

Evaluación de diferentes técnicas de extracción del ADN de hongos filamentosos

Lurá, María C.; Benitez, Joel D.; Jáuregui, Soledad; González, Ana M.

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. (3000) Santa Fe. Argentina
Dir. postal: Dra. María Cristina Lurá. Domingo Silva 1980. (3000) Santa Fe, Argentina.
e-mail: eocalafell@ciudad.com.ar - mclura@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Los métodos para extraer ácidos nucleicos a partir de los hongos filamentosos presentan dificultades. En general, son tediosos e insumen mucho tiempo. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar distintas técnicas de extracción de ADN y ensayar algunas modificaciones a las mismas para lograr una mayor recuperación y pureza del ADN de *Penicillium citrinum*. Se ensayaron seis técnicas propuestas para otros géneros fúngicos y se introdujeron modificaciones en cada una de ellas. Se calcularon el rendimiento y pureza del ADN obtenido. Las modificaciones consistieron básicamente en: - facilitar la disrupción celular, mediante el agregado de arena durante la molienda y la adición de N-lauril sarcosina al buffer de lisis, e -intensificar la limpieza del ácido nucleico incrementando el número de lavados. Al utilizar las técnicas originales, la propuesta por Martínez Culebras permitió obtener los mejores resultados. Las modificaciones introducidas favorecieron la recuperación y la pureza del ADN de *Penicillium citrinum*, sólo en dos de las técnicas ensayadas.

Palabras clave: * Hongos filamentosos * ADN fúngico * Extracción del ADN de mohos.

SUMMARY: Evaluation of different techniques for DNA extraction from filamentous fungi. Lurá, María Cristina; Benitez, Joel Dario; Jauregui, Soledad; González, Ana María. Methods to extract nucleic acids from filamentous fungi pose some difficulties, since they are usually tiresome and time-consuming. The aims of this work were to evaluate different techniques for extracting ADN and try some modifications aimed at improving ADN recovery and purity when *Penicillium citrinum* was used. Six techniques previously applied to other fungi were tried, each of them including some modifications. ADN recovery and purity were assessed.

Basically, some modifications were introduced: cellular disruption by adding sand during grinding and N lauril sarcosine to the buffer for lysis, and increased number of washings so as to improve ADN cleaning. Among the original techniques, that of Martínez Culebras yielded the best results. The modifications introduced resulted in higher ADN recovery and/or purity levels in two of the techniques.

Key words: filamentous fungi - methods to extract DNA from fungi.

Introducción

La pared celular de los hongos filamentosos constituye un 15 a un 30 % del peso seco; les otorga rigidez y protege a la membrana celular del shock osmótico (1). Su composición química es muy importante, puesto que es uno de los factores considerados para su clasificación taxonómica. Aproxima-

damente el 10% de ella está constituida por proteínas y glicoproteínas; los lípidos constituyen menos del 8% y los iones inorgánicos, entre los que se destacan fósforo, calcio y magnesio, se encuentran en cantidades variables (2).

Los componentes más relevantes, de la pared, son los hidratos de carbono. Representan más del 80% de la misma. Entre otros, se encuentran, quitina, quitosanos, α y β glucanos y mananos. Unos pocos hongos presentan celulosa. Estos polisacáridos se disponen en dos tipos principales de estructuras: las microfibrillas, con un alto grado de ordenamiento, y una matriz que presenta una estructura más desor-

Nota

Los datos fueron presentados parcialmente en el Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, 2002.

ganizada. Las primeras son los componentes estructurales principales de la pared y están constituidas por cadenas de polisacáridos entrelazadas formando hebras muy resistentes. Las redes compuestas por estas microfibrillas están embebidas en la matriz, conformada por un conjunto de polisacáridos más pequeños, proteínas y lípidos, de apariencia amorfa y granular, y que recibe el nombre de material cementante. Ambos componentes, en asociación, son responsables de la gran rigidez que presentan las paredes de los mohos (2).

