

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIOS FILOGENÉTICOS EN LA FAMILIA
“MYCOCALICIAEAE” (MYCOCALICIALES,
ASCOMYCOTA)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María de la Ángeles Vinuesa Navarro

Bajo la dirección del doctor

Manuel Valmaseda Jadú

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1722-5

*A Carlos, Clara y Silvia...
...que me dan la vida.*

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Cuando algo llega a su fin, y miro hacia atrás, sólo me acuerdo de lo bueno, de las personas que he conocido y han estado a mi lado, y a las que ahora quiero expresar mi agradecimiento.

El Dr. Leif Tibell, se interesó desde el principio por mi trabajo, y me proporcionó todo el material biológico con el que he realizado esta tesis. Le debo agradecimiento por su entusiasmo con mis resultados moleculares y por contestar a mis interminables correos llenos de preguntas acerca de la familia *Mycocaliciaceae*.

A mi tutora Pilar Estévez, que siempre ha estado pendiente de las cuestiones burocráticas, y me ha ido guiando por la complejidad de la Universidad Complutense, de la que me siento tan ajena.

En Smithkline Beecham realicé toda la parte experimental de la tesis y allí dejé amigos a los que quiero recordar, por los buenos momentos vividos.

Entre ellos destaco a Ana Sacristán, porque me consta que ha "sufrido" conmigo y de alguna manera ha revivido la elaboración de su propia tesis. Y por supuesto, por su eficacia a la hora de proporcionarme bibliografía.

A Jose María Sanchez-Puelles, que como gerente del departamento, me proporcionó todo lo que necesité, incluso cuando lo que necesitaba era un trabajo.

A mi director, Manuel Valmaseda, que siempre confió en mi capacidad para desarrollar este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, Ana Bardera, Ana Roa y M^a José Pozuelo, por tantas horas compartidas.

A los químicos, M^a Jesús Vázquez y Alfonso Rivera, que emplearon parte de su tiempo para echarme una mano.

A Laura Barrios, por guiarme en el mundo de la estadística.

Es imposible olvidar las discusiones sobre filogenia con mi buena amiga Pilar Vidal. ¡Buenos tiempos!. Se aprende mucho discutiendo. ¡Gracias Pilar!.

A Francisca Fernández del Campo, que me inició en la ciencia, por su apoyo constante desde hace diez años, y por permitirme utilizar los ordenadores de la unidad de Fisiología Vegetal (UAM).

A Fernando Peláez, que me inició en los hongos, y tanto me gustaron que desde entonces no los he dejado.

A Ana Crespo y Fernando Peláez, por sus comentarios sobre el manuscrito.

A Leopoldo G. Sancho, que siempre que he necesitado su ayuda me la ha ofrecido con total desinterés.

A todos aquellos que se han preocupado por mí y en algún momento me han hecho la eterna pregunta...pero, ¿cuándo vas a terminar?.

Papá, Mamá, terminé, ¿cómo se puede agradecer todo lo que unos padres sacrifican por sus hijos?.

Y a ti Carlos, siempre a mi lado, en las alegrías y en las penas..., también en la figuras, las tablas, análisis por HPLC, etc...en fin, gracias por tu ayuda incalculable.

Por último agradezco y ofrezco este trabajo a mis pequeñas Clara y Silvia. Sin vosotras habría terminado esta tesis hace años, pero me faltaría lo mejor por hacer.

ÍNDICE

<i>INTERÉS Y PLANTEAMIENTO</i>	1
---	---

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La familia <i>Mycocaliciaceae</i> (<i>Mycocaliciales</i>, <i>Ascomycota</i>)	4
--	---

2. Aproximaciones empleadas en el estudio filogenético	6
---	---

2.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

2.1.1 Características morfológicas de la familia	6
---	---

<i>Mycocaliciaceae</i>	6
------------------------------	---

2.1.1.1 Forma y tamaño del ascocarpo	7
--	---

2.1.1.2 Estructura del pedúnculo	7
--	---

2.1.1.3 Estructura del excípulo	8
---------------------------------------	---

2.1.1.4 Estructura y tamaño de las ascas	
--	--

2.1.1.5 Tamaño, forma, número de septos y pigmentación de las	8
---	---

ascosporas	9
------------------	---

2.1.2 Ecología y distribución de <i>Mycocaliciaceae</i>	10
--	----

2.1.3 Cultivo en laboratorio y producción de anamorfos de <i>Mycocaliciaceae</i> ...	
---	--

2.2 ANÁLISIS GENÉTICO

2.2.1 Utilización de los genes que codifican para el ARN ribosómico en el	12
--	----

estudio filogenético de la familia	
---	--

<i>Mycocaliciaceae</i>	17
------------------------------	----

2.2.2 Técnicas de biología molecular y metodología informática al servicio del	17
---	----

análisis de secuencias	17
-------------------------------------	----

2.2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación cíclica...	18
--	----

2.2.2.2 Alineamientos de secuencias de nucleótidos	18
--	----

2.2.2.3 Métodos de inferencia filogenética	19
--	----

2.2.2.3.1 Métodos basados en distancias genéticas.....	
2.2.2.3.2 Métodos basados en el criterio de Parsimonia.....	20
2.2.2.3.3 Métodos basados en la estimación de probabilidad. Máxima verosimilitud.....	
	20
2.3 ANÁLISIS QUÍMICO	
2.3.1 Utilización de los metabolitos secundarios en taxonomía.....	21
2.3.1.1 Uso de los metabolitos secundarios en la taxonomía de hongos liquenificados.....	22
2.3.2 Metabolitos secundarios en la familia <i>Mycocaliciaceae</i>.....	
 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	 24
	24
1. Material biológico.....	24
2. Métodos de extracción de ADN.....	25
2.1 A partir de cultivos (Möller et al., 1992).....	26
2.2 A partir de cuerpos fructíferos y esporas (Grube et al., 1995).....	26
3. Cálculo de la concentración de ADN extraído.....	27
4. Amplificaciones por PCR.....	28
4.1 Protocolos para la amplificación de las distintas regiones del ADNr.....	28
4.1.1 Región ITS1-5.8S-ITS2.....	29
4.1.2 Gen 28S ADNr.....	29
4.1.3 Gen 18S ADNr.....	29
4.2 Oligonucleótidos cebadores empleados en amplificación y secuenciación por PCR.....	29
4.2.1 Región ITS1-5.8S-ITS2.....	31
4.2.2 Gen 28S ADNr.....	31
4.2.3 Gen 18S ADNr.....	32
4.3 Localización de los oligonucleótidos cebadores en el ADNr.....	32
4.4 Seguimiento mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa.....	32

5. Purificación de fragmentos de ADN.....	33
6. Digestion con enzimas de restricción para la obtención de patrones polimórficos (“RFLP’s”, restriction fragments length polimorphism).....	33
7. Secuenciación de los productos de PCR. Secuenciación cíclica.....	34
7.1 Manual: Termosecuensasa (Ahmersham).....	34
7.2 Automática: terminadores con d-rodamina (Perkin Elmer).....	34
8. Bioinformática.....	34
8.1 Obtención de secuencias a partir de bases de datos: Genebank.....	35
8.2 Obtención de secuencias completas y corregidas de los hongos objeto de estudio: ensamblaje DNASTAR.....	35
8.3 Alineamientos.....	36
8.4 Análisis filogenéticos	36
8.4.1 Métodos de distancias.....	37
8.4.2 Parsimonia.....	38
8.4.3 "Parsimony Jackknifing" versión 4.22 (Farris et al., 1995).....	38
8.4.4 Máxima verosimilitud.....	38
8.5 Análisis de consistencia: Bootstrap.....	38
8.6 Enraizamiento de los árboles obtenidos.....	38
9. Análisis de patrones de metabolitos secundarios producidos por hongos representantes de la familia <i>Mycocaliciaceae</i>.....	39
9.1 Condiciones de cultivo.....	40
9.2 Preparación de las muestras y extracción.....	40
9.3 Generación de patrones de metabolitos por HPLC.....	40
9.4 Análisis multivariante de agrupamiento."Clustering".....	40
10. Análisis multivariante de componentes principales y de agrupamiento a partir de siete características morfológicas.....	40

DESARROLLO DEL TRABAJO

BLOQUE 1. Análisis de la variabilidad intraespecífica en <i>Mycocalicium subtile</i>. Búsqueda de congruencia entre aproximaciones genéticas, químicas y morfológicas.	42
	46
	47

	47
1. Introducción	
2. Objetivos	48
3. Resultados	51
3.1 Análisis genético	52
3.1.1 Estudio preliminar por RFLP's de la variabilidad contenida en la región del ADN (ITS1-5.8S-ITS2) seleccionada.....	58
3.1.2 Secuenciación, alineamiento y análisis del alineamiento.....	59
3.1.3 Inferencia de relaciones filogenéticas.....	
3.2 Análisis químico	60
3.2.1 Obtención de patrones de producción de compuestos de representantes de las especies <i>Mycocalicium subtile</i> y <i>Mycocalicium albonigrum</i>	65
3.2.2 Transformación de los patrones en matrices de datos y análisis de agrupamiento.....	66
3.3 Análisis morfológico	74
3.3.1 Análisis multivariante de componentes principales, agrupamiento, y discriminante a partir de características morfológicas de los cuerpos fructíferos de 19 representantes de <i>M. subtile</i>	74
	79
	80
4. Discusión	82
4.1 Análisis de la variabilidad intraespecífica en <i>Mycocalicium subtile</i>	
4.2 Establecimiento de <i>M. minutellum</i> como sinónimo de <i>M. subtile</i>	
4.3 Discriminación genética y química entre <i>M. subtile</i> y <i>M. albonigrum</i>	
5. Conclusiones	84
	91
BLOQUE 2. Demarcación de los géneros <i>Mycocalicium</i> y <i>Chaenothecopsis</i> (<i>Mycocaliciaceae</i>)	92
	92
1. Introducción	93
2. Objetivos	
3. Resultados	
3.1 Análisis genético	95

3.1.1 Estudio preliminar de la variabilidad contenida en la mitad 5' del gen 28S mediante la búsqueda de polimorfismos (RFLP's)	99 103
3.1.2 Secuenciación de la región 5' terminal del gen 28S ADNr. Alineamientos y análisis de los alineamientos.....	103
3.1.3 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones....	107
3.2 <i>Análisis químico</i>	122
3.2.1 Obtención de patrones de producción de compuestos de representantes de la familia <i>Mycocaliciaceae</i> , por HPLC.....	124 127
3.2.2 Análisis de agrupamiento de los patrones de producción de compuestos en representantes de la familia <i>Mycocaliciaceae</i>	132 134
4. Discusión	
4.1 Género <i>Mycocalicium</i> Vainio.....	
4.2 Género <i>Chaenothecopsis</i> Vainio	
4.3 Géneros <i>Phaeocalicium</i> A. Schmidt y <i>Stenocybe</i> (Nyl.) Koerb.....	
5. Conclusiones	136 136
BLOQUE 3. Localización de la familia <i>Mycocaliciaceae</i> en la sistemática de Ascomycota	141 146 147
1. Introducción	147
1.1 La sistemática de Ascomycota.....	147
1.2 La familia <i>Mycocaliciaceae</i> A. Schmidt.....	
2. Objetivos	
3. Resultados	147
3.1 <i>La familia <i>Mycocaliciaceae</i> en la sistemática de Ascomycota</i>	154
3.1.1. Estudio del gen 18S ADNr.....	159
3.1.1.1 Secuenciación del gen 18S ADNr de un conjunto de representantes de la familia <i>Mycocaliciaceae</i> , alineamiento con secuencias homólogas de otros ascomicetos y análisis de los alineamientos.....	159
3.1.1.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones	162
3.1.2 Estudio del gen 28S ADNr.....	

3.1.2.1 Secuenciación la mitad 5' del gen 28S ADNr de un conjunto de representantes de la familia <i>Mycocaliciaceae</i> , alineamiento con secuencias homólogas de otros ascomicetos y análisis de los alineamientos	167
3.1.2.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.	
3.2. La familia <i>Mycocaliciaceae</i> y su relación con las familias del antiguo orden Caliciales	167
3.2.1 Estudio del gen 28S ADNr.....	169
3.2.1.1 Secuenciación de la región 5´ terminal de gen 28S ADNr de un conjunto de representantes de la familia <i>Mycocaliciaceae</i> , <i>Coniocybaceae</i> , <i>Caliciaceae</i> y <i>Sphaerophoraceae</i> , alineamiento y análisis de los alineamientos.....	173
3.2.1.2 Inferencia de las relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.....	174
3.2.1.2 Inferencia de las relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.....	176
3.2.1.2 Inferencia de las relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.....	179
4. Discusión	
4.1 La sistemática de Ascomycota.....	180
4.2 La familia <i>Mycocaliciaceae</i> en la sistemática de ascomicetos	
4.3 La familia <i>Mycocaliciaceae</i> y su relación con las familias del antiguo orden <i>Caliciales</i>	185
5. Conclusiones	
	197
<i>DISCUSIÓN GENERAL</i>	
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	
<i>ANEXOS 1, 2 Y 3</i>	

INTERÉS Y PLANTEAMIENTO

La sistemática de los hongos es una disciplina en constante evolución. La clasificación del reino Eumycota y sus phyla, ha sufrido varias modificaciones en función de los caracteres taxonómicos disponibles en cada momento. El desarrollo de los métodos de análisis de secuencias ha permitido una aceleración considerable en el establecimiento de una clasificación natural o filogenética. Se ha estimado la existencia de 1.5 millones de especies de hongos, de los cuales 70000 son conocidos (O'Donnell et al., 1994; Hackstein, 1997), por lo que la construcción de una clasificación basada en principios filogenéticos requiere la colaboración de distintos grupos de investigación.

Esta tesis aporta una aproximación filogenética de la familia *Mycocaliciaceae*, tanto en relación con otros ascomicetos, como en las relaciones internas de sus géneros y algunas especies. La familia *Mycocaliciaceae*, provisionalmente incluida por su morfología y ecología en el orden Caliciales (Tibell, 1984) (Figura 1), necesitaba una revisión en función de datos de distinta naturaleza. A finales de 2000 se describe *Mycocaliciales* como un nuevo orden que incluye a las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae*, anteriormente integrantes del orden Caliciales (Figura 2). Este nuevo agrupamiento se realiza tras el análisis de la secuencia del gen 18S y de caracteres morfológicos y biológicos (Tibell y Wedin, 2000).

En esta tesis las aproximaciones filogenéticas se realizan en función de las secuencias de distintos genes que codifican para el ARN ribosómico, tomando como base comparativa caracteres morfológicos y ecológicos.

Se analizan también los patrones de producción de metabolitos secundarios detectados en cultivo sobre medio sólido y líquido. Con nuestro análisis de metabolitos secundarios producidos por representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, se pretende estudiar si éstos son válidos como caracteres quimiotaxonómicos para la delimitación de subespecies, especies o géneros en esta familia.

Se presenta una introducción general acerca de la familia *Mycocaliciaceae* y una descripción de los métodos empleados en el establecimiento de filogenias (morfológicos, genéticos y químicos).

El desarrollo del trabajo se estructura en tres bloques en función del nivel taxonómico analizado. Cada bloque contiene una introducción específica, identificación de objetivos, desarrollo de resultados, discusión y conclusiones.

El primer bloque analiza las variaciones intra e interespecíficas entre especies del género *Mycocalicium*. La variabilidad se analiza por tres vías. La vía principal está basada en el estudio de la secuencia de los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S. Las otras dos alternativas conducen al agrupamiento de especímenes en función de los patrones de compuestos producidos en cultivo, y de datos morfométricos, buscando congruencia con las hipótesis filogenéticas obtenidas mediante el análisis de secuencias. En el segundo bloque, se analizan las secuencias de la mitad 5' del gen 28S en un intento de delimitar los géneros constituyentes de la familia *Mycocaliciaceae*. Se incluyen los agrupamientos obtenidos en función de los patrones de compuestos producidos en cultivo por representantes de distintos géneros.

En el tercer bloque se analizan las secuencias de los genes 18S y 28S (fragmento 5' terminal), para el establecimiento de hipótesis sobre la localización de la familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de hongos ascomicetos, y la búsqueda de sus parientes más cercanos. Una secuencia de mayor longitud del gen 28S de *Mycocaliciaceae*, se utiliza en la comparación con representantes de otras familias del antiguo orden Caliciales, con quienes *Mycocaliciaceae* estuvo relacionada no sin reticencias y de manera provisional (Tibell, 1984).

El vertiginoso avance en la producción y tratamiento de secuencias ha dado lugar a continuas modificaciones en la clasificación de los hongos ascomicetos, por lo que los resultados expresados en esta tesis, en cuanto a las hipótesis filogenéticas, se encuentran en función de las secuencias presentes hasta el momento de su escritura en las bases de datos. La posibilidad de ejercer una modificación en la clasificación actualmente aceptada con la introducción de nuevas secuencias no se puede descartar.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La familia Mycocaliciaceae (Mycocaliciales, Ascomycota).

2. Aproximaciones empleadas en nuestro estudio filogenético.

2.1 APROXIMACIÓN MORFOLÓGICA

2.1.1 Características morfológicas de la familia *Mycocaliciaceae*

2.2 APROXIMACIÓN GENÉTICA

2.2.1 Utilización de los genes que codifican para el ARN ribosómico en el estudio filogenético de la familia *Mycocaliciaceae*

2.2.2 Técnicas de biología molecular y metodología informática al servicio del análisis de secuencias

2.3 APROXIMACIÓN QUÍMICA

2.3.1 Utilización de los metabolitos secundarios en taxonomía

1. La familia *Mycocaliciaceae* (*Mycocaliciales*, *Ascomycota*).

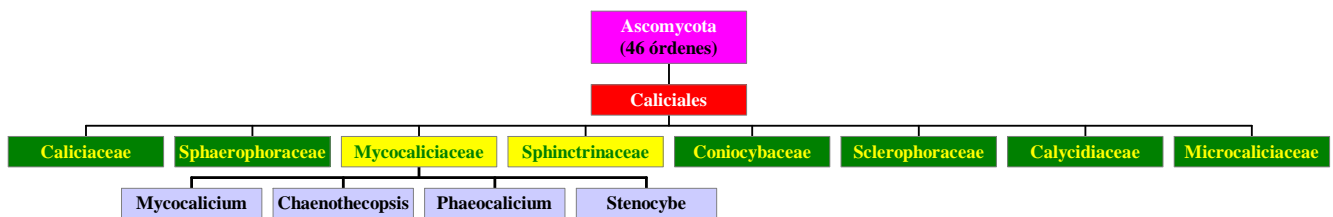


Figura 1. Representación esquemática de la localización de la familia *Mycocaliciaceae* y sus géneros constituyentes en la sistemática de *Ascomycota*, antes de 1998.

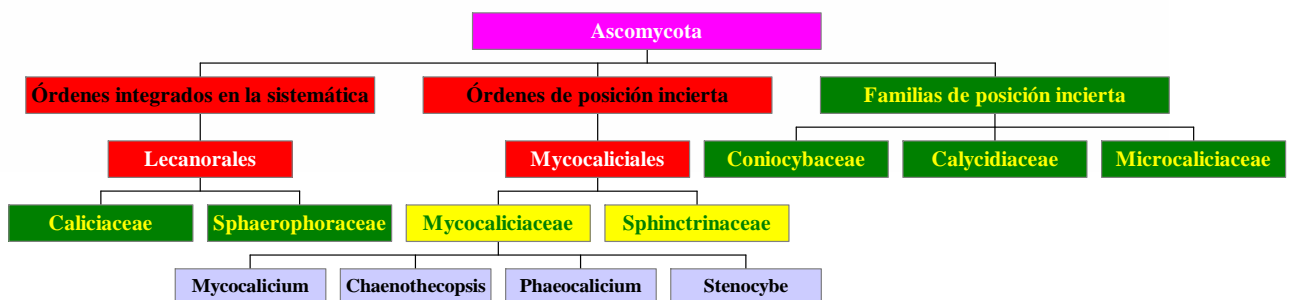


Figura 2. Representación actualizada de la clasificación de la familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de *Ascomycota* (Wedin et al, 1998, Tibell y Wedin, 2000, Eriksson , 2001).

La familia *Mycocaliciaceae* fue descrita por primera vez en 1970 por Schmidt. En ella quedaron incluidos los géneros *Mycocalicium*, *Chaenothecopsis*, *Strongyleuma*, *Stenocybe* y *Phaeocalicium* (Schmidt, 1970). Estos géneros fueron descritos a lo largo de los dos últimos siglos. El primero de los géneros reconocido fue *Stenocybe*, por Nylander en 1855. Vainio describió *Mycocalicium* en 1890 y en 1927 los géneros *Chaenothecopsis* y *Strongyleuma* (Tibell, 1984). El género *Phaeocalicium* fue descrito por Schmidt (1970).

Previamente al establecimiento de *Mycocaliciaceae* como familia, los géneros que la integran han sido clasificados en diversos grupos, pero siempre con relación a otros hongos liquenizados y no liquenizados del orden Caliciales. Por esta razón, a pesar de ser hongos ascomicetos no liquenizados, su estudio y tratamiento sistemático ha estado ligado tradicionalmente al de líquenes.

En la clasificación de Caliciales realizada por Reinke en 1895, se proponía la separación de los géneros no liquenizados constituyendo una subfamilia dentro de *Caliciaceae* a la que denominó Protocaliciaceae. Reinke consideraba al género *Mycocalicium* como la forma no liquenizada de *Calicium* (Bonar, 1971).

Schmidt sugirió una proximidad taxonómica entre los géneros *Mycocalicium*, *Chaenothecopsis*, *Strongyleuma*, *Stenocybe* y *Phaeocalicium*, en función de características morfológicas, y consideró a estos cinco géneros como un grupo monofilético, descartando la posibilidad de ser formas no liquenizadas de otros Caliciales (Schmidt, 1970).

Las características en función de las cuales estos cuatro géneros fueron escindidos del resto de los Caliciales constituyendo la familia *Mycocaliciaceae* fueron, la dispersión activa de esporas, la forma de vida no liquenizada y la ausencia de mazedio (acumulación de esporas sobre el apotecio).

En la revisión del orden Caliciales realizada por Tibell (1984), se mantiene la familia *Mycocaliciaceae* constituida sólo por cuatro de los géneros mencionados anteriormente, puesto que *Strongyleuma* es considerado sinónimo de *Chaenothecopsis*. Tibell la describe como una familia homogénea y por tanto monofilética, aislada dentro del orden Caliciales por sus características distintivas, y acomodada en él de manera provisional (Figura 1) (Tibell, 1984).

Recientemente la familia *Mycocaliciaceae* junto con la familia *Sphinctrinaceae*, incluida desde su descripción en el orden Caliciales, han sido escindidas del mismo, y juntas constituyen un orden nuevo, *Mycocaliciales*, en función de sus semejanzas biológicas, morfológicas y genéticas (secuencia del gen ribosómico 18S) (Figura 2) (Tibell y Wedin, 2000)

2. Aproximaciones empleadas en nuestro estudio filogenético.

La generación de hipótesis filogenéticas, a distintos niveles taxonómicos, para especies integrantes de la familia *Mycocaliciaceae*, se realizará en función de datos de distinta naturaleza, morfológica, genética y química.

2.1 ANALISIS MORFOLÓGICO

2.1.1 Características morfológicas de la familia *Mycocaliciaceae*.

Se trata de hongos no liquenizados cuyo talo vegetativo está inmerso en el sustrato sobre el que viven. Esta es una característica compartida con otras familias del antiguo orden Caliciales no liquenizadas (*Sphinctrinaceae* y *Microcaliciaceae*) y con el género liquenizado *Sclerophora* (*Coniocybaceae*). Este tipo de talo puede encontrarse raramente en algunas especies de los géneros *Calicium* y *Chaenotheca* (familias *Caliciaceae* y *Coniocybaceae*, respectivamente). Sus cuerpos fructíferos son la única parte del hongo que ofrecen características morfológicas con valor taxonómico (Tibell, 1984).

2.1.1.1 Forma y tamaño del ascocarpo.

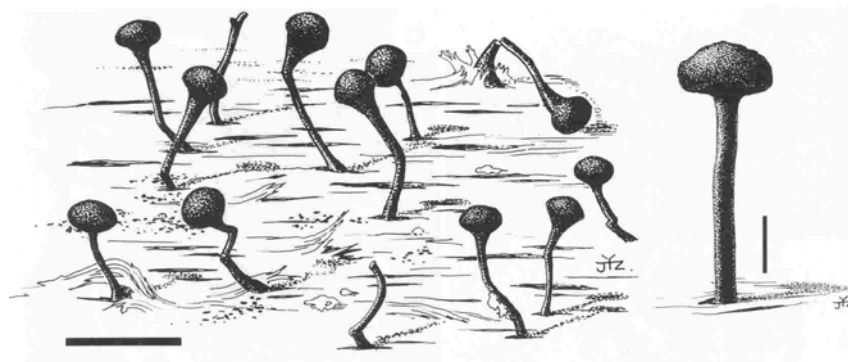


Figura 3. *Mycocalicium subtile* (NZ. T13045). Escala horizontal, 0.5 mm. Escala vertical, 0.1 mm (Tibell, 1987a).

Todos los géneros de la familia presentan ascocarpos (Figura 3) con pedúnculo de longitud variable, pero generalmente menor de 1.2 mm. Solamente el género *Chaenothecopsis* presenta algunas especies con pedúnculo muy corto, casi sésiles. La forma del ascocarpo puede ser ovoide o lenticular con un diámetro generalmente menor de 0.3 mm.

2.1.1.2 Estructura del pedúnculo.

La parte interna del pedúnculo (Figura 4) está constituida por hifas incoloras de ordenamiento periclinal (paralelas a la superficie). Esta estructura se encuentra en todos los géneros de la familia excepto en gran parte de las especies del género *Chaenothecopsis*, donde las hifas se ordenan de forma variable según las especies (Tabla 2.1, Bloque 2, pag 85-86).

La parte externa del pedúnculo está formada por hifas periclinales de color marrón oscuro, a veces rojizo en *Chaenothecopsis*.

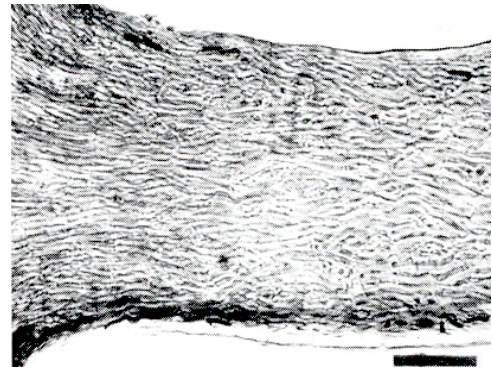


Figura 4. Anatomía del pedúnculo de *M. subtile*. Contiene hifas de ordenamiento periclinal. Escala 50 μm (Tibell, 1987a)

2.1.1.3 Estructura del excípulo.

El excípulo es la estructura que rodea al himenio o hifas fértiles (Figura 5). En los cuatro géneros el excípulo está formado generalmente por hifas de ordenamiento periclinal y de color marrón oscuro. Algunas especies de *Mycocalicium* presentan hifas anticlinales (perpendiculares a la superficie), ramificadas y con paredes engrosadas. En los géneros *Phaeocalicium* y *Stenocybe* esta estructura se encuentra muy bien desarrollada, mientras que en los géneros *Chaenothecopsis* y *Mycocalicium* su desarrollo es variable según las especies.

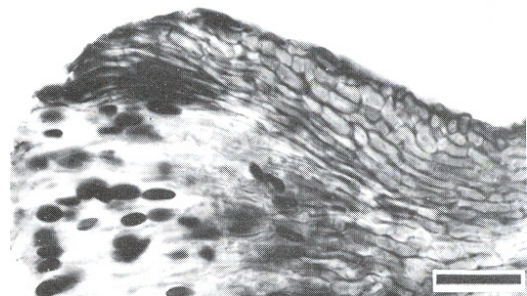


Figura 5. Estructura del excípulo en *M. subtile*. Escala 25 μm (Tibell, 1987a)

2.1.1.4 Estructura y tamaño de los ascos.

En los cuatro géneros de la familia los ascos se forman a partir de una hifa ascógena. Su forma es, en general, cilíndrica, aunque en el caso de *Chaenothecopsis* pueden estar también ligeramente constreñidas en la base (Figura 6). En todos los casos se trata de ascos que persisten hasta la madurez de las ascosporas. La dispersión de las esporas en *Mycocaliciaceae* es activa. La estructura del ápice del asco en *Mycocalicium*, *Stenocybe* y *Phaeocalicium* es semejante y consiste en un engrosamiento uniforme de la pared en esta zona. El ápice del asco en *Chaenothecopsis* presenta un engrosamiento desigual de la pared y está atravesado por un canal visible preferentemente en estadios semimaduros. La estructura del ápice del asco y el tamaño de los mismos son característicos de cada género. Los ascos de menor tamaño se encuentran en *Chaenothecopsis* (25-55 micrometros). Algo mayor es el rango de tamaños de los ascos de *Mycocalicium* (35-65 micrometros). *Phaeocalicium* y *Stenocybe* tienen ascos de mayor tamaño que los géneros anteriormente mencionados. *Stenocybe* (70-250 micrometros) presenta un rango de tamaño mayor que *Phaeocalicium* (70-100 micrometros).



Figura 6. Asco de *M. victoriae*.

Escala 10 μm (Tibell, 1987a)

2.1.1.5 Tamaño, forma, número de septos y pigmentación de las ascosporas.

Las ascosporas de los cuatro géneros tienen la pared gruesa y de color marrón oscuro. Son lisas o bien con ornamentación verrucosa, excepto en el género *Stenocybe* que carecen de ornamentación. Las ascosporas del género *Mycocalicium* no tienen septos, son fusiformes y su tamaño se encuentra en el rango de 5-11 x 3-5 micrómetros (Figura 7).

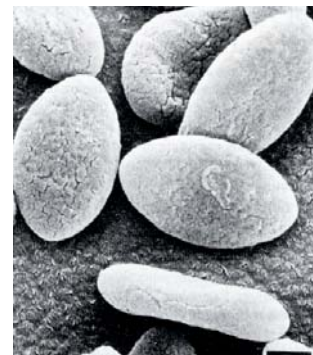


Figura 7. Esporas maduras de *M.*

victoriae. SEM Escala 2 μm (Tibell, 1987a)

Las ascosporas de los géneros *Chaenothecopsis* y *Phaeocalicium* pueden ser unicelulares o bien pueden tener un septo. Las esporas de *Chaenothecopsis* son elipsoidales con los extremos ligeramente redondeados y son las más pequeñas de la familia, 3.5-10 x 2-4 micrómetros. Las esporas del género *Phaeocalicium* tienen la misma forma que las de *Chaenothecopsis* pero su rango de tamaño es mayor, 10-18 x 4-6 micrómetros. *Stenocybe* tiene esporas elipsoidales o fusiformes de tamaño 12-75 x 4-21 micrómetros, con un número variable de tres a siete septos.

2.1.2 Ecología y distribución de *Mycocaliciaceae*.

Esta familia comprende especies saprófitas, parásitas y parasimbiontes de líquenes. *Chaenothecopsis* y *Mycocalicium* tienden a vivir de forma saprófita sobre madera. *Chaenothecopsis* spp. puede aparecer como parásito de líquenes o de colonias de algas de vida libre. En *Phaeocalicium* y *Stenocybe* el parasitismo o saprofitismo tiene lugar sobre plantas vasculares. Algunas especies son altamente específicas respecto a su hospedador. Algunos ejemplos se encuentran en los géneros *Chaenothecopsis* y *Mycocalicium*. *Chaenothecopsis consociata* siempre se encuentra sobre *Chaenotheca chrysocephala*. *Mycocalicium sequoiae* sobre *Sequoiadendron gigantea* y *Metasequoia sempervirens*, *Mycocalicium chaudharii* sobre exudados de *Mangifera indica* y *Mycocalicium victoriae* sobre madera de *Eucalyptus*.

Phaeocalicium crece preferentemente sobre pequeñas ramas de plantas vasculares en zonas templadas. La mayor parte de sus especies son específicas de un género de hospedador. *Stenocybe* vive como parásito o saprófito en plantas vasculares y hepáticas. Sus especies, al igual que ocurre en *Phaeocalicium*, están restringidas a un género e incluso a una especie del hospedador.

Otras sin embargo viven sobre una gran variedad de sustratos. *Chaenothecopsis pusilla* puede aparecer sobre colonias de algas de vida libre y una gran variedad de líquenes, *Chaenothecopsis debilis* y *Chaenothecopsis fennica* siempre crecen sobre madera y *Chaenothecopsis nana* sobre corteza. *Mycocalicium subtile*, *Mycocalicium americanum* y *Mycocalicium albonigrum* crecen sobre los troncos de una gran diversidad de árboles (Tibell, 1984).

La mayor parte de las especies de la familia son epífitas excepto algunas especies de *Chaenothecopsis* que crecen asociadas a líquenes o colonias de algas sobre rocas.

Se encuentran preferentemente en lugares húmedos y sombríos. La ocupación de este tipo de microhabitat compartido con otras familias del antiguo orden Caliciales s.l. ha permitido la permanencia de los llamados hongos calicioideos como una unidad natural de investigación, a pesar de su desmembramiento taxonómico. La presencia de hongos y líquenes calicioideos se emplea como indicador de bosques antiguos (Tibell, 1991a).

Algunas especies saprófitas de *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* prefieren, sin embargo, zonas expuestas.

La familia está bien representada en zonas frías y templadas de ambos hemisferios, siendo menos frecuentes en áreas tropicales (Tibell, 1982).

2.1.3 Cultivo en laboratorio y producción de anamorfos en *Mycocaliciaceae*.

La pequeña cantidad de caracteres morfológicos que se pueden estudiar en estos organismos hace dificultosa, en muchos casos, la delimitación de géneros y especies. La búsqueda de un nuevo conjunto de datos analizables que facilitara la discriminación de especies y géneros, condujo al cultivo de estos hongos en condiciones controladas de laboratorio. La obtención de cultivos puros permitió, en algunos casos, la observación de formas de reproducción asexual o anamorfos. El primer representante de *Mycocaliciaceae* que pudo ser cultivado en el laboratorio fue *Mycocalicium subtile* en 1887 (Tibell, 1990). Möller (1887) observó una fase asexual con producción de conidios elipsoidales, sin septos y de color marrón, producidos en el interior de un picnidio. Este mismo tipo de anamorfo se encontró en cultivos de *Mycocalicium albonigrum* (Tibell, 1990). Otra especie de este mismo género *Mycocalicium sequoiae*, fue cultivada en distintas condiciones de temperatura e iluminación, pero en ningún caso se obtuvo el anamorfo, aunque si se consiguió la formación de apotecios maduros (Bonar, 1971). *Chaenothecopsis shefflerae* fue estudiado en cultivo y en él no se observó la producción de picnidios, pero mostraba una fase asexual de reproducción, en la que los conidios se producían en fiálides a partir de conidióforos de tipo *Phialophora* (Samuels y Buchanam, 1983). Los conidios producidos por esta especie eran unicelulares, elipsoidales y de color verde claro. Hutchison (1987) consiguió un cultivo puro de *Phaeocalicium polyporaneum* donde obtuvo apotecios, pero no observó ninguna forma de reproducción asexual.

Tibell realizó un estudio sobre la producción de anamorfos en varias especies del género *Chaenothecopsis*. La especie *Chaenothecopsis haematopus* presenta en cultivo un anamorfo identificado como *Catenomyces rosea*, género y especie de nueva

descripción. Se trata de un anamorfo poco diferenciado con conidioforos simples e incoloros. Los conidios son unicelulares e incoloros producidos de forma acrópeta (fiálides en las que los conidios más jóvenes se encuentran en el extremo apical de la cadena), por lo que podría asemejarse a varios hifomicetos con este tipo de conidiogénesis. No se ha encontrado nunca esta forma asexual en la naturaleza. (Tibell y Constantinescu, 1991).

El cultivo de *Chaenothecopsis savonica* reveló la presencia de dos tipos de anamorfos, uno de ellos es de tipo celomiceto y el otro es un hifomiceto de tipo *Phialophora*. El estudio del celomiceto mostró una gran similitud estructural con un hongo liquenícola, *Asterophoma mazaediicola*, que vive sobre el mazedio de dos especies muy relacionadas de *Calicium* (*Caliciaceae*, Lecanorales liquenizados). Algunas especies de *Chaenothecopsis* viven asociadas con especies de *Calicium*, parasitando o compartiendo el fotobionte con el líquen. No es el caso de *Chaenothecopsis savonica*. Esta especie aparece habitualmente asociada a colonias de algas de vida libre y nunca a *Calicium*. Por esta razón ecológica se descartó que *Asterophoma mazaediicola* fuera el anamorfo de *Chaenothecopsis savonica*, aunque se confirma que su anamorfo es de tipo *Asterophoma* y que coexiste con el teleomorfo (forma sexual) en la naturaleza. *Asterophoma* tiene un conidioma de estructura poco usual, puesto que su pared está compuesta por una sola capa de células. En el extremo proximal de estas células se producen los conidios, que al contrario de los de *Mycocalicium albonigrum* y *Mycocalicium subtile* no están pigmentados. En el extremo distal las células están fuertemente pigmentadas (Tibell, 1991b).

Chaenothecopsis viridireagens es una de las especies del género que puede vivir parasitando una colonia de algas de vida libre o bien a aquellas que constituyen el fotobionte de algunas especies de *Chaenotheca* (*Coniocybaceae*). En estudios realizados a partir de cultivos de esta especie, se ha señalado la presencia de dos anamorfos, uno de tipo celomiceto y otro hifomiceto. El conidioma del anamorfo celomiceto es muy similar al producido por *Chaenothecopsis savonica*, con una sola capa de células, aunque en este caso, la parte más interna de estas células se curva, pigmenta y entrelaza para formar en el conidioma una superficie externa oscura y poco uniforme. La formación de los conidios, su forma y falta de pigmentación es también similar a la de esta especie. Esta forma asexual de *Chaenothecopsis viridireagens* se ha encontrado también en la naturaleza (Tibell, 1992).

Chaenothecopsis debilis en cultivo produce frecuentemente un anamorfo de tipo celomiceto. Su conidioma puede aparecer aislado o formando grupos. Generalmente su pared externa es negra y está formada por 5-6 capas de células entremezcladas. La

conidiogénesis es fialídica y los conidios son elipsoidales, curvados e hialinos. El anamorfo de esta especie se ha encontrado también en la naturaleza (Tibell, 1995).

Otras especies de *Chaenothecopsis* cultivadas en medios nutritivos dieron resultados diversos. Las ascosporas de *Chaenothecopsis viridialba*, *C. asperopoda*, *C. consociata*, *C. sagenidii* y *C. vainioana* no germinaron en los medios de cultivo habitualmente empleados. *C. fennica* y *C. nana* crecieron en cultivo, pero no produjeron ningún anamorfo. *C. pusilla*, *C. pusiola* y *C. tasmanica* produjeron anamorfos de tipo hifomiceto, con conidios elipsoidales e hialinos (Tibell, 1995).

Algunas especies pertenecientes a otros géneros de la familia, como son *Phaeocalicium praecedens*, *P. populneum*, *Stenocybe septata* y *S. pullatula*, han sido también cultivadas a partir de sus ascosporas sin que haya tenido lugar la producción de anamorfos en ninguno de los casos (Tibell, comunicación personal).

2.2. ANÁLISIS GENÉTICO

2.2.1 Utilización de los genes que codifican para el ARN ribosómico en el estudio filogenético de la familia *Mycocaliciaceae*

Los genes con información filogenética, son aquellos que tienen una misma función en todos los organismos, evolucionan aproximadamente a la misma velocidad y se encuentran presentes en una sola copia en el genoma o bien se comportan como tal (evolución concertada). Algunos genes que se adaptan a estos criterios y han sido empleados en estudios filogenéticos de hongos, son los genes que codifican para la citocromo oxidasa, factores de elongación de proteínas ribosomales (Mitchell et al., 1995), gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, orotidina -5'-monofosfato decarboxilasa (Taylor et al., 1994) y genes ribosómicos.

Este trabajo supone el primer acercamiento genético a la familia *Mycocaliciaceae* por lo que comenzaremos analizando las secuencias de regiones bien exploradas en el resto de los hongos, con fines comparativos. La mayor parte de los estudios de sistemática y filogenia molecular realizados en hongos han empleado las secuencias de los genes que codifican para las moléculas de ARN, que constituyen la base de la estructura del ribosoma.

Las ventajas de uso del ADN ribosómico para el estudio de relaciones filogenéticas son :

- Universalidad y homología.

Estas moléculas se encuentran en el genoma de todos los organismos. Se trata de secuencias homólogas cuya estructura y función se ha conservado a lo largo de la evolución.

- Alto número de copias.

El agrupamiento de ADNr nuclear en eucariotas consta en la mayoría de los casos de varios cientos de copias repetidas. Los procesos de evolución concertada permiten una homogeneidad en las copias (Hillis y Dixon, 1991). Este fenómeno permite que los genes que codifican para el ARN ribosómico se encuentren bien representados en el ADN extraído, y facilita la amplificación de los mismos a partir de una cantidad mínima de material biológico de partida .

- Elevado número de residuos.

Puesto que cada posición en la secuencia es considerada un carácter, el número de caracteres homólogos analizables en una secuencia de uno de estos genes es muy elevado.

- Distintos grados de conservación evolutiva.

Puesto que se observa diferente grado de conservación en distintos segmentos de estos genes, una adecuada elección de la región del ADN ribosómico a analizar, permitirá la utilización de estas secuencias en el estudio de organismos a distintos niveles taxonómicos.

- Disponibilidad de secuencias.

La secuenciación de cantidades crecientes de estos genes y su almacenamiento en bases de datos públicas permite la comparación con secuencias nuevas y la disponibilidad de “outgroups” para los análisis filogenéticos.

