los enzimas de restricción utilizados. Los distintos patrones de bandas que se pueden distinguir por electroforesis (Fig.7) tras digerir los amplímeros con una batería de enzimas de restricción se denominan RFLPs (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción o “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”). Numerosos autores (WINGFIELD & WINGFIELD, 1993; DANELL, 1994; HENRION *et al.*, 1994; NYLUND *et al.* 1994 y WARD & AKROFI 1994, entre otros), han demostrado que los análisis por RFLP de la región ITS del DNA ribosómico son suficientes para diferenciar táxones muy próximos.

### SECUENCIACIÓN

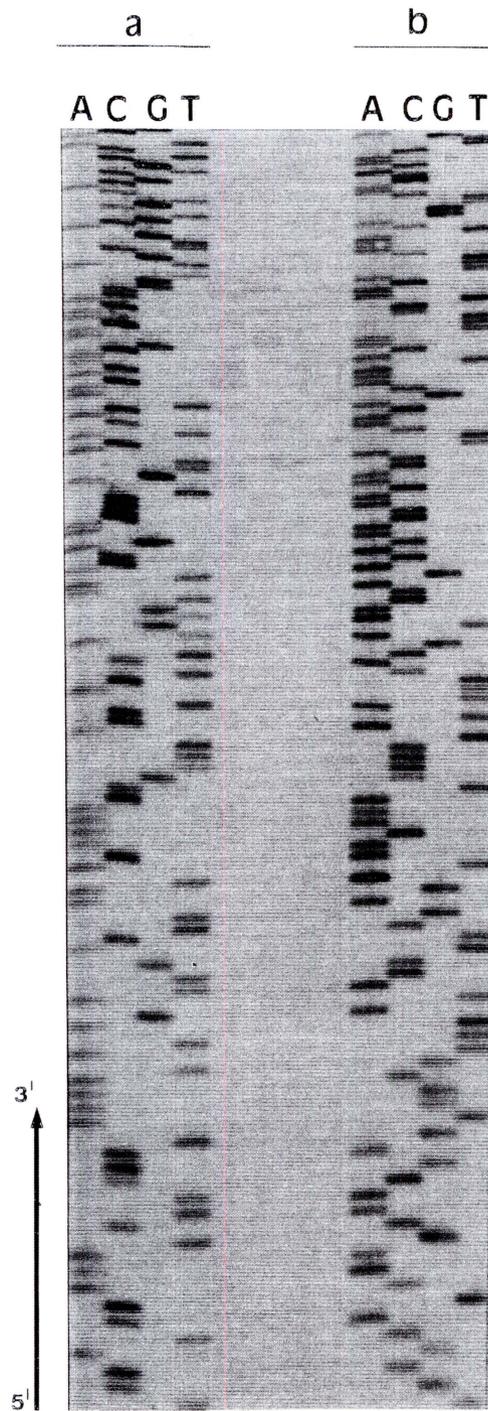
Cuando el nivel de polimorfismo no se manifiesta mediante RFLP, se puede recurrir a analizar la totalidad de la secuencia de nucleótidos completa del amplímero. Este método es más largo y costoso que los RFLPs, pero al comparar la totalidad de la secuencia, permite aventurar relaciones filogenéticas (es decir, distancia genética indicadora del tiempo transcurrido desde que dos táxones se separaron en el transcurso de la evolución) entre los individuos analizados, siempre que se asuma que el polimorfismo de la región analizada es representativo del polimorfismo general del genoma.

Técnicamente, la secuenciación por métodos enzimáticos (SANGER, 1977), se basa, al igual que la PCR, en la replicación del DNA (Fig. 1). En este caso, también se copia la secuencia del DNA molde a partir de un extremo, determinado por el iniciador. Sin embargo, aquí, las copias se interrumpen mediante el uso de dideoxinucleótidos, ddNTPs, análogos de los dNTPs que carecen del grupo OH en posición 3' y que, por consiguiente, no permiten que prosiga el alargamiento de la cadena. Realizando por separado todas las copias truncadas posibles de la cadena original con cada uno de los análogos, obtendremos cuatro colecciones de cadenas truncadas (una para cada tipo de base), todas con un extremo común. Además, todas las cadenas se marcan con radiactividad o con sistemas fríos (no radiactivos), para amplificar la señal. A continuación, las cuatro colecciones de cadenas se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de muy alta resolución, que permiten distinguir fragmentos de entre 20 y 600 pb de tamaño, que se diferencien en un solo nucleótido. Una vez revelado el gel, la secuencia se deduce del orden (de abajo a arriba) en que aparecen fragmentos en los cuatro carriles del gel (Fig. 8).