Las especies fúngicas pertenecientes a los hongos filamentosos, entre los que se encuentran *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, han sido tradicionalmente identificadas en función de criterios basados en sus aspectos macro y microscópicos, tales como morfología y color de las colonias, velocidad de desarrollo, producción de exudado, presencia o ausencia de reproducción sexual, morfología y tamaño de los conidios o esporos, etc. Sin embargo, los aislamientos de un mismo género presentan una gran variabilidad fenotípica, lo que da lugar a valores intermedios en estos caracteres morfológicos y de cultivo (3), dificulta la identificación (4) y ocasiona frecuentes cambios en su nomenclatura (5), especialmente en *Fusarium* (6) y *Penicillium* (3). La taxonomía clásica de este último género, fue establecida por Raper y Thom (7), quienes describieron los teleomorfos pero continuaron utilizando sólo nombres de los anamorfos. Pitt y Hocking (8) contribuyeron a mejorar la taxonomía de *Penicillium* con el agregado de caracteres fisiológicos, y clarificaron la nomenclatura de los géneros teleomorfos relacionados (*Eupenicillium* y *Talaromyces*). Los conceptos de especie se esclarecieron por medio de la aplicación quimiotaxonomía de los perfiles de producción de micotoxinas y otros metabolitos secundarios (9,10), campo en el cual fueron pioneros Frisvad y Filtenborg.

Si bien los criterios taxonómicos clásicos continúan siendo la base para la separación entre especies, y la posibilidad de comparar los perfiles enzimáticos y los metabolitos secundarios que generan, determinó un importante avance en los estudios taxonómicos, las técnicas moleculares en general, y sobre todo las basadas en los ácidos nucleicos, han aportado nuevas herramientas para resolver los problemas de la taxonomía clásica (5).

Sin embargo, está ampliamente aceptado que la extracción de ADN puro y de elevado peso molecular a partir de los mohos, es muy dificultosa (11,12). En general, las técnicas son tediosas, requieren grandes cantidades de micelio e insumen mucho tiempo (13). Esto ha motivado la inquietud de varios autores que han propuesto diferentes metodologías para permitir la obtención del ADN de este tipo de hongos.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar distintas técnicas de extracción de ADN y ensayar algunas modificaciones a las mismas para lograr una mayor recuperación y pureza del ADN de *Penicillium citrinum*.

Materiales y Métodos

Cultivo fúngico

Se utilizó una cepa de *Penicillium citrinum* CECT 2269, cedida gentilmente por la Colección Española de Cultivos Tipo.

Métodos ensayados

Se ensayaron los protocolos propuestos por:

- Martínez Culebras (Lee y Taylor modificado) (5).
- Saghai-Marooft MA, Soliman KM, Jorgensen RA y Allard RW (14).
- Chow TY-K y Käfer E (13).
- Chang P-K, Bhatnagar D, Cleveland TE y Bennet JW (15).
- Al-Samarrai TH y Schmid J (11).
- Wendland J, Lengeler KB y Kothe E (16).

Las principales características de cada uno de ellos, se resumen en la Tabla 1, detallándose la técnica de Martínez Culebras por no encontrarse publicada.

Técnica de Martínez Culebras (Lee y Taylor modificado) (5)

Para la obtención del micelio, se partió de una suspensión de conidios, cuya concentración se ajustó a 10^3 UFC/ml de agua destilada estéril. Dicha suspensión se inculó en 100 ml de Caldo Papa Dextrosa y se incubó en agitación orbital a $28 \pm 0,5$ °C durante 24 horas. El micelio obtenido se filtró a través

de un paño, se lavó con agua destilada a fin de eliminar el medio de cultivo y se colocó en estufa a $37 \pm 0,5$ °C durante 72 horas hasta conseguir el secado completo, corroborado por constancia de peso. Una vez seco, se pulverizó en mortero. A 0,06 g del micelio molido, se añadieron 600 μ l de buffer de lisis [Tris-HCl (pH 7,2) 0,05M, EDTA 0,05M, SDS 3%, 2-mercaptoetanol 1%]; la mezcla se incubó en Baño María a $65 \pm 0,5$ °C durante una hora y a continuación se le añadió igual volumen de una solución de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se agitó y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm. Una vez obtenida la fase acuosa, se añadió acetato de potasio 5M y cloruro de sodio 4M hasta conseguir una concentración final de 1,8M y 1M respectivamente y se colocó en baño de hielo durante 30 minutos, al cabo de los cuales se procedió a centrifugar nuevamente a 12000 rpm. El ácido nucleico se precipitó con un volumen de isopropanol y se dejó secar, en estufa de $37 \pm 0,5$ °C, durante 18-24 horas. El ADN obtenido se conservó a -20 °C, resuspendido en buffer TE (Tris-EDTA).