Los genes que codifican para los ARNr se encuentran agrupados en una misma región del genoma en eucariotas. Los genes de este agrupamiento están repetidos de manera seriada en un alto número de copias. La organización de estos agrupamientos en eucariotas se muestra en la Figura 8. El agrupamiento contiene tres regiones que constituyen el ARN estructural del ribosoma, 18S, 28S y 5.8S. Entre los genes aparecen regiones espaciadoras. Las regiones que flanquean el gen 5.8S se denominan espaciadores internos o ITS (Internal Transcribed Spacers). Estos espaciadores se transcriben aunque son posteriormente procesados y eliminados y no llegan a formar parte del ribosoma. La región que separa una copia del agrupamiento de otra se denomina IGS (Intergenic Spacer) o espaciadores intergénicos. La región IGS comprende a su vez dos regiones, la ETS (Externally Transcribed Spacer) o espaciador externo, que se localiza en el extremo 5' del gen 18S y cuya naturaleza es similar a la de los ITS, y la región NTS (Non-Transcribed Spacer),

espaciador que no se transcribe y que contiene elementos repetidos que actúan como potenciadores de la transcripción. Los espaciadores internos ITS y externos ETS contienen señales para el procesamiento del ARNr transcrito (Hillis y Dixon, 1991).

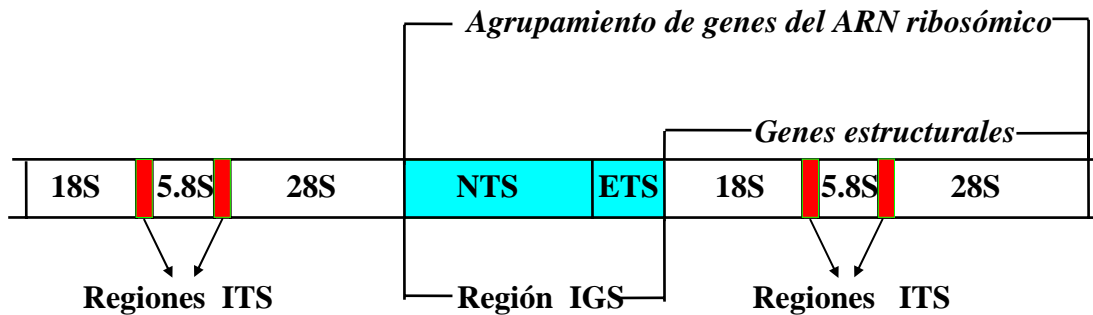


Figura 8. Estructura de agrupamiento de genes que codifican para los distintos ARN ribosómicos (Mitchell et al., 1995).

Cada una de las regiones que constituye este agrupamiento evoluciona a distinta velocidad, de manera que sus secuencias pueden ser empleadas para discriminar organismos a distintos niveles taxonómicos. Los genes estructurales 18S, 28S y 5.8S son los más conservados. Las regiones ITS e IGS son mucho más variables.

El ARNr mejor estudiado ha sido el 18S. Se considera que este gen es uno de los que más lentamente ha evolucionado en todos los organismos y por lo tanto es útil en la exploración de procesos evolutivos primitivos (Hillis y Dixon, 1991). Su alto grado de conservación permite el desarrollo de oligonucleótidos que pueden ser usados como sondas o bien como cebadores de reacciones de amplificación y secuenciación en otros organismos no estudiados previamente. El estudio de la estructura secundaria de la molécula de ARNr constituyente de la subunidad pequeña del ribosoma en procariotas, eucariotas, mitocondrias, cloroplastos y arqueobacterias, permite observar una estructura común con cuatro dominios y diez regiones variables. En esta estructura se encuentran regiones, fundamentalmente del dominio IV conservadas en todos los tipos de subunidades pequeñas, que posiblemente sean las más involucradas en la funcionalidad del ribosoma. (Figura 9).

El gen nuclear que codifica para la subunidad grande o 28S es de mayor longitud que el 18S y presenta zonas conservadas y zonas con una mayor variabilidad denominadas segmentos de expansión (Raué et al., 1988). La comparación de la estructura secundaria de las diferentes clases de ARNr constituyentes de la subunidad grande del ribosoma, permite

distinguir seis dominios conservados, siendo los dominios IV y V aquellos cuya estructura ha sido especialmente conservada a lo largo de la evolución (Figura 10).

El ARNr 5.8S forma parte de la subunidad grande del ribosoma, mediante la unión de esta molécula a regiones conservadas del dominio I del ARNr 28S. El gen 5.8S es de características similares, en cuanto a su variabilidad al 28S, pero su pequeño tamaño limita su utilidad en estudios filogenéticos.

Las regiones espaciadoras que flanquean este gen (ITS1 e ITS2) son transcritas en la misma unidad transcripcional que los genes constitutivos del ribosoma, por la RNA polimerasa I, siendo posteriormente procesados y eliminados. Se ha observado que deleciones parciales de la secuencia de ETS en levaduras impiden la acumulación del ARNr 18S (Musters et al., 1990, van Nues et al., 1995).

Las regiones espaciadoras son muy variables en su secuencia y se utilizan para inferir la filogenia de organismos muy relacionados. De las regiones espaciadoras los NTS son las secuencias que evolucionan más rápidamente.

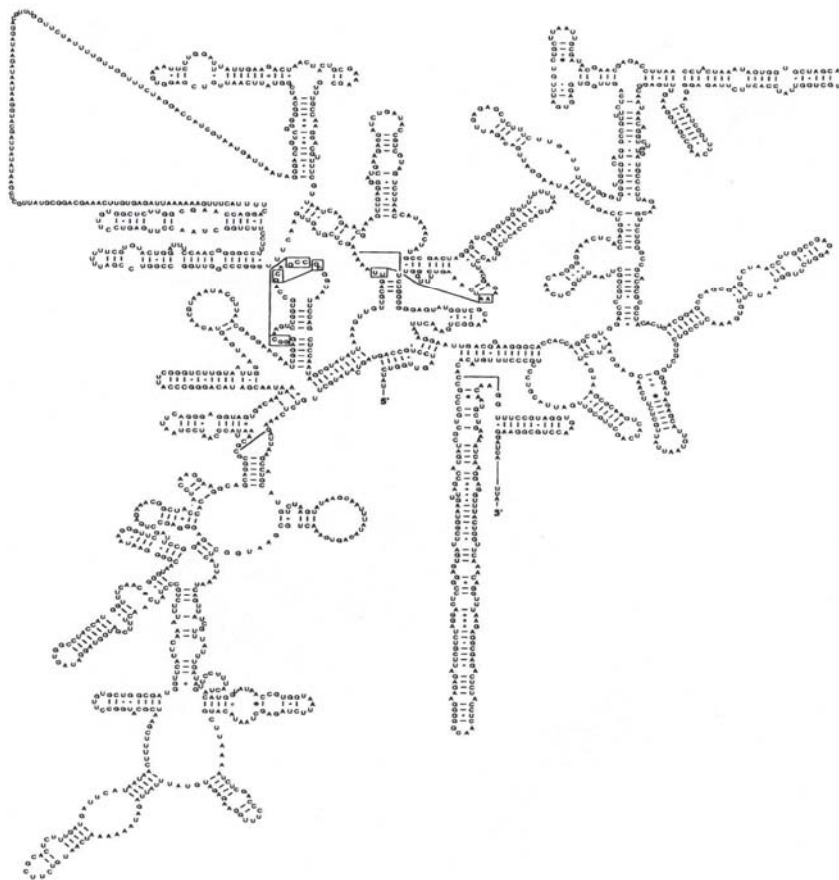


Figura 9. Estructura secundaria del ARNr 18S de *Saccharomyces cerevisiae* (Neefs et al, 1993).

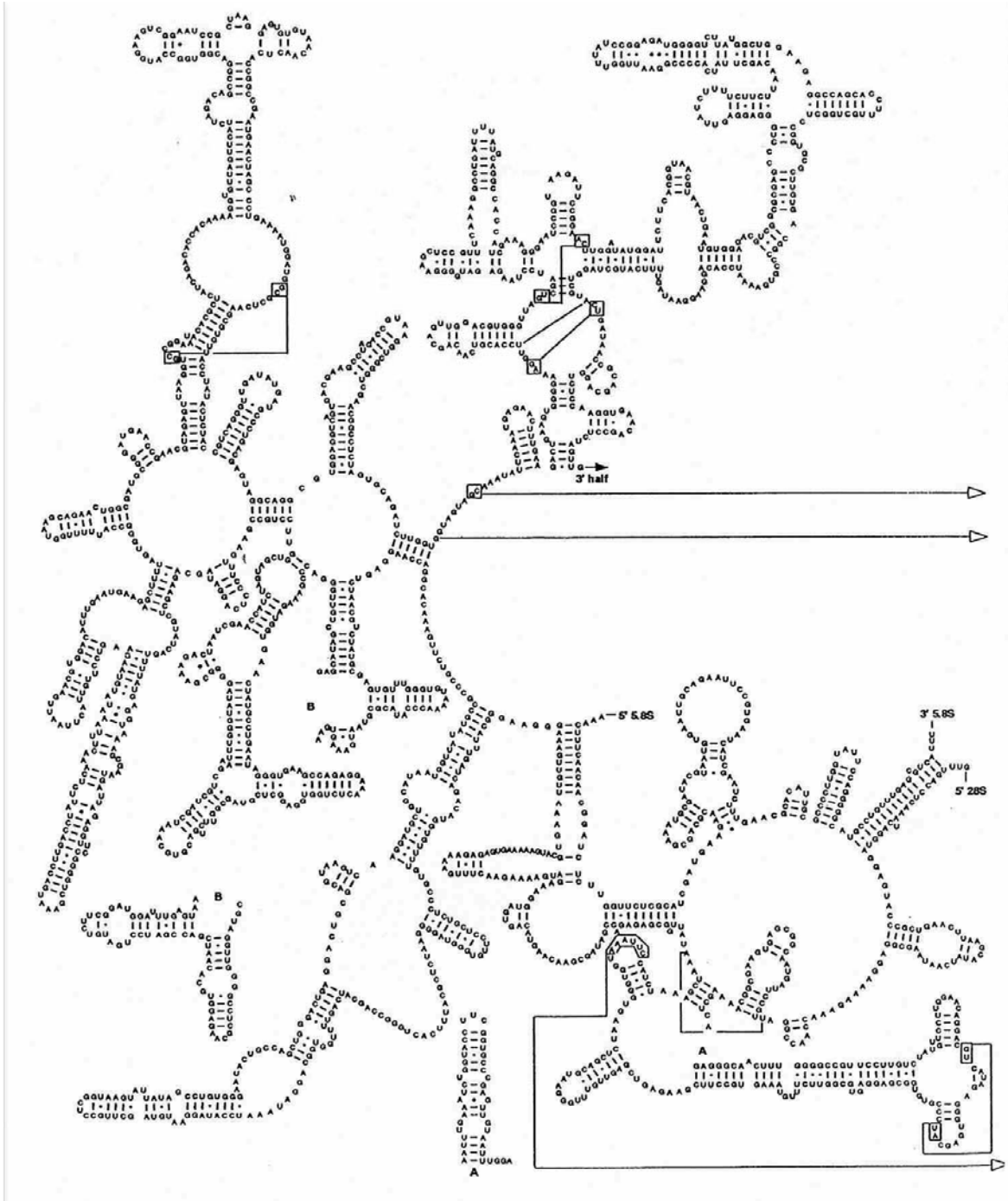


Figura 10. Modelo de la estructura secundaria de la mitad 5' de la molécula de ARN ribosómico que constituye la subunidad grande del ribosoma en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Gutell et al., 1993).

2.2.2 Técnicas de biología molecular y metodología informática al servicio del análisis de secuencias.

2.2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Secuenciación cíclica.

La obtención de un número elevado de secuencias a comparar ha sido posible gracias al desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Fallona, 1987). Esta técnica permite la localización de la secuencia objeto de estudio, mediante la hibridación por sus extremos con oligonucleótidos, y su amplificación, al actuar estos oligonucleótidos como cebadores de la reacción de polimerización. De esta forma se generan grandes cantidades del fragmento de ADN elegido, a partir de cantidades iniciales de material genético muy pequeñas. El desarrollo de esta técnica ha hecho posible el estudio de porciones del genoma de organismos difíciles de cultivar (Mitchell et al., 1995). Esta técnica es la base de la metodología de secuenciación cíclica automatizada, que está permitiendo la obtención de un gran número de secuencias.

2.2.2.2 Alineamiento de secuencias de nucleótidos.

La base sobre la que se sustenta cualquier análisis filogenético molecular es el alineamiento de un conjunto de secuencias de genes homólogos. El alineamiento es el proceso de comparación de secuencias en busca de homología posicional (Swofford et al., 1996).

Para asumir posiciones homólogas debe postularse la aparición de fenómenos de inserción o delección de fragmentos de secuencia (Swofford et al., 1996). Puesto que se desconoce la secuencia de los genes ancestrales, no es posible determinar si han ocurrido inserciones o delecciones, por tanto a ambos eventos se los denomina “gaps”. El mejor alineamiento es aquel que minimiza el número de posiciones desapareadas y de “gaps”.

Cuando hay pocas diferencias entre las secuencias los alineamientos pueden realizarse manualmente. La presencia de posiciones invariables o altamente conservadas, en su estructura primaria o secundaria sirven de guía para el alineamiento. En el caso de secuencias largas o con muchos puntos de variación es necesario el uso de programas informáticos diseñados para ello (Ginsburg, 1994).

El alineamiento de las secuencias es a menudo el componente más difícil y oscuro del análisis filogenético.

2.2.2.3 Métodos de inferencia filogenética.

Se han desarrollado métodos basados en algoritmos y métodos basados en criterios de optimización. Los métodos basados en algoritmos (métodos de distancias) incluyen en éste los procesos de obtención y definición del mejor árbol. Son métodos rápidos puesto que no requieren la evaluación de un gran número de árboles posibles (Swofford et al.,1996).

Los métodos basados en criterios de optimización, en primer lugar generan árboles y los evalúan. Posteriormente comparan los árboles obtenidos y seleccionan los que presentan mejores valores respecto a un criterio (parsimonia, máxima verosimilitud)

Los métodos más utilizados en la reconstrucción de relaciones filogenéticas (Felsenstein, 1988) son:

2.2.2.3.1 Métodos basados en distancias genéticas.

Estos métodos de reconstrucción filogenética tienen en cuenta la disimilitud global entre pares de secuencias alineadas.

El cálculo de las distancias entre dos secuencias se realiza mediante el tratamiento conjunto de las posiciones con sustituciones y "gaps", según un modelo evolutivo.

Los modelos más empleados para el cálculo de la probabilidad de sustitución de un nucleótido por otro en una secuencia de ADN, son el modelo de Jukes y Cantor o modelo de 1 parámetro, donde se considera que la sustitución ocurre al azar entre los cuatro posibles nucleótidos. El modelo de Kimura o modelo de dos parámetros considera que las transiciones (sustitución de una base púrica por otra, o de una base pirimidínica por otra) son más probables que las transversiones (sustitución de una base púrica por una base pirimidínica). Una mayor probabilidad de transiciones frente a transversiones es lógica en el contexto de mutación por error en la replicación del ADN.

Cuando dos secuencias comienzan a divergir se producen en ellas acumulaciones de sustituciones de nucleótidos. Si el grado de divergencia de dos secuencias es bajo, también lo es la probabilidad de que haya sucedido más de un cambio en un mismo sitio, por lo que el número de sustituciones observadas debe estar cercano al número real de sustituciones ocurridas. Cuando el grado de divergencia es alto es más probable que haya tenido lugar sustituciones múltiples en un mismo sitio (Li y Graur, 2000). El número de sustituciones suele expresarse en número de sustituciones por sitio. La velocidad de sustitución es el

número de sustituciones por sitio que ocurren en un año. Aquellos genes que presentan una velocidad de sustitución constante a lo largo del tiempo se consideran relojes moleculares. Una vez calculada la distancia para cada par de secuencias según el modelo elegido, se construye una matriz cuadrada de distancias a la que se pueden aplicar distintos algoritmos que permiten inferir filogenias, entre ellos los más empleados son, UPGMA (unweighted pair-group average method), sólo válido si los datos se ajustan a un reloj molecular, y “Neighbor joining” que construye árboles mediante el agrupamiento sucesivo de especies de manera que la distancia entre cada par de especies es la suma de la longitud de las ramas que las conectan (Saitou y Nei, 1987). Este método no asume un reloj molecular.

2.2.2.3.2 Métodos basados en el criterio de Parsimonia.

El alineamiento de las secuencias es especialmente importante en este método, puesto que el análisis de las similitudes entre secuencias se evalúa posición a posición. La localización de las especies en el árbol filogenético, se basa en los caracteres significativos (aquellos que favorecen la elección de unos árboles sobre otros al aplicar el criterio de máxima parsimonia) y no en una distancia global estimada con respecto a las demás especies en el análisis, como sucede en los métodos de distancias. Se requiere un mínimo de cuatro taxones para trabajar con este método. Cuando el número de taxones a estudiar no sobrepasa los 10 puede realizarse una búsqueda exhaustiva, que consiste en la generación de árboles bifurcados con todas las combinaciones posibles de taxones en sus ramas. Cada carácter (posición en el alineamiento) es evaluado en cada uno de los árboles para determinar el número de sustituciones que son necesarias para explicar la distribución de los taxones en cada árbol. De todos los posibles árboles generados, se escoge el más parsimonioso, es decir aquel en el que la suma total -una vez analizadas todas las posiciones del alineamiento- del número de sustituciones requeridas en sus ramas para dar lugar al árbol, sea la mínima (Forey et al. 1991). Para un número mayor de secuencias la generación y análisis del enorme número de árboles posibles se hace inabordable, de forma que se emplean distintos métodos de búsqueda. Los métodos más utilizados son las aproximaciones heurísticas, que consisten en la selección de un árbol inicial que se reorganiza mediante el intercambio de ramas (“Branch-swapping”), seleccionando aquel cuya longitud sea mínima.

En los árboles generados por Parsimonia sólo es importante el orden de ramificación. En esta aproximación la longitud de las ramas no expresa distancia evolutiva. Este método no requiere asumir un proceso evolutivo “a priori”.

2.2.2.3.3 Métodos de estimación de probabilidad. Máxima verosimilitud.

Consiste en seleccionar la hipótesis (árbol evolutivo) que hace máxima la probabilidad de que los datos observados (secuencias) hayan ocurrido. Requiere un conjunto de datos y un modelo probabilístico del proceso evolutivo. El modelo debe dar cuenta de la conversión de una secuencia en otra. A partir de los parámetros del modelo, que pueden ser determinados por el investigador o bien estimados a partir de los datos, se calcula la probabilidad de esta conversión.

Los modelos de máxima verosimilitud coinciden con los de parsimonia en que se generan árboles que son evaluados por un criterio de optimización, en este caso mediante su verosimilitud. En la evaluación de la verosimilitud intervienen los parámetros de probabilidad de sustitución de un nucleótido por otro y longitud de las ramas. Puesto que se asume que cada sitio evoluciona independientemente, se calcula por separado la verosimilitud de cada árbol para cada posición. Después se combinan las verosimilitudes en un valor total. El resultado es estadísticamente consistente y será tan bueno como lo sean las ideas asumidas en el modelo evolutivo (Felsenstein, 1981).

2.3 ANÁLISIS QUÍMICO

2.3.1 Utilización de los metabolitos secundarios en taxonomía.

La quimiotaxonomía consiste en la delimitación de taxones y su ordenamiento utilizando características químicas. En un sentido amplio quedan incluidas las sustancias producidas por el metabolismo primario y secundario (Hawksworth et al., 1995).

Existen en la literatura muchas definiciones de metabolito secundario que difieren unas de otras fundamentalmente en el momento de definir la funcionalidad de los mismos. La definición dada por la última edición del diccionario de los hongos (Hawksworth et al., 1995) es muy general y engloba a todos aquellos compuestos que no son intermediarios esenciales del metabolismo central y que suelen encontrarse constituyendo mezclas de

compuestos muy relacionados entre sí. Los distintos metabolitos secundarios, en contraste con los productos del metabolismo primario, no son esenciales para los procesos celulares y su aparición se encuentra restringida a unos pocos organismos, y en muchos casos sólo a algunas de sus células (Rogers, 1989). El hecho de no ser moléculas esenciales hace de los metabolitos secundarios unas dianas importantes sobre las que pueden actuar procesos evolutivos y coevolutivos (Frisvad, 1994). Los metabolitos secundarios son, por tanto, potencialmente útiles en taxonomía.

La quimiotaxonomía basada en metabolitos secundarios ha sido especialmente explotada en plantas y líquenes y en mucha menor medida en otros hongos y bacterias.

2.3.1.1 Uso de los metabolitos secundarios en la taxonomía de hongos liquenizados.

Los ascomicetos liquenizados son bien conocidos por la producción de las llamadas sustancias liquénicas. La química de las sustancias liquénicas ha sido empleada como uno de los criterios de clasificación de hongos liquenizados junto con otros criterios de naturaleza morfológica, ecológica y biogeográfica (Hafellner, 1988).

Sin embargo el valor de los caracteres químicos en la taxonomía de líquenes ha sido causa de debate durante más de un siglo. Han sido tres los principales puntos sobre los que se ha centrado el debate: a) cuáles son las variaciones que deben considerarse, es decir, si son más importantes las variaciones en los productos finales o bien en las rutas biosintéticas que dan lugar a ellos, y b) cuál es la validez taxonómica de las sustancias liquénicas por sí solas, especialmente en aquellos casos en los que aparece variación química pero no hay variación morfológica, y c) a qué nivel taxonómico se obtiene resolución mediante el análisis de las variaciones en estas sustancias.

Bu'Lock (Mantle, 1994), Rogers (1989) y Frisvad (1994) coinciden en su apreciación de que los caracteres quimiotaxonómicos importantes son las rutas biosintéticas y no los pequeños cambios en los productos finales de una misma ruta.

Feige y Lumbsch (1995) están en desacuerdo con Rogers respecto a este tema y piensan que la presencia esporádica de sustancias procedentes de distintas rutas es de menor importancia que las variaciones en una misma ruta. Consideran que hay que evitar las generalizaciones y tener en cuenta que la evolución del metabolismo secundario puede ser diferente en los distintos grupos de líquenes.

Culberson y Culberson (1970) conceden una gran importancia a las sustancias liquénicas en la taxonomía de estos organismos a muy diferentes niveles. En sus análisis se observa

que algunos géneros y familias bien definidas morfológicamente muestran una química uniforme y considera que en los casos donde no hay correlación con variaciones de otra naturaleza, los caracteres químicos son suficientes para delimitar especies crípticas (aquellas que son genéticamente distintas pero morfológicamente iguales) (Culberson, 1986). Rogers, en contraposición, considera que las diferencias en la producción de metabolitos secundarios en ascomicetos liquenizados no tienen siempre una base genética sino también ecológica, e igualmente, aunque hubiera una base genética que explicara un cambio en un producto final, ésta podría representar la variación de un solo gen. El concepto biológico de especie es difícil de aplicar en muchos líquenes puesto que la reproducción asexual es más común que la sexual. Aún así Rogers considera que la aplicación del concepto tipológico de especies no debe ser tan rígida como para que no permita variación alguna. Una diferencia en uno o varios genes podría ser demasiado pequeña para justificar el reconocimiento de especies diferentes. La concesión del rango de especie quedaría justificado si la química se correlaciona con variaciones morfológicas, fisiológicas y de otra naturaleza, o bien si estuviera involucrada más de una ruta biosintética mayoritaria (Rogers, 1989).

A pesar de la cada vez más abundante información sobre la química de líquenes, sigue habiendo posiciones encontradas (Feige y Lumbsch, 1995). Algunos autores reconocen la validez de las variaciones químicas por si solas dándoles la categoría de cepa química, sin otorgar rango taxonómico, otros prefieren la distinción en el nivel de especie o subespecie, y en otros casos hay autores que ignoran por completo cualquier información basada en datos químicos (Hawksworth, 1976).

El cultivo del micelio producido a partir de la siembra de esporas en condiciones controladas ha permitido la obtención de una mayor cantidad de biomasa fúngica, lo cual favorece el proceso de extracción de metabolitos que pueden estar en concentraciones muy pequeñas. El desarrollo de tecnologías analíticas más precisas como es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) asociada a un detector que mide la absorbancia de los productos en un rango amplio de longitudes de onda (diode array), permite la obtención de patrones de metabolitos secundarios comparables entre individuos.

2.3.2 Metabolitos secundarios en la familia *Mycocaliciaceae*.

Los análisis químicos en especies de la familia *Mycocaliciaceae*, con fines taxonómicos, se han centrado en reacciones de color frente a determinados agentes químicos, de los

pigmentos presentes en el pedúnculo o en el excípulo de sus cuerpos fructíferos (Santesson, 1973). El uso de esta técnica en este grupo de hongos se debe a su posición taxonómica tradicionalmente ligada a familias de hongos liquenizados. La primera mención acerca de la presencia de productos del metabolismo secundario en *Mycocaliciaceae* tiene lugar en 1984 (Tibell, 1984). *Mycocalicium sequoiae* y *Mycocalicium calicioides* son productoras de dos sustancias, ácido pinástrico y ácido vulpínico, detectados por TLC. El ácido vulpínico es una sustancia con actividad antibiótica ampliamente distribuida en las familias del antiguo orden Caliciales, *Caliciaceae*, *Coniocybaceae* y *Mycocaliciaceae*. El ácido pinástrico es un derivado del ácido vulpínico. Fue la primera vez que se señalaba la presencia de derivados del ácido vulpínico en hongos no liquenizados (Tibell, 1984). Los análisis químicos mediante TLC de extractos de cuerpos fructíferos de representantes de los géneros *Phaeocalicium*, *Chaenothecopsis* y *Stenocybe* no han mostrado la presencia de metabolitos secundarios reconocibles (Tibell, 1984). No se han identificado desde entonces nuevas sustancias en esta familia.

El cultivo de algunas especies sobre medios nutritivos ha permitido observar diversas pigmentaciones de los micelios obtenidos. El micelio de *Chaenothecopsis debilis* produce gradualmente pigmentos de color beige, rosa pálido y rojizo (Tibell, 1995). *Chaenothecopsis viridireagens* presenta cambios en su pigmentación, desde rosa pálido a violeta, marrón rojizo y negro (Tibell, 1992). *Chaenothecopsis savonica* produce una pigmentación rosa pálido (Tibell, 1991b). Los cuerpos fructíferos de *Chaenothecopsis haematopus* y el micelio resultante del cultivo de sus ascosporas fueron extraídos con acetona obteniéndose por TLC ocho sustancias no identificadas. Tres de ellas se encontraron tanto en los apotecios como en el extracto del cultivo. En los apotecios se observaron, sin embargo, dos pigmentos rojizos que no se produjeron en el cultivo (Tibell y Constantinescu, 1991).

Möller describió la producción en grandes cantidades de un pigmento rojizo en el micelio cultivado que también aparece de forma natural en el pedúnculo y excípulo de *Mycocalicium subtile* (Tibell, 1990). *Mycocalicium albonigrum* produce un pigmento rojo intenso a los 10 días de cultivo a partir de una ascospora (Tibell, 1990). La estructura química de estos pigmentos no se ha resuelto hasta el momento.

Otras técnicas más modernas como HPLC, Espectrometría de masas (MS) o Resonancia magnética nuclear (RMN), no se han utilizado hasta ahora en la caracterización química de compuestos de interés taxonómico en esta familia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico.

El material de herbario y los cultivos de hongos representantes de la familia *Mycocaliciaceae* han sido proporcionados por el Dr. Leif Tibell del departamento de Botánica Sistemática de la Universidad de Uppsala, Suecia. Los especímenes de referencia se guardan en el herbario del Museo Botánico de la Universidad de Uppsala (UPS) y los cultivos se conservan en la colección de cultivos de hongos de la universidad de Uppsala (UPSC).

Los ejemplares empleados para cada estudio se describen en los apartados correspondientes de resultados.

2. Métodos de extracción de ADN.

Los métodos empleados han sido distintos según se trate de la extracción de ADN a partir de cultivos frescos o bien a partir de cuerpos fructíferos y esporas.

2.1 A partir de cultivos (Möller et al., 1992).

El ADN es extraído partiendo de una cantidad de 100-200 mg de micelio fresco o bien 30-60 mg de micelio liofilizado. Este método de extracción se basa en la formación de complejos N-cetil-N-N-N-trimetil-amonium-bromide (CTAB)-ADN. El CTAB es un detergente catiónico que se une a las moléculas de ADN. Dependiendo de la concentración salina presente en la solución, los complejos CTAB-ADN estarán solubles o precipitarán. Mientras estos complejos se mantienen solubles se precipitan proteínas y polisacáridos presentes en el extracto. Una vez eliminados, se deshace la unión CTAB-ADN y se precipita el ADN con isopropanol. El procedimiento empleado fue el siguiente: El micelio fresco o liofilizado se homogeneizó dentro del tubo eppendorf, con ayuda de una varilla estéril y nitrógeno líquido. El material se resuspendió en 500 µl de tampón TES (100mM Tris, pH 8.0, 10mM EDTA, 2% SDS),

y 100 µg de Proteinasa K (Boehringer). La combinación SDS/Proteinasa K permitió la inactivación de las proteínas en el extracto durante una incubación de 60 minutos a 60° C. La concentración de sal se ajustó hasta 1.4M con NaCl 5M. Posteriormente se añadió a la mezcla 1/10 de volumen de CTAB al 10%, y se incubó durante 10 minutos a 65°C, para favorecer la formación de los complejos CTAB-ADN y la precipitación de polisacáridos ácidos. Se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (en proporción 24 : 1) y se mezcló suavemente. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo para facilitar la precipitación de proteínas y otros restos celulares. Para favorecer la sedimentación de los residuos, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm en una centrífuga de mesa Beckman Microfuge TM 11. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio al que se añadió 225 µl de acetato amónico 5M, mezclando suavemente. Con objeto de liberar el ADN del detergente esta mezcla se incubó en hielo durante un tiempo mínimo de 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm a una temperatura de 4° C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo donde se añadieron 0.55 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN. Esta mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y el ADN precipitado se limpió con 70% de etanol frío. El ADN limpio se secó en un desecador Speed Vac DNA 110 SAVANT, durante 5 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua esteril.

2.2 A partir de cuerpos fructíferos y esporas (Grube et al., 1995).

Como material de partida se tomó 5-10 apotecios, los cuales fueron triturados, en presencia de nitrógeno líquido con un microémbolo previamente enfriado, hasta conseguir un polvo fino. Una vez evaporado el nitrógeno líquido se añadieron 50 µl de tampón de guanidina (isotiocianato de guanidina 4M, Tris : ClH 0.1M pH 7.5) para permitir la resuspensión del material. La mezcla se incubó a 65°C durante 10 minutos con agitación suave y esporádica. Posteriormente se centrifugó durante dos minutos en una microcentrífuga a 12.000 r.p.m.. El sobrenadante se guardó y el sedimento se extrajo del mismo modo combinando después los dos sobrenadantes recogidos. Los sobrenadantes se trataron con un volumen de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se centrifugó la emulsión durante 10 minutos. El sobrenadante y se extrajo con cloroformo:alcohol isoamílico (24: 1). A partir de una nueva

centrifugación de la mezcla anterior se tomó el sobrenadante al que se añadieron tres volúmenes de NaI 6M y 2-3 μ l de "glassmilk" (Geneclean II Bio 101). La mezcla se mantuvo a 4°C durante un tiempo mínimo de 5 minutos y se centrifugó durante 5 segundos para precipitar el "glassmilk". El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 200 μ l de etanol 80% a -20°C. Se volvió a centrifugar, eliminando el sobrenadante y repitiendo el paso de lavado del sedimento con etanol. Una vez eliminado el sobrenadante, se secó el sedimento y posteriormente se resuspendió el ADN separándolo del "glassmilk" en 20 μ l de agua estéril. Para sedimentar el "glassmilk" y se centrifugó la mezcla, tomando el sobrenadante donde se encuentra el ADN limpio.

3. Cálculo de la concentración de ADN extraído.

El cálculo se realizó midiendo la absorbancia de la solución de ADN a 260 nm en un espectrofotómetro UNICAM 8700. La concentración se calculó sabiendo que una unidad de densidad óptica corresponde a 50 μ g de ADN/ml. El cociente entre las densidades ópticas medidas a 260 y 280 nm indica la pureza de la muestra. Para una preparación de ADN este valor debe ser de aproximadamente 1.8. Un valor menor indica posible contaminación con proteínas.

Generalmente la concentración de ADN obtenida tras la extracción a partir de cuerpos fructíferos es tan pequeña que no puede ser correctamente detectada por este método. En este caso se procedió directamente a la amplificación tomando distintas diluciones de partida.

4. Amplificaciones por PCR.

4.1 Protocolos para la amplificación de las distintas regiones del ADNr.

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 100 μ l, en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. El enzima empleado fue Amplitaq DNA polimerasa (Perkin Elmer) 5 Unidades por μ l, junto con el tampón 10X y la solución 25mM de MgCl₂ suministrados por el proveedor del enzima. Los dNTP`s fueron

sumistrados por Boehringer en soluciones independientes de concentración 100mM. Se prepararon soluciones madre de los cuatro dNTP's a una concentración 20mM, de las que se obtuvieron soluciones de uso a 2mM. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Med Probe y suministrados como liófilos. Se preparó una solución madre a 50µM. El agua y otros materiales como tubos y puntas de pipetas fueron esterilizados en autoclave.

4.1.1 Región ITS1-5.8S-ITS2.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (µl)</i>	<i>Concentración final</i>
Tampón 10X	10	1x
Solución dNTP's 2mM	5	0.1mM
MgCl ₂ 25mM	6	1.5 mM
Oligonucleótido ITS4 50µM	1	0.5 µM
Oligonucleótido ITS5 50µM	1	0.5 µM
Amplitaq ADN polimerasa 5U/µl	0.5	2.5 U

La amplificación de esta región del ADN se realizó en 30 ciclos, cada uno de ellos dividido en tres pasos sucesivos: un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, seguido del apareamiento de los nucleótidos, realizado a 53°C durante 30 segundos y por último una fase de extensión desarrollada a 72°C durante un minuto.

Previamente a los ciclos la reacción fue sometida a una temperatura de 95°C durante 3 minutos para favorecer la desnaturalización del ADN genómico, y posteriormente a los ciclos se mantuvo una temperatura de 72°C durante 10 minutos que permite finalizar la extensión en aquellos productos de PCR donde la polimerización no hubiera finalizado.

4.1.2 Gen 28S ADNr.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (μl)</i>	<i>Concentración final</i>
Tampón 10X	10	1x
Solución dNTP's 2mM	5	0.1mM
MgCl ₂ 25mM	8	2 mM
Oligonucleótido LR0R 50 μ M	1	0.5 μ M
Oligonucleótido LR7 50 μ M	1	0.5 μ M
Amplitaq ADN polimerasa 5U/ μ l	0.5	2.5 U

La amplificación de la mitad 5' de este gen se realizó en 40 ciclos. Cada ciclo se estableció en, 92°C durante un minuto, 43°C durante un minuto y 72°C durante dos minutos, en los pasos de desnaturalización, apareamiento de los oligonucleótidos y extensión respectivamente. También se realizó un paso previo de desnaturalización a 92°C durante 3 minutos y un paso posterior de extensión a 72°C durante 10 minutos.

4.1.3 Gen 18S ADNr.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (μl)</i>	<i>Concentración final</i>
Tampón 10X	10	1x
Solución dNTP's 2mM	5	0.1mM
MgCl ₂ 25mM	8	2 mM
Oligonucleótido NS17UCB 50 μ M	1	0.5 μ M
Oligonucleótido NS24UCB 50 μ M	1	0.5 μ M
Amplitaq ADN polimerasa 5U/ μ l	0.5	2.5 U

La amplificación de este gen se realizó en 30 ciclos. Cada ciclo se estableció en, 95°C durante 30 segundos, 48°C durante un minuto y 72°C durante dos minutos, en los pasos de desnaturalización, apareamiento de los oligonucleótidos y extensión respectivamente. También se realizó un paso previo de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos y un paso posterior de extensión a 72°C durante 10 minutos.

4.2 Oligonucleótidos cebadores empleados en la amplificación y secuenciación por PCR.

Los oligonucleótidos cebadores empleados en las reacciones de amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y las regiones espaciadoras han sido los siguientes (White et al., 1990):

4.2.1 Región ITS1-5.8S-ITS2.

Amplificación

ITS5 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'

ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Secuenciación manual

ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

ITS2 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'

ITS3 5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'

Secuenciación automática.

Los oligonucleótidos empleados en la secuenciación automática fueron los mismos con los que se amplificó el fragmento de ADN, es decir, ITS4 e ITS5.

4.2.2 Gen 28S ADNr.

Amplificación

LROR 5' GTACCCGCTGAACTTAAGC 3'

LR7 5' TACTACCACCAAGATCT 3' (Vilgalys y Hester, 1990).

Secuenciación automática

Se emplearon los oligonucleótidos LR0R y LR7, además de los siguientes oligonucleótidos cebadores internos (modificados en su secuencia para una mejor adaptación a la secuencia de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*):

JS5m 5' TCTTGAAACACGGACCA 3', modificación del oligonucleótido JS5 (Landvik, 1996).

JS5mR (secuencia complementaria de JS5m) 5' TGGTCCGTGTTTCAAGA 3'

P2m 5' AGATGAAAAGCACTTTGGAAGAG 3' ' modificación del oligonucleótido P2 (Guadet et al., 1989).

4.2.3 Gen 18S ADNr.

Amplificación (Gargas y Taylor, 1992).

NS17UCB 5' CATGTCTAAGTTTAAGCAA 3'

NS24UCB 5' AAACCTTGTTACGACTTTTA 3'

Secuenciación automática (Gargas y Taylor, 1992).

NS18UCB 5' CTCATTCCAATTACAAGACC 3'

NS19UCB 5' CCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC 3'

NS20UCB 5' CGTCCCTATTAATCATTACG 3'

NS21UCB 5' GAATAATAGAATGGGACG 3'

NS22UCB 5' AATTAAGCAGACAAATCACT 3'

NS23UCB 5' GACTCAACACGGGGAAACTC 3'

En algunos casos la presencia de inserciones en la secuencia del gen interrumpió los sitios de unión de estos oligonucleótidos y fue necesario emplear un nuevo conjunto de oligonucleótidos.

NS2 5' GGCTGCTGGCACCAGACTTGC 3'

NS3 5' GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 3'

NS4 5' CTTCCGTCAATTCCTTTAAG 3'

NS5 5' AACTTAAAGGAATTGACGGAAG 3'

NS6 5' GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC 3'

NS7 5' GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC 3' (White et al., 1990).

4.3 Localización de los oligonucleótidos cebadores en el ADNr.

La localización de los oligonucleótidos queda esquematizada en las figuras 11 y 12.

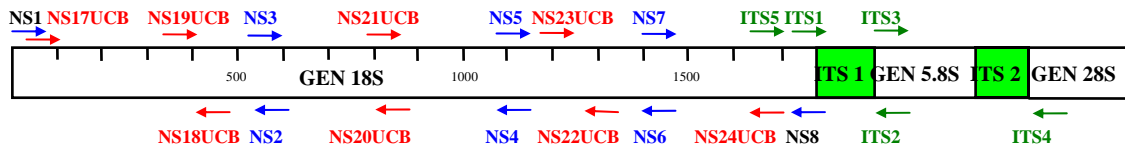


Figura 11. Localización de los oligonucleótidos en la subunidad pequeña (18S) del ADNr y en el gen 5.8S con las regiones espaciadoras (ITS).

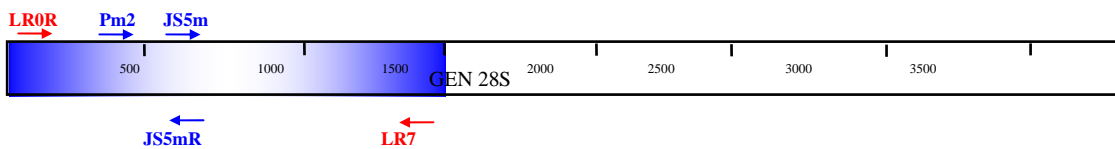


Figura 12. Localización de los oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la mitad 5' del gen 28S codificante para la subunidad grande del ribosoma.

4.4 Seguimiento mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de concentración variable (0.7-1.4%) en función del tamaño de los productos. El tampón de electroforesis empleado fue TAE 1x (Tris: acetato 0.04M pH 8.0, EDTA 0.001M) y el tampón de carga 6x contenía 0.25% de azul de bromofenol y sacarosa 40% (p/v) en agua (Sambrook et al. 1989). La electroforesis se realizó a 80V proporcionados por una fuente de electroforesis GPS 200/400 de Pharmacia LKB, durante 1-2 horas. El ADN se visualizó mediante la tinción del gel con bromuro de etidio (1µg/ml) durante 15 minutos, seguido de la iluminación del gel teñido con luz ultravioleta en un transiluminador UVP TM20. Las fotografías de los geles se obtuvieron con la cámara Polaroid MP-4 y películas Polaroid 667 iso 3000.

5. Purificación de fragmentos de ADN.

El grado de limpieza de los productos de PCR es importante para obtener una buena secuencia. Los métodos de limpieza empleados, fueron distintos según se tratara de secuenciación manual o secuenciación automática.

Para la secuenciación manual se empleó el tratamiento de limpieza de productos de PCR recomendado para la secuenciación con Thermosequenase, suministrado por Amhersam. Este tratamiento se basaba en el uso de dos enzimas, exonucleasa I y fosfatasa alcalina, que se añadían a los productos de PCR en la concentración de 10 unidades de exonucleasa y 2 de fosfatasa por cada 5 μ l de producto, seguido de una incubación a 37°C durante 15 minutos. La exonucleasa rompe fragmentos de ADN de cadena simple y por tanto digiere los restos de oligonucleótidos. Los dNTP's son neutralizados por efecto de la fosfatasa alcalina.

Posteriormente se procedió a la inactivación de estas enzimas mediante una incubación a 80°C durante 15 minutos.

La limpieza de fragmentos empleados para su secuenciación automática se realizó con GeneClean II (Bio101). Este tratamiento permite la purificación de fragmentos en disolución y en gel de agarosa. El procedimiento de limpieza se realizó según las instrucciones del proveedor. Este método se basa en la unión específica del ADN de tamaño superior a 200 pb a unas bolitas de vidrio ("glassmilk") que precipitan, permitiendo eliminar en el sobrenadante cualquier impureza presente, así como el tampón de la reacción de PCR, oligonucleótidos, *Taq* polimerasa y dNTP's.