Las técnicas moleculares, que han irrumpido con fuerza en numerosas áreas de conocimiento de las Ciencias de la Naturaleza, constituyen potentes herramientas que ya están dando frutos en Micología, y en especial, en los campos de la detección e identificación de hongos micorrícicos, así como en su seguimiento, tanto a nivel de invernadero como a nivel de campo (HENRION *et. al.*,



**Fig. 6.-** Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los fragmentos de ADN amplificados por PCR con los iniciadores ITS1/ITS4 de dos especies de *Cantharellus*. 1-6: *C.cibarius*; 7-15: *C.lutescens*; P: patrón de peso molecular (escala de 100 pb)[LLORENS, 1996] (arriba). **Fig. 7.-** Electroforesis en gel de agarosa meta-Phor (1.8 %) de los fragmentos de digestión generados con las endonucleasas de restricción *Hinf I* y *Msp I* en *Tricholoma* spp. Trf: *T.flavovirens*; Trp: *T.portentosum*; Trs: *T.saponaceum*. Los dígitos se refieren a diferentes carpóforos de una misma recolección; P: patrón de peso molecular (escala de 100 pb)[LLORENS, 1996] (abajo).



**Fig. 8.-** Autoradiografía de un experimento de secuenciación por el método de SANGER *et al* (1977), utilizando marcaje radioactivo, de dos muestras (a,b) de ADN. Las letras A,C,G,T indican el tipo de dideoxianálogo utilizado en cada caso. La lectura del gel se realiza de abajo a arriba. Muestra a: 5'...TCCATCCA AATCTTCCTAA...3'; Muestra b: 5'...TGCGCATCAAGCAACGAGT...3'.

1994). Por otro lado, estas técnicas también se están utilizando para establecer relaciones filogenéticas entre distintos grupos de hongos y facilitar su clasificación taxonómica (WHITE *et al.*, 1900).

## BIBLIOGRAFIA

- BRUNS, T.D., T.J. WHITE & J.W. TAYLOR (1991).- Fungal molecular systematics. *Annual Review Ecology and Systematics*. 22: 525-564.
- DANELL, E. (1994).- *Cantharellus cibarius: Mycorrhiza Formation and Ecology*. 76 pp. Doctoral thesis. SLU. (inédita).
- DEPRIEST, P.T. (1994).- Variation in the *Cladonia chlorophaea* Complex II: Ribosomal DNA variation in a Southern Appalachian Population. *The Bryologist*. 97 (2): 96-126.
- FEIBELMAN, T., P. BAYMAN & W. G. CIBULA (1994).- Length variation in the internal transcribed spacer of ribosomal DNA in chantarelles. *Mycol. Res.* 98(6): 614-618.
- HENRION, B., F. LETACON & F. MARTIN (1992).- Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122: 289-298.
- HENRION, B., G. CHEVALIER & F. MARTIN (1994).- Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98(1): 37-43.
- LLORENS, V. (1996).- Evaluación del potencial discriminatorio del polimorfismo de la región ITS del ADN ribosómico, en sistemática de hongos ectomicorrícicos. 155pp. Proyecto Final de Carrera. ETSEA, Lleida (inédita).
- MARTÍN, M.P. (1995).- The genus *Rhizopogon* in Europe. [Microforma 1996]. Col·lecció de Tesis Doctorals Microfitxades núm. 2804. Univ. Barcelona.
- MITCHELL, J.I., P.J. ROBERTS & S.T. MOSS (1995).- Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *Mycologist*. 9(2): 67-95.
- MOLINA, F.J., P. SHEN & S.-C. JONG (1992).- Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* from *Lentimus* and related genera. *Can. J. Bot.* 70: 2446-2452.
- NYLUND, J.-E., A. DAHLBERG, N. HÖGBERG, O. KARÉN, K. GRIP & L. JONSSON (1994).- Methods for studying species composition of ectomycorrhizal fungal communities in ecological research and environmental monitoring. pp 229-239. In *Biotechnology of ectomycorrhizae*. Edited by V. Stocchi et al., Plenum press, New York.
- REHN, H.J. & G. REED (1993).- *Biotechnology. Vol. 2. Genetic fundamentals and genetic engineering*. Edt. A. Pühler, 2ª ed., Weinheim, 880 pp.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A.R. COULSON (1977).- DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 5463-5467.
- SCHAAL, B.A. & G.H. LEARN (1988).- Ribosomal DNA variation within and among plant population. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1207-1216.
- SUZUKI, D.T., A.J.F. GRIFFITHS, J.H. MILLER & R.C. LEWONTIN (1994).- *Genética*.- 4ª Edición. McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A. Madrid. 800 pp.
- TAYLOR, G.R. (1991).- Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In MCPHERSON, M.J., P. QUIRKE & G.R. TAYLOR. *PCR. A practical approach*. Edt. IRLPRESS, Oxford, 1-14.
- WARD, E. & A.Y. AKROFI (1994).- Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycol. Res.* 98(2): 219-224.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990).- Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In INNIS et al. *PCR protocol. A guide to methods and applications*. Edt. Academic Press, Inc, San Diego, California. 315-322.
- WINGFIELD, B.D. & M.J. WINGFIELD (1993).- The value of dried fungal cultures for taxonomic comparison using PCR and RFLP analysis. *Mycotaxon* 46: 429-436.

CUADRO I

Nº de ciclos	Amplímeros
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
10	256
15	8.192
30	268.435.456