En paralelo, se implementaron algunas modificaciones en las técnicas originalmente propuestas y descritas previamente. Dichos cambios, que se introdujeron con la intención de obtener mejores resultados en cada una de ellas, dieron origen a las denominadas "técnicas modificadas" que se resumen del siguiente modo:

a) los micelios se obtuvieron, en cada caso, respetando la técnica propuesta originalmente por cada uno de los respectivos autores;

b) Independientemente de la técnica utilizada, para facilitar la rotura mecánica de la pared celular

se agregó arena estéril en una proporción 1:10 (p/p, micelio: arena estéril), respetando la cantidad de micelio propuesta originalmente por cada grupo de trabajo (Tabla 1). Por ejemplo, en el caso de la técnica de Martínez Culebras por cada 0,06 g de micelio pulverizado se agregaron 0,6 g de arena; para la de Saghai-Marooft y col. (14) por cada 0,10 g de micelio se agregó 1 g de arena y así sucesivamente para cada una;

c) por razones de practicidad se unificó el buffer de lisis, habiéndose utilizado el propuesto por Martínez Culebras (500 μ l), al que se le adicionaron 50 μ l de solución de N-lauril sarcosina (sarkosyl) 10%;

d) se intensificó la "limpieza" del ADN, mediante el agregado de dos lavados con (250 μ l/lavado) de una solución de cloroformo-isoamílico (24:1, v/v). Luego de cada lavado, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y, en cada oportunidad, se trasvasó el sobrenadante a un tubo limpio;

e) el ADN, se precipitó con un volumen de isopropanol. El pellet se lavó con etanol 70% y se dejó secar a $37 \pm 0,5$ °C durante 18-24 horas, luego de lo cual fue resuspendido en agua destilada estéril y conservado a 4 °C.

El resto de los pasos se mantuvo tal como fueron propuestos por los respectivos autores.

Determinación de la concentración y visualización del ADN

En todos los casos, el ADN extraído se cuantificó (mg de ADN/g de micelio) midiendo la absorbancia (A) a 260 nm, su pureza se determinó efectuando la relación con la lectura de la A a 280 nm y se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa sumergidos, según Sambroock y col. (17).

Tabla 1.: Protocolos utilizados para la extracción del ADN de *Penicillium citrinum* CECT 2269. Principales aspectos.

	Martínez Culebras	Saghai y col.	Chow y col.	Chang y col.	Al-Samarrai y col.	Wendland y col.
Obtención del micelio	CPD ¹ , 28°C, 24 h	CPD ¹ , 28°C, 24 h	CPD ¹ , 28°C, 24 h	0,5% extracto de levadura y 2% glucosa, 28°C, 24 h	APD ² , 22°C, 21 días. Medio de Pontecorvo, 22°C, 7 días	Medio Mínimo ³ , 28°C. Colonias de 3 cm ²
Condición inicial del micelio	micelio seco (0,06 g)	micelio seco (0,10 g)	micelio húmedo (0,10 g)	micelio seco (0,20 g)	micelio seco (0,03 g)	micelio seco (0,20 g)
Disrupción celular	molienda ⁴ y buffer de lisis ⁵ (600 µl)	molienda con perlas de vidrio ⁴ y buffer de lisis ⁶ (500 µl)	molienda con perlas de vidrio ⁴ y buffer de lisis ⁷ (300 µl)	molienda en N ₂ liq. ⁴ y buffer de lisis ⁸ (500 µl)	molienda en N ₂ liq. ⁴ y buffer de lisis ⁹ (500 µl)	molienda ⁴ y buffer de lisis ¹⁰ (500 µl)
Precipitación del ADN	isopropanol	isopropanol	etanol 96%, -20°C, 30'	isopropanol	etanol 96%	etanol en NaAc 0,3 M
Conservación del ADN	buffer TE ¹¹ , -20°C	buffer TE ¹¹ + ARNasa, -20°C ¹²	agua destilada estéril, 4°C ¹²	agua destilada estéril, 4°C	buffer TE ¹¹ , -20°C	agua destilada estéril, 4°C ¹²

¹ Caldo Papa Dextrosa; ² Agar Papa Dextrosa; ³ idéntica composición química al APD sin el agregado de glucosa; ⁴ en mortero; ⁵ Tris-HCl (pH 7.2; 0.05M), EDTA (0.05M), SDS (3%), 2-mercaptoetanol (1%); ⁶ Tris (pH 7.5; 0.1M), CTAB (1%), NaCl (0.7M), EDTA (0.01M), 2-mercaptoetanol (1%), proteinasa K (0.3 mg/ml conc. final); ⁷ Tris-HCl (pH 7.5; 0.2M), NaCl (0.5M), EDTA (0.01M), SDS (1%); ⁸ Tris-HCl (pH 8.0; 0.1M), NaCl (0.4M), EDTA (0.04M), SDS(2%); ⁹ Tris-acetato (0.04M), NaAc (0.02M), EDTA (0.001M), SDS (1%); ¹⁰ Tris-HCl (pH 8.0; 0.1M), EDTA (0.01 M), SDS (1%); ¹¹Tris-EDTA; ¹² dato no especificado en la técnica original, se implementó a los fines del trabajo.