6. Digestión con enzimas de restricción para la obtención de patrones polimórficos ("RFLP's", restriction fragments length polymorphism).

Las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por Promega y se emplearon según las indicaciones del proveedor.

En la Tabla 1 se muestran las enzimas empleadas y la secuencia de los sitios que reconocen.

Enzimas	<i>Ava II</i>	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Cfo I</i>	<i>Nci I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Taq I</i>
Secuencias Diana 5'- 3'	G G(A/T)CC CC(A/T)G G	GG CC CC GG	G ANTC CTNA G	GCG C C GCG	CC (C/G)GG GG(C/G) CC	GT AC CA TG	T CGA AGC T

Tabla 1. Dianas de restricción reconocidas por las enzimas empleadas en el análisis. Las letras en negrita indican los nucleótidos detrás de los cuales se produce el corte.

Los patrones de restricción se obtuvieron realizando electroforesis en minigeles verticales de poliacrilamida (acrilamida : N-N' metilenbisacrilamida 29:1 (BioRad)) al 8%, en tampón TAE 1x. Se utiliza TEMED (BioRad) como catalizador de la reacción de polimerización de la acrilamida y persulfato amónico 10% (BioRad), como iniciador de la reacción. Las electroforesis se realizaron a 50V durante 2 horas. La visualización de los fragmentos de ADN se consiguió mediante la tinción del gel con bromuro de etidio (1µg/ml) durante 5 minutos.

7. Secuenciación de los productos de PCR. Secuenciación cíclica.

7.1 Manual: Se utilizó el método de secuenciación cíclica por PCR utilizando el enzima Thermosequenase (Ahmersham Life Sciences), según las instrucciones del proveedor. El resultado de las reacciones de secuenciación se cargaron en un gel desnaturizante de acrilamida al 6% y se sometieron a un campo eléctrico de 70 watos y a una temperatura de 60°C, en presencia de tampón TBE (Tris-borato 0.09M pH 8.0, EDTA 0.002M). Las muestras se calentaron a 90°C durante 3 minutos antes de ser cargadas para evitar la formación de estructuras secundarias. Se realizó una carrera corta y una larga con cada muestra, finalizando cada carrera con la llegada del frente de azul de bromofenol al final del gel.

7.2 Automática: Se empleó el método de secuenciación cíclica por PCR con terminadores de d-rhodamina (Perkin Elmer). Se emplearon dos métodos para la lectura de la secuencia. Electroforesis capilar con el equipo ABI PRISM 310 y electroforesis en gel de acrilamida desnaturizante con el equipo ABI PRISM 377 ambos de Perkin Elmer.

Todas las secuencias obtenidas han sido depositadas en la base de datos de acceso público Genbank, y sus números de acceso se especifican en cada apartado en sus tablas de muestras correspondientes.

8. Bioinformática.

8.1 Obtención de secuencias a partir de bases de datos: Genbank.

La gran cantidad de información obtenida con el incremento de la capacidad de secuenciación de distintas regiones del genoma en una gran variedad de organismos, se encuentra depositada en bases de datos de libre acceso. En el estudio de localización de la familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de hongos ascomicetos, se tomaron del banco de secuencias Genbank, las secuencias de los genes 18S y 28S de representantes de las distintas clases de ascomicetos actualmente reconocidas. Así mismo se obtuvieron secuencias de esta base de datos que se emplean como "outgroups", para enraizar árboles filogenéticos. El código de acceso de las secuencias se indica en las tablas de muestras que preceden a cada estudio.

El acceso a Genbank se ha realizado a través de Internet mediante NCBI (National Centre for Biotechnology Information).

La dirección de acceso es: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

8.2 Obtención de secuencias completas y corregidas de los hongos objeto de estudio: Ensamblaje DNASTAR.

Como consecuencia del proceso de secuenciación de una región de ADN con distintos oligonucleótidos localizados en ambas cadenas, se obtiene una gran cantidad de secuencias parciales que deben ser ensambladas para conseguir la secuencia correcta del fragmento a estudiar. Las secuencias parciales son tratadas con el programa EDITSEQ del paquete de programas DNASTAR (1994). Todas las secuencias parciales que conforman un mismo gen se tratan en el programa SEQMAN. Este programa compara y solapa las secuencias parciales en ambas cadenas para conseguir el gen o región completa, localizada entre los dos oligonucleótidos empleados para la amplificación de ese fragmento.

8.3 Alineamientos.

Los alineamientos fueron realizados con ayuda del programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Todos los alineamientos fueron repasados visualmente y modificados para su presentación con el editor de alineamientos múltiples de secuencias GENEDOC.

Estos programas pueden obtenerse por Internet en las siguientes direcciones :

Clustal W versión 1.6 1996: <ftp.embl-Heidelberg.de> (en el directorio pub/software)

GeneDoc versión 2.0.4 1997: <http://www.cris.com/Ketchup/genedoc.shtml>

En regiones muy conservadas pudo tenerse en cuenta la información derivada de la estructura secundaria de regiones homólogas en *Saccharomyces cerevisiae*. Las inserciones localizadas en el interior de los genes ribosómicos, fueron excluidos del alineamiento. Su presencia o ausencia se trató posteriormente como información adicional a los árboles filogenéticos.

8.4 Análisis filogenéticos.

Se han empleado programas pertenecientes a cada una de las tres aproximaciones principales a la estimación de relaciones filogenéticas.

8.4.1 Método de distancias.

A partir de las secuencias alineadas se generó una matriz de distancias empleando para ello el programa DNADIST. Esta matriz puede ser calculada a partir de distintos algoritmos a elegir según el modelo evolutivo que queramos asumir. Se empleó el método de los "dos parámetros de Kimura" que permite distintas tasas de cambio de nucleótidos según se tratara de transiciones o transversiones. Los "gaps" son considerados como nucleótidos desconocidos.

A partir de la matriz de distancias se generó un árbol filogenético, empleando el método de "Neighbor Joining" desarrollado por Saitou y Nei (1987), que consiste en el agrupamiento sucesivo de los organismos generando un árbol sin raíz en el que se minimiza la longitud total de las ramas del mismo. Se empleó la opción NEIGHBOR del conjunto de programas filogenéticos PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.5C (Felsenstein, 1993). Este conjunto de programas se distribuye a través de Internet en la siguiente dirección : <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

8.4.2 Parsimonia.

Se empleó la opción DNAPARS del conjunto de programas filogenéticos PHYLIP.

Las premisas asumidas por este programa son las siguientes:

- Cada posición en la secuencia evoluciona independientemente.
- Un "gap" se trata como un quinto nucleótido. Un "gap" de n nucleótidos suponen n cambios de nucleótidos, debido a la independencia evolutiva de cada posición asumida anteriormente.
- Los distintos taxones evolucionan independientemente, es decir, no acepta la existencia de fenómenos de transferencia horizontal o lateral de genes.
- La sustitución de un nucleótido en una posición del alineamiento sucede con una probabilidad pequeña.
- La cantidad de cambios que podemos esperar en una rama del árbol es menor que dos cambios en una rama de alta velocidad de cambio o 1 cambio en una rama de baja velocidad.
- La cantidad de cambio esperado no es tan variable entre posiciones como para que la ocurrencia de dos cambios en un mismo sitio sea más probable que un cambio en otro sitio.

Se pidió al programa una entrada al azar de las secuencias de 10 formas distintas, y la realización de reordenamientos globales

8.4.3 “Parsimony Jackknifing” versión 4.22 (Farris et al., 1995)

Este programa está basado en la selección de árboles por el criterio de parsimonia. Por tanto reconoce y trabaja sólo con sitios significativos. El programa lleva asociado un análisis de consistencia de tipo "jackknife". Es un método semejante a “bootstrap”, pero en este caso los nuevos conjuntos de datos generados son de menor tamaño que el original, puesto que se originan mediante muestreo sin reemplazamiento. Esto reduce enormemente el tiempo de computación. El punto de corte para la estimación de la confianza se estableció en el 50% y fueron 10000 el número de replicaciones realizadas.

8.4.4 Máxima verosimilitud.

Se empleó la opción DNAML del conjunto de programas filogenéticos PHYLIP. Los alineamientos son transformados en una matriz de distancias con un algoritmo específico. Este programa permite introducir un valor relativo de transiciones frente a transversiones y calcula empíricamente la frecuencia de cada base.

El modelo evolutivo asumido por este programa es el siguiente:

- Cada posición en la secuencia evoluciona independientemente.
- Los distintos taxones evolucionan independientemente, es decir no acepta la existencia de fenómenos de transferencia horizontal o lateral de genes.
- La sustitución de un nucleótido en una posición del alineamiento sucede con una probabilidad que podemos especificar.
- Todas las posiciones del alineamiento se incluyen en el análisis.
- Un "gap" se trata como un nucleótido desconocido. Un "gap" de n nucleótidos suponen n nucleótidos desconocidos, debido a la independencia evolutiva de cada posición asumida anteriormente.

DNAML solo se utilizó en el análisis intraespecífico de *Mycocalicium subtile* que contiene 19 secuencias con una longitud de alineamiento de 599 posiciones. En el resto de los análisis en los que el número de secuencias o la longitud de las mismas es mayor, no pudimos realizar esta aproximación, debido a las limitaciones técnicas de los equipos informáticos disponibles para realizar reconstrucciones filogenéticas con este programa.

Entre los parámetros modificables se ajustaron los siguientes:

Entrada aleatoria de las secuencias en el análisis de 10 formas distintas.

Efectuar reordenamientos globales.

Fijar una sola categoría de sustitución.

Estimar empíricamente la frecuencia de cada base.

Fijar el cociente de transiciones/transversiones en 2.

8.5 Análisis de consistencia por “Bootstrap”.

Este método ha sido empleado para calcular los índices de soporte de los árboles obtenidos mediante NEIGHBOR, DNAPARS y DNAML.

Se han empleado 1000 replicaciones para los análisis de distancias y 100 para los basados en parsimonia y máxima verosimilitud. El programa DNAPARS y sobretodo

DNAML están basados en algoritmos de desarrollo muy lento, por lo que la generación de 1000 conjuntos de datos genera operaciones más costosas en tiempo, a medida que se utiliza un mayor número de secuencias y que éstas son más largas.

8.6 Enraizamiento de los árboles obtenidos.

Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de los distintos programas del paquete PHYLIP son gráficos sin raíz. El tratamiento y presentación de los árboles filogenéticos obtenidos a través de los distintos métodos de inferencia se realizó con ayuda del programa TREEVIEW versión 1.6 (Page, 1996), al que se puede acceder por Internet a través de la siguiente dirección: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

9. Análisis de patrones de metabolitos secundarios producidos por hongos representantes de la familia *Mycocaliciaceae*.

9.1 Condiciones de cultivo.

Las siembras se realizaron por triplicado en el medio MEYE* (Extracto de malta 10g/L; extracto de levadura 4 g/L; agar 15 g/L) suplementado con un 10% de sacarosa (MEYE*10S), a partir de 2 ml de inóculo homogeneizado de cada cultivo. Estos inóculos proceden del crecimiento en medio MEYE* líquido durante un mes a 18°C de cada una de las especies empleadas. La siembra en medio líquido se realizó en botellas de cultivo celular Corning 25cm²/"tissue culture flask", colocando 3 ml de medio y 2 ml de inóculo. La siembra en medio sólido se realizó extendiendo con un asa de siembra 2 ml de inóculo sobre 10 ml de medio MEYE* con 15% de agar en una placa Petri de 5.5 cm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron durante 2 meses a 18°C

9.2 Preparación de las muestras y extracción.

Los cultivos fueron sometidos a liofilización en un equipo Flexi Dry MP (FTS Systems). Posteriormente fueron extraídos con 30ml de metanol 100%. Los extractos se evaporaron en Speed Vac AES 2000 (Savant) y se resuspendieron a una concentración de 0.4g de extracto seco/ml metanol 100%, para ser inyectadas en HPLC. En cada muestra se introdujo 0.4µg/µl de hidroxibenzofenona, que actúa como patrón externo.

9.3 Generación de patrones de metabolitos por HPLC.

Se empleó un HPLC Alliance Waters 2690 con detector "photo diode array" Waters 996. La columna empleada fue de tipo Nucleosil 100 C18 5.5 µm 250 x 4.6 mm. Se inyectaron 40µl de cada muestra con un flujo de 0.8 ml/min. El gradiente empleado fue el siguiente:

Tiempo (minutos)	H ₂ O (0.1% TFA) %	Acetonitrilo %
0	80	20
5	80	20
30	0	100
40	0	100
43	80	20
45	80	20

Los cromatogramas se detectaron a una longitud de onda de 254nm. Se analizaron los picos mayoritarios eliminando aquellos cuya altura se detectó por debajo de 10000 µVoltios. Se identificaron los picos de todas las muestras mediante tiempo de retención, y su espectro de absorción adquirido entre 200 y 500nm.

Los patrones o conjuntos de picos que definen las muestras se introdujeron en una matriz, en la que se especificó además, en qué cantidad aparece cada pico en cada muestra, utilizando para ello el valor dado por el porcentaje de la altura de cada pico, respecto a la suma de alturas de todos los picos del cromatograma.

Las matrices son tratadas en análisis de agrupamiento.

9.4 Análisis multivariante de agrupamiento "clustering".

Este análisis se realizó empleando en paquete de programas BMDP, en el Centro de Cálculo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Se realizaron análisis de agrupamiento jerárquico y no jerárquico, analizando las distancias por los métodos de frecuencias, Jaccard y distancias binarias.

10. Análisis multivariante de componentes principales y de agrupamiento a partir de siete características morfológicas

Este análisis se realizó mediante el programa de análisis estadístico SPSS para Windows versión 7.5.

La reducción de factores se realizó mediante un análisis de componentes principales, seleccionando autovalores superiores a 1.

En el análisis de agrupamiento jerárquico el dendrograma se genera por el método de la media y los intervalos se miden en distancias euclídeas al cuadrado. El análisis de agrupamiento no jerárquico se realizó por el método de K- medias, siendo k (número de grupos que queremos obtener) un valor predefinido por nosotros. El análisis discriminante es un análisis complementario al de agrupamiento. Se realiza para verificar la estabilidad de las clases obtenidas generando un modelo lineal en función de una o varias de las variables. Las variables que forman el modelo lineal son seleccionadas por pasos.

DESARROLLO DEL TRABAJO

BLOQUE 1. Análisis de la variabilidad intraespecífica en *Mycocalicium subtile*. Búsqueda de congruencia entre aproximaciones genéticas, morfológicas, y químicas.

BLOQUE 2. Demarcación de los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* (*Mycocaliciaceae*).

BLOQUE 3. Localización de la familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de Ascomycota.

**BLOQUE 1. Análisis de la variabilidad intraespecífica en *Mycocalicium subtile*.
Búsqueda de congruencia entre aproximaciones genéticas, morfológicas, y químicas.**

1. Introducción

Mycocalicium subtile (Pers.) Szat. es una de las 10 especies reconocidas en el género *Mycocalicium* (*Mycocaliciaceae*) (Tibell, 1984). Es la especie tipo del género. Se trata de un hongo saprófito que se desarrolla sobre troncos secos de una gran variedad de árboles. Es característico en esta especie la presencia de un talo vegetativo poco o nada visible, por estar sumergido en el sustrato sobre el que vive. Su diminuto cuerpo fructífero es un apotecio de color negro y tamaño variable, que puede alcanzar hasta 1.6 mm de altura. Aquellos especímenes caracterizados por poseer un ascoma muy pequeño fueron reconocidos como un taxón diferente, denominado *Mycocalicium minutellum* (Ach.) Nádav (Poelt, 1969). En estudios morfológicos posteriores (Tibell, 1987b), se sugirió la inclusión de *M. minutellum* como sinónimo de *M. subtile*, ya que la dimensión del apotecio no se consideró característica suficiente para su delimitación como especie.

Su pedúnculo está constituido por hifas de color variable en tonos oscuros de marrón a verdoso, con disposición periclinal. Presenta ascas cilíndricas con un engrosamiento uniforme en la zona apical. Las ascas contienen 8 esporas unicelulares, de forma elipsoidal a fusiforme, y de tamaño variable comprendido en el rango de 5.5–9 X 2.3-5 μm (Tibell, 1975, 1987a). La dispersión de sus esporas es activa, por lo tanto no presenta mazedio.

El grado de desarrollo del excípulo es también variable. Se observan especímenes de excípulo fino, en los que las hifas que lo forman son delgadas, esclerotizadas y de disposición periclinal, ordenadas en un número pequeño de capas. En especímenes con excípulo más grueso, se pueden dar dos tipos de estructura, con variedad de formas intermedias. Uno de ellos consiste en un amplio entrelazamiento de hifas con paredes hinchadas. El otro tipo de estructura consta de filas de células cortas y cilíndricas con paredes ligeramente engrosadas.

M. subtile puede reproducirse de forma asexual a través de conidios desarrollados en el interior de picnidios (celomicetos). Estas estructuras se han observado tanto en la naturaleza, en las proximidades de los apotecios, como en colonias cultivadas en el laboratorio. El micelio de *M. subtile* cultivado en el laboratorio a partir de ascosporas o de conidios, produce, tras dos semanas de crecimiento, concentraciones variables de un

pigmento rojizo, el cual puede encontrarse también en los ascocarpos en estado natural, ocasionando una gradación de color en el excípulo y el pedúnculo (Tibell, 1990).

M. subtile puede aparecer ocasionalmente asociada a especies de los géneros *Calicium*, *Chaenotheca*, *Chaenothecopsis* y *Microcalicium* (todos ellos pertenecientes a familias del antiguo orden Caliciales s.l.).

Se trata de una especie ampliamente distribuida en zonas frías y templadas en ambos hemisferios. En Norteamérica se encuentra comúnmente sobre madera de coníferas, en troncos de *Picea*, *Pseudotsuga* y *Thuja*. En Europa es más frecuente sobre postes y vallas de madera vieja, en troncos de *Picea* y *Pinus* y más raramente en *Quercus* y *Betula* (Tibell 1975). En España sin embargo, casi siempre se describe sobre *Quercus* (Sarrión et al., 1993, 1999; Aragón y Martínez, 1997), aunque también se ha descrito sobre otros hospedadores: *Abies*, *Fraxinus*, *Juniperus*, *Olea*, *Sorbus* y *Taxus*. En Oceanía aparece habitualmente sobre *Eucalyptus* y *Nothofagus* (Tibell, 1987a).

No es una especie que requiera un sustrato específico, pero sí unas condiciones ecológicas concretas. *M. subtile*, al igual que otras especies de hongos y líquenes denominados calicioideos (antiguos Caliciales s.l.), se encuentran más frecuentemente sobre madera o troncos de bosques antiguos. Esto podría deberse en parte a la acidificación de la madera que tiene lugar en este tipo de bosques y a la tolerancia que muchos de estos hongos y líquenes muestran frente a este tipo de sustrato. Esta característica les permite competir con los macrolíquenes por el espacio (Hyvarinen et al., 1992).

La gran mayoría de estas especies de hongos calicioideos de amplia distribución no presentan variaciones apreciables entre las poblaciones (Tibell, 1987a). *M. subtile*, sin embargo, es una especie extremadamente variable con respecto a los tamaños de sus apotecios y esporas, a la estructura del excípulo y al color de las hifas que forman tanto el pedúnculo como el excípulo.

La variabilidad en la estructura del excípulo dio lugar a la formulación de una hipótesis acerca de la existencia de poblaciones susceptibles de constituir especies distintas (Tibell, 1987a). En ella se sugiere que poblaciones con distintas estructuras de excípulo podrían habitar distintas áreas geográficas o nichos. Sin embargo, el reconocimiento formal de estas poblaciones no se ha realizado, debido al gran número de especímenes con excípulos de características intermedias (Tibell, 1987a).

Así mismo, esta variabilidad en sus caracteres hace que sea una especie de difícil identificación y discriminación respecto a otras especies del mismo género, e incluso de

otros, especialmente respecto al género *Chaenothecopsis*, donde se encuentran especies de morfología muy semejante a *Mycocalicium*.

Mycocalicium albonigrum (Nyl.) Tibell, es un hongo saprófito muy parecido morfológicamente a *M. subtile*. Está incluido en el género *Mycocalicium* a pesar de no cumplir con todos los caracteres que definen al género, según la descripción de los géneros de *Mycocaliciaceae* realizada por Schmidt (Schmidt, 1970). Comparte características con *Mycocalicium* en cuanto a la anatomía del pedúnculo y el tipo de esporas. Su talo se encuentra sumergido en el sustrato sobre el que vive, siendo visible únicamente su cuerpo fructífero o apotecio. Este es de color negro con una altura comprendida en el rango 0.7-1.3 mm. Su pedúnculo está constituido por hifas de disposición periclinal de color marrón oscuro.

El excípulo, bien desarrollado en *M. albonigrum*, está constituido por grandes células isodiamétricas de pared fina organizadas en 2-4 capas celulares.

Sus ascas son cilíndricas y en estadios tempranos presenta un pequeño canal que atraviesa el engrosamiento apical, canal característico en el género *Chaenothecopsis* (Tibell, 1987a). Las esporas son unicelulares, de color marrón oscuro, de forma elipsoidal a ligeramente fusiforme y de tamaño variable en el rango de 6-8 X 3-3.5 μm (Tibell, 1987a).

M. albonigrum se ha descrito en el continente americano, y Oceanía. Se trata de una especie no específica de un determinado tipo de sustrato, y muestra preferencia por lugares expuestos (Tibell, 1987a).

En 1990 Tibell estudió los anamorfos de *M. subtile* y *M. albonigrum* con el objeto de encontrar nuevos caracteres que permitieran la discriminación entre estas dos especies. Los cultivos se obtuvieron a partir de una o varias ascosporas sobre distintos medios, a una temperatura de 20° C y un fotoperiodo de 12 horas de luz-oscuridad (Tibell, 1990).

La germinación de las ascosporas se observa en ambos casos a los dos días, comenzando con un hinchamiento de la espora, seguido por la pérdida de su pigmentación y la aparición de tubos germinativos. En las ascosporas de *M. subtile* aparece un septo transversal que no se observa en *M. albonigrum*. En ninguno de los casos se observó anastomosis entre las hifas.

El micelio de *M. subtile* a los 17 días de crecimiento muestra un abultamiento piriforme en algunas células de la parte terminal de las hifas y comienzan a dividirse adquiriendo al mismo tiempo una tonalidad marrón. Estas estructuras fueron interpretadas como clamidosporas, esporas unicelulares de origen asexual cuya función es la resistencia y no la dispersión. Se observó que aquellos cultivos que formaban numerosas clamidosporas,

desarrollaban pocos o ningún conidioma y viceversa. Se postuló que la formación de clamidosporas o de conidios podría estar determinada por la composición del medio nutritivo, y las condiciones de humedad y temperatura. En *M. albonigrum* se observa a los 8 días la formación de células piriformes, pero no continúan su desarrollo hacia clamidosporas (Tibell, 1990).

A los 17 días comienza la producción en ambas especies de un pigmento rojizo.

La aparición de conidios en ambas especies se inició alrededor de los 18 días, madurando a las 3-8 semanas según el medio. El desarrollo general de los cultivos y conidios en ambas especies es muy similar, siendo estos de tipo picnidial. Los picnidios constan de una pared externa formada por 3-8 capas en *M. subtile* y 2-5 capas en *M. albonigrum* de hifas muy pigmentadas, aglutinadas y parcialmente ramificadas. La pared interna está formada por 2-3 capas de células no pigmentadas y radialmente ordenadas. Las hifas fértiles o conidióforos localizadas en la pared interna del picnidio son cilíndricas y presentan conidiogénesis fialídica.

Los anamorfos de ambas especies han sido encontrados también en la naturaleza, aunque con algunas diferencias anatómicas centradas en la estructura del ostiolo, más desarrollado en el conidioma producido en la naturaleza (Tibell, 1990).

Chaenothecopsis nana Tibell, es otra especie que presenta gran semejanza morfológica con *M. subtile* y *M. albonigrum*. La estructura del ápice del asca considerada como de “tipo *Chaenothecopsis*” presenta un fino canal en estadios semi maduros (Tibell, 1987a). Sin embargo la mayor parte de sus caracteres son semejantes a los de *M. subtile*. Sus apotecios son pequeños 0.37-0.63 mm y de color negro. El pedúnculo en su parte interna está formado por hifas hialinas de disposición periclinal. En la parte externa las hifas son oscuras y entrelazadas. Su excípulo está poco desarrollado en su madurez, aunque en estadios semi maduros puede llegar a presentar 5-6 capas de hifas. Sus ascas contienen ocho esporas marrones elipsoidales y unicelulares de tamaños comprendidos entre 5.4-6.8 X 3.1-3.8 μm .

La distribución y ecología de esta especie es semejante a *M. subtile*. *C. nana* se encuentra sobre madera o corteza de distintos de árboles, siendo especialmente abundante en coníferas. En Europa suele aparecer sobre *Picea*, en Norte América sobre *Picea* y *Thuja*, y en Oceanía sobre *Eucalyptus*. Ha sido descrita en ambos hemisferios. Generalmente aparece aislada aunque puede encontrarse junto a líquenes del antiguo orden Caliciales, de los géneros *Calicium*, *Chaenotheca* y *Microcalicium* (Tibell, 1981).

Esta especie ha sido cultivada en el laboratorio pero en ningún caso se ha observado la producción de anamorfos (Tibell, 1995).

2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es investigar la variación genética, morfológica y química presente en un conjunto de especímenes de *Mycocalicium subtile*, en busca de agrupamientos de especímenes y de características, que nos permitan probar la hipótesis de Tibell, sobre la existencia de poblaciones que pueden constituir especies distintas, en función de la variabilidad de la estructura de su excípulo (Tibell, 1987a). Para ello se emplean tres conjuntos de datos, la secuencia del gen ribosomal 5.8S y sus regiones flanqueantes ITS1 e ITS2, un conjunto de caracteres morfológicos entre los que se encuentra la estructura del excípulo, y los patrones de producción de metabolitos, obtenidos a partir de cultivos realizados en medio sólido y líquido.

Otros objetivos que se pretenden resolver en este capítulo consisten en evaluar la validez de los datos genéticos y químicos para: a) facilitar la dificultosa discriminación entre las especies *M. albonigrum* y *M. subtile* obtenida en función de características morfológicas, y b) avalar con datos distintos a los morfológicos el establecimiento de *M. minutellum* como sinónimo de *M. subtile*.

2.1 Análisis genético

2.1.1 Análisis preliminar de la variabilidad contenida en los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 y del gen ribosomal 28S mediante el estudio de polimorfismos (RFLP's).

2.1.2 Secuenciación, alineamiento y análisis de los alineamientos.

2.1.3 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

2.2 Análisis químico

2.2.1 Obtención mediante HPLC de patrones de producción de compuestos en representantes de las especies *Mycocalicium subtile* y *Mycocalicium albonigrum*.

2.2.2 Análisis multivariante de agrupamiento de los patrones de producción de compuestos obtenidos a partir de representantes de las especies *Mycocalicium subtile* y *M. albonigrum*.

2.3 Análisis morfológico

2.3.1 Análisis multivariante de componentes principales, de agrupamiento y discriminante a partir de características morfológicas de los cuerpos fructíferos de 19 representantes de *M. subtile*.

3. Resultados

3.1 Análisis genéticos

En la realización de este análisis se han empleado diecinueve especímenes pertenecientes a la especie *Mycocalicium subtile*, dos de ellos identificados inicialmente como *M. minutellum*. Además se incluyen siete especímenes pertenecientes a tres especies morfológicamente relacionadas con ella, *M. albonigrum* (cuatro especímenes) *Chaenothecopsis nana* (un espécimen) y *Mycocalicium sp.* (Msp00975, Msp17604). Los dos representantes de *Mycocalicium sp.*, fueron originalmente identificados como *M. subtile* debido a su gran semejanza morfológica con esta especie. Sin embargo, tras un análisis de componentes principales realizado a partir de variables morfológicas, apoyado por la disimilitud genética mostrada en su ADNr, quedaron excluidas de la especie y a la espera de su descripción como especie nueva (Vinuesa et al., 2001).

Se incluye un representante de *Mycocalicium* (*M. victoriae*) y otro de *Chaenothecopsis* (*C. pusilla*), cuyas características morfológicas permiten relacionarlos de forma más lejana con el grupo de 26 especímenes anteriormente descrito. Estas dos especies se incluyen como “outgroups” del análisis. Así mismo se incluye un “outgroup” más distante correspondiente a la secuencia de la región homóloga de *Monascus purpureus* (Monascaceae, Eurotiales) obtenida del Genbank.

En la Tabla 1.1 se presenta una relación de estos especímenes indicando su código, número de acceso del Genbank, colección en la que se encuentran depositados, su origen y el tipo de material de partida sobre el que se realizó la extracción de ADN.

Código	Nº acceso Genebank	Colección	Origen	Material
*Ms00001	AF225427	UPS(Vinuesa 1)	NE: Suecia	E
Ms01161	AF225428	UPS(Goward 1161)	NAm:Canada	CV
Ms01839	AF225429	UPSC 1839	NE: Suecia	CS
Ms01896	AF225430	UPSC 1896	NE: Suecia	CS
Ms01904	AF225431	UPSC 1904	NE: Suecia	CS
Ms02173	AF225432	UPSC 2173	OC: Nueva Zelanda	CV
Ms02504	AF225433	UPSC 2504	NE: Suecia	CV
Ms03832	AF225434	UPS(Hermansson 3832)	EE: Rusia	E
Ms03850	AF225435	UPS(Hermansson 3850)	EE: Rusia	E
Ms06747	AF225436	UPS(Selva 6747)	NAm: USA	CV
*Ms16207	AF225437	UPS(Tibell 16207)	NE: Suecia	CS
Ms16388	AF225438	UPS(Tibell 16388)	NE: Suecia	CS
Ms17361	AF225439	UPS(Tibell 17361)	NE: Suecia	E
Ms17913	AF225440	UPS(Tibell 17913)	SAm: Argentina	E
Ms19319	AF225441	UPS(Tibell 19319)	EA: Rusia	E
Ms20093	AF225442	UPS(Tibell 20093)	NE: Suecia	CV
Ms20539	AF225443	UPS(Streimann 20539)	OC: Nueva Guinea	E
Ms21003	AF225444	UPS(Tibell 21003)	NE: Suecia	CV
Ms21020	AF225445	UPS(Tibell 21020)	NE: Suecia	CV
Ma02087	AF223969	UPSC 2087	OC: Nueva Zelanda	CV
Ma02088	AF223968	UPSC 2088	OC: Nueva Zelanda	CV
Ma02089	AF223967	UPSC 2089	OC: Nueva Zelanda	CV
Ma19038	AF223966	UPS(Tibell 19038)	OC: Nueva Zelanda	CV
Cn02083	AF243131	UPSC 2083		CV
Msp17604	AF243133	UPS(Tibell 17604)	SAm: Argentina	E
Msp00975	AF243134	UPS(Goward 975)	NAm: Canada	CV
Mvic00021	AF243135	UPS(Boom 21)		CV
Cp02522	AF243132	UPSC 2522		CV
Mpu	U18356			

Tabla 1.1. Relación de especímenes empleados en el análisis. Ms, *Mycocalicium subtile*. Ma, *Mycocalicium albonigrum*, Msp, *Mycocalicium sp.*, Cn, *Chaenothecopsis nana*, Mvic, *Mycocalicium victoricae*, Cp, *Chaenothecopsis pusilla*, y Mpu, *Monascus purpureus*, este espécimen fue utilizado como “outgroup” en los análisis filogenéticos. Los códigos precedidos por un asterisco, indican que se trata de especímenes identificados originalmente como *Mycocalicium minutellum*. UPSC, colección de cultivos de hongos de la Universidad de Uppsala. Los orígenes se distribuyen en seis regiones: NE, Norte de Europa, NAm, Norte de America, SAm, Sur de America, EE, Este de Europa, EA, Este de Asia, OC, Oceanía. El material a partir del cual se extrae el ADN puede ser: CV, cultivo vivo, CS, cultivo seco y E, esporas.

3.1.1 Estudio preliminar por RFLP's de la variabilidad contenida en la región del ADN (ITS1-5.8S-ITS2) seleccionada.

Con objeto de estudiar el nivel de variabilidad en la región ITS1-5.8S-ITS2 en *Mycocalicium subtile* y determinar la validez de esta región para el estudio del modo de evolución de esta especie, basado en la comparación de secuencias, se realizó un análisis preliminar, consistente en la comparación de los patrones de fragmentos obtenidos al digerir esta región del ADNr con un conjunto de enzimas de restricción.

Para ello, se procedió a la extracción del ADN total, bien a partir de cultivos frescos, secos o esporas según la disponibilidad de material de cada espécimen. La extracción de ADN a partir de esporas procedentes de material de herbario fue intentada en numerosas ocasiones, pero sólo se consiguió en los especímenes incluidos en la tabla de muestras. Esto ocasiona una baja representación de material de áreas geográficas de las cuales se carece de material cultivado.

Se observó que la eficiencia en la extracción de ADN a partir de cultivos generalmente depende de la edad del mismo. En algunas de las muestras la cantidad de ADN obtenida no fue suficiente para ser medida con fiabilidad por los métodos empleados, pero a pesar de ello fueron amplificadas con éxito.

La región ITS1-5.8S-ITS2 fue amplificada por PCR, empleando los oligonucleótidos cebadores ITS5 e ITS4 localizados en zonas muy conservadas del extremo 3' del gen 18S ADNr y el 5' del gen 28S ADNr respectivamente.

Los productos de PCR limpios por precipitación, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Ava* II, *Cfo* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Nci* I, *Rsa* I, y *Taq* I, en reacciones independientes. En este análisis preliminar, dirigido a la determinación de la existencia o no de variabilidad en este fragmento del ADNr para la especie en estudio, sólo se emplearon algunos de los especímenes incluidos en la tabla de muestras (Tabla 1.1).

Este análisis preliminar (Tabla 1.2) muestra variación en esta región del ADNr para la especie *Mycocalicium subtile*, representada por ocho especímenes. Cada una de las enzimas de restricción empleadas produce de 4 a 6 patrones de bandas diferentes para los ocho especímenes analizados. El espécimen Ms02173 procedente de Nueva Zelanda, no presenta patrones comunes con ningún otro espécimen para ninguna de las enzimas empleadas, y lo mismo sucede con Ms01896 originario de Suecia. Ms01839 presenta 6 patrones únicos y uno compartido con Ms21020. Los patrones obtenidos con cuatro de las enzimas en Ms21020 son únicos y los dos restantes son idénticos a los presentados por Ms20093 y Ms21003. Por otra parte los especímenes Ms20093 y Ms21003 muestran patrones idénticos entre sí para todas las enzimas de restricción con que fueron digeridos. En otros casos aparecen especímenes que presentan patrones comunes para la mayor parte de las enzimas, aunque con algunas excepciones. Ms00001 y Ms2504 presentan patrones idénticos exceptuando el obtenido con *Rsa* I.

<i>Código</i>	<i>Ava II</i>	<i>Cfo I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Nci I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Taq I</i>
Ms01839	A1	C1	Ha1	Hi1	N1	R1	T1
Ms02504	A2	C2	Ha2	Hi2	N2	R2	T2
Ms01896	A3	C3	Ha3	Hi3	N3	R3	T3
Ms00001	A2	C2	Ha2	Hi2	N2	R1	T2
Ms20093	A2	C2	Ha4	Hi4	N4	R4	T4
Ms21003	A2	C2	Ha4	Hi4	N4	R4	T4
Ms21020	A1	C4	Ha5	Hi5	N5	R4	T4
Ms02173	A4	C5	Ha6	Hi6	N6	R5	T5
Ma02087	A5	C6	Ha7	Hi7	N7	R6	T6
Ma02088	A5	C6	Ha7	Hi8	N7	R6	T6
Ma02089	A5	C6	Ha7	Hi9	N7	R6	T6
Ma19038	A5	C6	Ha7	Hi10	N7	R6	T6

Tabla 1.2. Representación de los distintos patrones obtenidos al digerir el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de un conjunto de especímenes pertenecientes a las especies *Mycocalicium subtile* y *Mycocalicium albonigrum*. Los especímenes vienen representados por su código. Cada patrón de bandas viene codificado por las iniciales de la enzima con la que fue obtenido, seguido de un número que indica un tipo de patrón. Los colores ayudan a identificar los conjuntos de patrones semejantes.

La aparición de patrones de bandas polimórficos en un conjunto de representantes de una misma especie revela la existencia de variaciones en la secuencia de nucleótidos presente en el fragmento de ADNr estudiado. La variabilidad expresada en 4-6 patrones distintos para 8 especímenes fue considerada suficiente para profundizar en la naturaleza de la variación intraespecífica en *M. subtile*, mediante el análisis de las secuencias en la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de un conjunto de especímenes representantes de la especie. Ningún representante de *Mycocalicium albonigrum* comparte patrones de restricción con representantes de *M. subtile*. Dentro de *M. albonigrum* se encuentra una gran homogeneidad excepto en los sitios de restricción para *Hinf I*, donde cada uno de los cuatro representantes empleados muestra un patrón distinto. Cabe esperar poca variación en la secuencia de nucleótidos de este fragmento del ADNr estudiado en los especímenes empleados de esta especie. La ausencia de patrones comunes entre *M. subtile* y *M. albonigrum* indica que pueden existir diferencias suficientes entre estas dos especies que permitan su discriminación molecular.

3.1.2. Secuenciación, alineamiento y análisis del alineamiento

La región ITS1-5.8S-ITS2 de los 28 especímenes escogidos, fue secuenciada por el método de secuenciación cíclica con Thermosequenase (Amersham), empleando los oligonucleótidos ITS1, ITS2 e ITS3, con objeto de cubrir ambas cadenas de la región a secuenciar. Las secuencias fueron alineadas con ayuda del programa Clustal W, revisadas visualmente y modificadas en el programa GENEDOC. Algunas de las modificaciones consistieron en la eliminación de determinadas regiones en las que el alineamiento era ambiguo (Figura 1.1). En la Figura 1.2 (Anexo 1, pag. 198-201) se muestra el alineamiento final una vez realizadas las correcciones.

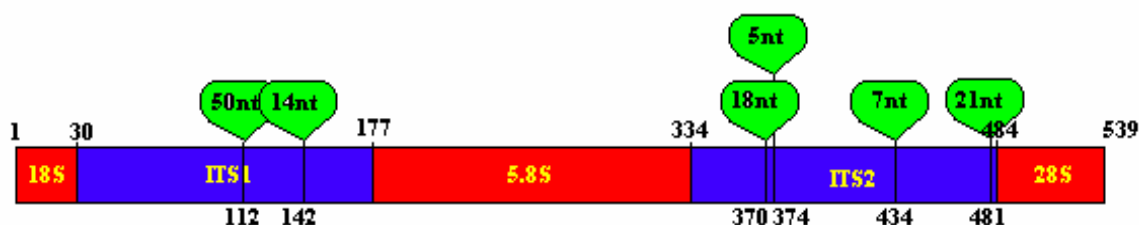


Figura 1.1. Representación esquemática de las regiones que fueron eliminadas del alineamiento. La barra horizontal representa el alineamiento final corregido, en el que se muestran las distintas regiones que lo componen y sus límites, que corresponden con la numeración en la parte superior. Los límites de cada región fueron inferidos por comparación con la secuencia de *Neurospora crassa* (Chambers et al.,1986). La numeración que aparece en la parte inferior de la figura corresponde a las posiciones en las que se elimina una región de alineamiento ambiguo. El número de nucleótidos eliminados se muestra en las cajas verdes.

El alineamiento corregido contiene un total de 539 posiciones de las cuales 234 son variables (Tabla 1.3). La mayoría de las posiciones variables se localizan en las regiones ITS1 e ITS2. Entre especímenes de una misma especie la variación se debe en su mayor parte a mutaciones de tipo transición. Es especialmente interesante el caso de las secuencias de *M. subtile* Ms02173 y Ms01896, puesto que en su relación con otros especímenes de su especie muestra 18 transversiones frente a 23 transiciones. Considerando únicamente el resto de las secuencias de *M. subtile* se observan 2 posiciones con transversión frente a 30 transiciones. La aparición de transversiones y "gaps" se registran fundamentalmente cuando se comparan especímenes de distintas especies. La

mayor parte de los "gaps" han sido introducidos por el alineamiento de las secuencias más divergentes *M. victoriae*, *C. pusilla* y *M. purpureus*.

	ALINEAMIENTO COMPLETO	18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S
POSICIONES TOTALES	539	30	146	157	150	56
POSICIONES VARIABLES	234	8	99	6	110	11
SITIOS SIGNIFICATIVOS	125	1	67	3	53	1
TRANSICIONES	52	3	21	5	21	2
TRANSVERSIONES	50	2	14	0	28	6
"GAPS"	40	2	19	1	15	3
POSICIONES HIPERVARIABLES	92	1	44	0	47	0

Tabla 1.3. Sumario del alineamiento (Figura 1.2). La tabla describe el alineamiento mediante el recuento de posiciones totales, variables, significativas, transiciones, transversiones, "gaps" y posiciones hipervariables. Posiciones hipervariables se denominan a aquellas en las que dos o más secuencias muestran cada una un tipo diferente de mutación respecto a la secuencia del "outgroup". El conteo de las posiciones se expresa tanto en el alineamiento completo como en las posiciones correspondientes a cada región, gen 18S ADNr, ITS1, gen 5.8S ADNr, ITS2 y gen 28S ADNr

3.1.3 Inferencia de relaciones filogenéticas

Para la inferencia de relaciones filogenéticas se emplea el alineamiento que se muestra en la Figura 1.2, donde las posiciones con "gaps" se someten a un doble tratamiento, bien como un quinto carácter, o bien como nucleótidos desconocidos. La topología de los árboles resultantes de los distintos programas de inferencia filogenética empleados es idéntica para ambos tratamientos, la única diferencia reside en los índices de soporte de las ramas que son mayores cuando los "gaps" se tratan como quinto carácter.

En los análisis filogenéticos basados en parsimonia (DNAPARS y Jackknife parsimony), se observa que la mayoría de los especímenes de la especie *M. subtile* forman un grupo monofilético con el índice máximo de soporte (100%/99%). Dos especímenes, uno procedente de Suecia Ms01896 y otro de Nueva Zelanda Ms02173 se separan del grupo de *M. subtile* y forman entre sí un nuevo grupo 87 /83%, hermano del anterior, con un índice de soporte del 62% (Figura 1.3).

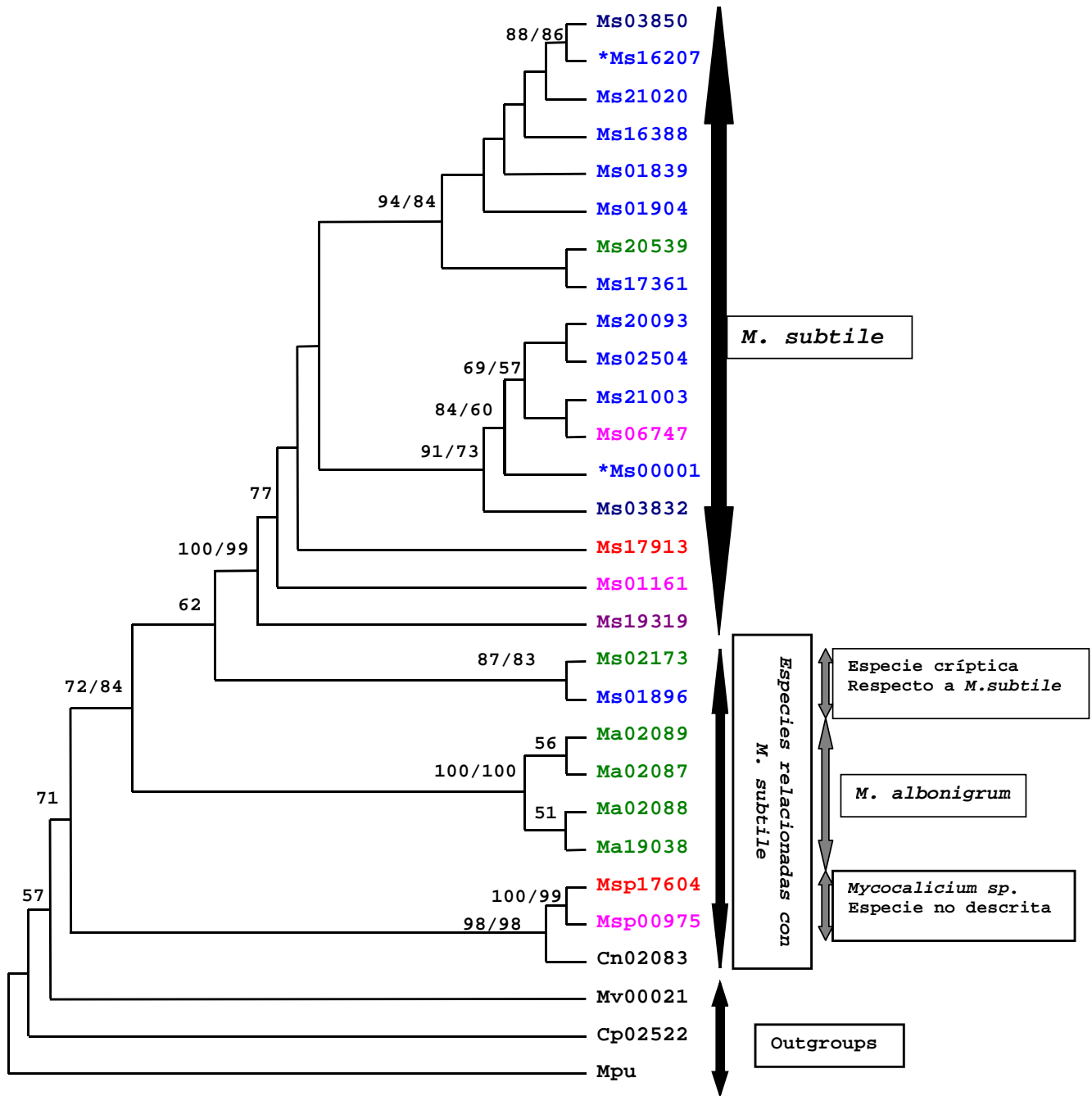


Figura 1.3 Árbol filogenético que muestra las relaciones entre 19 especímenes de *Mycovalicium subtile* y otras especies relacionadas. El árbol fue construido mediante métodos basados en el criterio de parsimonia, empleando la opción DNAPARS del paquete de programas filogenéticos PHYLIP, con 10 entradas al azar en el orden de las secuencias. Este árbol se obtuvo a partir de un alineamiento en el que las posiciones con "gaps" fueron consideradas como un quinto carácter. Los valores de soporte que se muestran en las ramas corresponden a 100 replicaciones por "bootstrap" (delante de la barra inclinada) y valores obtenidos por "Jackknife parsimony" (detrás de la barra inclinada). Los códigos de las muestras se especifican en la Tabla 1.1. Los colores indican el origen geográfico de las muestras: Norte de Europa, Este de Europa, Este de Asia, Norte de América, Sur de América, Oceanía.

Cuando se aplican métodos basados en distancias genéticas (DNADIST-NEIGHBOR), el grupo formado por MS01896-Ms02173 aparece más cercano al conjunto formado por las secuencias de *M. albonigrum* que a las de *M. subtile*, pero de nuevo con un bajo índice de soporte, 65% (Figura 1.4).

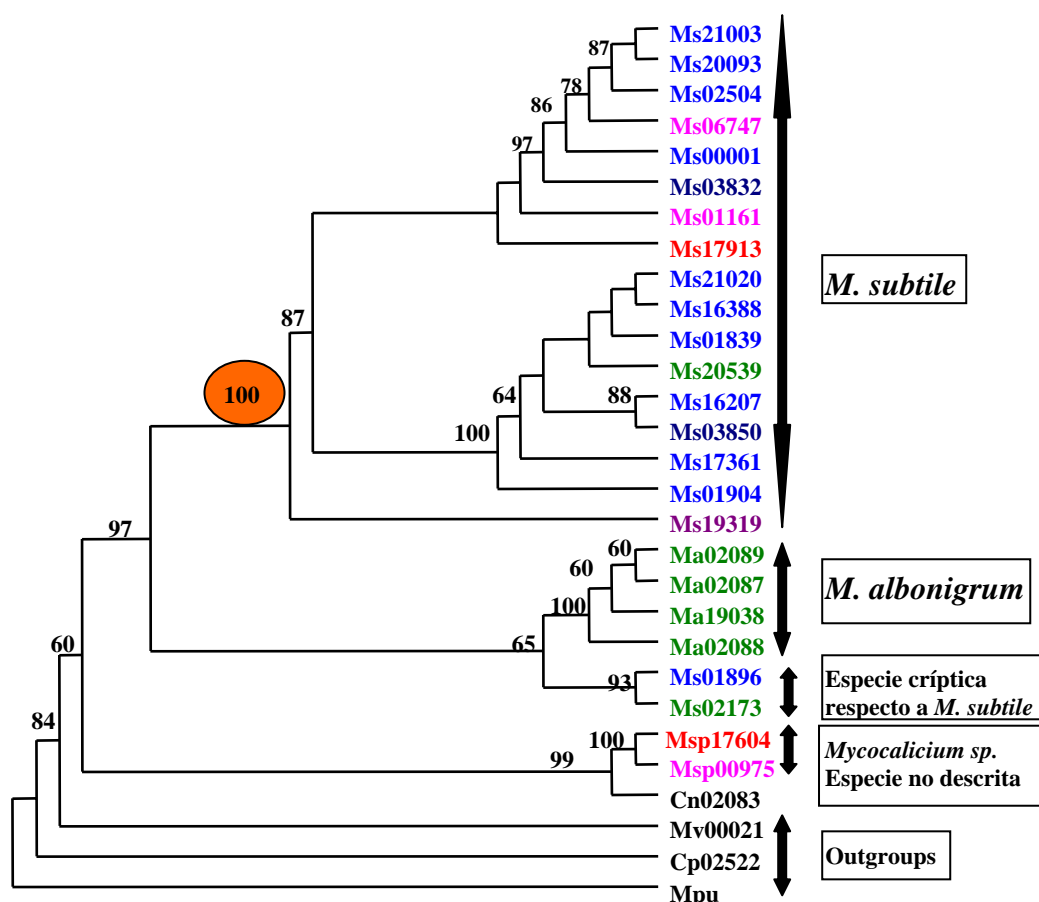


Figura 1.4. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre 19 especímenes de *Mycocalicium subtile* y otras especies relacionadas. El árbol fue construido mediante métodos de distancias genéticas, empleando las opciones DNADIST y NEIHBOR del paquete de programas PHYLIP. Las distancias se calcularon según el algoritmo de máxima verosimilitud. Los soportes de las ramas se obtuvieron analizando 1000 conjuntos de datos ("bootstrap").

Los códigos de las muestras se especifican en la Tabla 1.1. Los colores indican el origen geográfico de las muestras: Norte de Europa, Este de Europa, Este de Asia, Norte de América, Sur de América, Oceanía.

Dentro del grupo principal de *M. subtile* aparecen tres especímenes, Ms17913, Ms01161, y Ms19319, procedentes de América del Sur, Norte de América y Este de Asia respectivamente, ocupando posiciones aisladas. El resto de los especímenes se distribuyen en dos grupos de ocho y seis miembros respectivamente, ambos apoyados por buenos índices de soporte (Figuras 1.3 y 1.4). El grupo formado por ocho componentes contiene especímenes procedentes de orígenes diversos, Norte y Este de Europa y Oceanía. Lo

mismo sucede con el grupo de seis componentes, con procedencias registradas del Norte y Este de Europa y Norte de América.

Los dos especímenes caracterizados por sus pequeños ascomas como *M. minutellum* (*Ms00001, *Ms16207) aparecen en grupos distintos.

Los cuatro representantes de *M. albonigrum* forman un grupo monofilético con un 100% de soporte, y a su vez aparece como grupo hermano de *M. subtile* con un soporte del 72%/84% (Figura 1.3).

Los especímenes Msp00975 y Msp17604 forman un grupo apoyado por un soporte del 98%, junto con la secuencia de *C. nana* (Cn02083).

El conjunto de las secuencias de *M. subtile* y especies morfológicamente cercanas (*M. albonigrum*, *Mycocalicium sp.* y *C. nana*), forman un grupo monofilético apoyado por un soporte del 71%, según el análisis realizado con "DNAPARS".

En la búsqueda de grupos monofiléticos realizado por "Jackknife parsimony", las secuencias de *Mycocalicium sp.* y *C. nana* quedan excluidas del grupo monofilético (84%) formado por *M. subtile* –*M. albonigrum* (Figura 1.3). Este tipo de análisis no apoya la posición del grupo Ms01986-Ms02173 como grupo hermano de *M. subtile* ni de *M. albonigrum*, como sucede en los análisis realizados por parsimonia y distancias respectivamente.

Ms01896-Ms02173 aparece dentro de una politomía que contiene a los tres grupos.

Con objeto de seleccionar la localización más correcta para el grupo formado por Ms01896 –Ms02173 respecto a las especies *M. subtile* y *M. albonigrum*, se realizaron dos aproximaciones. En primer lugar se realizó la prueba de Kishino y Hasegawa, empleando los árboles obtenidos de parsimonia (DNAPARS) y distancias como árboles de usuario en el programa DNAML (Tabla 1.4).

Tratamiento de los "gaps"	Análisis filogenético	Ln verosimilitud	Diff Ln verosimilitud	Significativamente peor?
Quinto caracter	Parsimonia	-272.788.885	← mejor	
Quinto caracter	Distancias	-272.877.365	-0.88479	No
Nucleótido desconocido	Parsimonia	-272.788.901	← mejor	
Nucleótido desconocido	Distancias	-272.877.365	-0.88464	No

Tabla 1.4 Pruebas de Kishino y Hasegawa efectuadas sobre cuatro árboles obtenidos según distintos tratamientos. Las flechas señalan los árboles que muestran una mayor probabilidad de ser correctos en función del alineamiento dado.

Esta prueba evalúa los árboles filogenéticos introducidos, en función del alineamiento dado y selecciona la topología más probable basada en el criterio de máxima verosimilitud. El

programa seleccionó el árbol obtenido en el análisis de parsimonia, en el que el grupo Ms01896-Ms02173 se sitúa más cercano al resto de los *M. subtile*. Sin embargo, la topología obtenida por distancias no se muestra significativamente peor (Tabla 1.4).

La segunda estrategia consistió en realizar un nuevo alineamiento (Figura 1.5, Anexo 1, pag. 202-204), excluyendo las especies que en el alineamiento original (Figura 1.2, Anexo 1, pag. 198) introducen ambigüedad y por tanto obligan a eliminar determinadas regiones. El nuevo alineamiento contiene las secuencias de todos los representantes de *M. subtile* y *M. albonigrum*. En este caso se introduce la secuencia de *Stenocybe pullatulla* Sp02448 (*Mycocaliciaceae*) como “outgroup” del análisis. Las secuencias de ambas especies fueron alineadas con la ayuda del programa Clustal W. El alineamiento se revisó visualmente y se modificó en el programa GENEDOC. No fue eliminada ninguna región del alineamiento. El alineamiento corregido (Figura 1.5, Anexo 1, pag. 202-204) muestra un total de 613 posiciones, dentro de las cuales se contabilizan 197 sitios variables, teniendo en cuenta “gaps”, transiciones y transversiones (Tabla 1.5). El 55% de los sitios variables observados (107 posiciones), se acumulan en el espaciador ITS1, quedando un 43% (84 posiciones) en el ITS2 y tan solo el 1.5% en el gen 5.8S ADNr. Veinticinco posiciones variables se deben exclusivamente a la secuencia del “outgroup”. Cuarenta y nueve posiciones, que suponen el 25% de los 195 sitios variables, corresponden a posiciones donde las mutaciones se originan por transiciones. Son 21 (11%) las posiciones en las que sólo han tenido lugar transversiones.

	ALINEAMIENTO COMPLETO	18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S
POSICIONES TOTALES	613	30	184	157	184	58
POSICIONES VARIABLES	195	0	107	3	84	1
SITIOS SIGNIFICATIVOS	86	0	53	1	32	0
TRANSICIONES	49	0	26	2	20	1
TRANSVERSIONES	21	0	15	0	6	0
"GAPS"	52	0	27	0	25	0
POSICIONES HIPERVARIABLES	47	0	26	0	21	0

Tabla 1.5. Sumario del alineamiento (Figura 1.5, Anexo 1, pag. 202). Los valores reflejados en las filas correspondientes a transiciones, transversiones y “gaps”, indican el número de posiciones en los que una o más secuencias muestran sólo un tipo de mutación respecto a la secuencia del “outgroup”, del tipo transición, transversión o “gap” respectivamente. Las posiciones hipervariables se denominan a aquellas en las que dos o más secuencias muestran cada una un tipo diferente de mutación respecto a la secuencia del “outgroup”.

La distribución del número de transiciones en las regiones ITS1 e ITS2 se encuentra equilibrada. El número de transversiones es sin embargo más elevado en la región ITS1 que en ITS2. Se observan 47 sitios de mayor variabilidad donde ocurren varios tipos de mutación. La presencia de "gaps" es elevada y alcanza un total de 52 posiciones en las que ocurre exclusivamente este fenómeno. La mayor parte de las posiciones con "gaps" se originan por efecto de las secuencias de *M. albonigrum* y no por la secuencia del "outgroup". Las transversiones respecto a las secuencias de *M. subtile* ocurren mayoritariamente en las secuencias de *M. albonigrum*, Ms01896, Ms02173 y en el "outgroup".

Se emplea el programa "Jackknife parsimony" para localizar grupos monofiléticos (Figura 1.6). En este tipo de análisis los "gaps", muy numerosos en este alineamiento, son tratados siempre como nucleótidos desconocidos. Se intentan dos tipos de análisis, manteniendo y eliminando las posiciones en las que aparecen "gaps".

Este programa detecta 86 sitios significativos de un total de 613 en el alineamiento donde se mantienen las posiciones con "gaps". Eliminando las posiciones con "gaps" el alineamiento conserva 537 posiciones de las cuales 78 son significativas. Analizando el alineamiento en el que los "gaps" se mantienen (Figura 1.6, árbol derecho), se observa un índice de soporte de 0.67 para el mantenimiento de un grupo monofilético que comprende a todos los representantes de la especie *M. subtile* analizados, incluidos Ms01896 y Ms02173. Esta rama a su vez contiene dos subgrupos uno de ellos apoyado por el índice máximo de soporte (1.0), formado por la gran mayoría de los especímenes de *M. subtile* y un segundo subgrupo se mantiene con un índice de soporte de 0.9 y contiene dos especímenes de *M. subtile*, Ms01896 procedente del Norte de Europa y Ms02173 de Nueva Zelanda. En el alineamiento (Figura 1.5, Anexo 1, pag. 202), las secuencias de estos dos especímenes introducen una fuente de variabilidad con respecto al resto de los especímenes de *M. subtile* analizados, debido fundamentalmente a transversiones y fenómenos de inserción/delección.

En el estudio de inferencia filogenética a partir del alineamiento en el que los "gaps" son eliminados, el árbol filogenético resultante (Figura 1.6, árbol izquierdo), muestra una topología semejante al anterior, pero el índice de soporte calculado para la rama que sostiene el taxón formado por todos los especímenes analizados de *M. subtile* disminuye hasta el 0.53.

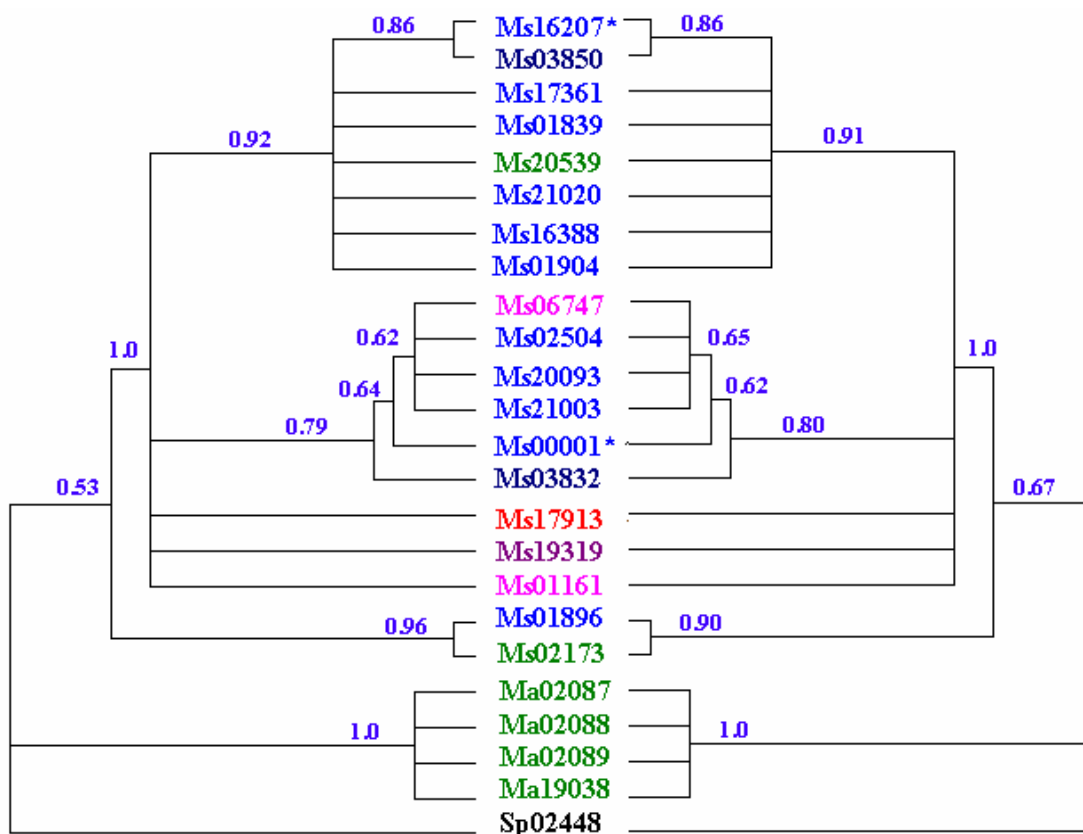


Figura 1.6. Análisis cladístico de búsqueda de grupos monofiléticos a partir de 19 especímenes de la especie *M. subtile* y 4 de la especie *M. albonigrum*. Los árboles que se muestran fueron construidos con el programa "Parsimony Jackknifing" mediante 1000 replicaciones. El árbol de la izquierda procede del alineamiento en el que las posiciones con "gaps" fueron eliminadas. El árbol de la derecha muestra el análisis del alineamiento sin eliminar las posiciones con "gaps" (Figura 1.5, Anexo 1, pag. 202). *Stenocybe pullatula* fue empleado como "outgroup". El asterisco señala los especímenes identificados como *M. minutellum*. Los códigos de las muestras se especifican en la Tabla 1.1. Los colores indican un origen geográfico: Norte de Europa, Este de Europa, Este de Asia, Norte de América, Sur de América, y Oceanía.

Los resultados obtenidos en este análisis y en los realizados con métodos de distancias, parsimonia y máxima verosimilitud, son semejantes.

3.2 Análisis químico.

Los resultados que se muestran en este apartado acerca de la obtención de patrones de producción de compuestos, para el análisis de la variabilidad de representantes de la especie *Mycocalicium subtile*, proceden de un estudio más amplio realizado con objeto de delimitar los géneros de la familia *Mycocaliciaceae*. Este análisis, se presenta detalladamente en el BLOQUE 2, pag. 103.

3.2.1. Obtención de patrones de producción de compuestos de representantes de las especies *Mycocalicium subtile* y *Mycocalicium albonigrum*.

Para la realización de este análisis se seleccionan siete especímenes de *M. subtile* (Tabla 1.6), siendo dos de ellos los especímenes que se segregan del resto de la especie según los análisis genéticos realizados previamente (Ms02173 y Ms01896). Los cinco restantes representan a cada uno de los dos subgrupos de la especie (Ms02504, Ms06747, Ms20093), (Ms21020) y a aquellos especímenes que en el análisis genético ocupan posiciones aisladas (Ms01161) dentro del grupo de *M. subtile*. Se incluye un solo representante de *M. albonigrum* por la homogeneidad genética demostrada. Cada muestra es cultivada en medio MEYE sólido y líquido, extraída y analizada por triplicado.

ESPECIE	CÓDIGO	ANÁLISIS
<i>Mycocalicium subtile</i> 01161	Ms01161	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 01896	Ms01896	Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 02173	Ms02173	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 02504	Ms02504	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 06747	Ms06747	Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 20093	Ms20093	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 21020	Ms21020	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium albonigrum</i> 10938	Ma19038	Líquido / Sólido

Tabla 1.6. Relación de especies de *M. subtile* y *M. albonigrum* incluidas en los análisis de producción de patrones de metabolitos secundarios en medio líquido y sólido. En algunos casos debido a la escasez de micelio empleado como inóculo, se dió preferencia al análisis en medio sólido.

Los picos correspondientes a los compuestos producidos por cada muestra en su medio son identificados por su tiempo de retención y por su espectro de absorción en el intervalo 200-500nm.

En una primera aproximación al análisis de los cromatogramas, se crea una tabla en la que se detalla el caso (replicado 1, 2 ó 3 de cada muestra) en el que aparece cada uno de los picos identificados en el conjunto de los cromatogramas (Tabla 2.11, Anexo 2, pag. 218-223).

Del estudio de esta tabla ya se pueden observar grupos de muestras que presentan un mismo pico o patrón de picos, tanto en extractos procedentes de cultivos en medio sólido como en medio líquido. Los picos P5, P9, P10, P11 son casos evidentes de la presencia de un patrón de compuestos compartido por un conjunto de muestras, en este caso de todos

los especímenes representantes de *M. subtile*, excepto Ms02173 y Ms01896. Del mismo modo los picos P15.5 y P26.5 son picos que aparecen en *M. subtile* Ms02173, Ms01896 y *M. albonigrum*, y en ningún otro representante de *M. subtile*.

Se observan compuestos que son producidos únicamente por una muestra con sus replicados, y otros que sólo aparecen en un replicado de una muestra. Otros picos de gran interés son aquellos que aparecen en muestras de distintas especies.

Con objeto de obtener grupos de muestras en función de los patrones de compuestos y de su cantidad relativa, se crea una matriz de muestras frente a compuestos obtenidos y se procede a un análisis de agrupamiento jerárquico.

3.2.2. Transformación de los patrones en matrices de datos y análisis de agrupamiento.

Se construye una matriz que contiene tantas columnas como el total de picos identificados en el conjunto de los cromatogramas, y tantas filas como muestras. En cada celda se especifica el valor del porcentaje de altura que cada pico supone en cada cromatograma. La ausencia de un pico se expresa con valor 0.

Se obtienen dos matrices, una correspondiente al análisis de los cultivos sólidos y otra a los líquidos (Tablas 1.7, 1.8, Anexo 1, pag. 205-207/208).

Las matrices son tratadas en análisis de agrupamiento en el programa BMDP, realizando agrupamientos jerárquicos a partir de la transformación de las matrices originales en matrices de distancias generadas por frecuencias, distancias de Jaccard y distancias de “matching”.

En la experiencia realizada a partir de extractos de muestras crecidas en medio MEYE líquido (Figura 1.7), los grupos obtenidos según los tres tipos de distancias empleadas son idénticos. El conjunto de las muestras se divide en dos grupos, según su patrón de producción de compuestos. El grupo 1 está formado por todos los representantes de *M. subtile* empleados (Ms01161, Ms20093, Ms21020 y Ms02504), excepto Ms02173. El grupo 2 lo constituyen las muestras *M. subtile* Ms02173 y *M. albonigrum* (Ma19038).

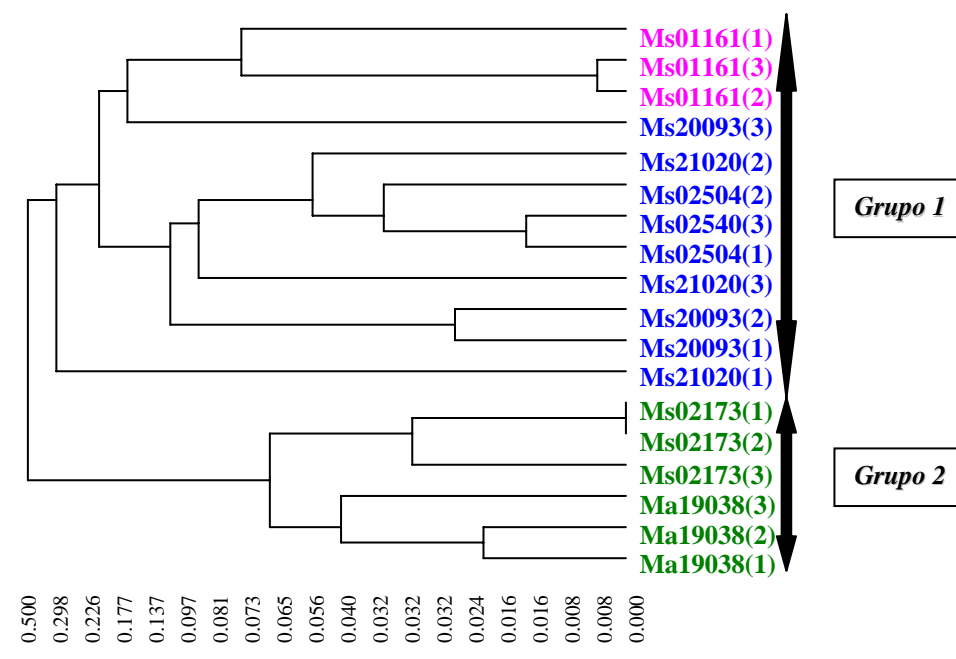


Figura 1.7. Dendrograma obtenido a partir del análisis jerárquico de agrupamiento de las muestras en función de los compuestos producidos en medio MEYE líquido. Este dendrograma se corresponde con el obtenido por distancias de Jaccard. La topología de los dendrogramas resultantes de los otros dos tipos de análisis es semejante. La escala inferior muestra las distancias de amalgamamiento. Los colores indican el origen geográfico de las muestras: Norte de Europa, Norte de América y Oceanía.

En el análisis a partir de cultivos en medio sólido (Figura 1.8), encontramos diferencias en el establecimiento de los grupos según sea la fórmula empleada para el cálculo de las distancias. El agrupamiento es idéntico para distancias calculadas por frecuencias y “matching”, donde se establecen dos grupos muy semejantes a los obtenidos en el caso de los cultivos líquidos. El grupo 1 lo forman todos los especímenes de la especie *M. subtile*, de nuevo con la excepción de Ms02173 y Ms01896, que forman el grupo 2 junto con el representante de *M. albonigrum* (Ma19038). En el agrupamiento basado en distancias de Jaccard se distingue un tercer grupo que procede de la excisión del grupo 2 en dos grupos, uno contiene los representantes de *M. subtile* (Ms02173 y Ms01896), y el otro al representante de *M. albonigrum* (Ma19038).

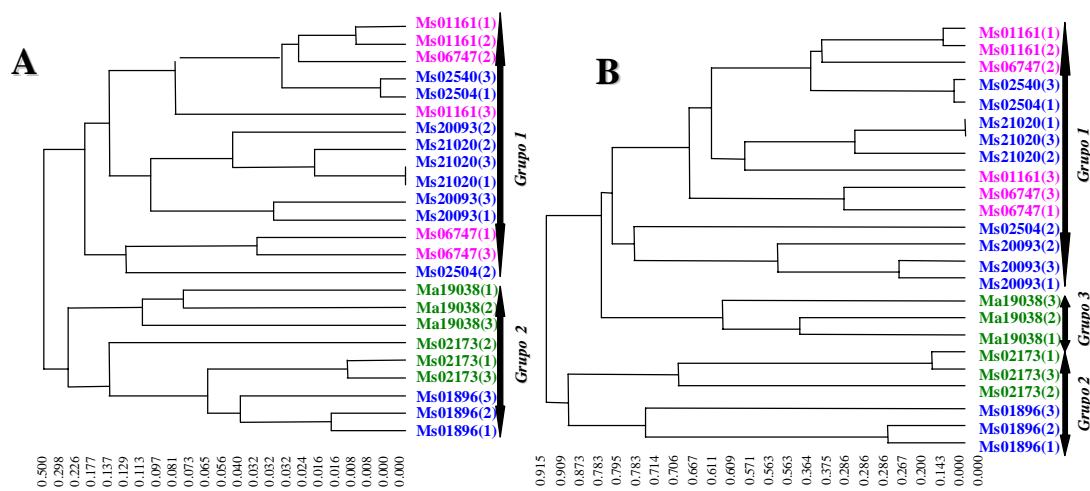


Figura 1.8. Dendrograma obtenido a partir del análisis jerárquico de agrupamiento de las muestras, en función de los compuestos producidos en medio MEYE sólido. El dendrograma A se corresponde con el análisis realizado mediante distancias de “matching”. El dendrograma B procede del análisis por distancias de Jaccard. La topología del dendrograma obtenido mediante el análisis de frecuencias es similar al dendrograma A. Las escalas inferiores muestran las distancias de amalgamamiento. Los colores indican el origen geográfico de las muestras: Norte de Europa, Norte de América y Oceanía.

Una vez seleccionados los grupos de muestras a partir de los dendrogramas, se procede a un análisis descriptivo de los grupos según los picos que los componen (Tabla 1.9 y Tabla 1.10).

El patrón que define al grupo 1 está formado por los compuestos P5, P9, P10 y P11. Estos picos se encuentran en todas las muestras que componen el grupo 1 y sólo en ellas. El resultado es el mismo para el análisis realizado a partir de cultivos en medio sólido y en medio líquido, con la excepción del pico P10, sólo producido por algunos especímenes del grupo 1 en medio líquido.

El patrón de compuestos que define al grupo 2, considerando como tal el grupo formado por Ms02173, Ms01896 y Ma19038, está compuesto por P15.5 y P26.5 para los cultivos en medio sólido, y P5.5, P15.5, P29.5 y P59 para los cultivos crecidos en medio líquido (el espécimen Ms01896 no se ensayó en medio líquido). El resto de los picos que sólo se encuentran en un grupo son en su mayoría exclusivos de una muestra, e incluso de un replicado (Anexo 1, Tabla 1.11, pag. 209-210, Tabla 1.12, pag. 211).

Algunos compuestos aparecen en dos o más muestras dentro de un grupo. Esto permite apreciar cierta tendencia a producir los mismos compuestos entre algunas muestras como

FRECUENCIAS MATCHING				JACCARD			
Código	Caso	Grupo	Picos	Código	Caso	Grupo	Picos
Ms01161	1-3	1	P5 P6 P8.5 P9 P9.5 P10 P11 P15	Ms01161	1-3	1	P5 P6 P8.5 P9 P9.5 P10 P11 P15
Ms20093	1-3	1	P17 P21.75 P22 P24.75 P27.5 P32	Ms20093	1-3	1	P17 P21.75 P22 P24.75 P27.5 P32
Ms21020	1-3	1	P34 P35 P36 P37 P39 <u>P40</u> P48	Ms21020	1-3	1	P34 P35 P36 P37 P39 <u>P40</u> P48
Ms02504	1-3	1	P52 P56 P83 P113 P127 P144	Ms02504	1-3	1	P52 P56 P83 P113 P127 P144
Ms06747	1-3	1	P145 P146 P147	Ms06747	1-3	1	P145 P146 P147
Ma19038	1-3	2	P4.5 <u>P5.5</u> P11.5 P12.5 P15.5 P18 P21 P24 P24.5 P26 <i>P26.5</i> P28 P29.5 P43 P46 P59 P61 P62 P63	Ma19038	1-3	3	P11.5 P12.5 P21 P24.5 P28 P29.5 P43 P81 P119 P138 P139 P141 P142 P143
Ms01896	1-3	2	P64 P65 P66 P67 P68 P69 P70	Ms01896	1-3	2	P4.5 P18 P24 <u>P26</u> P46 P61
Ms02173	1-3	2	P71 P72 P73 P78 P81 P90 P119	Ms02173	1-3	2	P62 P63 P64 P65 P66 P67 P68 P69
			P138 P139 P141 P142 P143				P70 P71 P72 P73

FRECUENCIAS MATCHING			Picos compartidos	JACCARD			Picos compartidos
Grupos	1	2	P7 P16 P19 P20 P23.5 P42 P60	Grupos	1	2	P16 P42 P60
			P75 P137	Grupos	1	3	P7 P19 P20 P23.5 P75 P137
				Grupos	2	3	<u>P5.5</u> P15.5 P26.5 P59

Tabla 1.9 Tabla resumen de los dendrogramas obtenidos a partir de los análisis de agrupamiento de las muestras crecidas en medio MEYE sólido. Los picos en negrita son picos presentes en todos los triplicados de las muestras que forman el grupo. Los picos en cursiva, son aquellos presentes en todas las muestras que forman el grupo, pero no en todos sus triplicados. Los picos subrayados son picos presentes en más de la mitad de los casos que componen el grupo. Picos en formato normal, son picos presentes en menos de la mitad de los casos que componen el grupo..

es el caso de Ms20093, Ms2010 y Ms02504, en cultivos líquidos y Ms01161, Ms06746, Ms02504, en cultivos crecidos en medio sólido (Anexo 1, Tabla 1.11, pag. 209, Tabla 1.12, pag. 211).

En el análisis realizado sobre muestras crecidas en medio líquido (Tabla 1.9) es interesante observar la ausencia de picos compartidos entre los dos grupos generados. Los cultivos crecidos en medio sólido presentan picos compartidos entre los grupos, pero ninguno de ellos son picos mayoritarios, con la lógica excepción de los picos compartidos entre el grupo 2 (Ms02173, Ms01896) y el grupo 3 (Ma19038) generados por distancias de Jaccard .

FRECUENCIAS JACCARD MATCHING			
Código	Caso	Grupo	Picos
Ms01161	1-3	1	<i>P5 P6 P9 P10 P11 P15.75 P17</i>
Ms20093	1-3	1	<i>P23 P23.5 P32 P39 P40 P41 P43</i>
Ms21020	1-3	1	<i>P44 P46 P47 P48 P53 P54 P55.5</i>
Ms02504	1-3	1	<i>P56 P70 P94 P118 P134</i>
Ma19038	1-3	2	P5.5 P8.75 P14 P15.5 P26 P26.5
Ms02173	1-3	2	P29.5 P58 P59 P59.5 P143

Tabla 1.10. Tabla resumen de los dendrogramas obtenidos a partir de los análisis de agrupamiento de las muestras crecidas en medio MEYE líquido. Los picos en negrita son picos presentes en todos los triplicados de las muestras que forman el grupo. Los picos en cursiva, son aquellos presentes en todas las muestras que forman el grupo, pero no en todos sus triplicados. Los picos subrayados son picos presentes en más de la mitad de los casos que componen el grupo. Picos en formato normal, son picos presentes en menos de la mitad de los casos que componen el grupo.

Un estudio detallado de los compuestos compartidos por los grupos 1 y 2, en los cultivos en medio sólido (Tabla 1.10), señala al representante de *M. albonigrum* como la muestra que mayoritariamente comparte compuestos con el grupo 1, todos ellos *M. subtile*, en lugar de los dos representantes de *M. subtile* presentes en el grupo 2.

En resumen, el análisis químico realizado en función de los patrones de producción de compuestos analizados por HPLC de un conjunto de representantes de las especies *M. subtile* y un representante de *M. albonigrum*, presenta una separación de las muestras en dos grandes grupos. Uno de ellos está formado por los representantes de la

especie *M. subtile* (Ms01161, Ms20093, Ms02504, Ms06747) caracterizados por el patrón P5, P9 y P11. El segundo grupo está formado por dos representantes de la especie *M. subtile* Ms02173 y Ms01896 y por el representante de la especie *M. albonigrum* Ma19038. Este grupo queda caracterizado por la producción del compuesto P15.5.

3.3 Análisis morfológico

La investigación de la variabilidad morfológica en *M. subtile* se realizó a partir del estudio de siete variables continuas de naturaleza morfológica, examinadas en los diecinueve especímenes de *M. subtile* empleados en apartados anteriores (Tabla 1.1).

Las variables muestran las diferencias entre especímenes respecto a la estructura del excípulo, el tamaño del apotecio, diámetro del capítulo, longitud y anchura del asco y longitud y anchura de las esporas.

Cepas	Ori	Nche	At	Dc	La	Aa	Le	Ae	GDNA	K3
Ms00001	NE	9	0.34	0.13	40.3	3.5	6.8	3.6	2	1
Ms01161	NAm	5	0.70	0.23	36.9	3.8	7.1	4.0		2
Ms01839	NE	4	0.64	0.14	44.8	4.1	7.8	3.5	1	3
Ms01896	NE	5	0.56	0.26	41.9	3.5	7.6	3.6		3
Ms01904	NE	4	0.44	0.17	44.4	3.6	7.1	4.0	1	3
Ms02173	OC	8	0.94	0.15	38.3	3.1	6.8	3.3		1
Ms03832	EE	7	0.65	0.16	40.4	4.1	7.2	3.3	2	1
Ms03850	EE	5	0.50	0.17	43.0	3.4	7.2	3.3	1	3
Ms06747	NAm	6	0.73	0.20	38.0	3.6	6.9	4.3	2	2
Ms16207	NE	5	0.38	0.07	39.5	3.9	6.8	3.4	1	1
Ms16388	NE	5	0.46	0.14	38.4	3.3	8.0	3.7	1	2
Ms17361	NE	6	0.56	0.10	43.5	3.2	7.4	3.9	1	3
Ms17913	SAm	7	0.70	0.18	49.7	3.8	8.4	3.9		
Ms19319	EA	5	0.66	0.23	42.3	3.7	7.0	3.6		3
Ms20093	NE	6	0.76	0.24	43.0	3.7	6.9	3.6	2	3
Ms20539	OC	3	0.74	0.16	35.3	3.3	5.9	3.3	1	2
Ms21003	NE	7	0.67	0.16	42.9	3.3	7.1	4.0	2	3
Ms21020	NE	6	0.74	0.17	39.8	3.4	7.6	4.0	1	1
Ms02504	NE	7	0.47	0.18	41.3	3.6	7.8	3.3	2	1

Tabla 1.13. Matriz de datos morfológicos. Las columnas 1y 2 corresponden a los códigos de las muestras empleadas y su origen geográfico respectivamente. Las columnas 3-9 corresponden a las variables continuas: Nche, número de capas de hifas presentes en el excípulo; At, altura total del apotecio (mm); Dc, diámetro del capítulo(mm); La, longitud del asco (µm); Aa, anchura del asco (µm); Le, longitud de las esporas (µm); Ae, anchura de las esporas (µm). Las columnas 10-11 son variables clasificatorias: GDNA, corresponde a los dos grandes grupos encontrados en la especie tras el análisis genético. K3, son los grupos obtenidos tras el análisis de agrupamiento.

Se construye una matriz de datos que presenta once columnas correspondientes a dos variables de identificación (Cepas y ORI), dos variables clasificatorias (GDNA y K3), necesarias para los análisis discriminantes y siete parámetros de estudio representados por variables continuas (Nche, At, Dc, La, Aa, Le y Ae). Los valores que se muestran en la matriz (Tabla 1.13) son valores tipo, correspondientes a la media de diez observaciones para cada variable y espécimen.

3.3.1 Análisis multivariante de componentes principales, agrupamiento, y discriminante a partir de características morfológicas de los cuerpos fructíferos de 19 representantes de *M. subtile*.

Se procedió a un análisis de componentes principales en busca de variables correlacionadas y de componentes que permitan disminuir el número de variables que expliquen el conjunto de datos. En la matriz de correlación (Tabla 1.4) los valores superiores a 0.4 indican la existencia de correlación entre variables.

Matriz de correlación

	AA	AE	AT	DC	LA	LE	NCHE
AA	1,000	-,087	-,135	,104	,272	,206	-,146
AE	-,087	1,000	,105	,194	,142	,206	,006
AT	-,135	,105	1,000	,381	-,139	-,162	,050
DC	,104	,194	,381	1,000	,041	,058	-,118
LA	,272	,142	-,139	,041	1,000	,613	,119
LE	,206	,206	-,162	,058	,613	1,000	,151
NCHE	-,146	,006	,050	-,118	,119	,151	1,000

Tabla 1.14. Matriz de correlación establecida entre las siete variables objeto de estudio. : Nche, número de capas de hifas presentes en el excípulo; At, altura total del apotecio (mm); Dc, diámetro del capítulo(mm); La, longitud del asco (μm); Aa, anchura del asco (μm); Le, longitud de las esporas (μm); Ae, anchura de las esporas.