Cálculos estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 10.0. Las medias fueron comparadas aplicando a los valores obtenidos, el Test de la *t* de Student para un intervalo de confianza del 95 %, según lo aconsejado en la bibliografía (18).

Resultados

Tanto las técnicas originales, como las denominadas "modificadas" se ensayaron, al menos, por duplicado.

Los resultados obtenidos se observan en las Tablas 2 y 3 (técnicas originales y modificadas, respectivamente). Se resumen los valores medio, máximo y mínimo de los rendimientos obtenidos. Estos valores, que se expresan como mg de ADN/ g de micelio, se calcularon teniendo en cuenta la relación entre la cantidad de ADN extraído y el peso de micelio procesado. En las mismas tablas, también se expresan los valores medio, máximo y mínimo, correspondientes a la pureza del ácido nucleico (calculada como A_{260}/A_{280}).

Comparados los datos obtenidos entre las técnicas propuestas por cada uno de los autores y sus respectivas modificaciones, se detectaron diferencias significativas que indican ventajas en la concentración y pureza del ADN del *P. citrinum* CECT 2269, cuando se efectuaron los cambios propuestos, en la técnica de Saghai y col. ($p < 10^{-3}$ y $p < 10^{-2}$, respectivamente), mientras que las modificaciones a la técnica original de Al-Samarrai permitieron obtener una mejor concentración de ADN ($p < 10^{-2}$). El resto de las técnicas modificadas no arrojó resultados significativos en relación a los valores obtenidos con los protocolos originales.

En todos los casos, la obtención del ADN fúngico demandó, como mínimo, cuatro días de trabajo ya que, a la incubación del hongo, deben sumársele el secado y la extracción propiamente dicha del ADN. Las técnicas de Al-Samarrai y col (11) y Wendland y col (16), implicaron mayor tiempo, ya que los periodos de incubación del hongo para obtener el micelio fueron 28 y 7 días, respectivamente.

Discusión

Algunos de los hongos filamentosos, habituales contaminantes ambientales, son ejemplos claros de la dificultad que suscita la ubicación taxonómica e identificación de ciertas especies.

La capacidad de "mirar" directamente secuencias de ácido nucleico, posibilita que la identificación y reconstrucción filogenética pueda ser llevada a cabo sin siquiera haber visto el microorganismo. Sin embargo, aunque las técnicas moleculares se han desarrollado en un tiempo relativamente corto y en ocasiones son fundamentales para el diagnóstico, es dudoso que puedan suplir por completo los métodos morfológicos tradicionales (19).

Uno de los inconvenientes para poder llevar a cabo las técnicas moleculares es la dificultad que se presenta en la extracción del ADN (11,12), debido principalmente a los componentes y estructura de la pared celular de estos hongos que le confieren una gran rigidez (2) y a la presencia de los carbohidratos excretados, por las células fúngicas, durante los cultivos sumergidos (16).

En el presente trabajo se ensayaron técnicas de obtención del ácido nucleico total, propuestas por seis diferentes grupos de trabajo, que se basan en distintas condiciones de obtención del micelio (medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación), formas de disrupción de la pared celular fúngica y metodologías de limpieza del ADN extraído.

Es importante destacar que, a excepción de Al-Samarrai y col. (11), son muy escasos los autores que han realizado sus ensayos con *Penicillium*, ya que por ejemplo Martínez Culebras (5) modificó el protocolo original propuesto por Lee y Taylor para trabajar con *Colletotrichum* spp, Chow y col. (13) trabajaron con *Aspergillus* y hongos levaduriformes, Chang y col. (15) también lo hicieron con *Aspergillus* sección *Flavi*, Saghai-Marouf y col. (14) extrajeron ADN de especies de *Cochliobolus*, *Alternaria* y *Fusarium* y Wendland y col. (16) desarrollaron su técnica con *Schizophyllum commune*.