Sólo se observa correlación entre las variables La y Le. En la composición de factores a partir de las variables se seleccionan aquellos componentes con autovalores superiores a 1, obteniéndose tres componentes que permiten explicar el 65% de la varianza observada (Tabla 1.15).

Para poder explicar un 87% de la varianza se requieren 5 factores, los dos últimos con autovalores inferiores a 1 (Tabla 1.15). Este resultado indica que las variables son independientes y no puede ser reducido el número de variables de forma aceptable.

Componentes principales			
	Autovalores	% varianza explicada	% varianza acumulada
1	1,879	26,847	26,847
2	1,482	21,177	48,024
3	1,210	17,283	65,306
4	,914	13,061	78,368
5	,612	8,746	87,113
6	,527	7,529	94,642
7	,375	5,358	100,000

Tabla 1.15. Análisis de componentes principales: varianza total explicada .

Se procede a la realización de análisis de agrupamiento jerárquico y no jerárquico.

En el agrupamiento jerárquico podemos distinguir cuatro conjuntos de muestras, dos de ellos constituidos por un solo especimen (Figura 1.9).

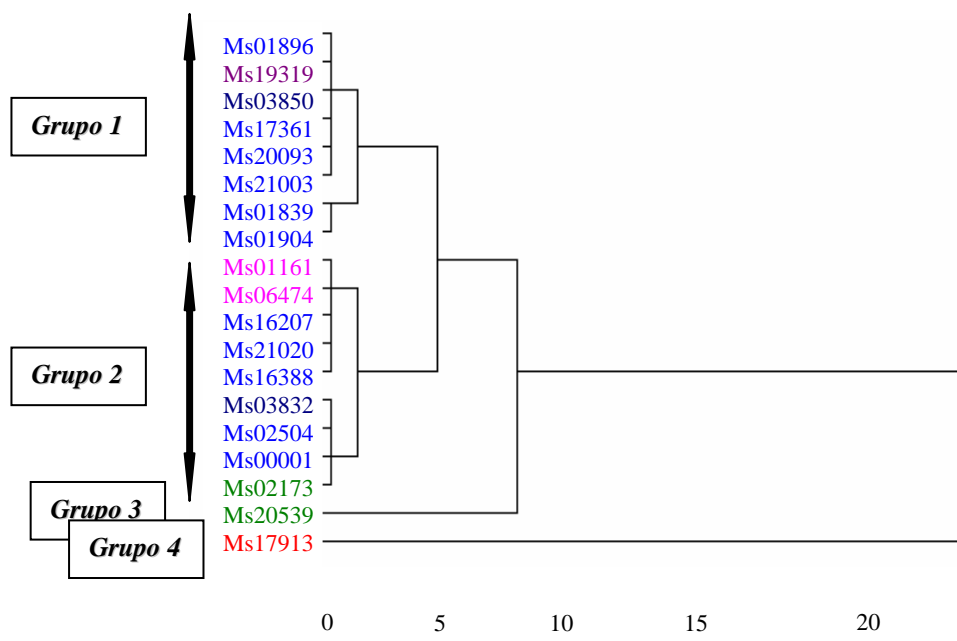


Figura 1.9. Análisis de agrupamiento jerárquico mediante distancias euclídeas al cuadrado, realizado a partir de los caracteres morfológicos medidos en la Tabla 1.13. Los colores indican el origen geográfico de las muestras: Norte de Europa, Este de Europa, Este de Asia, Norte de América, Sur de América, Oceanía.

La muestra Ms17913 procedente de América del Sur aparece aislada, en una posición distante del resto. En una posición también aislada se encuentra formando otro grupo la

muestra Ms20539, procedente de Nueva Guinea. Los especímenes restantes forman una agrupación claramente divisible en dos subgrupos. En cuanto al origen geográfico de las muestras, se observa que los dos especímenes procedentes de América del Norte, se localizan en un mismo grupo junto a representantes del norte de Europa mayoritariamente. Sin embargo los representantes de Europa del este no aparecen en el mismo conjunto y lo mismo sucede con los de Oceanía. La topología de este agrupamiento no coincide con la obtenida a partir de datos genéticos, excepto en el aislamiento de Ms17913 observado en ambos casos.

En los análisis de agrupamiento no jerárquico se escoge un agrupamiento preliminar en cuatro grupos. El resultado (Tabla 1.16) es similar a los grupos obtenidos en el agrupamiento jerárquico con la excepción del espécimen Ms01161 que pasa a formar un grupo con Ms20539.

GRUPOS K=4	ESPECÍMENES	GRUPOS K=3
1	Ms00001	1
1	Ms16207	1
1	Ms21020	1
1	Ms02504	1
1	Ms03832	1
1	Ms02173	1
1	Ms16388	2
1	Ms06747	2
2	Ms01161	2
2	Ms20539	2
4	Ms01839	3
4	Ms01896	3
4	Ms01904	3
4	Ms20093	3
4	Ms21003	3
4	Ms17361	3
4	Ms03850	3
4	Ms19319	3
3	Ms17913	-

Tabla 1.16 Distribución de los especímenes de *M. subtile* en cada grupo tras los análisis de agrupamiento no jerárquico, K=4, K=3.

Para poder realizar un análisis discriminante que permita verificar la estabilidad de los grupos es necesario que el número de elementos que constituyen cada grupo sea homogéneo. Para ello se elimina la muestra Ms17913 que siempre da lugar a un grupo de un elemento, y se realiza un nuevo agrupamiento esta vez en tres grupos. Se obtienen grupos de 6, 4 y 8 elementos (Tabla 1.16), que permiten la realización de un análisis discriminante por pasos, en el que se toma K3 (Tabla 1.13) como variable clasificatoria que representa los grupos obtenidos. A partir de las siete variables empleadas en el establecimiento de grupos se realiza un ANOVA (Tabla 1.17) respecto a los tres grupos obtenidos y se observa que en las variables La y Nche se rechaza la hipótesis nula de la igualdad de medias entre los grupos con más del 95% de confianza, es decir, que el valor medio de la longitud del asco y del número de capas de hifas presentes en el excípulo es significativamente distinto en cada uno de los tres grupos establecidos por el análisis de agrupamiento.

Prueba de la igualdad de las medias

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
AA	,983	,131	2	15	,878
AE	,822	1,627	2	15	,229
AT	,968	,250	2	15	,782
DC	,841	1,421	2	15	,272
LA	,144	44,627	2	15	,000
LE	,947	,424	2	15	,662
NCHE	,592	5,178	2	15	,020

Tabla 1.17 ANOVA realizado para siete variables en el conjunto de los 18 especímenes analizados de *M. subtile*. Se establece una hipótesis nula en la que se supone que el valor medio de las variables son iguales para todos los grupos. Los valores de significación inferiores a 0.05 indican que se rechaza esa hipótesis nula con una probabilidad superior al 95%. La y Nche son las variables que rechazan la hipótesis nula.

Sin embargo, las medias del resto de las variables no son significativamente distintas, de modo que es la longitud del asco y la complejidad del excípulo las variables que mayoritariamente definen los grupos. Para confirmar estos resultados se realiza un análisis discriminante por pasos. El proceso se detiene en el segundo paso. En el primer paso se selecciona la variable La y en el segundo la variable Nche. Con estas variables construimos funciones discriminantes canónicas que ofrecen un modelo lineal que permite la

descripción de los grupos. Dos funciones son suficientes para explicar el 100% de la varianza (Tabla 1.18).

Discriminante canonica

Función	Autovalores	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)	Correlación canonica
1	5,993	89,7	89,7	,926
2	,687	10,3	100,0	,638

Tabla 1.18. Selección del número de funciones discriminantes canónicas que son necesarias para explicar el 100% de la varianza observada.

Aplicando los valores de las variables a las funciones discriminantes obtenidas se obtiene que un 100% de los casos se encuentra correctamente clasificados. La representación gráfica de los valores de ambas funciones para cada elemento, en dos ejes de coordenadas, permite la observación del agrupamiento de las muestras (Figura 1.10).

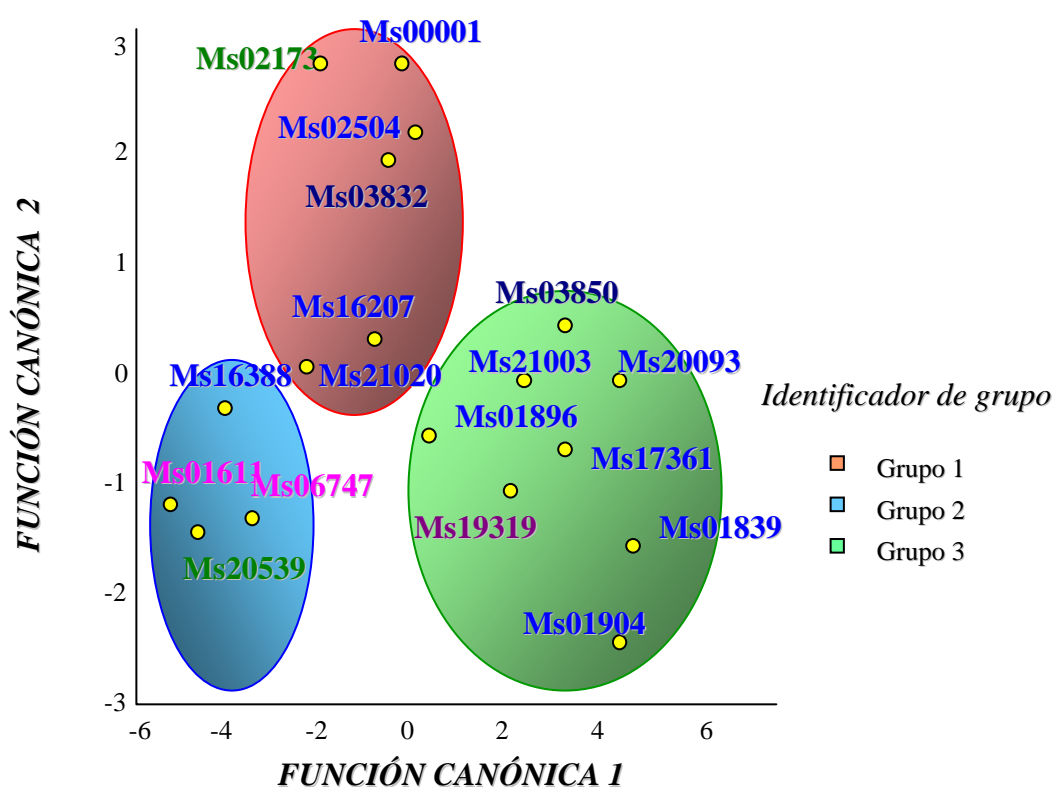


Figura 1.10. Agrupamiento en tres conjuntos de los 18 especímenes analizados de *M. subtile*. Las dos primeras funciones canónicas explican el 100% de la varianza observada. La variable con mayor peso en la función canónica 1 es la longitud del asco (La). En la función canónica 2 la variable con más peso es el número de capas de hifas en el excípulo (Nche). Los colores de los códigos de los especímenes indican un origen geográfico: Norte de Europa, Este de Europa, Este de Asia, Norte de América, Oceanía.

La primera función explica el 90% de la varianza (eje X), siendo la variable La la que otorga un mayor peso. El gráfico muestra una buena separación de los grupos. El valor medio de la longitud del asco (La) de las muestras presentes en el grupo 3 es mayor que la media en los grupos 1 y 2 (Tabla 1.19).

Variabes	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
AA	3.6	3.50	3.56
AE	3.48	3.82	3.68
AT	0.58	0.65	0.59
DC	0.14	0.18	0.183
LA	39.93	37.15	43.22
LE	7.16	6.97	7.26
NCHE	7.00	4.75	5.25

Tabla 1.19. Valores medios de las variables en cada grupo

No se observa un agrupamiento coincidente con el origen de las muestras. En los tres grupos aparecen representantes procedentes del norte de Europa, pero esto no es extraño debido al exceso de representación de muestras con esta procedencia. Las muestras procedentes de América del norte aparecen en el mismo grupo, pero no ocurre lo mismo con las del este de Europa y Oceanía.

Las muestras que en el análisis genético aparecen como un grupo claramente distinguible (Ms02173 y Ms01896) no se agrupan, lo que indica que no son semejantes en cuanto a sus características morfológicas ni de distribución geográfica.

Las dos muestras identificadas como *M. minutellum* (Ms00001 y Ms16207) se encuentran en el mismo grupo (grupo 1), caracterizado por un valor intermedio en cuanto a la longitud del asco. Observando los valores medios de la variable que indica la altura total del apotecio para cada grupo, se observa que el grupo 1 tiene el valor menor.

En un intento de relacionar los agrupamientos obtenidos en función de caracteres genéticos con las características morfológicas, se realiza un análisis discriminante tomando GDNA como variable clasificatoria. Esta variable puede tomar los valores 1 y 2, que indican la pertenencia de las muestras a los dos grandes subgrupos obtenidos en el análisis genético (Figuras 1.3, 1.4, 1.6). Se eliminan por tanto del análisis aquellos especímenes de posición poco definida en el análisis genético (Ms01161, Ms19319, Ms17913), así como los

especímenes de *M. subtile* que se desligan de la especie (Ms02173 y Ms01896). Se realiza un ANOVA (Tabla 1.20) para las siete variables en función de los dos grupos GDNA y se obtiene una sola variable cuya media es significativamente distinta para cada grupo, esta variable es el número de capas de hifas presentes en el excípulo.

Prueba de igualdad de medias

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
AA	,964	,452	1	12	,514
AE	,995	,061	1	12	,810
AT	,974	,325	1	12	,579
DC	,770	3,581	1	12	,083
LA	1,000	,005	1	12	,947
LE	,989	,130	1	12	,725
NCHE	,438	15,429	1	12	,002

Tabla 1.20. ANOVA realizado para siete variables en el conjunto de especímenes de *M. subtile* constituyentes de los dos subgrupos principales encontrados en la especie tras su análisis genético. La variable Nche es la única que rechaza la hipótesis nula.

En el análisis discriminante por pasos se seleccionan dos variables, la complejidad del excípulo (Nche) y el diámetro del capítulo (Dc). Con estas variables se genera una función discriminante que permite explicar el 100% de la varianza (Tabla 1.21). La variable Nche es la que proporciona un mayor peso a la función. Aplicando los valores de las variables a la función se obtiene que un 93% de los casos se encuentran correctamente clasificados.

Autovalores

Función canónica	Autovalores	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)	Correlación canónica
1	3,211	100,0	100,0	,873

Tabla 1.21. Funciones canónicas necesarias para explicar el 100% de la varianza observada.

Este resultado apoya la división de los especímenes de *M. subtile* empleados en dos grupos, obtenidos mayoritariamente en función de la complejidad de su excípulo. Los valores de la variable Nche se encuentran en el rango de 3-9. El grupo 1 (Figura 1.11) consta de ocho elementos y se caracteriza por una media de 4.7 capas de hifas en el excípulo.

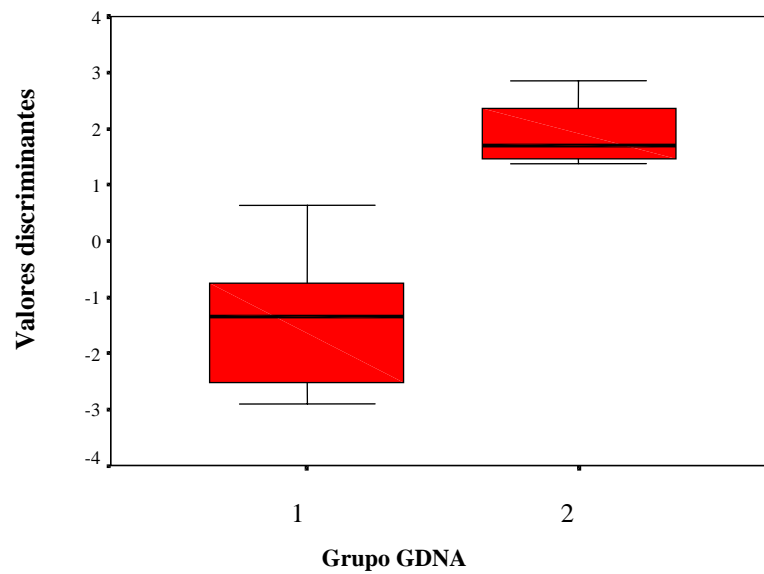


Figura 1.11. Diagrama de cajas en el que se representan los dos grupos obtenidos en el análisis discriminante a partir de una sola función canónica, en la que el mayor peso recae sobre la variable Nche.

El grupo 2 contiene seis elementos y se caracteriza por presentar una media de 7 capas de hifas en el excípulo. Dividiendo la variable Nche en dos subgrupos, que indiquen excípulos menos (3,4,5 capas) y más (6,7,8,9 capas) complejos obtenemos una distribución muy semejante a la obtenida en función de datos genéticos, para las 14 muestras analizadas.

4. Discusión

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha introducido nuevos puntos de vista en la sistemática de los organismos, permitiendo la adquisición y análisis de secuencias, y generando información con valor filogenético. La secuencia genética es un registro histórico de la evolución, por tanto, la determinación de la estructura primaria de fragmentos de ADN, es una aproximación al estudio de las relaciones evolutivas de las moléculas y de los organismos de los que proceden.

La enorme aceptación de estas técnicas ha traído consigo el olvido, en parte, de datos de distinta naturaleza, que pueden proporcionar informaciones válidas.

El establecimiento de la taxonomía de un organismo en función de la recolección y el análisis de un solo tipo de datos, proporciona un conocimiento limitado. La búsqueda de congruencia entre datos de distinta naturaleza, morfológicos, genéticos, químicos, etc... permiten contrastar hipótesis y proporcionan conclusiones más firmes. Para ello, es necesario un conocimiento previo de los organismos en estudio, que nos permita realizar hipótesis acerca de qué datos pueden ser más representativos de su historia evolutiva, en función del nivel taxonómico que queramos analizar.

La información proporcionada por moléculas como son los marcadores quimiotaxonómicos (metabolitos secundarios), sintetizados bajo el control de sus genes, no ha sido considerada válida previamente por algunos autores (Rogers, 1989, Mantle, 1994) para la obtención de relaciones evolutivas, puesto que distintas rutas con distintos enzimas en distintos organismos pueden generar moléculas similares. A pesar de no tener un valor filogenético claro, los marcadores químicos así como los patrones de metabolitos secundarios obtenidos por HPLC (Frisvad, 1992), son útiles en la caracterización taxonómica de especies definidas genéticamente (Stackebrandt y Rainey, 1995).

4.1 Análisis de la variabilidad intraespecífica en *Mycocalicium subtile*.

La elección de la región más apropiada del material genético para realizar un análisis de variabilidad en un determinado nivel taxonómico, es una decisión crítica para obtener resultados informativos. En el estudio de variaciones intraespecíficas, los espaciadores internos (ITS) se muestran como la mejor opción, dado el elevado nivel de variación

descrito para esta región en la literatura (Bruns et al., 1991, Samuels y Seifert, 1995). Sin embargo el grado de variabilidad dentro de cada especie es distinto en función de las fuerzas evolutivas a las que se encuentre sometida y al tiempo transcurrido desde su divergencia a partir de su ancestro. De esta forma se pueden encontrar trabajos que presentan porcentajes elevados de variabilidad intraespecífica en esta región (O' Donnell, 1992, Yan et al., 1995, Pramateftaki et al., 2000). Así mismo en otras especies se describen variaciones mínimas (Carbone y Kohn, 1993, Sreenivasaprasad et al., 1993). Es conveniente, por tanto, realizar un análisis previo a la secuenciación, en el que se discrimine de una forma rápida la existencia o no de variabilidad en la región supuestamente adecuada. En nuestro caso, este análisis previo se ha realizado mediante búsqueda de polimorfismos, en los patrones de los fragmentos producidos por la digestión del gen y regiones intergénicas, con una serie de enzimas de restricción.

Se emplearon 7 enzimas de restricción en reacciones aisladas frente a 8 especímenes de *M. subtile*, y se obtuvieron entre cuatro y seis patrones diferentes con cada enzima. La observación de patrones distintos se debe a la aparición o desaparición de dianas para las enzimas de restricción, hecho que indica que la secuencia nucleotídica ha sufrido mutaciones. El análisis de los lugares y tipos de mutaciones ocurridas en un conjunto de secuencias, se realiza mediante técnicas de secuenciación, alineamiento y análisis del alineamiento.

La variabilidad observada en las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de distintos especímenes de la especie *M. subtile*, se debe en su mayoría a mutaciones por transición de bases, probablemente derivadas de errores espontáneos no corregidos en el proceso de replicación. Las secuencias de los especímenes Ms01896 y Ms02173 muestran sin embargo un elevado número de transversiones y "gaps" respecto al resto de las secuencias de la especie. Las transiciones y transversiones son mutaciones puntuales que pueden suceder de forma espontánea en una secuencia de nucleótidos. Las transiciones son más comunes y pueden ocurrir por conversión química directa de una base en otra (Lewin, 2000), o por la presencia de formas tautoméricas de las bases que modifican el número de hidrógenos libres e inducen su apareamiento con bases incorrectas (Suzuki et al., 1990). Los fenómenos de transversión son menos frecuentes y su mecanismo aún poco conocido. Las diferencias en la frecuencia de aparición en cada tipo de mutación entre secuencias homólogas, proporciona información filogenética. Las transiciones, al ser fenómenos más comunes sugieren procesos evolutivos próximos, mientras que las transversiones son fenómenos más raros cuya presencia indica una mayor divergencia evolutiva.

Los distintos análisis de inferencia filogenética realizados a partir de las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2, de un conjunto de 19 especímenes de *Mycocalicium subtile*, confirman la naturaleza heterogénea de la especie, ya descrita por Tibell (1987a).

La heterogeneidad genética se localiza básicamente en la secuencia de los especímenes Ms01896 y Ms02173, procedentes de Suecia y Nueva Zelanda respectivamente. Estos dos especímenes aparecen como un grupo monofilético frente al resto con un soporte superior al 83% en todos los casos (Figuras 1.3, 1.4, 1.6).

Los análisis de patrones de metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivos en medios sólido y líquido confirman los datos genéticos, respecto a la diferenciación de Ms02173 y Ms01896 del resto de los especímenes de la especie (Figura 1.7, 1.8). El estudio morfológico, sin embargo, no apoya el agrupamiento de estas dos especies respecto al resto. Ms01896 forma parte de un grupo que se mantiene constante en los distintos análisis de agrupamiento, caracterizado por unas longitudes medias de sus ascos de 43.2 μm y 5.2 capas de hifas en el excípulo (Tabla 1.19) Ms02173 se localiza en distintas posiciones según los análisis, pero en general se asocia a especímenes caracterizados por un tamaño de asco ligeramente menor (39.9 μm) a las descritas en el grupo anterior, pero con un excípulo más complejo, formado por una media de 7 capas de hifas.

Según su morfología se trata sin duda de representantes de *M. subtile*. Sus características morfológicas se encuentran dentro de los rangos de valores establecidos para la especie (Tibell, 1987a). Su única posibilidad de confusión es con *M. albonigrum*, tomando como base los datos genéticos (Figura 1.4). La aproximación a su filogenia por distancias genéticas, muestra a estos especímenes como monofiléticos con *M. albonigrum*, pero con un soporte bajo. La asociación de estos especímenes con *M. albonigrum*, también se ha observado en función de los patrones de producción de metabolitos secundarios en cultivo. Las características de *M. subtile* solapan, en algunos casos, con las de *M. albonigrum*, tanto en morfología como en ecología y distribución (Tibell, 1987a). Las características con mayor peso en la discriminación morfológica entre estas especies, se centran en la presencia de un fino canal que atraviesa el ápice del asca en estadios semimaduros de *M. albonigrum*, así como la presencia de un excípulo formado por células isodiamétricas organizadas en un número pequeño de capas (2-4).

Los especímenes Ms02173 y Ms01896, carecen de canal en el ápice del asco y la organización de su excípulo tiene lugar en ocho y cinco capas respectivamente.

Estos especímenes ya fueron empleados en estudios anteriores como claros representantes de la especie *M. subtile*. En el estudio comparativo sobre las diferencias en cuanto a la

formación y estructura de los anamorfos en las especies *M. subtile* y *M. albonigrum* (Tibell, 1990), estos dos especímenes fueron algunos de los seleccionados como representantes de la especie *M. subtile*. No existe duda sobre la correcta identificación morfológica de estos dos especímenes, dentro de la especie *M. subtile*.

En los análisis químicos de producción de compuestos se puede observar el agrupamiento de estos dos especímenes entre sí (Ms02173 y Ms01896). Este agrupamiento se identifica por un patrón, formado por los picos P15.5 y P26.5. Ninguno de estos compuestos es producido por *M. subtile*, sin embargo, ambos forman parte del patrón de producción de *M. albonigrum*.

Estos dos especímenes comparten con *M. subtile* algunos picos (P16, P60), pero en ningún caso se trata de compuestos presentes en todas las muestras y réplicas, que puedan sugerir un patrón de producción común.

La topología de los árboles inferidos en función de la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2, apoya la cercanía del grupo formado por estos dos especímenes con el resto de los representantes de la especie *M. subtile*. Así mismo, la secuenciación de otra región del genoma (mitad 5' del gen 28S), realizada con otros fines en el bloque 2 de esta tesis, corroboran también esta relación (Figura 2.5, bloque 2, pag. 101).

Sin embargo la formación de un grupo monofilético que incluya a estos dos especímenes con el resto de los representantes de *M. subtile* presenta un soporte bajo, inferior al 67% según "Jackknife parsimony" (Fig.1.6).

En resumen, los especímenes Ms02173 y Ms01896 no presentan diferencias morfológicas distinguibles del resto de los representantes de la especie *M. subtile*, y el agrupamiento producido en función de siete características morfológicas no señala ninguna tendencia hacia el agrupamiento de estos dos especímenes. Sin embargo, el agrupamiento de estas muestras entre sí, y con *M. albonigrum*, es evidente en función de sus patrones de producción de metabolitos secundarios. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 de su ADNr, muestra su diferenciación genética tanto de *M. subtile* como de *M. albonigrum*.

A juzgar por estos resultados este grupo podría constituirse como un taxón perteneciente al género *Mycocalicium*, *Mycocalicium sp.* 02173 y *Mycocalicium sp.* 01896, no descrito y morfológicamente críptico respecto a *M. subtile*.

Su caracterización como tal requiere la obtención de un mayor número de especímenes que compartan sus características genéticas y químicas.

El origen geográfico tan diverso en estos dos especímenes es interesante. Esto podría ser debido a la existencia de mecanismos de dispersión a larga distancia dentro del género (Tibell, 1994a).

Los diecisiete especímenes analizados de *M. subtile* forman un grupo monofilético con un soporte superior a 99%. Pueden distinguirse dos subgrupos y tres especímenes de posición no resuelta (Figura 1.6). Entre estos últimos se encuentra el espécimen Ms17913 procedente de América del sur. En este caso los datos morfológicos confirman esta situación, puesto que *M. subtile* 17913 aparece siempre aislado debido a su mayor tamaño de ascas y esporas. Los otros dos especímenes de posición no resuelta en los dos grandes grupos, según datos genéticos, son Ms01161 y Ms19319. Esta falta de resolución se traduce en una politomía en el análisis de Jackknifing (Figura 1.6). *M. subtile* 01161 procede de Norte América. Según el análisis químico (Tablas 1.9 y 1.11) produce el patrón mayoritario característico de la especie. Tiende hacia una semejanza en la producción en la producción de compuestos minoritarios con *M. subtile* 02504, procedente de Suecia, así como con *M. subtile* 21020, también de Suecia. Morfológicamente forma parte del grupo 2, junto con otro representante de América del norte, uno de Nueva Guinea y uno de Suecia. Este grupo se caracteriza por poseer ascas de menor longitud. Estos especímenes con los que comparte características se localizan con buen soporte en los dos grandes subgrupos observados en los análisis genéticos de la especie.

M. subtile 19319 procede del este de Asia y se agrupa según su morfología con especímenes del norte y este de Europa, en un grupo que contiene la media más alta respecto al tamaño de sus ascas. Sus características morfológicas y de distribución geográfica no explican la posición de este espécimen en el análisis genético.

El resto de los especímenes en el análisis genético constituyen dos agrupamientos con soporte superior al 74% en todos los análisis.

En este caso los patrones de producción de compuestos no aportan información adicional puesto que todos estos representantes de la especie muestran un patrón de producción común, formado por los compuestos P5, P9, P10 y P11 (Tabla 1.9). El compuesto que se produce en mayores cantidades en esta especie es el denominado P5, cuya estructura se intentó elucidar sin éxito. La identificación de los compuestos integrantes de los patrones característicos de las distintas especies serán muy útiles como criterio taxonómico.

La variabilidad morfológica en *M. subtile* ha sido descrita previamente (Tibell, 1987a), sugiriéndose que la especie podría contener poblaciones susceptibles de ser consideradas como taxones distintos. Esta variabilidad se centra en la plasticidad de la estructura del

excípulo. Se ha sugerido que poblaciones con distinto tipo de excípulo podrían habitar distintas áreas o nichos ecológicos, sin embargo, la existencia de especímenes con características intermedias y la ausencia de evidencias acerca de la existencia de esta relación ecofenotípica, han impedido el establecimiento de distintos taxones (Vinuesa et al., 2001). En nuestro análisis morfológico el tipo de excípulo se evalúa por el número de capas de hifas que contiene. En un análisis discriminante, realizado en función de las siete características morfológicas empleadas en los análisis de agrupamiento, tomando como muestras únicamente los especímenes de estos dos grandes subgrupos genéticos de la especie, y empleando este valor como variable clasificatoria (GDNA), se obtiene una función discriminante que explica esta distribución en dos grupos. En esta función sólo son necesarias dos de las siete variables, siendo el número de capas de hifas constituyentes del excípulo (Nche), la variable con más peso en la función. Nuestros resultados sólo tienen validez descriptiva del conjunto de las muestras utilizadas, pero no predictiva, puesto que el número de muestras disponibles es bajo. Aún así, estos resultados sugieren una correspondencia entre la variación morfológica, representada por la complejidad del excípulo y la genética para los dos conjuntos de especímenes de *M. subtile* empleados. Esto apoyaría la hipótesis de Tibell acerca de la existencia de poblaciones distinguibles en función de la estructura de su excípulo, con posibilidad de ocupar distintos nichos ecológicos. La relación entre la ecología y la estructura de su excípulo es incierta, aunque se podría sugerir que puesto que el excípulo es una capa con función protectora de la capa fértil (himenio), la complejidad de su estructura podría estar en función de una mayor o menor necesidad de protección según se trate de poblaciones que se desarrollen en lugares más o menos expuestos a rigores climáticos o de defensa frente a otros organismos. No se ha encontrado una relación entre la estructura del excípulo y la distribución geográfica de las muestras. Muestras procedentes de la misma zona se localizan en grupos distintos, por lo que sería interesante tener información de las características microclimáticas de cada espécimen para estudiar la posibilidad de establecer las relaciones anteriormente sugeridas.

4.2 Establecimiento de *M. minutellum* como sinónimo de *M. subtile*

M. minutellum fue reconocido como un taxón diferente de *M. subtile* caracterizado por sus apotecios de pequeño tamaño (Poelt, 1969). Sin embargo esta única característica morfológica fue considerada insuficiente en trabajos posteriores, para su reconocimiento

como especie (Tibell 1987b). En nuestros análisis morfológicos, genéticos y químicos se incluyen dos muestras que fueron originariamente identificadas como *M. minutellum* y se observó su comportamiento.

Según el estudio genético ambas muestras forman parte del conjunto central de especímenes de *M. subtile*, aunque cada una se localiza en uno de los dos grandes subgrupos encontrados (Figura 1.3). Por lo tanto genéticamente no son más parecidos entre sí que con el resto de los representantes de la especie.

En el análisis morfológico de agrupamiento no jerarquico en tres grupos, encontramos a estos dos especímenes formando parte de un mismo grupo (Grupo 2 Figura 1.10) que comparten con otros cuatro especímenes de *M. subtile*. Este grupo se caracteriza por poseer un valor intermedio respecto a la longitud de sus ascos y a una alta complejidad de su excípulo (Tabla 1.19). Observando los valores medios de cada grupo para el tamaño de sus apotecios, encontramos el valor mínimo en el grupo 2 al que estos especímenes pertenecen. Puesto que en función de datos de distinta naturaleza no se obtienen resultados que apoyen la discriminación de los especímenes identificados como *M. minutellum* en el sentido de Poelt, se establece como válida la hipótesis de Tibell en la que se considera *M. minutellum* como un sinónimo de *M. subtile*.

4.3 Discriminación genética y química entre *M. subtile* y *M. albonigrum*

M. subtile y *M. albonigrum* son dos especies muy semejantes morfológicamente, de modo que su discriminación en función de los pocos caracteres morfológicos disponibles es dificultosa. El estudio de sus diferencias en la producción y estructura de sus anamorfos en cultivo (Tibell, 1990), aportó un nuevo conjunto de datos sobre los que establecer diferencias entre estas especies. En nuestro estudio sobre la variabilidad genética en *M. subtile* se incluyen cuatro representantes de *M. albonigrum* y otras especies relacionadas con fines comparativos. Los árboles filogenéticos obtenidos en función de la secuencia de nucleótidos de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, apoya el reconocimiento de *M. subtile* como especie diferente de *M. albonigrum*. Los representantes de cada especie se agrupan entre sí con porcentajes de soporte del 100% (Figura 1.6). El estudio detallado de las secuencias permite observar diferencias entre las especies, no solo en el rango de longitud total de la región secuenciada, sino también en el tipo de mutaciones que establecen las diferencias entre especímenes. Dentro de cada especie, sus representantes difieren por

mutaciones de tipo transición mayoritariamente, mientras que entre las especies aparecen transiciones en mayor número y además mutaciones de tipo transversión, e inserciones/deleciones.

En conclusión, la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr permite de una forma rápida la discriminación entre las especies *M. subtile* y *M. albonigrum*. La secuenciación de un mayor número de representantes de *M. albonigrum* procedentes de distintas áreas geográficas podría permitir el diseño de sondas de ADN específicas para cada especie que permitan su identificación mediante técnicas de hibridación, o bien de presencia/ausencia de amplificación por PCR.

Los patrones de producción de compuestos son también diferentes para cada especie. La especie *M. albonigrum* viene representada por un solo espécimen en este estudio, pero se puede observar que los compuestos producidos por ella tanto en cultivo líquido como en sólido no siguen el mismo patrón que el mostrado por *M. subtile* (Tabla 2.12, Anexo 2, pag 224-226). En cultivo sólido se observan picos compartidos entre *M. albonigrum* y representantes de *M. subtile*, especialmente con Ms20093 y Ms02504 (Tabla 1.11, Anexo 1, pag. 209), aunque principalmente su patrón de producción es parecido al obtenido por las muestras Ms02173 y Ms01896 (Tabla 1.9). Por el momento no ha sido descrito ningún metabolito secundario de las especies *M. subtile* ni *M. albonigrum*, aunque si se señala la presencia de pigmentos de estructura desconocida (Tibell, 1984, 1990).

A pesar de la escasez de representantes de *M. albonigrum* en nuestro estudio, se puede apuntar que la producción de compuestos a partir de cultivos en medio líquido y sólido podría constituir un conjunto válido de datos para la discriminación entre las especies *M. subtile* y *M. albonigrum*, aunque sería necesaria la utilización de un mayor número de representantes de la especie *M. albonigrum*, para establecer el patrón de producción de metabolitos en esta especie y permitir la discriminación respecto a *M. subtile*

CONCLUSIONES

De los análisis realizados se obtienen las siguientes conclusiones:

- 1) La especie *Mycocalicium subtile*, representada por diecinueve especímenes de distintos orígenes geográficos, muestra variabilidad genética en función de los patrones de restricción generados mediante la fragmentación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico.
- 2) El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, en diecinueve representantes de *Mycocalicium subtile*, muestra dos grupos dentro de la especie, apoyados por porcentajes de soporte del 80%-90%.
- 3) La evaluación de estos grupos mediante un análisis discriminante en función de siete características morfológicas, es congruente entre los grupos establecidos por el análisis genético y la complejidad en la estructura del excípulo. Este resultado refuerza la hipótesis de Tibell (1984), en la que plantea la posible discriminación de distintos taxones dentro de *M. subtile*, establecidos en función de la variabilidad en la estructura de su excípulo.
- 4) El análisis de la secuencia genética de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, ha permitido detectar dos especímenes genéticamente distintos, pero indistinguibles en su caracterización morfológica, respecto de la especie *M. subtile*. Estos especímenes podrían constituir una especie nueva.
- 5) Los análisis filogenéticos basados en la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, sitúan a los representantes de esta especie morfológicamente críptica más cercanos a la especie *M. subtile* que a *M. albonigrum*. Sin embargo, el análisis de los metabolitos producidos en cultivo muestra, en estos especímenes, un patrón de producción semejante a *M. albonigrum*.
- 6) La ausencia de patrones de restricción comunes, en la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico entre los diecinueve representantes de *M. subtile* y los cuatro de *M.*

albonigrum, así como los análisis filogenéticos realizados en función de la secuencia de la misma región, indican que existen diferencias suficientes en su secuencia que permiten la discriminación genética entre estas especies.

7) Se confirma, en función del análisis de la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, que la especie *M. minutellum*, es un sinónimo de *M. subtile*.

BLOQUE 2. Demarcación de los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* (*Mycocaliciaceae*).

1. Introducción.

En la familia *Mycocaliciaceae* A. Schmidt, se reconocen actualmente cuatro géneros, *Mycocalicium* Vainio, *Chaenothecopsis* Vainio, *Phaeocalicium* A. Schmidt y *Stenocybe* (Nyl.) Koerb. (Tibell, 1984). *Mycocalicium*, es el género tipo. A medida que se describen nuevas especies, aumenta la duda acerca del valor taxonómico de los caracteres que se han empleado hasta ahora para definir cada uno de ellos (Tibell, 1994b). En 1970, Schmidt consideró que las estructuras del asco y del pedúnculo, así como el tamaño y número de septos en las esporas, eran los caracteres más importantes para la discriminación de los géneros de esta familia (Schmidt, 1970). Las características morfológicas y químicas, presentes en los cuerpos fructíferos de este grupo de hongos son escasas. Esta escasez de caracteres analizables, junto con la variabilidad que presentan en algunas de las especies, dificulta la selección de un grupo de características que permitan delimitar cada género.

El género con mayor número de especies es *Chaenothecopsis* Vainio. Está formado por 55 especies de hongos de ecología variada. La especie tipo del género es *Chaenothecopsis rubescens* Vainio. Pueden ser saprófitos de plantas vasculares, o bien parásitos de líquenes o de algas de vida libre. También se pueden encontrar sobre exudados de distintas plantas vasculares. Muchas de las especies resinícolas son específicas de un solo sustrato. En ningún caso forman asociaciones liquénicas. Sus cuerpos fructíferos son apotecios sin margen talino, que presentan un pedúnculo de longitud variable. Este pedúnculo está formado por hifas generalmente poco pigmentadas que se entrelazan de forma irregular, aunque hay excepciones en las que la organización de las hifas es periclinal (Tabla 2.1). Sus ascos son unitunicados y presentan un fino canal que atraviesa el engrosamiento apical. Sus esporas son de color marrón, elipsoidales y pueden ser unicelulares o bicelulares y con mecanismos de dispersión activa, por lo que no forman mazedio.

La estructura y tamaño del asco y la anatomía del pedúnculo en *Chaenothecopsis* comprende una variación considerable. En algunos casos son bastante similares a los que Schmidt describió como características de *Mycocalicium* o *Phaeocalicium* (Tibell, 1995).

El género *Mycocalicium* Vainio contiene 10 especies de hongos saprófitos no liquenizados. Sus cuerpos fructíferos son apotecios pedunculados sin margen talino. Sus ascos son unitunicados y permanecen hasta la madurez de las esporas. No forman mazedio.