Los resultados obtenidos al aplicar estas técnicas con *Penicillium citrinum* CECT 2269, fueron muy diversos. Los mejores se consiguieron con la metodología utilizada por Martínez Culebras (Técnica de Lee y Taylor modificada) (5) ya que se alcanzó una buena concentración (9,75 mg ADN/g micelio) y pu-

Tabla 2: Concentraciones y purezas del producto obtenido a partir de *Penicillium citrinum* CECT 2269. Técnicas Originales.

	n ¹	Concentración media ²	Concentraciones Máximo/Mínimo ²	Pureza media ³	Pureza Máximo/Mínimo ³
Martínez Culebras	2	9,75	9,12-10,38	1,876	1,788-1,965
Saghai y col.	2	0,44	0,42-0,46	1,253	1,167-1,339
Chow y col.	4	0,63	0,28-0,79	1,592	1,341-1,828
Chang y col.	2	0,51	0,49-0,53	1,558	1,539-1,578
Al- Samarrai y col.	2	0,85	0,82-0,88	1,735	1,721-1,750
Wendland y col.	3	0,16	0,04-0,29	1,195	1,063-1,326

¹ n° veces que se repitió la experiencia; ² mg de ADN/ g de micelio; ³ A₂₆₀/ A₂₈₀

Tabla 3: Concentraciones y purezas del producto obtenido a partir de *Penicillium citrinum* CECT 2269. Técnicas Modificadas.

	n ¹	Concentración media ²	Concentraciones Máximo/Mínimo ²	Pureza media ³	Pureza Máximo/Mínimo ³
Martínez Culebras	4	5,57	0,63-7,61	1,790	1,666-1,866
Saghai y col.	3	10,49	9,97-10,70	1,824	1,804-1,851
Chow y col.	4	0,68	0,12-1,79	1,754	1,643-1,824
Chang y col.	4	0,52	0,35-0,65	1,641	1,605-1,665
Al- Samarrai y col.	4	2,09	1,82-2,42	1,884	1,747-1,946
Wendland y col.	4	0,15	0,13-0,18	1,443	1,213-1,821

¹ n° de veces que se repitió la experiencia; ² mg de ADN/ g de micelio; ³ A₂₆₀/ A₂₈₀

reza ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) de ADN. Cuando se trabajó con la técnica de Al- Samarraí y col. (11), se obtuvo una concentración de ADN (0,85 mg ADN/g micelio), que coincide con la descrita por el autor (0,27-1,07 mg ADN/g micelio), pero la relación A_{260}/A_{280} no superó el valor de 1,8.

Con el resto de las técnicas no se obtuvieron buenos resultados. Por ejemplo, Chow y col. (13) describen la obtención de 1,1-2,6 mg ADN/g micelio húmedo que es prácticamente el doble de la concentración obtenida en el presente trabajo. Estas diferencias podrían deberse a la diferente composición química de las paredes de los hongos con que se trabajó.

En líneas generales, las modificaciones de las técnicas llevadas a cabo en este trabajo consistieron en: - incrementar la ruptura mecánica de las paredes de las hifas, por molienda, mediante el agregado de arena, - facilitar la acción del buffer de lisis mediante el agregado de sarkosyl (acción detergente) y - utilizar, en todos los casos, el buffer de lisis propuesto por Martínez Culebras (Tabla 1). Esta determinación se adoptó debido a los buenos resultados obtenidos en los ensayos con la técnica original (9,75 mg ADN/g micelio y una $A_{260}/A_{280} > 1,8$) y a que la presencia del 2-mercaptoetanol, facilitaría la acción detergente del SDS.

Los mejores valores se obtuvieron con las modificaciones introducidas a la técnica de Saghai y col. (12), ya que se incrementó notablemente la cantidad (> 10 mg ADN/g micelio) y pureza del ADN obtenido (en los 3 ensayos fue $> 1,8$). Los resultados obtenidos con las modificaciones efectuadas al protocolo de Al- Samarraí y col. (11), también fueron satisfactorios. Sin embargo, el mayor inconveniente para la utilización de esta técnica radica en que la obtención del micelio demanda, en total, 28 días de incubación frente a otras metodologías que sólo requieren 24 horas.

Los dos casos mencionados, fueron los únicos en los que, comparando las medias de los resultados hallados (técnicas originales vs. técnicas modificadas), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a favor de las modificaciones efectuadas.