ESPECIE	APOTECIO	EXCIPULO	PEDÚNCULO	ASCOS	ESPORAS	ECOLOGÍA	DISTRIBUCIÓN	OBSERVACIONES
	A) Tamaño B) Forma C) Color	A) Grosor B) Disposición - hifas	A) Disposición - hifas B) Color	A) Forma B) Tamaño C) Ápice	A) Forma B) Tamaño C) Color D) N° de septos			
<i>C. debilis</i>	A) 0.7-1.4 mm B) Lenticular C) Negro brillante	A) 10-35 µm. Desarrollo variable B) 7- 8 capas de hifas periclinales	A) Periclinal B) Negro en el exterior, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 40-54 X 2.7- 3.3µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 6.5-9.8 X 2.2- 3.3µm C) Marrón D) Un septo	Sobre troncos decorticados.	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Anamorfo tipo celomiceto, semejante al producido por <i>Mycocalicium</i>
<i>C. nana</i>	A) 0.37-0.63 mm B) Lenticular - irregular C) Negro	A) 11-14µm.Poco desarrollado	A) Periclinal B) Marrón a verde en el exterior, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 26-33 X 3.1- 3.8µm C) Engrosamiento con canal	A) Fusiformes B) 5.4-6.8 X 2.8-3.4 µm C) Marrón oscuro D) Sin septo	Saprófito. Sobre madera en zonas expuestas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Las hifas en la base del pedúnculo se organizan de forma irregular
<i>C. viridireagens</i>	A) 0.5-1.2 mm B) Esférico - hemisférico C) Negro	A) 10-14µm B) Periclinal a irregular	A) Irregular B) Marrón oscuro, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 33-39 X 2.2- 3.3µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 6-7.1 X 2.2-2.7µm C) Marrón claro D) Un septo	Parásito o parasimbionte de líquenes (Chaenotheca) o algas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Anamorfo <i>Asterophoma sp.</i> ; Sinanamorfo <i>Phialopora</i>
<i>C. haematopus</i>	A) 0.7 - 1.3 mm B) Esférico - hemisférico C) Negro	A) -35 µm. Poco desarrollado B) 3-4 capas	A) Periclinal B) Marrón rojizo, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 29-35 X 2.8-4µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 3.5-6 X 2-3.5 µm C) Marrón claro D) Sin septo	Saprófito. Sobre coníferas Parásito o parasimbionte de líquenes o algas.	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Anamorfo <i>Catenomyces rosea</i> Asociado a otros "calicioides"

Tabla 2.1. Características morfológicas de las especies del género *Chaenothecopsis* empleadas en nuestros análisis genético y químico. Se incluye información acerca del tipo de sustrato sobre el que vive y el tipo de anamorfo que produce tanto en estado natural como en cultivo de laboratorio. (Continúa en la página siguiente)

ESPECIE	APOTECIO	EXCIPULO	PEDÚNCULO	ASCOS	ESPORAS	ECOLOGÍA	DISTRIBUCIÓN	OBSERVACIONES
	A) Tamaño B) Forma C) Color	A) Grosor B) Disposición - hifas	A) Disposición - hifas B) Color	A) Forma B) Tamaño C) Ápice	A) Forma B) Tamaño C) Color D) N° de septos			
<i>C. savonica</i>	A) 0.5 - 1.3 mm B) Esférico - lenticular C) Negro	A) -30 µm .Poco desarrollado B) Periclinal	A) Periclinal B) Marrón verdoso, más pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 22-32 X 2.5- 3.5µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 6-8 X 3-3.5 µm C) Marrón verdoso claro D) Sin septo	Parásito o parasimbionte de líquenes (Chaenotheca) o algas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Anamorfo <i>Asterophoma</i> Sinamorfo <i>Phialopora</i> .
<i>C. fennica</i>	A) 0.9 - 1.6 mm B) Lenticular C) Negro o marrón muy oscuro	A) Bien desarrollado B) Anticlinal	A) Irregular B) Marrón oscuro (brillante) en el exterior, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 50-60 X 3µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 7.5-8.7 X 2.6- 3.1 µm C) Marrón D) Un septo	Saprófito. Sobre madera en zonas expuestas	Áreas templadas a frías en el hemisferio norte	Asociado a <i>Calicium</i> <i>denigratum</i>
<i>C. pusilla</i>	A) 0.7 - 1 mm B) Lenticular C) Negro	A) 8-14 µm . B) Irregular	A) Irregular B) Marrón a verde en el exterior, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 29-36 X 2.7- 3.8µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 6-7.1 X 2.2- 2.7 µm C) Marrón D) Un septo	Saprófito, parásito o parasimbionte de líquenes ("calicioides") o algas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Es una especie muy variable. Asociado a una gran variedad de hospedadores
<i>C. pusiola</i>	A) 0.15-0.35 mm B) Lenticular - hemisférico C) Negro	A) Bien desarrollado B) Periclinales. 4-5 capas	A) Irregular B) Marrón amarillento, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 30-45 X 3-4µm C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 5.4-6.5 X 2.2- 2.7µm C) Marrón claro D) Un septo	Parásito o parasimbionte de líquenes o algas. Saprófito en coníferas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Produce un anamorfo de tipo hifomiceto

Tabla 2.1 Continuación

La parte apical del asco presenta un engrosamiento uniforme. El pedúnculo está formado por hifas de disposición periclinal, de color marrón oscuro. Las esporas son unicelulares, fusiformes, y de color marrón oscuro.

Las características morfológicas en ambos géneros son similares. Las diferencias se centran en la estructura del ápice del asco, disposición de las hifas del pedúnculo y segmentación de las esporas.

La delimitación entre los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* es problemática (Tibell, 1987a). Se han descrito especies con características intermedias como es el caso de *Chaenothecopsis fennica* (Laurila) Tibell. Esta especie presenta un pedúnculo con hifas de organización irregular, pero el grosor de la pared del ápice del asco, en la madurez, es intermedio entre *Chaenothecopsis* y *Mycocalicium* y el tamaño del asco es, a su vez, intermedio entre el descrito para *Chaenothecopsis* y *Phaeocalicium* (Tibell, 1978a).

La estructura típica del ápice del asco de *Chaenothecopsis* fue descrita e ilustrada en *Chaenothecopsis nana* Tibell (Tibell, 1987a), una especie muy parecida a *Mycocalicium subtile* (Pers.) Szat. por su anatomía y por la forma de sus esporas.

Algunas especies de *Chaenothecopsis* tienen pedúnculos con hifas oscuras de organización periclinal, como sucede en *Mycocalicium* (Tabla 2.2). *Mycocalicium albonigrum* (Nyl.) Tibell, y *Mycocalicium sequoiae* Bonar, presentan un fino canal en el ápice del asco, al igual que ocurre en *Chaenothecopsis* (Tabla 2.1).

La taxonomía de *Chaenothecopsis* es compleja y se requiere la búsqueda de grupos monofiléticos en éste género, en los cuales podrían estar localizadas algunas especies actualmente incluidas en *Mycocalicium* y en *Phaeocalicium* (Tibell y Titov, 1995).

En un intento de clarificar las relaciones entre *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*, Tibell realizó un análisis filogenético a partir de 10 características morfológicas y 2 químicas. Tomó cuatro especies de *Mycocalicium* y diecisiete especies de *Chaenothecopsis*, e intentó relacionar estos resultados con la naturaleza de los anamorfos obtenidos en cultivo.

El árbol filogenético resultante (Figura 2.1) muestra a los representantes del género *Chaenothecopsis* como un grupo monofilético, excluyendo a *Chaenothecopsis fennica*, cuya naturaleza intermedia entre *Chaenothecopsis* y *Mycocalicium* ya había sido puesta de manifiesto previamente (Tibell, 1978a). Las especies cuyo anamorfo es de tipo *Asterophoma* (*Chaenothecopsis savonica* (Räs.) Tibell y *Chaenothecopsis viridireagens* (Nádv.) A. Schmidt), aparecen incluidas en el grupo delimitado por el nodo I (Figura 2.1), junto con otras especies con anamorfos diversos.

ESPECIE	APOTECIO	EXCIPULO	PEDÚNCULO	ASCOS	ESPORAS	ECOLOGÍA	DISTRIBUCIÓN	OBSERVACIONES
	A) Tamaño B) Forma C) Color	A) Grosor B) Disposición - hifas	A) Disposición - hifas B) Color	A) Forma B) Tamaño C) Ápice	A) Forma B) Tamaño C) Color			
<i>M. sequoiae</i>	A) 1.5 - 3.2 mm B) Cónico - lenticular (varios capítulos por pedúnculo) C) Negro, pruina amarilla - verde	A) 80-100 μ m Bien desarrollado B) Isodiamétricas, periclinales en el interior	A) Periclinal, a veces entrecruzadas B) Marrón rojizo oscuro, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 35-45 X 4.5 μ m C) Engrosamiento con canal	A) Elipsoidal B) 5.5-8 X 3- 4 μ m C) Marrón claro	Resinícola. Sobre <i>Sequoiadendron</i> y <i>Sequoiae</i>	California	Produce ácido pinástrico y ác. vulpínico. Presenta canal en el ápice del asco (tipo <i>Chaenothecopsis</i>)
<i>M. subtile</i>	A) Hasta 1.6 mm B) Cónico - lenticular C) Negro	A) Desarrollo muy variable B) Disposición variable	A) Periclinal B) Marrón oscuro	A) Cilíndrica B) 30-55 X 3.5- 4.5 μ m C) Engrosamiento uniforme	A) Elipsoidal B) 5.5-9 X 3.5-5 μ m C) Marrón oscuro	Saprófito. Sobre madera en zonas expuestas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Características del excípulo muy variables. Produce anamorfos de tipo celomiceto
<i>M. victoriae</i>	A) 0.6-0.9 mm B) Cónico - lenticular C) Negro	A) 35-60 μ m B) Alargadas formando un "tejido pseudoparenquimato so"	A) Periclinal B) Rojo en la zona externa, pálido en el interior	A) Cilíndrica B) 44-55 X 4.5 μ m C) Engrosamiento uniforme	A) Elipsoidal B) 8-9 X 3.5- 4.5 μ m C) Marrón oscuro	Saprófito. Sobre madera en zonas expuestas	Zonas tropicales y subtropicales en ambos hemisferios	
<i>M. albonigrum</i>	A) 0.7 - 1.3 mm B) Cónico - lenticular C) Negro	A) 20-45 μ m. Bien desarrollado B) Isodiamétricas en 2-4 capas	A) Periclinal B) Marrón oscuro	A) Cilíndrica B) 30-45 X 3-4 μ m C) Engrosamiento con canal	A) Fusiforme B) 6-8 X 3- 3.5 μ m C) Marrón oscuro	Saprófito. Sobre madera en zonas expuestas	Áreas templadas a frías en ambos hemisferios	Presenta canal en el ápice del asco (tipo <i>Chaenothecopsis</i>). Produce anamorfos de tipo celomiceto

Tabla 2.2. Características morfológicas de las especies del género *Mycocalicium* empleadas en nuestros análisis genético y químico. Se incluye información acerca del tipo de sustrato sobre el que vive y el tipo de anamorfo que produce tanto en estado natural como en cultivo de laboratorio.

Chaenothecopsis debilis (Turn y Borr.)Tibell, presenta formas de reproducción asexual semejantes a las descritas en *Mycocalicium*, sin embargo sus posiciones no están cercanas en el análisis cladístico. Los anamorfos de tipo *Phialophora*, presentes en *Chaenothecopsis savonica* y *Chaenothecopsis schefflerae* Samuels y Buchanam, están localizadas en el nodo J del árbol filogenético. Otras especies con anamorfos de tipo hifomiceto semejantes a *Phialophora*, como son *Chaenothecopsis tasmanica*, *Chaenothecopsis pusilla* (Flk) A. Schmidt y *Chaenothecopsis pusiola*, se concentran en un grupo delimitado por el nodo M, cercano al nodo J donde se encuentran los anamorfos de tipo *Phialophora*. Tibell concluye que las formas asexuales de las especies de *Chaenothecopsis* corroboran, en parte, los análisis cladísticos basados en caracteres morfológicos del teleomorfo. De esta manera el tipo o tipos de anamorfo presentes en las distintas especies de la familia se constituye como un nuevo conjunto de datos sobre los que apoyar la clasificación de estos grupos (Tibell, 1995).

Mycocalicium, *Phaeocalicium* y *Stenocybe* comparten entre sí su estructura homogénea y engrosada en el ápice del asco, así como la presencia de hifas con ordenamiento periclinal en el pedúnculo. Por otro lado, difieren en el tamaño de esporas y ascos y en el número de septos en las esporas.

Stenocybe (Nyl.) Koerb, con 8 especies descritas, es el género menos problemático de la familia, aunque parece estar compuesto por varios grupos naturales (Tibell, 1996). Es similar a *Phaeocalicium* en algunos aspectos de su morfología y ecología, pero distinguible debido a la presencia de esporas con 3-7 septos, de pared más gruesa y de mayor tamaño. Sin embargo el número de septos presentes en las esporas no parece ser una característica suficiente para la discriminación entre estos géneros.

El género *Phaeocalicium* A. Schmidt, contiene 15 especies de hongos fundamentalmente parásitos de plantas vasculares. Sus especies se encuentran en su mayoría restringidas a un género de planta hospedadora. La descripción del género es muy parecida a la de *Mycocalicium*, con diferencias en el tamaño de los ascos, mayores en *Phaeocalicium* que en *Mycocalicium*, y en la forma de las esporas, que en este género son elipsoidales, con un septo o ninguno.

Phaeocalicium interruptum (Nyl.) Tibell, es una especie intermedia entre *Phaeocalicum* y *Stenocybe*. El tamaño y forma de las esporas ajusta mejor con los descritos para *Phaeocalicium*, pero presenta un engrosamiento en el límite superior del excípulo semejante al que ocurre en algunas especies de *Stenocybe*. Sus esporas contienen un septo, pero en las esporas viejas pueden observarse septos adicionales, de manera que la

presencia de esporas con 3 septos, al igual que en algunas especies de *Stenocybe*, es un hecho común en esta especie (Tibell, 1996).

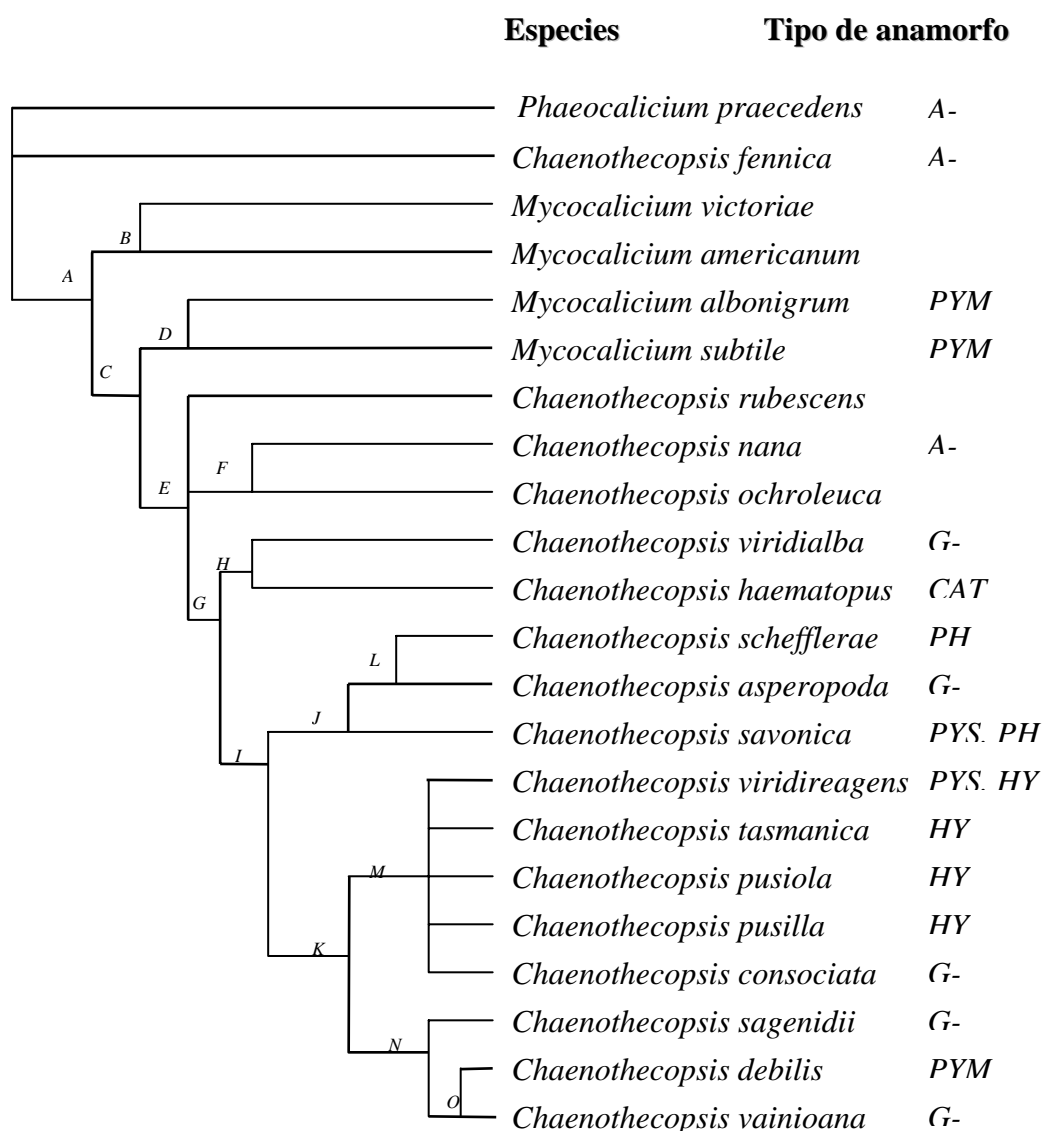


Figura 2.1. Árbol consenso obtenido por parsimonia a partir del análisis de 10 caracteres de naturaleza morfológica y 2 química (reacciones de color del apotecio frente a la adición de 10% KOH y 10% HNO₃). A-, cultivos que no producen ningún anamorfo. CAT, anamorfo hifomiceto de tipo *Catenomyces*. HY, anamorfo hifomiceto desconocido. G-, cultivos fallidos a partir de esporas. PH, anamorfo hifomiceto de tipo *Phialophora*. PYS, anamorfo con picnidios de una sola capa de células en su pared. PYM, anamorfo con picnidios de múltiples capas celulares en la pared. *Phaeocalicium praecedens* fue empleado como “outgroup” en el análisis (Tibell y Titov, 1995).

Tibell señaló una tendencia evolutiva en la familia *Mycocaliciaceae*, consistente en la adquisición de esporas de mayor tamaño y con un número creciente de septos transversales. *Phaeocalicium* y *Stenocybe* presentan ascosporas de mayor tamaño que *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*. Así mismo podría sugerirse una tendencia ecológica, desde una forma de vida liquenícola o sobre algas de vida libre (*Chaenothecopsis*) o bien sobre madera muerta (*Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*), hacia un parasitismo o saprofitismo sobre plantas vasculares (*Phaeocalicium* y *Stenocybe*) (Tibell, 1984).

2. Objetivos

En este bloque se estudia la demarcación de los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*. Para la resolución de este objetivo se toma como base los estudios morfológicos y los datos de producción de anamorfos en cultivo, realizados previamente por Tibell, y se aportan dos nuevos conjuntos de datos, de naturaleza genética y química. Los datos genéticos se basan en la secuencia de la mitad 5' del gen 28S ADNr. Los datos químicos consisten en un análisis de agrupamiento de las especies, en función de los patrones de metabolitos secundarios, producidos por éstas en cultivos realizados en medio MEYE líquido y sólido.

2.1 Análisis genético.

- 2.1.1 Estudio preliminar de la variabilidad contenida en la mitad 5' del gen 28S mediante la búsqueda de polimorfismos (RFLP's).
- 2.1.2 Secuenciación de la región 5' terminal del gen 28S. Alineamientos y análisis de los alineamientos.
- 2.1.3 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

2.2 Análisis químico.

- 2.2.1 Obtención de patrones de producción de metabolitos secundarios, a partir de representantes de los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*, por HPLC.
- 2.2.2 Análisis multivariante de agrupamiento de especies representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, en función de los metabolitos detectados por HPLC.

3. Resultados.

3.1 Análisis genético

En la realización de este análisis se han empleado un total de quince especímenes (Tabla 2.3), pertenecientes a especies de los cuatro géneros reconocidos de la familia *Mycocaliciaceae*.

<i>Taxonomía</i>	<i>Código</i>	<i>Colección</i>	<i>ADN extraído de :</i>
<i>Mycocalicium subtile</i>	Ms02504	UPSC 2504	Cultivo vivo
<i>Mycocalicium subtile</i>	Ms021020	UPS(Tibell 21020)	Cultivo vivo
<i>Mycocalicium sp.</i>	Msp02173	UPSC 2173	Cultivo vivo
<i>Mycocalicium albonigrum</i>	Ma19038	UPS(Tibell 19038)	Cultivo vivo
<i>Mycocalicium sequoiae</i>	Mseq92055	UPS(Rikkinen 92055)	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis savonica</i>	Cs02200	UPSC 2200	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis nana</i>	Cn02083	UPSC 2083	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis debilis</i>	Cd02080	UPSC 2080	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis haematopus</i>	Ch02082	UPSC 2082	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis pusiola</i>	Cpo19258	UPS(Tibell 192589)	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis fennica</i>	Cf08190	UPS(Hermansson 8190)	Esporas
<i>Chaenothecopsis pusilla</i>	Cp02522	UPSC 2522	Cultivo vivo
<i>Chaenothecopsis viridireagens</i>	Cv02105	UPSC 2105	Cultivo vivo
<i>Phaeocalicium populneum</i>	Pp19286	UPS(Tibell 19286)	Cultivo vivo
<i>Stenocybe pullatula</i>	Sp02448	UPSC 2448	Cultivo vivo
<i>Calicium adpersum</i> (<i>Caliciaceae</i>)	Ca02299	UPSC 2299	Cultivo vivo

Tabla 2.3. Relación de especímenes empleados, con especificación de su código, colección de la que proceden y tipo de material sobre el que se realizó la extracción de su material genético. La secuencia de *Calicium adpersum* Pers. fue empleada como “outgroup” de los análisis filogenéticos. UPSC, colección de cultivos de hongos de la Universidad de Uppsala.

La selección de los especímenes se realizó teniendo en cuenta la disponibilidad de los mismos en las colecciones e intentando abarcar la mayor variabilidad morfológica, dentro de los representantes de un mismo género. En el caso de *Mycocalicium subtile*, se incluyen dos especímenes, representantes de los distintos grupos obtenidos en los análisis previos de variabilidad intraespecífica en esta especie (Bloque 1), así como un representante de la especie morfológicamente críptica respecto a *M. subtile* (*Mycocalicium* sp. 02173).

3.1.1 Estudio preliminar de la variabilidad contenida en la mitad 5' del gen 28S mediante la búsqueda de polimorfismos (RFLP's).

La mitad 5' terminal del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma (28S) fue amplificada por PCR a partir del ADN extraído, empleando los oligonucleótidos cebadores LR7 y LR0R. Los productos de PCR fueron detectados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (Figura 2.2).

Para analizar la existencia de variabilidad en la mitad 5' del gen 28S en los especímenes empleados, se procedió a la digestión de estos fragmentos de ADN con distintas enzimas de restricción (*Ava* II, *Hae* III, *Hinf* I, *Nci* I, *Taq* I).

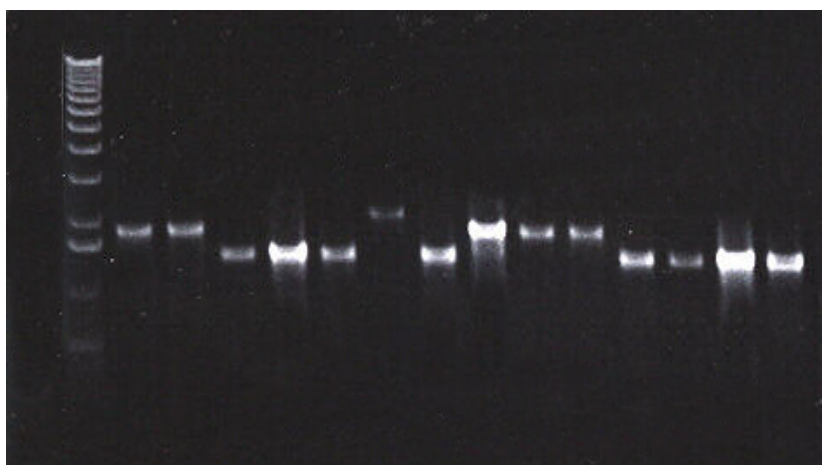


Figura 2.2 Productos de PCR resultantes de la amplificación de la mitad 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma (entre los oligonucleótidos LR7-LR0R). Calle 1: ADN ladder, calle 2 : *Mycocalium subtile* 02504, calle 3: *M. subtile* 21020, calle 4: *Mycocalicium* sp. 02173, calle 5: *M. albonigrum* 19038, calle 6: *M. sequoiae* 92055, calle 7: *M. victoriae* 00021, calle 8: *Chaenothecopsis nana* 02083, calle 9: *C. debilis* 02080, calle 10: *C. pusiola* 19258, calle 11: *C. viridireagens* 02105, calle 12: *C. savonica* 02200, calle 13: *C. haematopus* 02082, calle 14: *Phaeocalicium populneum* 19286, calle 15: *Stenocybe pullatula* 02448.

Debido a la diferencia de tamaño observada en los productos de PCR obtenidos, el análisis de fragmentos de restricción polimórficos se realizó en un grupo de especies en las que el tamaño del fragmento amplificado era semejante. Las especies escogidas se detallan en la Tabla 2.4, en la que se muestran los resultados de la digestión.

<i>Código</i>	<i>Ava II</i>	<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Nci I</i>	<i>Taq I</i>
Ma19038	A1	Ha1	Hi1	N1	T1
Msp02173	A2	Ha2	Hi1	N2	T1
Mseq92055	A1	Ha1	Hi1	N3	T1
Ch02082	A3	Ha3	Hi2	N4	T1
Cn02083	A1	Ha4	Hi3	N5	T1
Cs02200	A4	Ha5	Hi4	N6	T2
Pp19286	A5	Ha1	Hi5	N5	T1
Sp02448	A6	Ha6	Hi1	N7	T1

Tabla 2.4. Representación de los distintos patrones obtenidos al digerir el fragmento 5' del gen 28S del ADNr a partir de un conjunto de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*. Los especímenes vienen representados por su código. Cada patrón de bandas viene codificado por las iniciales de la enzima con la que fue obtenido, seguido de un número que indica un tipo de patrón. Los colores indentifican patrones comunes.

Este análisis preliminar, muestra variabilidad en los patrones de restricción obtenidos para las distintas especies, con la excepción del patrón obtenido con el enzima *Taq I*, cuyo sitio de restricción debe localizarse en una región muy conservada, obteniéndose un patrón idéntico para todas las especies, excepto para *Chaenothecopsis savonica*.

Chaenothecopsis nana comparte patrones comunes con *M. sequoiae* y *M. albonigrum* para el enzima *Ava II* y con *Phaeocalicium* para el enzima *Nci I*. No se observa coincidencia de patrones entre los tres representantes del género *Chaenothecopsis*, exceptuando el patrón obtenido con *Taq I*. Los representantes del género *Mycocalicium* presentan un patrón común con el enzima *Hinf I*, patrón que también aparece en el representante del género *Stenocybe*. *Mycocalicium albonigrum* y *Mycocalicium sequoiae* presentan patrones idénticos para todas las enzimas empleadas a excepción de *Nci I*.

Los patrones obtenidos, tras la digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR, con un tamaño semejante en distintas especies, confirman la presencia de variabilidad en el fragmento amplificado.

A continuación, se examina el tipo de variación mediante la secuenciación de este fragmento del gen, en busca de caracteres moleculares que permitan la demarcación de los géneros dentro de la familia.

3.1.2 Secuenciación de la región 5' terminal del gen 28S ADNr. Alineamientos y análisis de los alineamientos.

La región 5' terminal del gen 28S ADNr de las especies seleccionadas para este análisis, fue secuenciada automáticamente como se describe en Materiales y Métodos, empleando para ello los oligonucleótidos cebadores LR7 y LR0R, además de los oligonucleótidos internos JS5m y JS5mR (Tabla 2.5).

<i>Código</i>	<i>Oligonucleótidos empleados</i>	<i>Longitud LR7/LR0R</i>	<i>Longitud corregida</i>	<i>Nº de insertos</i>	<i>Longitud y posición de los insertos</i>
Ms02504	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1797 pb	1247 pb	1	396 pb, comienza en 1068 de <i>S. cerevisiae</i>
Ms21020	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1785 pb	1248 pb	1	392 pb, comienza en 1068 de <i>S. cerevisiae</i>
Ms02173	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1422 pb	1248 pb	0	
Ma19038	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1407 pb	1248 pb	0	
Mseq92055	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1407 pb	1248 pb	0	
Cs02200	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1410 pb	1248 pb	0	
Cn02083	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1404 pb	1248 pb	0	
Cd02080	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1767 pb	1247 pb	1	367 pb, comienza en 1068 de <i>S. cerevisiae</i>
Ch02082	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1414 pb	1248 pb	0	
Cpo19258	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1765 pb	1253 pb	1	392 pb, comienza en 1046 de <i>S. cerevisiae</i>
Cf08190	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1860 pb	1247 pb	1	485 pb, comienza en 1046 de <i>S. cerevisiae</i>
Cp02522	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1757 pb	1252 pb	1	379 pb, comienza en 1046 de <i>S. cerevisiae</i>
Cv02105	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR, P2m	1792 pb	1255 pb	2	344 pb, comienza en 1068 de <i>S. cerevisiae</i> 54 pb, comienza en 1102 de <i>S. cerevisiae</i>
Pp19286	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1409 pb	1251 pb	0	
Sp02448	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1394 pb	1247 pb	0	
Ca02299	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1730 pb	1250 pb	1	333 pb, comienza en 1338 de <i>S. cerevisiae</i>

Tabla 2.5. En esta tabla se especifican los tamaños en pares de bases (pb) de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del extremo 5' del gen 28S perteneciente al ADNr. Así mismo se ofrece el tamaño de las secuencias que se emplearán en el alineamiento después de haber sido eliminadas las regiones de secuencia no confirmada con ambas cadenas, y las inserciones presentes en la secuencia. Se especifica la posición en la que se localiza el inicio de las inserciones en relación a la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de Genebank : J01355). *Calicium adspersum* se emplea como "outgroup del alineamiento". Las especies se identifican a partir de sus códigos (ver Tabla 2.3). La secuencia de los oligonucleótidos cebadores se encuentran en Materiales y Métodos.

En algunos casos en los que el tamaño del fragmento amplificado fue mayor de lo esperado, se hizo necesario el uso de otro oligonucleótido interno, P2m, que permitió la secuenciación del fragmento completo.

Las especies analizadas pueden dividirse en dos grupos en función del tamaño del fragmento secuenciado (Tabla 2.5). Uno de ellos, formado por las especies, *Mycocalicium* sp. 02173, *M. albonigrum*, *M. sequoiae*, *Chaenothecopsis savonica*, *C. nana*, *C. haematopus* Tibell, *Stenocybe pullatula* (Ach.) B. Stein, *Phaeocalicium populneum* (Brond. ex Duby) A. Schmidt, presenta un fragmento de menor tamaño que oscila entre 1394-1422 pares de bases. En el grupo de especies que contienen este fragmento de menor tamaño no se observa la presencia de inserciones. El otro grupo, formado por el resto de las especies analizadas, presenta un fragmento de tamaño variable entre 1730-1860 pares de bases. En todos los casos este fragmento presenta una sola inserción, excepto en la secuencia de *Chaenothecopsis viridireagens* donde se observan dos inserciones. Dentro del grupo de secuencias que presentan insertos podemos distinguir cuatro clases, según la posición en la que éstos se localicen. (Figura 2.3).

Los que se insertan en la posición 1068 respecto a la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* son fragmentos con un tamaño variable entre 344-396 pares de bases. Estos insertos se presentan en las secuencias de las especies *Mycocalicium subtile* 02504, *Mycocalicium subtile* 21020, *Chaenothecopsis debilis* y *Chaenothecopsis viridireagens*. *Chaenothecopsis viridireagens* presenta además una pequeña inserción de 54 pares de bases localizada en la posición 1102 respecto a la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las regiones que se insertan en la posición 1046 de *Saccharomyces cerevisiae* presentan un tamaño variable entre 379-485 pares de bases. Son tres las especies en la que aparece una inserción en esta posición, *Chaenothecopsis pusilla*, *C. pusiola* y *C. fennica*.

Calicium adpersum presenta una inserción de 333 pb en la posición 1338 del gen homólogo en *Saccharomyces cerevisiae*.

Una vez eliminados las inserciones, el tamaño de las secuencias a alinear oscila entre 1247 y 1255 pares de bases (Tabla 2.5).

Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W y revisadas visualmente. El alineamiento se editó con ayuda del programa GENEDOC, en función de la información obtenida a partir de la estructura secundaria de la molécula de ARN transcrita a partir del ADN. La estimación de la estructura secundaria del ARN ribosomal se realizó asumiendo que la misma se mantiene constante en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 10, Introducción general, pag. 16) y en el resto de los hongos ascomicetos, de manera que los

nucleótidos que alinean con aquellos que forman parte de tramos de doble cadena de ARN ("stems") en la levadura formarán también "stems" en el resto de los ascomicetos.

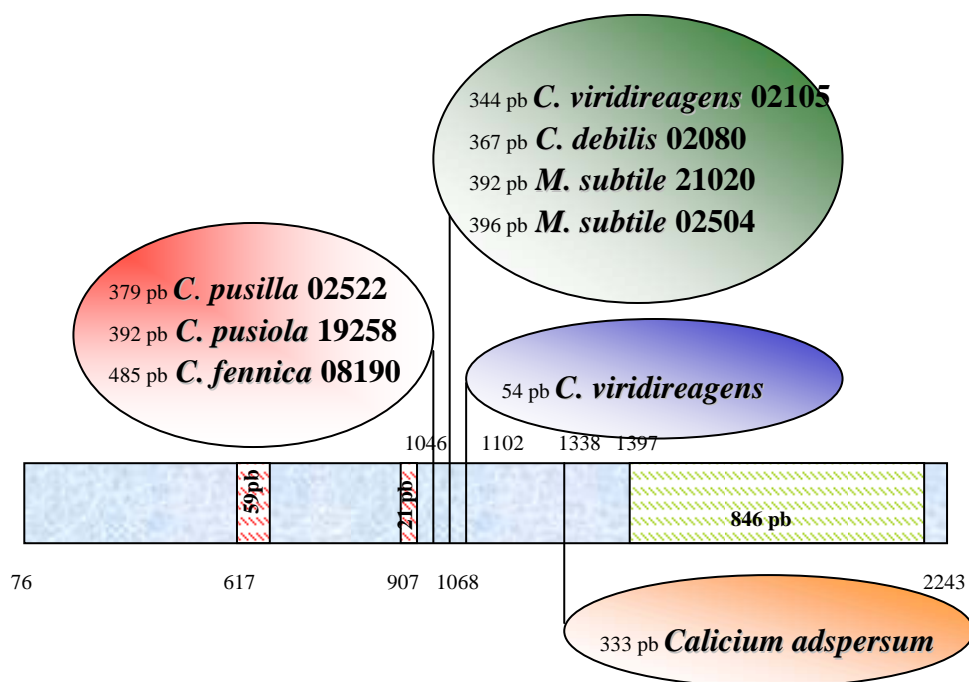


Figura 2.3. Esquema representativo del alineamiento de secuencias de la mitad 5' del gen que codifica para el ARN constituyente de la subunidad grande del ribosoma, de un conjunto de especies de la familia *Mycocaliciaceae* (Tabla 2.5). Las posiciones se expresan en función de la secuencia del gen homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* (Nº acceso Genbank K01048). Las regiones rayadas en rojo indican zonas eliminadas por alineamiento ambiguo. La región rayada en verde, señala el intrón presente en la secuencia de *S. cerevisiae*. Las elipses señalan las posiciones en las que se encontraron inserciones, y el tamaño de las mismas en cada especie.

Las regiones de alineamiento ambiguo fueron eliminadas (Figura 2.3). El alineamiento final se muestra en la Figura 2.4. (Anexo 2, pag. 213-217)

La información obtenida a partir del alineamiento se divide en dos subgrupos en función de la estructura secundaria adoptada por la molécula de ARN que se transcribe a partir del gen. Estos subgrupos son los correspondientes a las regiones que forman cadenas dobles de ARN ("stems") y a las que forman cadenas simples de ARN ("loops").

Se observa una escasa variación en la secuencia. De un total de 1246 posiciones alineadas (Tabla 2.6) un 17% de ellas son variables (Tabla 2.7). Un 40% de las posiciones variables (Tabla 2.8) son significativas para los posteriores análisis filogenéticos basados en el criterio de parsimonia. Teniendo en cuenta la estructura secundaria del gen inferida a partir de la estructura del gen homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 10, Introducción general, pag. 16), la proporción de posiciones variables es ligeramente superior en el

subgrupo de posiciones que forman parte de "stems", que en las posiciones constituyentes de "loops" (19%, 14.8% respectivamente) (Tabla 2.7). A pesar de ello la proporción de sitios significativos es mayor en las posiciones en "loops".

Posiciones alineadas

ESTRUCTURA SECUNDARIA					
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
Número		Número	Posiciones totales	Número	Posiciones totales
1246		706	56.7%	540	43.3%

Tabla 2.6. Análisis de las posiciones alineadas totales y en los subgrupos que forman "stems" y "loops", del alineamiento (Figura 2.4, Anexo2, pag. 213-217) realizado a partir de especies representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, tomando la secuencia de *Calicium adpersum* como "outgroup".

Posiciones variables

ESTRUCTURA SECUNDARIA					
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
Número	Posiciones totales	Número	Posiciones en "stem"	Número	Posiciones en "loop"
213	17%	133	19%	80	14.8%

Tabla 2.7. Análisis de las posiciones variables, totales y en los subgrupos que forman "stems" y "loops", del alineamiento (Figura 2.4, Anexo 2, pag. 213-217) realizado a partir de especies representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, tomando la secuencia de *Calicium adpersum* como "outgroup".

Sitios significativos

ESTRUCTURA SECUNDARIA								
Sitios totales			Sitios en "stem"			Sitios en "loop"		
Número	Posiciones totales	Posiciones variables	Número	Posiciones en "stem"	P. variables en "stem"	Número	Posiciones en "loop"	P. variables en "loop"
85	7 %	40%	50	7%	37.5%	35	6.5%	43.7%

Tabla 2.8. Análisis de los sitios significativos, totales y en los subgrupos que forman "stems" y "loops", del alineamiento (Figura 2.4, Anexo 2, pag. 213-217) realizado a partir de especies representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, tomando la secuencia de *Calicium adpersum* como "outgroup".

Se observa un predominio de las mutaciones de tipo transición (53% de las posiciones variables) (Tabla 2.9) sobre las transversiones (23.5 % de las posiciones variables). El cociente observado de transiciones / transversiones, a lo largo del alineamiento completo, es de 2.3. En el subgrupo de posiciones que forman parte de "stems", este cociente es de 2.7, siendo inferior la relación en el subgrupo de posiciones en "loop" (1.8). Las transiciones predominan en el subgrupo de posiciones en "stem".

El 22% de las transiciones totales y 26% de las transversiones se observan exclusivamente en relación a la secuencia del "outgroup" (*Calicium adspersum*).

La variación producida por eventos de inserción/delección es baja, suponiendo tan solo un 2.3% del total de las posiciones variables. Ninguno de estos "gaps" es originado por la secuencia del "outgroup".

	ESTRUCTURA SECUNDARIA					
	Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en loop	
	Número	Posiciones variables	Número	P. variables en "stem"	Número	P. variables en "loop"
Sitios con transiciones	114	53.5%	73	55%	41	51.2%
Sitios con transversiones	50	23.5%	27	20.3%	23	28.7%
Sitios con transiciones + transversiones	44	20.6%	29	22%	15	19%
Sitios con inserciones/delecciones (gaps)	5	2.3%	3	2.2%	2	2.5%

Tabla 2.9. Tipos de mutaciones encontradas en posiciones totales y en los subgrupos que forman "stems" y "loops", en el alineamiento (Figura 2.4, Anexo 2, pag. 213-217). La secuencia de *Calicium adspersum* fue empleada como "outgroup".

3.1.3 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

En la búsqueda de grupos monofiléticos realizada empleando el programa 'Parsimony Jackknifing' (Figura 2.5), las especies analizadas de la familia *Mycocaliciaceae* se presentan como un grupo monofilético, con un índice de soporte del 80%, si se excluye la secuencia de *C. viridireagens*. Este grupo se resuelve en una politomía de 10 ramas que sólo permite establecer agrupaciones consistentes en tres conjuntos de especies. Uno de ellos está formado por los dos representantes de la especie *Mycocalicium subtile* y la especie morfológicamente críptica respecto a ella, *Mycocalicium sp.*, apoyado por un soporte del 87%. Otras especies de *Mycocalicium* analizadas, *M. albonigrum* y *M. sequoiae* forman

parte de la politomía, como grupos individuales sin establecer relaciones con otras especies. Lo mismo sucede con cinco de las especies de *Chaenothecopsis* analizadas, *C. debilis*, *C. savonica*, *C. nana*, *C. haematopus*, y *C. pusilla*.

Las otras dos especies del género *Chaenothecopsis*, *C. fennica*, *C. pusiola*, forman un grupo monofilético con un soporte del 78%.

Las especies representativas de los otros dos géneros que forman la familia *Mycocaliciaceae*, *Stenocybe pullatula* y *Phaeocalicium populneum* se encuentran formando un grupo monofilético con un soporte de 72%.

Los árboles obtenidos mediante los métodos de parsimonia y distancias genéticas, muestran topologías semejantes entre sí (Figura 2.6). *M. subtile* es monofilético con *Mycocalicium sp.* con un porcentaje de soporte de 78%. *M. albonigrum* forma un grupo monofilético con *M. subtile - Mycocalicium sp.* con un soporte del 66%, según el análisis de distancias. *Phaeocalicium populneum* y *Stenocybe pullatula* forman un grupo monofilético con un soporte del 75%/86%, según los análisis de parsimonia y distancias respectivamente. Así mismo *Chaenothecopsis fennica* y *C. pusiola* son monofiléticos con un soporte del 84%/92%. Este último grupo es monofilético con *C. pusilla* soportado por un porcentaje de 53%/63%.

La topología del árbol filogenético obtenido mediante parsimonia muestra otras agrupaciones consideradas las más parsimoniosas a partir del conjunto de secuencias analizado, pero carecen de un valor de soporte superior al 50%. Entre ellas se encuentra el agrupamiento formado por *C. savonica* y *C. nana*. Estas dos especies junto con *C. debilis* se integran en un grupo formado por todos los representantes empleados del género *Mycocalicium*, *Phaeocalicium* y *Stenocybe*. Este grupo es hermano del formado por *C. fennica*, *C. pusiola* y *C. pusilla*.

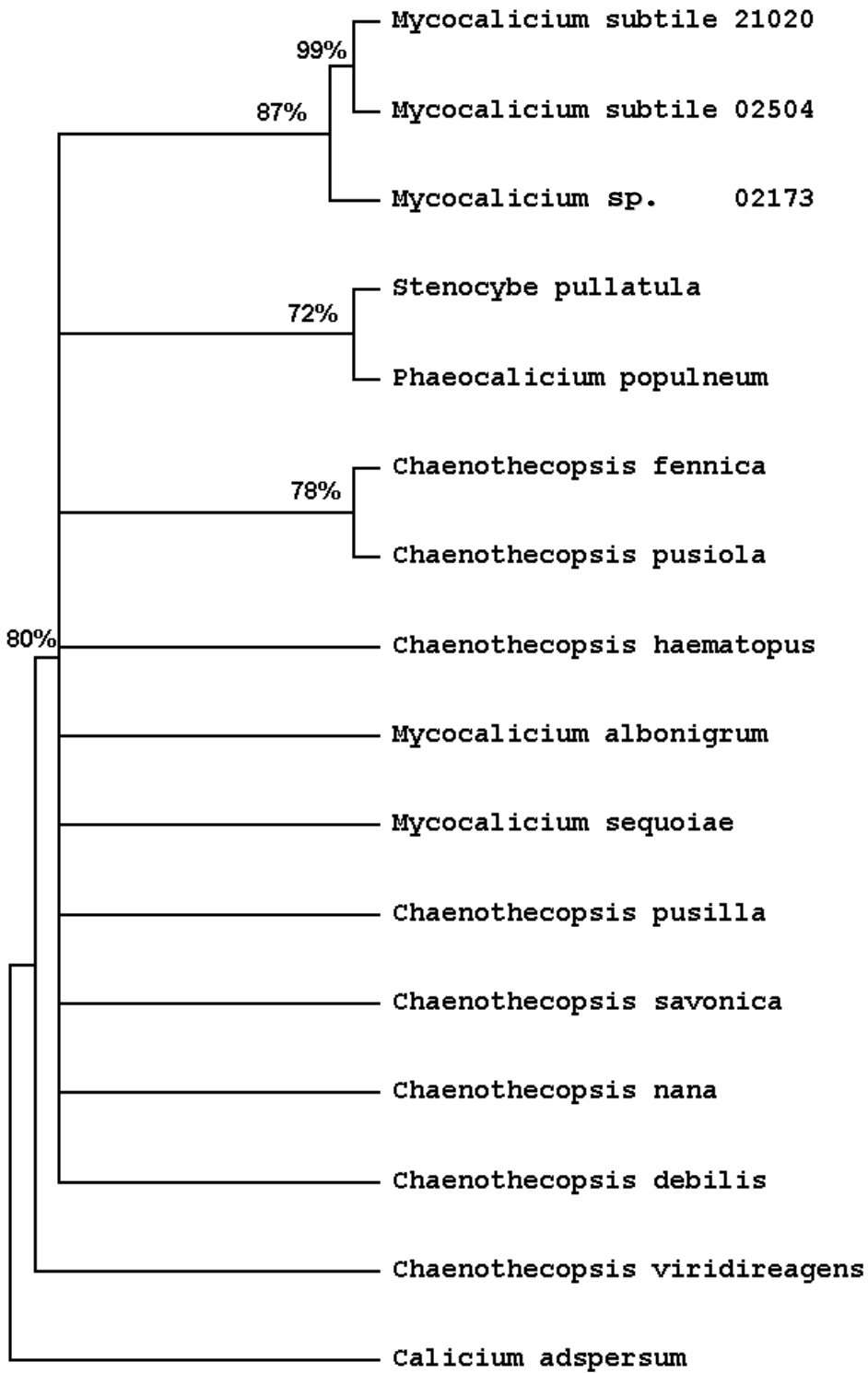


Figura 2.5. Análisis cladístico de búsqueda de grupos monofiléticos en *Mycocaliciaceae*, a partir de las secuencias de la mitad 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma. El análisis incluye 8 especies del género *Chaenothecopsis*, 4 especies del género *Mycocalicium*, *Phaeocalicium populneum* y *Stenocybe pullatula*. El árbol fue construido con el programa "Parsimony Jackknifing" mediante 1000 repeticiones. La secuencia homóloga de *Calicium adpersum* (*Caliciaceae*) fue empleada como "outgroup".

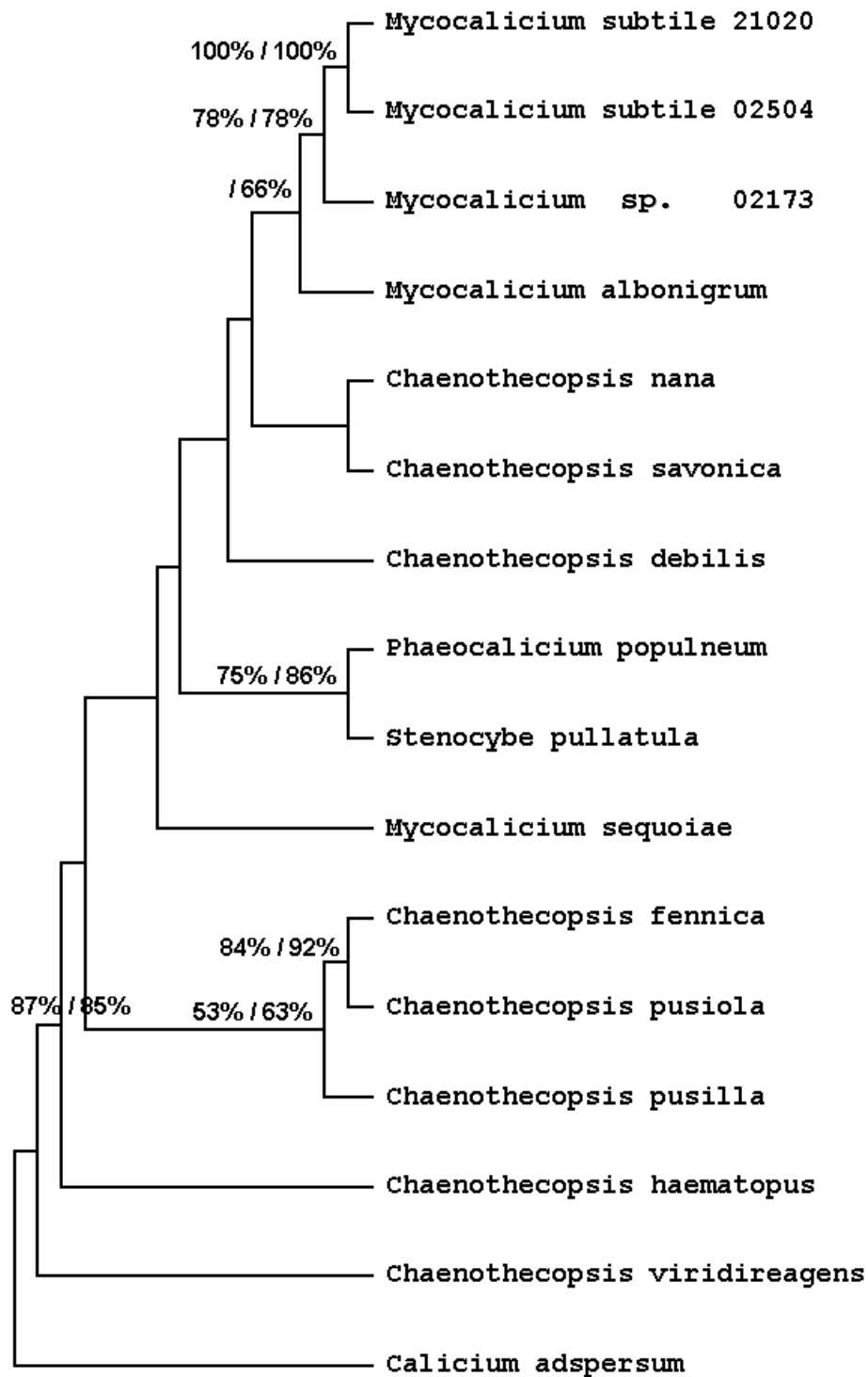


Figura 2.6. Árbol filogenético de la familia *Mycocaliciaceae* generado por el programa DNAPARS empleando 100 repeticiones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El árbol filogenético obtenido mediante distancias genéticas muestra idéntica topología. Los valores de soporte de las ramas proceden del análisis por parsimonia (a la izquierda de la barra inclinada) y por distancias (a la derecha). El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 2.4, (Anexo 2, pag. 213-217). La especie *Calicium adpersum* (*Caliciaceae*) se empleó como “outgroup”.

3.2 Análisis químico

3.2.1 Obtención de patrones de producción de compuestos, en representantes de los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* (*Mycocaliciaceae*), por HPLC.

La producción de metabolitos secundarios en *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* se estudió a partir de cultivos realizados en medio MEYE líquido y sólido. El estudio comparativo de la producción de metabolitos en medio líquido y sólido responde a la producción diferencial de compuestos en micelio aéreo y en micelio sumergido descrita en otros hongos (Ueno et al., 1975).

Las condiciones de cultivo, preparación de muestras y generación de patrones de HPLC se describen en Materiales y Métodos. Las especies representativas de la familia *Mycocaliciaceae* empleadas en este análisis se detallan en la Tabla 2.10.

Especie	Código	Análisis
<i>Mycocalicium subtile</i> 01161	Ms01161	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 01896	Ms01896	Sólido
<i>Mycocalicium sp.</i> 02173	Ms02173	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 02504	Ms02504	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 06747	Ms06747	Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 20093	Ms20093	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium subtile</i> 21020	Ms21020	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium albonigrum</i> 10938	Ma19038	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium sequoiae</i>	Mseq92055	Sólido
<i>Mycocalicium victoriae</i>	Mvic00021	Líquido / Sólido
<i>Mycocalicium sp.</i> 00975	Msp00975	Sólido
<i>Chaenothecopsis debilis</i> 02080	Cd02080	Líquido / Sólido
<i>Chaenothecopsis haematopus</i> 02082	Ch02082	Líquido / Sólido
<i>Chaenothecopsis nana</i> 02083	Cn02083	Líquido / Sólido
<i>Chaenothecopsis viridireagens</i> 02105	Cv02105	Líquido / Sólido
<i>Chaenothecopsis savonica</i> 02200	Cs02200	Líquido / Sólido
<i>Phaeocalicium populneum</i> 01966	Pp01966	Líquido / Sólido
<i>Phaeocalicium populneum</i> 19286	Pp19286	Líquido / Sólido
<i>Stenocybe pullatula</i> 02448	Sp02448	Líquido / Sólido

Tabla 2.10. Relación de especies incluidas en los análisis de producción de patrones de metabolitos secundarios en medio MEYE líquido y sólido. En algunos casos, debido a la escasez de micelio disponible como inóculo, se dio preferencia al análisis en medio sólido.

Cada una de las especies fue cultivada, extraída y analizada por HPLC por triplicado, según las condiciones descritas en la sección 9.3 de Materiales y Métodos.

En cada cromatograma, registrado a 254 nm, los picos son identificados por su tiempo de retención y por su espectro de absorción tomado en el rango 200-500 nm. Los picos que coinciden en ambas características, en el conjunto de los distintos cromatogramas, se denominan con el mismo código.

En general, se observa una tendencia hacia una mayor producción tanto en número de picos como en cantidad de compuesto, en los extractos realizados a partir de cultivos en placa (Figura 2.7) frente a los cultivos líquidos (Figura 2.8).

De las especies analizadas, *S. pullatula*, *P. populneum*, *C. savonica* y *C. debilis* son las que producen un menor número de sustancias en las condiciones de cultivo utilizadas.

C. nana, *M. albonigrum* y *Mycocalicium sp.* Ms2173 son mejores productoras en estas condiciones de cultivo.

En una primera aproximación al análisis de los cromatogramas, se crea una tabla en la que se recoge el total de los picos identificados en el conjunto de los cromatogramas. Al lado de cada pico se detalla la muestra o muestras en la que aparece (Tabla 2.11, Anexo 2, pag. 218-223).

Denominamos patrón de producción al conjunto de metabolitos propios de una muestra o comunes a un conjunto de muestras. Los patrones de producción obtenidos a partir de los distintos especímenes de *Mycocalicium subtile* presentan diferencias, debido a la aparición de muchos compuestos propios de cada espécimen. Se observa, sin embargo, una tendencia hacia la producción de 3 ó 4 sustancias comunes para todos ellos. Los especímenes *Mycocalicium sp.* 02173 y *Mycocalicium sp.* 01896 producen metabolitos comunes con otras especies del mismo género, *M. albonigrum* y *M. victoriae*, así como con *C. viridireagens*. Esta última también presenta compuestos comunes a los producidos por *M. subtile* Ms20093. *M. sequoiae* produce pocas sustancias, algunas de ellas similares a las de *Mycocalicium sp.* Msp00975 y *Phaeocalicium populneum* Pp01966.

Los dos representantes de *P. populneum* (Pp01966, Pp19286) no presentan patrones similares, tan solo coinciden en la producción de un compuesto (P70), que no es exclusivo de la especie, sino que aparece en otras de distintos géneros. *P. populneum* Pp19286 muestra, sin embargo, varias sustancias comunes a las producidas por *S. pullatula*. Esta a su vez presenta varios picos comunes con tres especies de *Chaenothecopsis*, *C. nana*, *C. savonica* y *C. debilis*. *C. haematopus* comparte picos con *P. populneum* Pp01966 y en menor medida con *C. nana*, *C. savonica*, *C. debilis* y *S. pullatula*.

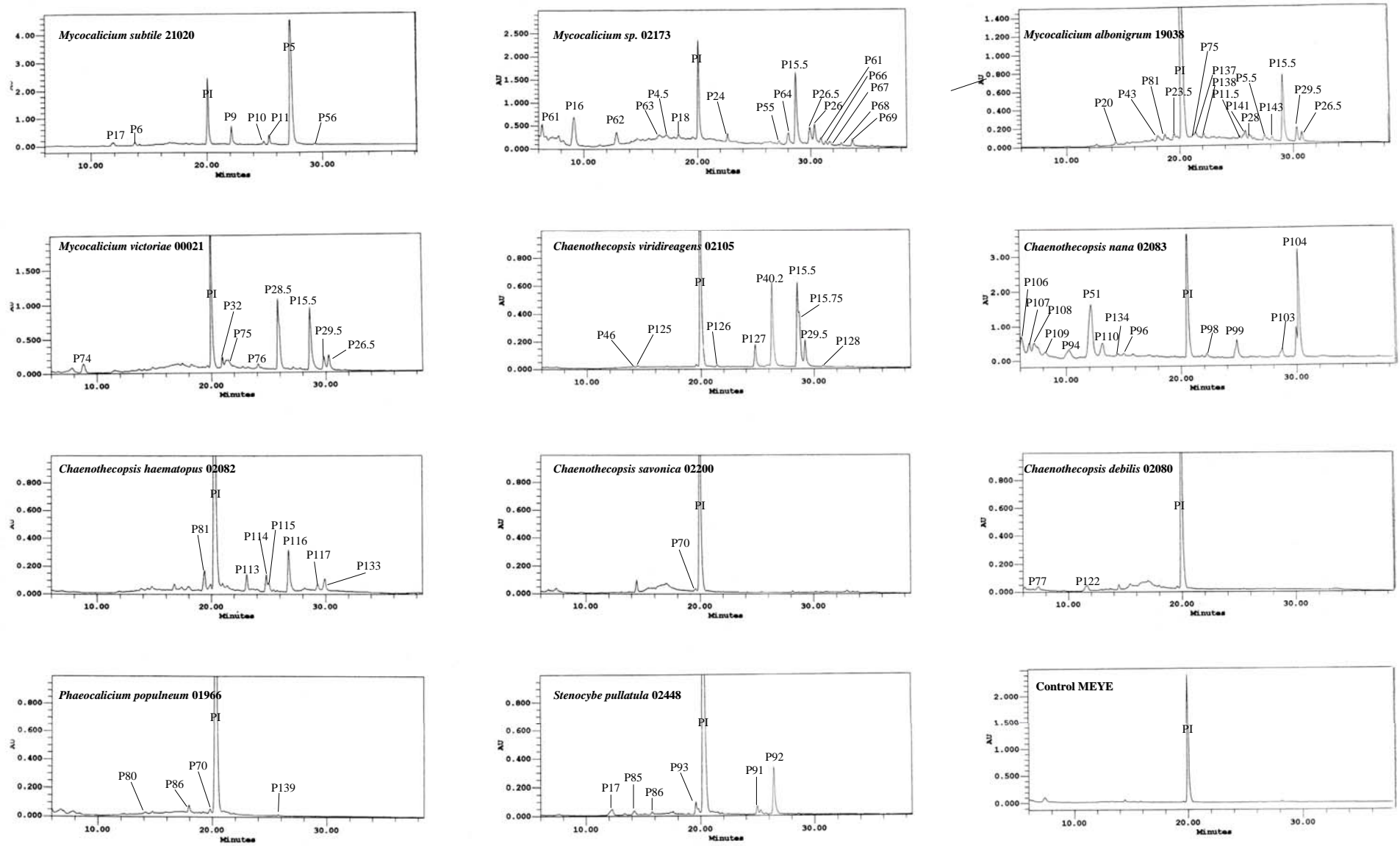


Figura 2.7. Cromatogramas de los extractos realizados a partir de cultivos en medio MEYE sólido. Cada uno de los picos viene identificado por un código. Los picos pertenecientes al medio se identifican por comparación entre los cromatogramas de los extractos con muestra y el cromatograma de un extracto del medio control. El pico correspondiente al patrón (hidroxibenzofenona) se denomina PI.

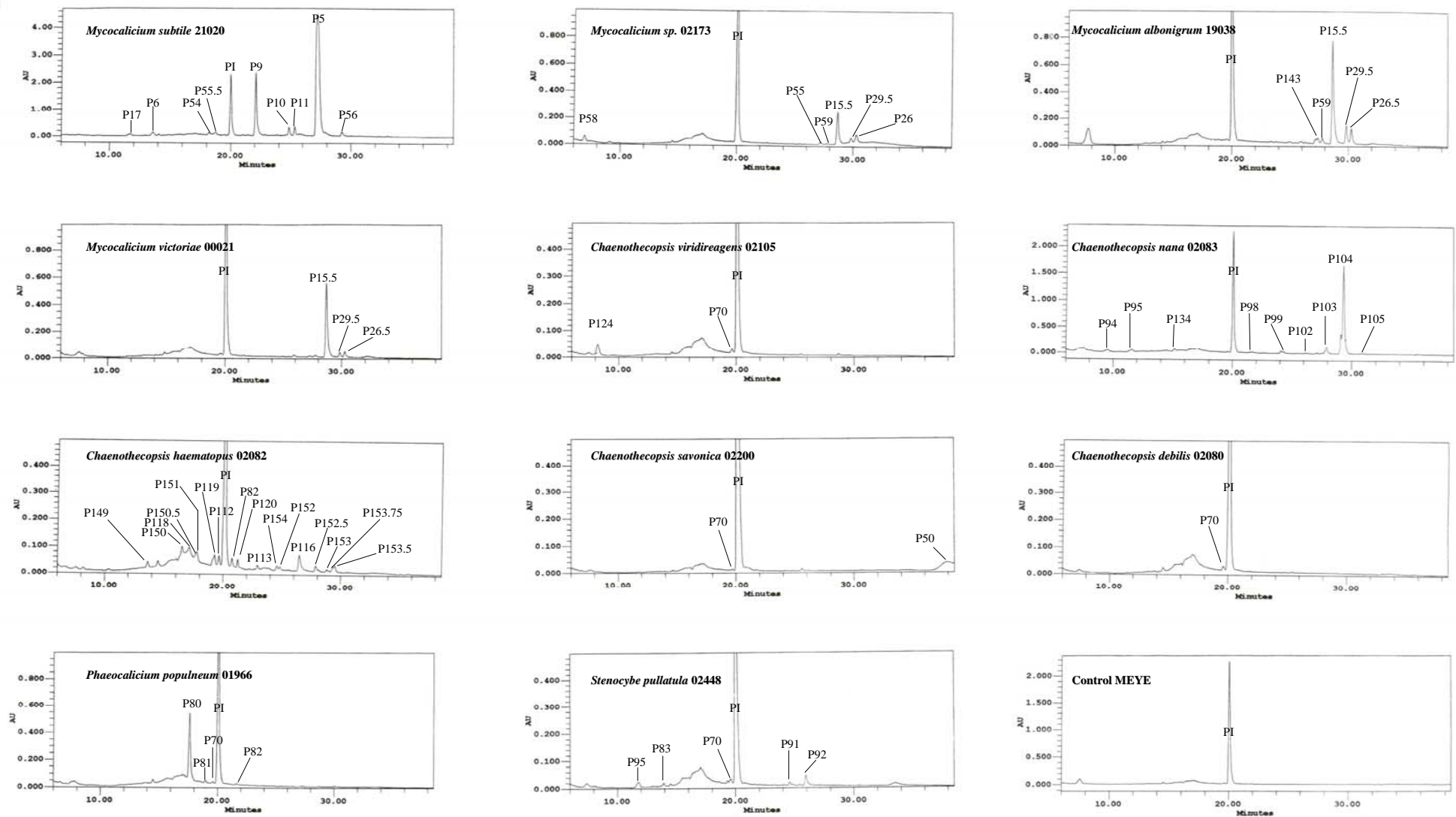


Figura 2.8. Cromatogramas de los extractos realizados a partir de cultivos en medio MEYE líquido. Cada uno de los picos viene identificado por un código. Los picos pertenecientes al medio se identifican por comparación entre los cromatogramas de los extractos con muestra y el cromatograma de un extracto del medio control. El pico correspondiente al patrón (hidroxibenzofenona) se denomina PI.

Para ordenar todos estos resultados y obtener grupos basados en los conjuntos de sustancias compartidos entre ellas se construyen matrices que serán empleadas en análisis de agrupamiento.

3.2.2 Análisis de agrupamiento de los patrones de producción de compuestos, en representantes de *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*

Se construyen dos matrices una correspondiente al análisis de los cultivos líquidos y otra a los sólidos (Tablas 2.12 y 2.13, Anexo 2, pag. 224-228).

Las matrices son tratadas en el programa BMDP, realizando agrupamientos jerárquicos a partir de la transformación de las matrices originales en matrices de distancias generadas por frecuencias, distancias de Jaccard y distancias de "matching"

Estas dos últimas se generan en función de la presencia o ausencia del compuesto, por lo que es necesario transformar la matriz original en una matriz 0/1, de modo que todo valor >0 en la matriz original es sustituido por 1.

A partir de las matrices de distancias se realizan agrupamientos jerárquicos empleando el método de amalgamamiento del centroide, obteniéndose los dendrogramas a partir de los cuales se establecen hipótesis sobre el agrupamiento de las especies.

A partir de cultivos crecidos en medio sólido la topología de los dendrogramas obtenidos permite establecer 4, 8 y 9 grupos, según el método de distancias empleado, frecuencias, Jaccard y "matching" respectivamente (Figuras 2.9, 2.10, 2.11 y Tabla 2.14).

En el análisis de agrupamiento jerárquico por frecuencias, se generan distancias en las que se tiene en cuenta el valor del porcentaje de la altura de cada pico. Este tipo de agrupamiento genera un dendrograma en el que se obtienen dos grupos bien definidos (Figura 2.9). Uno de ellos (grupo 1) formado por todos los especímenes de *M. subtile*. El otro grupo (grupo 3) está constituido por *C. nana* Cn02083 (Tabla 2.14). El resto de las muestras se agrupa en una formación de baja resolución que presenta distancias de amalgamamiento pequeñas en su base. La topología de este gran grupo permite la definición de dos conjuntos de muestras, uno de ellos (grupo 2) constituido por *Mycocalicium* sp. 02173, *Mycocalicium* sp. 01896, *M. victoriae* 00021, *M. albonigrum* 19038 y por *P. populneum* Pp01966 y *C. viridireagens* Cv02105. El conjunto restante (grupo 4) es una agrupación heterogénea que comprende especies de los cuatro géneros de la familia *Mycocaliciaceae*. En el se encuentran todos los representante de *Chaenothecopsis*, *C. debilis* 02080, *C. savonica* 02200, *C. haematopus* 02082, excepto *C.*

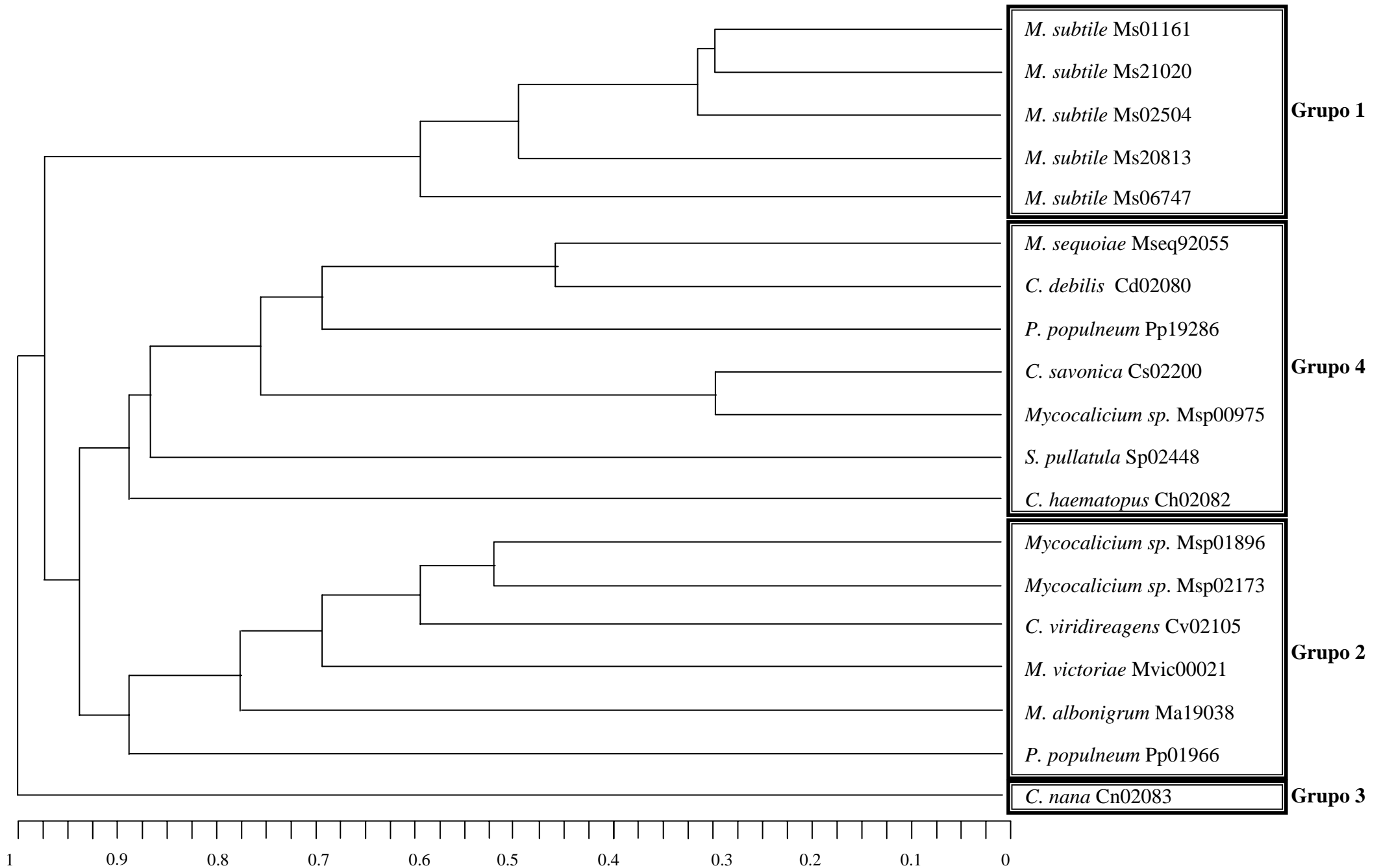


Figura 2.9 . Dendrograma obtenido por análisis de frecuencias, a partir de los compuestos obtenidos en cultivo sobre medio sólido.

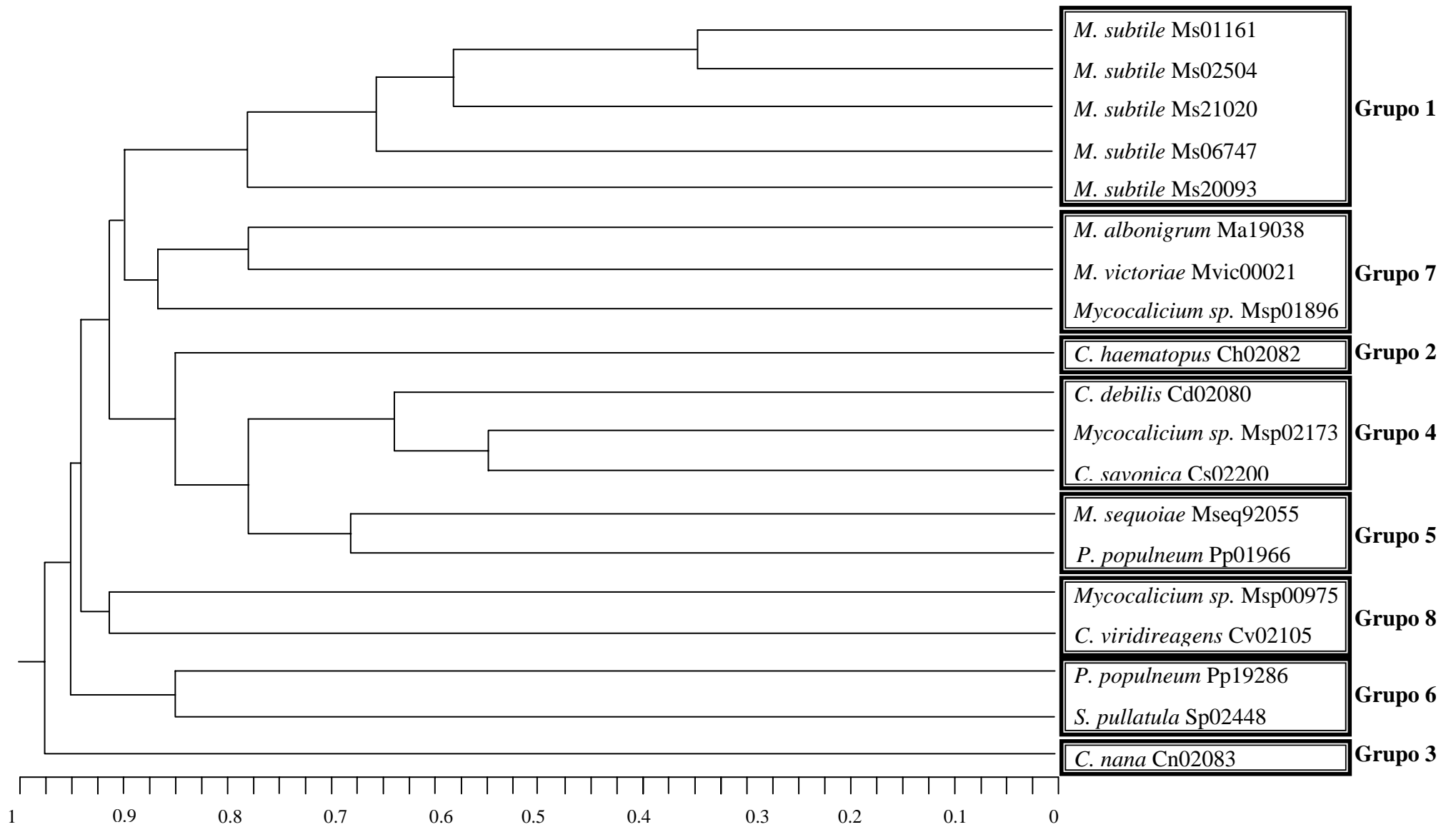


Figura 2.10 . Dendrograma obtenido por distancias de Jaccard, a partir de los compuestos obtenidos en cultivo sobre medio sólido.

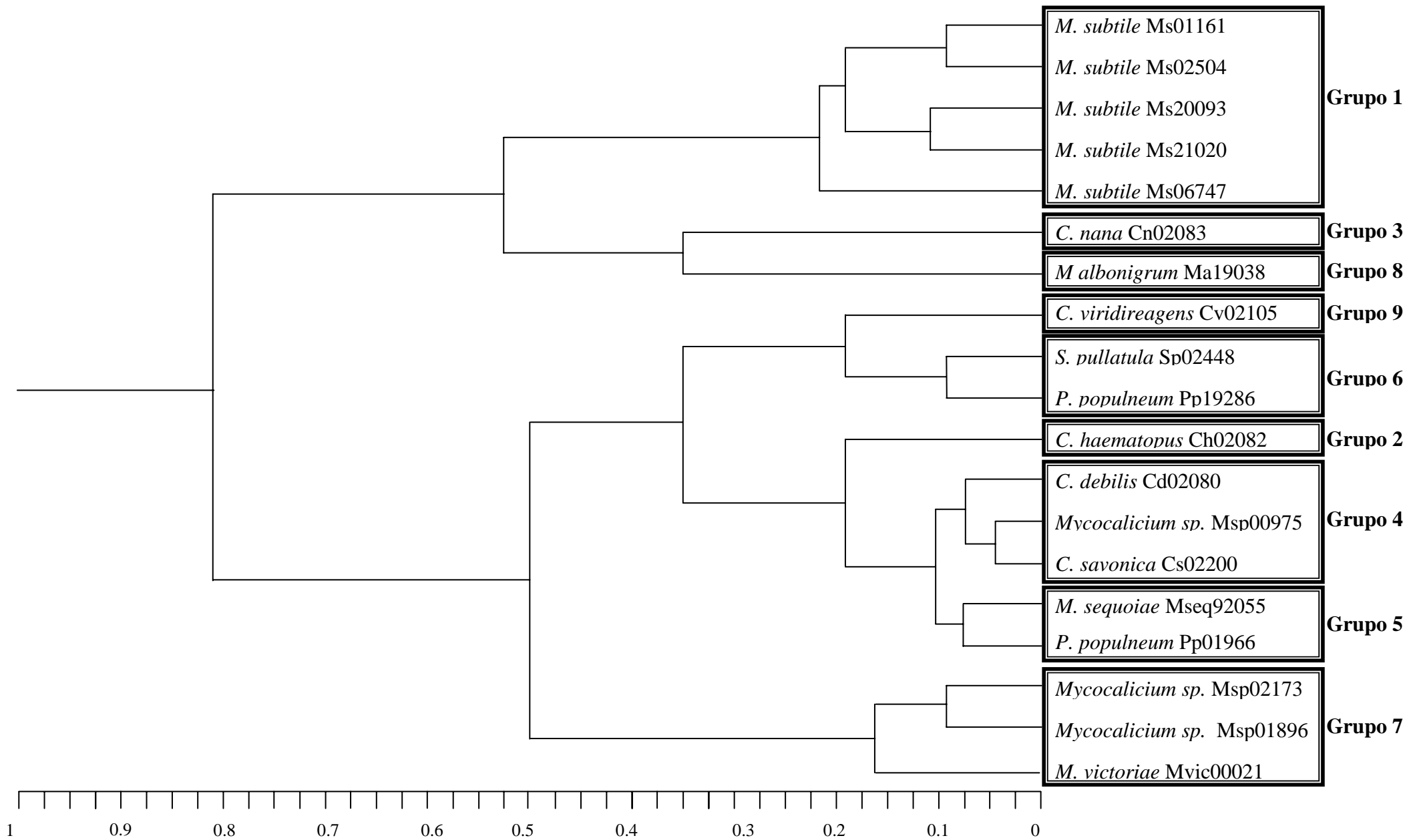


Figura 2.11 . Dendrograma obtenido por distancias de "matching", a partir de los compuestos obtenidos en cultivo sobre medio sólido.

viridireagens 02105, junto a ellos dos especies de *Mycocalicium*, *Mycocalicium sp.*00975 y *M. sequoiae* 92055, además de *P. populneum* 19286 y *S. pullatula* 02448.

Se procede al análisis de estos grupos en función de los picos que los definen, mediante la realización de un análisis descriptivo de la media de cada pico en cada grupo. A partir de estos datos se genera una tabla (Tabla 2.14), en la que se especifican los picos que se encuentran exclusivamente en cada grupo.

El grupo 1 (*M. subtile*) se define por la producción en el total de las muestras que lo componen, de los picos P5, P9, P10 y P11. Este conjunto de compuestos constituye un patrón propio de la especie.

El grupo 3 formado exclusivamente por la especie *C. nana* presenta varios picos que constituyen su patrón de producción, P94, P104, P106, P110, P111. Otros compuestos aparecen en dos de los tres replicados de *C. nana* P51, P96, P98, P103, P108, P109. Para considerar este patrón como el propio de la especie sería necesario introducir otros especímenes de *C. nana*, como se ha hecho con *M. subtile*, puesto que algunos de estos picos pueden ser propios del espécimen *C. nana* 02083 y no del conjunto de la especie.

El grupo 4 es muy heterogeneo y no presenta ningún compuesto común para las 7 especies que lo integran.

Las especies constituyentes del grupo 2 (*Mycocalicium sp.* 02173, *Mycocalicium sp.* 01896, *M. albonigrum*, *M. victoriae*, *C. viridireagens* y *P. populneum* 01966) presentan tres picos, P15.5, P26.5 y P29.5, que aparecen en más de la mitad de las muestras que forman el grupo. Es especialmente interesante el compuesto P15.5, que se encuentra en todas las muestras excepto en Pp01966 (Tabla 2.11, Anexo 2, pag. 218-223). La posición de la especie *P. populneum* 01966 en este grupo es cuestionable. Se trata de un hongo que produce pocos compuestos en las condiciones de cultivo empleadas. Algunos de estos compuestos son compartidos con algún componente del grupo 2, pero también produce compuestos comunes con los encontrados en muestras del grupo 4. Su localización en la base del grupo 2, podría estar influida por el valor numérico del porcentaje de altura de los picos, valor que se emplea en la generación de distancias por frecuencias. La posición de esta y otras especies varía cuando se realizan análisis de agrupamiento por distancias de Jaccard y "matching". Las generadas por Jaccard solo tienen en cuenta las coincidencias en la presencia de los compuestos, mientras que las de "matching" tienen en cuenta las coincidencias tanto en presencia como en ausencia de los mismos.

A) FRECUENCIAS				B) JACCARD				C) MATCHING			
Código	Caso	Grupo	Picos exclusivos de grupo	Código	Caso	Grupo	Picos exclusivos de grupo	Código	Caso	Grupo	Picos exclusivos de grupo
Ms01161	1-3	1	P5 P6 P8.5 P9 P9.5 P10	Ms01161	1-3	1	P5 P6 P8.5 P9 P9.5 P10	Ms01161	1-3	1	P5 P6 P8.5 P9 P9.5 P10
Ms20093	1-3	1	P11 P15 P21.75 P22	Ms20093	1-3	1	P11 P15 P21.75 P22	Ms20093	1-3	1	P11 P15 P21.75 P22
Ms21020	1-3	1	P24.75 P32 P43 P35 P36	Ms21020	1-3	1	P24.75 P32 P43 P35 P36	Ms21020	1-3	1	P24.75 P32 P43 P35 P36
Ms02504	1-3	1	P37 P39 P48 P52 P56	Ms02504	1-3	1	P37 P39 P48 P52 P56	Ms02504	1-3	1	P37 P39 P48 P52 P56
Ms06747	1-3	1	P144 P145 P146 P147	Ms06747	1-3	1	P144 P145 P146 P147	Ms06747	1-3	1	P144 P145 P146 P147
Ms01896	1-3	2	P4.5 P5.5 P11.5 P12.5 P15.5	Ms01896	1-3	7	P11.5 P12.5 P19.5 P21	Ms01896	1, 2	7	P4.5 P18 P19.5 P24 P26
Ms02173	1-3	2	P18 P19.5 P21 P24 P24.5	Mvic	1	7	P24.5 P28 P28.5 P32.5	Mvic	1-3	7	P28.5 P32.5 P61 P62 P63
Ma19038	1-3	2	P26 P26.5 P28 P28.5 P29.5	Ma19038	1-3	7	P43 P59 P71 P72 P73	Ms02173	1-3	7	P64 P65 P66 P67 P68
Mvic	1-3	2	P32.5 P43 P46 P59 P61 P62				P74 P76 P119 P135	Ma19038	1-3	8	P69 P71 P72 P73 P74
			P63 P64 P65 P66 P67 P68				P136 P138 P141 P142 P143				P76 P135 P136
			P69 P71 P72 P73 P74 P76								P11.5 P12.5 P21 P24.5 P28 P43
			P79 P80 P119 P125 P126								P119 P138 P141 P142 P143
Cv02105	1-3	2	P128 P135 P136 P138 P141	Ms02173	1-3	8	P4.5 P18 P24 P26 P46 P61 P62	Cv02105	1-3	9	P125 P126 P128
Pp01966	1-3	2	P142 P143	Cv02105	2, 3	8	P63 P64 P65 P66 P67 P68				
							P69 P125 P126 P127 P128				
Cs02200	1-3	4		Ch02082	1, 2	2	P112 P114 P115 P116 P117	Ch02082	1, 2	2	P112 P114 P115 P116 P117
Cd02080	1-3	4	P34.5 P77 P84 P85 P86				P133				P133
Msp0975	1-3	4	P87 P88 P89 P91 P92	Cn02083	1-3	3	P51 P94 P96 P98 P99 P101	Cn02083	1-3	3	P51 P94 P96 P98 P99 P101
			P93 P112 P114 P115				P103 P104 P106 P107 P108				P103 P104 P106 P107 P108
			P116 P117 P122 P129				P109 P110 P111 P134				P109 P110 P111 P134
Mseq	1-3	4	P130 P133	Cs02200	1-3	4		Cs02200	1-3	4	
Ch02082	1-3	4		Cd02080	1-3	4	P122 P129 P130	Cd02080	1-3	4	P122 P129 P130
Pp19286	1-3	4		Msp0975	1-3	4		Msp0975	1-3	4	
Sp02448	1-3	4		Mseq	1-3	5	P79 P80	Mseq	1-3	5	P79 P80
Cn02083	1-3	3	P51 P94 P96 P98 P99 P101	Pp01966	1-3	5		Pp01966	1-3	5	
			P103 P104 P106 P107 P108	Pp19286	1-3	6	P85 P86 P87 P88 P89 P91	Pp19286	2, 3	6	P85 P86 P87 P88 P89 P91 P92
			P109 P110 P111 P134	Sp02448	1-3	6	P92 P93	Sp02448	1-3	6	P93

Tabla 2.14. Sumario de los análisis de agrupamiento de las muestras en función de los compuestos producidos en medio MEYE sólido.

Tabla 2.14 Sumario de los análisis de agrupamiento de las muestras en función de los compuestos producidos en medio MEYE sólido. La tabla se divide en tres partes, A, B y C, cada una indica un tipo de análisis de agrupamiento, frecuencias, jaccard y matching, respectivamente. Cada análisis genera un número distinto de grupos. Cada grupo de muestras aparece en un color y contiene cuatro columnas que indican: las muestras que componen el grupo, el caso o número de replicado (1-3, significa que los tres replicados están incluidos en el grupo), nº de identificación del grupo, picos producidos exclusivamente por las muestras que componen cada grupo. Dentro de esta última columna, los códigos en negrita señalan los compuestos producidos por la totalidad de las muestras .