Los cambios que se introdujeron en la metodología de Martínez Culebras (5), permitieron obtener una buena recuperación de ADN, aunque en menor

cantidad que con la técnica original; en lo que se refiere a la pureza, el valor promedio logrado ($A_{260}/A_{280} = 1,790$) es muy cercano al considerado óptimo (17) (en sólo uno de los cuatro ensayos realizados se obtuvo un valor $< 1,8$).

En cuanto al resto de las técnicas, la concentración de ADN conseguida con cada una de ellas, fue muy semejante a la alcanzada con los protocolos originales, lográndose incrementar la pureza del producto, a pesar de que las diferencias entre las medias de los valores obtenidos, no fueron estadísticamente significativas (con excepción de la modificación al de Saghai y col.).

No se lograron buenos resultados con la metodología de Wendland y col. (16), ni aún con las modificaciones introducidas. La baja concentración y la escasa pureza de ADN posiblemente puedan ser atribuidas a diferentes motivos. En primer término, este método fue propuesto para hongos Basidiomycota; en segundo lugar, el medio de cultivo arrastrado podría interferir ya que, una vez alcanzado el tamaño deseado, la colonia se separa seccionando el mismo. Tampoco hace aconsejable la aplicación de esta técnica el hecho de que el hongo se cultiva sobre un medio muy pobre en nutrientes y, para obtener una colonia de un tamaño ligeramente mayor a 1 cm, *Penicillium* debe ser incubado durante más de un día; la incubación prolongada podría aumentar el grosor de las paredes fúngicas, que dificultaría aún más la extracción de ADN.

Conclusiones

Al utilizar las técnicas originales, la propuesta por Martínez Culebras permitió obtener los mejores resultados. Las modificaciones introducidas favorecieron la recuperación y la pureza del ADN de *Penicillium citrinum*, sólo en dos de las técnicas ensayadas (Saghai y col. y Al- Samarraí y col.).

Agradecimientos

A los Dres. Raquel Chan, Sergio Guerrero, Alejandro Beccaria y Víctor Mantovani, al bioquímico José Di Conza y al Sr. Gustavo Ribero, por el asesoramiento científico y técnico.

Trabajo realizado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral a través de la Programación CAI+D.

Bibliografía

- Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM. 1994. "Zinsser Microbiología". Editorial Médica Panamericana, 1427-1435.
- Garraway MO. 1984. "Fungal Nutrition and Physiology". John Wiley & Sons, Inc. (Canadá), 22-48.
- Samuels GJ, Seifert KA. 1995. The impact of molecular characters on systematics of filamentous fungi. *Rev Phytopathology* **33**: 37-67.
- Rinyu E, Varga J, Ferenczy L. 1995. Phenotypic and Genotypic Analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **33**, 10: 2565-2567.
- Martínez Culebras, P.V. 1999. Caracterización y Diagnóstico molecular de las cepas de *Colletotrichum* patógenas en plantas de fresas. Tesis Doctoral. Facultat de CC Biològiques. Universitat de Valencia.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, 454-500.
- Raper KB, Thom C. 1949. "A manual of the *Penicillia*". Williams and Wilkins Co. (Baltimore), 27-88
- Pitt JI, Hocking AD. 1999. "Fungi and food spoilage". Academic Press (Australia), 5-51
- Boysen M, Jacobson KG, Schnürer J. 2000. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4: 1523-1526.
- Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L. 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* **142**, 3: 541-549.
- Al-Samarrai TH, Schmid J. 1999. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Lett Appl Microbiol* **30**, 1: 53-56.
- Van Burik JAH, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. 1998. Comparison of six techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* **36**: 299-303.
- Chow TY-K, Käfer E. A rapid method for isolation of total nucleic acids from *Aspergillus nidulans*. <http://www.fgsc.net/fgn/chow.html>
- Saghai-Marooif MA, Soliman KM, Jorgensen RA & Allard RW. <http://wheat.pw.usda.gov/homepage/lazo/methods/lazo/dnafun.html>
- Chang P-K, Bhatnagar D, Cleveland TE, Bennet JW. 1995. Sequence variability of the aflatoxin pathway gene *aflR* distinguishes species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 40-43.
- Wendland J, Lengeler KB, Kothe E. 1996. An instant preparation method for nucleic acids of filamentous fungi. <http://www.fgsc.net/fgn43/wendlan.html>
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (New York).
- Norman GR, Streiner DL. 1996. "Bioestadística". Mosby/Doima Libros (España).
- Salas Téllez E, Arenas R. 2001. Biología Molecular en Micología Médica. *Dermatol Venez* **39**: 7-10.