Estos análisis de agrupamiento ofrecen dendrogramas con una estructura definida en grupos más pequeños que los obtenidos en el análisis de frecuencias. Los resultados son parecidos entre sí con algunas diferencias (Figuras 2.10, 2.11). En ambos análisis se obtiene un grupo formado por todos los especímenes de la especie *M. subtile* (grupo 1). Así mismo se establece un grupo (grupo 3) para la especie *C. nana* 02083. Los patrones de compuestos que definen estos grupos son idénticos que los obtenidos en el análisis por frecuencias.

Los agrupamientos por distancias de Jaccard y "matching" muestran cuatro grupos comunes (grupos 2, 4, 5 y 6). El grupo 2 está constituido por *C. haematopus* 02082, y muestra un patrón de producción formado por los picos P114, P115, P116 y P117. El grupo 4 contiene a las especies *C. savonica* 02200, *C. debilis* 02080 y *Mycocalicium sp.* 00975. No se observan compuestos comunes para todas las muestras que componen el grupo 4, sólo el compuesto P80 se produce en algunas de las especies de este grupo (Tabla 2.11, Anexo 2, pag. 218-223). El grupo 5, está formado por *M. sequoiae* 92055 y *P. populneum* 01966. Esta especie carecen de un patrón de producción común. Por último encontramos la agrupación (grupo 6) entre las especies *P. populneum* 19286 y *S. pullatula* 02448 que presenta dos compuestos, P85 y P86, comunes para ambas especies.

Las diferencias entre ambos tipos de análisis (Jaccard y "matching"), se establecen en la disposición de las muestras restantes. Según el análisis realizado por distancias de Jaccard (Figura 2.10), las especies *Mycocalicium sp.* 01896, *M. victoriae* y *M. albonigrum* 19038, forman el grupo 7, con un solo compuesto (P59) producido por estas tres especies (Tabla 2.14).

C. viridireagens 02105 se asocia a *Mycocalicium sp.* 02173 (grupo 8), mostrando un pico (P46) producido por ambas especies (Tabla 2.14). Según el dendrograma generado por distancias de "matching" (Figura 2.11), la especie *M. albonigrum* 19038 forma un grupo (grupo 8) por sí sola, definido por el pico P28, presente en los tres replicados de la muestra y los picos P138, P141 y P142 que aparecen en dos de los tres replicados (Tabla 2.11, Anexo 2, pag. 218-223).

En este análisis la muestra *C. viridireagens* 02105 forma el grupo 9.

M. victoriae, *Mycocalicium sp.* 02173 y *Mycocalicium sp.* 01896, forman el grupo 7, sin presentar un patrón de compuestos común.

Se observa que los grupos bien definidos por la producción de un patrón de compuestos coinciden con aquellos constituidos por una sola especie (grupos 1 y 3 de frecuencias, 1, 2 y 3 de Jaccard y 1, 2, 3 y 8 de "matching"). Es más dificultoso encontrar patrones que definan grupos formados por número variable entre 2 y 7 especies. Un ejemplo es el grupo 6 de los análisis realizados por Jaccard y matching (Tabla 2.14), el cual está formado por dos especies *S. pullatula* 02448 y *P. populneum* 19286, que producen un patrón de compuestos común P85 y P86. Ninguno de estos compuestos se producen en otra especie, ni siquiera por el otro representante de *P. populneum*, Pp01966.

Es interesante estudiar aquellos compuestos presentes en dos o más grupos (Tabla 2.15), puesto que nos pueden dar idea de relaciones entre especies. En el análisis por frecuencias las especies presentes en el grupo 2 comparten un buen número de compuestos con otros grupos, especialmente con el grupo 1 y el grupo 4. La mayoría de los picos compartidos entre los grupos 1 y 2 se deben a compuestos comunes entre las especies *M. subtile* y *M. albonigrum*, mientras que la relación entre el grupo 2 y el grupo 4 se basa en los compuestos comunes entre *P. populneum* 01966 (grupo 2) y *C. haematopus*, *M. sequoiae* (grupo 4).

En los análisis por distancias de Jaccard y "matching" destacan los picos compartidos entre los grupos 7 y 8 que constituyen un patrón reconocible P15.5. Este patrón define a las especies *M. albonigrum*, *Mycocalicium sp.* (02173 y 01896) y *M. victoriae*.

FRECUENCIAS				<i>Picos compartidos</i>				JACCARD				<i>Picos compartidos</i>				MATCHING				<i>Picos compartidos</i>			
Grupos		1	2	P16 P19 P20 P23.5 P27.5 P42 P60 P75 P83 P127 P137	Grupos					1	2	P113	Grupos					1	2	P113			
Grupos		1	3	P40	Grupos					1	3	P40	Grupos					1	3	P40			
Grupos		1	4	P17 P113	Grupos					1	5	P83	Grupos					1	5	P83			
Grupos		2	4	P70 P78 P81 P82 P97 P139	Grupos					1	6	P17	Grupos					1	6	P17			
Grupos		3	4	P95	Grupos					1	7	P19 P20 P23.5 P27.5 P42 P75 P137	Grupos					1	8	P19 P20 P23.5 P42 P137			
Grupos	1	2	4	P7	Grupos					1	8	P16	Grupos					1	7	P16 P27.5			
Grupos	2	3	4	P90 P123	Grupos					2	4	P34.5	Grupos					1	9	P127			
					Grupos					2	5	P82	Grupos					2	4	P34.5			
					Grupos					3	6	P95	Grupos					2	5	P82			
					Grupos					4	6	P84	Grupos					4	6	P84			
					Grupos					4	8	P97	Grupos					4	9	P97			
					Grupos					5	7	P139	Grupos					5	8	P139			
					Grupos					7	8	P5.5 P15.5 P26.5 P29.5	Grupos					7	8	P5.5 P26.5 P59			
					Grupos					1	5	8	P60	Grupos					7	9	P46		
					Grupos					1	6	7	P7	Grupos					1	5	7	P60	
					Grupos					2	5	7	P81	Grupos					1	7	8	P7 P75	
					Grupos					3	4	8	P123	Grupos					2	5	8	P81	
					Grupos					4	5	6	P77	Grupos					3	5	6	P77	
					Grupos					4	5	7	P78	Grupos					4	5	7	P78	
					Grupos					4	5	6	7	P70	Grupos					3	4	9	P123
					Grupos	2	3	4	5	7	8	P90	Grupos						7	8	9	P15.5 P29.5	
														Grupos					4	5	6	7	P70
														Grupos	2	3	4	5	7		P90		

Tabla 2.15 Ver pie de tabla en la página 116.

Tabla 2.15 Compuestos producidos en más de uno de los grupos establecidos en los análisis de agrupamiento en función de los compuestos producidos en medio MEYE sólido. La tabla se divide en tres partes, cada una indica un tipo de análisis de agrupamiento, frecuencias, jaccard y matching. En cada análisis se especifican los códigos de los compuestos compartidos y los grupos en los que se encuentran. Las muestras que componen los grupos se detallan en la Tabla 2.14. Los códigos en negrita señalan los compuestos producidos por la totalidad de las muestras y replicados del grupo.

En los análisis realizados a partir de cultivos en medio líquido se obtienen dendrogramas que permiten diferenciar 7, 6 y 7 grupos (frecuencias, Jaccard y "matching" respectivamente) (Figuras 2.12 y 2.13). En este caso los resultados son semejantes en los análisis por frecuencias y distancias de Jaccard (Figura 2.12), con una única excepción respecto a la posición de *C. nana* 02083. Esta especie, según el análisis por frecuencias, se constituye como un grupo por sí sola, mientras que por distancias de Jaccard la topología del árbol resultante sugiere una relación con *S. pullatula* Sp02448, y *C. savonica* Cs02200 (grupo 4 Jaccard, Tabla 2.16).

En los tres tipos de análisis se observan grupos comunes. Los representantes de *M. subtile* (grupo 1) se agrupan mostrando un patrón de producción basado en la presencia del compuesto P5, y en menor medida los compuestos P9 y P11 (Tabla 2.11, Anexo 2, pag. 218-223). El grupo 2 contiene las restantes especies de *Mycocalicium*, *Mycocalicium* sp. 02173, *M. albonigrum* 19038 y *M. victoriae* 00021. Este grupo queda definido por los compuestos P15.5 y P29.5. A diferencia de lo observado en los cultivos en medio sólido la especie *C. viridireagens* no presenta ningún compuesto común con las especies del grupo 2. Los compuestos producidos a partir de cultivos líquidos, relacionan a *C. viridireagens* con otros *Chaenothecopsis*, *C. debilis* 02080, en el análisis por frecuencias y distancias de Jaccard y con *C. debilis* 02080 y *C. savonica* 02200, en el análisis por distancias de "matching", constituyendo el grupo 3.

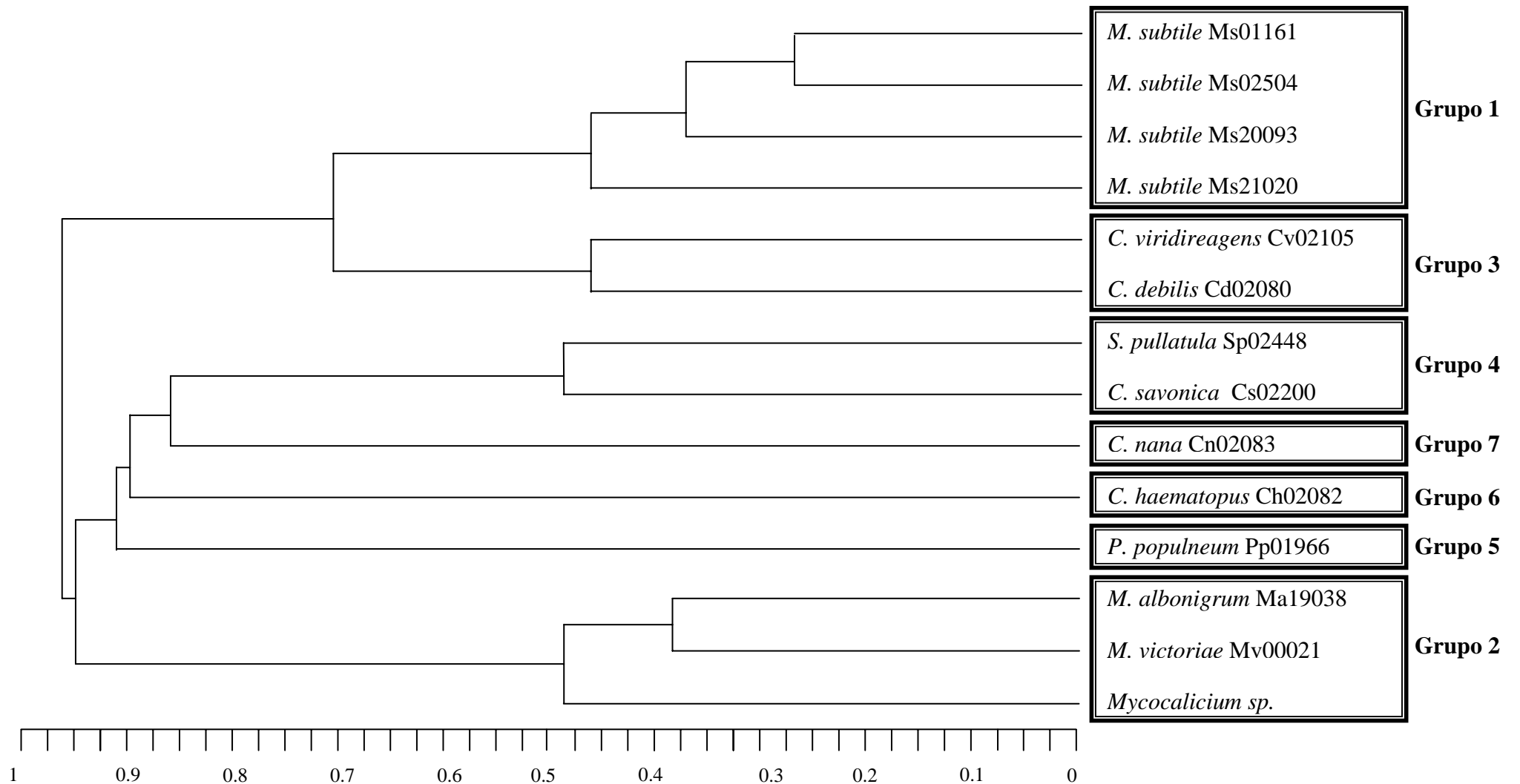


Figura 2.12 . Dendrograma obtenido por frecuencias y distancias de Jaccard, a partir de los compuestos obtenidos en cultivo sobre medio MEYE líquido.

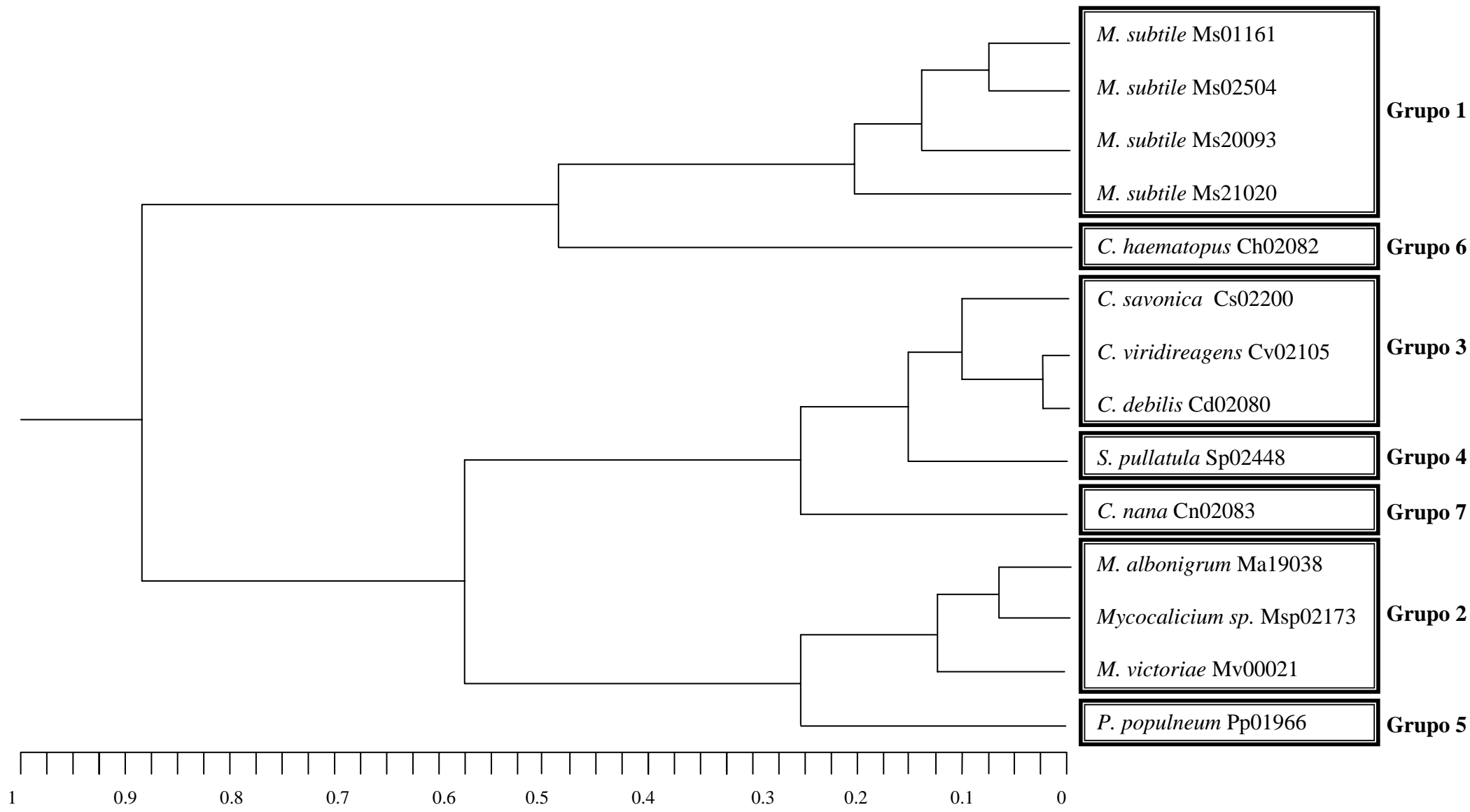


Figura 2.13 . Dendrograma obtenido por distancias de "matching", a partir de los compuestos obtenidos en cultivo sobre medio MEYE líquido

FRECUENCIAS				JACCARD				MATCHING			
Código	Caso	Grupo	Picos	Código	Caso	Grupo	Picos	Código	Caso	Grupo	Picos
Ms01161	1-3	1	P5 P6 P9 P10 P11 P17	Ms01161	1-3	1	P5 P6 P9 P10 P11 P17	Ms01161	1-3	1	P5 P6 P9 P10 P11 P17
Ms20093	1-3	1	P23 P23.5 P32 P39 P40	Ms20093	1-3	1	P23 P23.5 P32 P39 P40 P41	Ms20093	1-3	1	P23 P23.5 P32 P39 P40 P41
Ms21020	1-3	1	P41 P43 P44 P46 P47 P48	Ms21020	1-3	1	P43 P44 P46 P47 P48 P53	Ms21020	2, 3	1	P43 P44 P46 P47 P48 P53
Ms02504	1-3	1	P53 P54 P55.5 P56	Ms02504	1-3	1	P54 P55.5 P56	Ms02504	1-3	1	P54 P55.5 P56
Mvic	1-3	2	P5.5 P8.75 P15.5 P26	Mvic	1-3	2	P5.5 P8.75 P15.5 P26 P26.5	Mvic	1-3	2	P5.5 P8.75 P15.5 P26 P26.5
Ms02173	1-3	2	P26.5 P29.5 P58 P59 P59.5	Ms02173	1-3	2	P29.5 P58 P59 P59.5 P74	Ms02173	1-3	2	P29.5 P58 P59 P59.5 P74
Ma19038	1-3	2	P74 P143 P148	Ma19038	1-3	2	P143 P148	Ma19038	1-3	2	P143 P148
Pp01966	1-3	5	P14.2 P60 P79 P80 P81 P155 P156	Pp01966	1-3	5	P14.2 P60 P79 P80 P81 P155 P156	Pp01966	1-3	5	P14.2 P60 P79 P80 P81 P155 P156
Cv02105	2, 3	3		Cv02105	2, 3	3		Cv02105	2, 3	3	
Cd02080	2, 3	3	P12.5 P78 P124	Cd02080	2, 3	3	P12.5 P78 P124	Cd02080	1-3	3	P12.5 P50 P78 P84 P124
								Cs02200	1-3	3	
Sp02448	1-3	4		Sp02448	1-3	4	P13.5 P34.2 P34.5 P50 P83 P91 P92	Sp02448	1-3	4	P83 P91 P92
Cs02200	1, 2	4	P34.5 P50 P83 P91 P92	Cs02200	1, 2	4	P95 P98 P99 P101 P102 P103				
				Cn02083	1-3	4	P104 P105 P110 P111				
Cn02083	1-3	7	P34.2 P99 P101 P102 P103 P104 P105 P110 P111					Cn02083	1-3	7	P34.2 P99 P101 P102 P103 P104 P105 P110 P111
Ch02082	1-3	6	P19 P20 P107 P112 P113 P116 P119 P120 P149 P150 P150.5 P151 P152 P152.5 P153 P153.5 P153.75 P154	Ch02082	1-3	6	P19 P20 P107 P112 P113 P116 P119 P120 P149 P150 P150.5 P151 P152 P152.5 P153 P153.5 P153.75 P154	Ch02082	1-3	6	P19 P20 P107 P112 P113 P116 P119 P120 P149 P150 P150.5 P151 P152 P152.5 P153 P153.5 P153.75 P154

Tabla 2.16 Sumario de los análisis de agrupamiento de las muestras en función de los compuestos producidos en medio MEYE líquido.

Tabla 2.16 Sumario de los análisis de agrupamiento de las muestras en función de los compuestos producidos en medio MEYE líquido. La tabla se divide en tres partes, A, B y C, cada una indica un tipo de análisis de agrupamiento, frecuencias, jaccard y matching, respectivamente. Cada análisis genera un número distinto de grupos. Cada grupo de muestras aparece en un color y contiene cuatro columnas que indican: las muestras que componen el grupo, el caso o número de replicado (1-3, significa que los tres replicados están incluidos en el grupo), nº de identificación del grupo, picos producidos exclusivamente por las muestras que componen cada grupo. Dentro de esta última columna, los códigos en negrita señalan los compuestos producidos por la totalidad de las muestras y replicados del grupo.

El grupo 4 es variable según el tipo de análisis. En todos los casos se encuentra la especie *S. pullatula* 02448. En el análisis realizado por distancias de "matching" esta especie constituye el grupo por sí sola, mientras que por distancias de Jaccard se establece una relación entre *S. pullatula* 02448 y las especies *C. savonica* 02200 y *C. nana* 02083. El compuesto denominado P13.5 fue producido por estas tres especies, pero no en todos sus replicados (Tabla 2.11, Anexo 2, pag 218-223). *C. nana* 02083 se desliga del grupo 4, y forma en solitario el grupo 7, según los análisis de frecuencias y "matching", al igual que sucedía en los agrupamientos obtenidos a partir de los cultivos en medio sólido.

Los grupos 5 y 6 (Tabla 2.16) son grupos formados por una sola especie, *P. populneum* 01966 (grupo 5) caracterizado por la producción del compuesto P60, y *C. haematopus* 02082 (grupo 6), que produce los compuestos P112, P116, P119, P120.

Los compuestos P95 y P98 son producidos exclusivamente por *C. nana* y *S. pullatula* (grupos 4 y 7 "matching") (Tabla 2.17). Esta relación se muestra más claramente en el análisis realizado por distancias de Jaccard, quedando ambas especies englobadas en el grupo 4. En todas estas muestras aparece el compuesto P34.5, que además es producido por *C. savonica* y por un replicado de *C. haematopus* (Tabla 2.11, Anexo 2, pag 218-223).

La relación más clara se establece entre dos grupos bien definidos, los formados por las especies *P. populneum* 01966 (grupo 5) y *C. haematopus* 02082 (grupo 6). Estos grupos comparten un compuesto común para los tres replicados de ambas especies (P82) (Tabla 2.17). Esto podría suponer una relación entre especies aunque la topología de los dendrogramas no permita su asociación en un grupo común.

FRECUENCIAS					<i>Picos compartidos</i>	JACCARD					<i>Picos compartidos</i>	MATCH					<i>Picos compartidos</i>
Grupos			1	6	P118	Grupos			1	4	P94 P134	Grupos			1	6	P118
Grupos			1	7	P94 P134	Grupos			1	6	P118	Grupos			1	7	P94 P134
Grupos			1	8	P15.75	Grupos			1	7	P15.75	Grupos			2	3	P14
Grupos			2	4	P14	Grupos			2	4	P14	Grupos			2	5	P34
Grupos			2	5	P34	Grupos			2	5	P34	Grupos			3	5	P97
Grupos			4	5	P97	Grupos			4	5	P97	Grupos			4	6	P93
Grupos			4	6	P93	Grupos			4	6	P34.5 P93	Grupos			4	7	P95 P98
Grupos			4	7	P13.5 P34.5 P95 P98	Grupos			5	6	P82	Grupos			5	6	P82
Grupos			5	6	P82	Grupos	1	3	4	5	P70	Grupos		3	4	7	P13.5
Grupos		4	6	7	P34.5							Grupos	1	3	4	5	P70
Grupos	1	3	4	5	P70							Grupos	3	4	6	7	P34.5

Tabla 2.17 Compuestos producidos en más de uno de los grupos establecidos en los análisis de agrupamiento en función de los compuestos producidos en medio MEYE líquido. La tabla se divide en tres partes, cada una indica un tipo de análisis de agrupamiento, frecuencias, Jaccard y "matching". En cada análisis se especifican los códigos de los compuestos compartidos y los grupos en los que se encuentran. Las muestras que componen los grupos se detallan en la Tabla 2.16. Los códigos en negrita señalan los compuestos producidos por la totalidad de las muestras y replicados del grupo.

4. Discusión

La familia *Mycocaliciaceae* A. Schmidt comprende cerca de 90 especies reconocidas y organizadas en cuatro géneros. El establecimiento de estos géneros (Schmidt, 1970) fue realizado en función de las características anatómicas de sus pequeños cuerpos fructíferos. Los caracteres morfológicos analizables son pocos y aquellos que se consideraron importantes, para la discriminación entre géneros, son variables en muchos casos. Esta variabilidad morfológica de algunos caracteres da lugar a confusión en la determinación taxonómica, puesto que permite encontrar especímenes de características intermedias entre dos o más géneros.

Era por tanto necesaria la aplicación de nuevos conjuntos de datos que permitieran corroborar o rechazar las hipótesis, fundadas en la morfología de estas especies.

Para ello procedimos a la secuenciación de la mitad 5' del gen 28S ADNr de ocho especies de *Chaenothecopsis*, tres de *Mycocalicium*, una de *Phaeocalicium* y una de *Stenocybe*. Se tomó el ADN ribosómico como punto de partida del análisis genético. Esta familia nunca había sido estudiada genéticamente. Consideramos esta región del material genético como la más apropiada para comenzar, puesto que se trata una región previamente estudiada en otros hongos, lo cual nos facilita la elección de oligonucleótidos cebadores para las amplificaciones por PCR, y nos permite disponer de secuencias homólogas en otros hongos que nos puedan servir con fines comparativos. La selección de la mitad 5' del gen 28S ADNr para la delimitación de los géneros de la familia, se realizó teniendo en cuenta los problemas de alineamiento observado para los espaciadores internos entre especies de esta familia (bloque 1) y el carácter intermedio en cuanto a grado de variabilidad entre ITS y 18S descrito en la literatura para esta región (Mitchell et al., 1995). En nuestro análisis acerca de la variabilidad intraespecífica de *Mycocalicium subtile* (bloque 1), se incluyen secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de dos especies de *Chaenothecopsis*. Se observa que la variabilidad es grande respecto a las secuencias de *Mycocalicium*, lo que dificulta en gran medida el proceso de alineamiento, dando lugar a regiones de alineamiento ambiguo que es necesario eliminar del alineamiento final. Por esta razón se buscaron zonas del genoma más conservadas que permitieran alineamientos menos ambiguos, pero que al mismo tiempo, exhibieran una variabilidad suficiente que permitiera el establecimiento de relaciones entre especies de distintos géneros. El gen 18S es el gen más utilizado para el establecimiento de relaciones filogenéticas y del que más secuencias se encuentran en las

bases de datos. Sin embargo se trata de una zona excesivamente conservada. El gen 28S que codifica para la subunidad grande del ribosoma contiene alrededor de 3500 pb y presenta zonas muy conservadas que ayudan al alineamiento de las secuencias, así como zonas de mayor variabilidad que las mostradas en el gen 18S. Debido a la gran longitud del gen se seleccionó la mitad 5' del mismo para su análisis en la familia *Mycocaliciaceae*.

Antes de proceder a su secuenciación se realizó un estudio preliminar en busca de fragmentos polimórficos resultantes de un proceso de digestión del fragmento del gen previamente amplificado. La presencia de patrones distintos para cada especie nos señaló la presencia de variabilidad en la secuencia elegida (Tabla 2.4).

Estos resultados preliminares ya apuntaban hacia una mayor variabilidad en el género *Chaenothecopsis* respecto de *Mycocalicium*, e incluso hacia la existencia de relaciones entre especies de distintos géneros. El estudio de estas relaciones se realizó en función de las secuencias de nucleótidos del fragmento elegido, apoyándonos en las características morfológicas y de producción de anamorfos conocidas (Tibell, 1995), y en los resultados obtenidos a partir de los estudios de producción de metabolitos secundarios en medios sólido y líquido.

El análisis genético realizado en función de las secuencias de la mitad 5' del gen 28S ADN_r, permite establecer tres grupos monofiléticos:

El primero está formado por las especies *C. pusilla*, *C. pusiola* y *C. fennica*. La relación *C. pusilla* y *C. pusiola* queda apoyada por características morfológicas, ecológicas y de producción de anamorfos (Tibell 1987a, 1995). La relación de estas dos especies con *C. fennica* no es evidente en función de caracteres morfológicos, según los cuales esta especie presenta características intermedias entre *Chaenothecopsis*, *Mycocalicium* y *Phaeocalicium* (Tibell, 1978a).

El segundo grupo monofilético está constituido por las especies *Stenocybe pullatula* y *Phaeocalicium populneum* Pp19286. Esta agrupación queda apoyada por los datos químicos de producción de compuestos a partir de cultivos en medio sólido.

El tercer grupo monofilético está formado por los dos representantes de *M. subtile* y el representante de la especie morfológicamente críptica respecto a la anterior *Mycocalicium* sp. Ms02173, lo cual apoya la existencia de una relación más cercana entre estas dos especies frente a la relación entre *Mycocalicium* sp. y *M. albonigrum*. Sin embargo, en este caso los datos químicos señalan lo contrario puesto que se observa la producción de

compuestos comunes entre Ms02173 y Ma19038 capaces de generar un patrón de producción común (P15.5, P29.5).

La topología de los árboles filogenéticos (Figura 2.6) permite establecer otras relaciones entre especies, como la observada entre *C. savonica*, *C. nana*, *C. debilis*, pero sin un soporte superior al 50%

A continuación se discute el establecimiento de los géneros de la familia *Mycocaliciaceae*, en función de los datos morfológicos, ecológicos y de producción de anamorfos obtenidos de la bibliografía, y de la información obtenida a partir de nuestros análisis genéticos y químicos.

Género *Mycocalicium* Vainio

Este género ha sido representado por cuatro especies en el análisis genético, *M. subtile*, *M. albonigrum*, *M. sequoiae* y *Mycocalicium sp.*, y por cinco en el análisis químico, *M. victoriae* y *Mycocalicium sp.* 00975 además de las anteriores. *Mycocalicium subtile* es la especie tipo

Sí el género fuera monofilético, cabría esperar un agrupamiento de estas cuatro especies, sin embargo, en el análisis por "Parsimony Jackknifing" (Figura 2.5, pag), las distintas especies de *Mycocalicium* forman parte de una politomía en la que se presentan también las especies de *Chaenothecopsis* empleadas. El análisis genético muestra que el género *Mycocalicium* tal como se circunscribe actualmente, no es monofilético

M. subtile y *M. albonigrum* son especies muy relacionadas morfológicamente (Tibell 1987a,1990) y forman un grupo monofilético en las inferencias realizadas por parsimonia y distancias (Figura 2.6, pag. 101), pero *M. sequoiae* no se agrupa con ellos en función de datos genéticos ni químicos.

M. victoriae, sólo incluido en el análisis químico, aparece claramente relacionado con *M. albonigrum* y *Mycocalicium sp.* (Msp02173 y Msp01896).

Mycocalicium subtile (Pers.) Szat- *Mycocalicium sp.*- *Mycocalicium albonigrum* (Nyl.)

Tibell- *Mycocalicium victoriae* (Knight in Wilson) Tibell

El análisis de la secuencia de la mitad 5' del gen 28S ADNr apoya el resultado obtenido en el bloque 1 sobre la posición de *Mycocalicium sp.* (especímenes Msp 02173 y Msp.01896), más cercana a *M. subtile* que a *M. albonigrum* (Figuras 2.5 y 2.6, pag. 101 y 102).

En los análisis filogenéticos realizados por parsimonia y distancias genéticas (Figura 2.6, pag. 102), la topología de los árboles obtenidos establece una relación entre *M. subtile* y *M. albonigrum*, aunque sólo en el análisis por distancias aparece un índice de soporte para este grupo superior al 50%.

Los estudios químicos muestran la existencia de compuestos producidos por representantes de ambas especies. Esta situación es visible en el análisis de compuestos producidos a partir de cultivos en medio sólido, realizada por distancias de "matching" (Tabla 2.14, pag.112). En este estudio de agrupamiento, las especies *M. subtile* y *M. albonigrum* forman dos grupos diferenciados (grupo 1 y grupo 8 respectivamente). En la tabla de compuestos compartidos entre grupos (Tabla 2.15, pag. 115), observamos que entre estos dos grupos aparecen cinco compuestos compartidos, aunque ninguno de ellos se encuentra en el total de las muestras, por lo que no se pueden considerar constituyentes de un patrón común de producción.

En el análisis químico realizado a partir de cultivos en medio líquido, no se observa ningún compuesto compartido entre *M. subtile* y *M. albonigrum* (Tabla 2.17, pag. 121). Sin embargo, se establece una relación entre los especímenes *Mycocalicium sp.* Msp02173, *M. albonigrum*, y *M. victoriae*, que se agrupan formando el grupo 2, caracterizado por la producción de los compuestos codificados como P15.5 y P29.5. Esta relación establecida en función de los patrones de compuestos producidos en cultivo, coincide con las similitudes morfológicas entre *M. albonigrum* y *M. victoriae* (Tabla 2.2, pag. 88). *M. victoriae* presenta también similitudes morfológicas con *M. subtile*, incluso más que con *M. albonigrum* puesto que ambas carecen de canal que atraviesa el engrosamiento apical del asco, y sus tamaños de ascos y esporas son muy semejantes, así como forma tamaño y color de las mismas. La mayor diferencia radica en el color de las hifas que forman la parte interior del pedúnculo que son hialinas en *M. victoriae* y marrones oscuras en *M. subtile* y *M. albonigrum* (Tibell, 1987a)

Mycocalicium sequoiae Bonar

La posición de la secuencia del gen 28S de esta especie es variable según el método de inferencia empleado. Se trata de una especie resinícola, que sólo se encuentra sobre exudados de *Sequoiadendron* y *Sequoia*, en California y presenta características morfológicas intermedias entre *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* (Tabla 2.2, pag. 88). Esta especie fue descrita en 1971 (Bonar, 1971) y en su descripción no se hace referencia en ningún momento al establecimiento de *Mycocaliciaceae* y los géneros que lo forman, realizada por Schmidt (1970). Bonar consideró a esta especie como perteneciente a la familia *Caliciaceae*, y del género *Mycocalicium* por ser un hongo no liquenizado. El pedúnculo contiene hifas de disposición periclinal y en algunos casos también se han encontrado hifas muy entrecruzadas, de color claro en la zona interior y marrones a negras en el exterior del pedúnculo. Presentan un engrosamiento apical con canal, característica compartida con *M. albonigrum* y con *Chaenothecopsis* (Tabla 2.2, pag. 88). Tiene apotecios de pedúnculo largo 1.5-3.2, los de mayor tamaño encontrados en el género, y sus ascos y esporas podrían entrar dentro del rango de tamaños establecido para *Chaenothecopsis* (Schmidt, 1970).

Empleando métodos de análisis genético y químico, no se observa en ningún caso, un agrupamiento con las otras especies del género *Mycocalicium* incluidas en este análisis. La secuencia del gen 28S no ha sido adecuada para encontrar los parientes próximos de esta especie, o bien la falta de resolución se debe a la escasez de especies representantes de *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis* empleadas.

Los análisis químicos en medio MEYE sólido muestran una escasa producción de compuestos. Sólo tres compuestos se observan en su cromatograma P77, P78 y P139. Los dos últimos son picos compartidos con uno de los triplicados de *Phaeocalicium populneum* Pp01966, pero no se puede establecer un patrón de producción común. Por lo que esta relación tampoco tiene ningún soporte.

Por sus características morfológicas, *Mycocalicium sequoiae* podría pertenecer al género *Chaenothecopsis*. Si esto fuera así, el género *Mycocalicium* representado por las especies, *M. subtile*, *M. albonigrum* y *Mycocalicium sp.* sería monofilético para la mitad 5' del gen 28S ADNr. La secuencia del gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma (18S ADNr), analizada en el bloque 3 de esta tesis, muestra al género *Mycocalicium* como monofilético (*M. subtile*, *M. albonigrum*, *M. victoriae*), con la excepción de *M. sequoiae*, que se agrupa con especies del género *Chaenothecopsis* (*C. savonica* y *C. nana*) (Figura

3.7, bloque 3, pag. 157). Estas dos especies muestran una característica excepcional dentro de su género, la disposición periclinal de las hifas dentro del pedúnculo, característico del género *Mycocalicium*. Esta nueva coincidencia con las características morfológicas de *M. sequoiae* apoyan la hipótesis sobre la introducción de esta especie en el género *Chaenothecopsis*.

Género *Chaenothecopsis* Vainio

Chaenothecopsis es el género más problemático de los cuatro actualmente reconocidos en la familia *Mycocaliciaceae*. Las características morfológicas que permiten su discriminación respecto al resto de los géneros, (hifas de organización irregular en el pedúnculo, presencia de un fino canal que atraviesa el ápice del asco) no son caracteres definitivos. Se sospechaba que algunas especies de *Mycocalicium* podrían clasificarse junto con *Chaenothecopsis*, por esta razón se realizaron análisis filogenéticos en función de caracteres morfológicos, que permitieran la búsqueda de grupos monofiléticos en un conjunto de representantes de ambos géneros (Figura 2.1, pag. 90). En este análisis *Chaenothecopsis* aparece como un grupo monofilético respecto de *Mycocalicium*, con la excepción de la especie *Chaenothecopsis fennica* de características intermedias entre ambos géneros. En este análisis se observaba una tendencia al agrupamiento de especies con anamorfos parecidos (Tibell, 1995).

Nuestro análisis genético permite el establecimiento de relaciones entre algunas especies, y rechaza la hipótesis realizada en función de características morfológicas (Tibell, 1995) que presenta a *Chaenothecopsis* como un grupo monofilético.

La especie tipo del género es *Chaenothecopsis rubescens* Vainio, de la que se intentó sin éxito la amplificación del ADN ribosómico a partir de apotecios. En su lugar se empleó la especie cercana *Chaenothecopsis pusilla* (Flk) A. Schmidt.

Chaenothecopsis pusilla (Flk) A. Schmidt.- *Chaenothecopsis pusiola*- *Chaenothecopsis fennica*(Laurila) Tibell

Se observa una clara relación entre tres especies de *Chaenothecopsis*, *C. pusilla*, *C. pusiola* y *C. fennica*, especialmente entre las dos últimas. Esta relación es patente en todos los análisis filogenéticos realizados, cualquiera que sea el método empleado para la inferencia de las mismas. Otra característica genética que apoya esta relación, es la presencia de una

inserción en la posición 1046 respecto de la secuencia de *S. cerevisiae*, en la mitad 5' del gen 28S de estas tres especies. Ninguna de las restantes especies de *Chaenothecopsis*, *Mycocalicium*, *Phaeocalicium* o *Stenocybe* empleadas en nuestro análisis genético contienen una inserción en esa posición, lo cual apoya la hipótesis de un origen común para estas tres especies. Estas tres especies contienen hifas de organización irregular en el pedúnculo, frente a otras cuatro especies de *Chaenothecopsis* empleadas en nuestro análisis (*C. nana*, *C. savonica*, *C. haematopus*, *C. debilis*), cuyo pedúnculo contiene hifas de organización periclinal. La organización periclinal de las hifas del pedúnculo supone una excepción en el género *Chaenothecopsis*, puesto que la mayor parte de las especies que lo constituyen contienen hifas de disposición irregular. Los géneros *Mycocalicium*, *Phaeocalicium* y *Stenocybe* presentan un ordenamiento periclinal en las hifas del excípulo. Según el análisis morfológico realizado por Tibell (1995) (Figura 2.1, pag. 90), *C. fennica* aparece como la única especie de *Chaenothecopsis* no incluida en el grupo monofilético constituido por el resto de las especies del género, debido a sus características anatómicas intermedias entre *Chaenothecopsis*, *Mycocalicium* y *Phaeocalicium*.

C. fennica no produce anamorfos en las condiciones de cultivo empleadas, por lo que este dato no puede ser utilizado en la búsqueda de relaciones. Por otra parte, tanto *C. pusilla* como *C. pusiola* producen como anamorfo un hifomiceto de identidad desconocida parecido a *Phialophora*. Estas dos especies se agrupan en el análisis morfológico (Figura 2.1, pag. 90) junto con otras especies de *Chaenothecopsis* todas ellas productoras de anamorfos de tipo hifomiceto y cercanas al grupo que produce anamorfos de tipo *Phialophora*.

Genéticamente *C. fennica*, *C. pusiola* y *C. pusilla* forman un grupo monofilético. La relación más fuerte se establece entre *C. fennica* y *C. pusiola*, aunque morfológicamente comparten pocas características comunes. La relación entre *C. pusilla* y *C. pusiola*, sin embargo, se fundamenta en características morfológicas, ecológicas y de producción de anamorfos.

Chaenothecopsis savonica (Räs.) Tibell, *Chaenothecopsis nana* Tibell y *Chaenothecopsis savonica* (Räs.) Tibell

La topología del árbol generado por parsimonia permite establecer una relación entre *M. subtile*, *M. albonigrum*, *C. savonica*, *C. nana* y *C. debilis* (Figura 2.6, pag. 102). Morfológicamente se trata de especies muy similares. Las tres especies del género

Chaenothecopsis muestran una característica común con *Mycocalicium*, característica que supone una excepción dentro del género *Chaenothecopsis*. Se trata de la disposición periclinal de las hifas constituyentes del pedúnculo.

Todas ellas presentan rasgos comunes en cuanto a ecología y distribución con algunas excepciones. Se trata de especies de vida saprófita, que se desarrollan sobre madera en lugares expuestos. *C. savonica* es la excepción, puesto que vive como parásito de líquenes o de colonias de algas de vida libre (Tibell, 1987a, 1991a). Todas ellas aparecen ampliamente distribuidas en zona templadas a frías en ambos hemisferios (Tibell, 1994a). Las mayores coincidencias morfológicas se establecen entre *C. savonica* y *C. nana* con rangos de valores parecidos para el tamaño y forma de los ascos, tamaño de las esporas y excípulo pobremente desarrollado en la madurez (Tibell, 1987a). *C. nana* no produce anamorfos en cultivo por lo que esta característica no puede ser comparada con los dos tipos de anamorfos encontrados en *C. savonica*, *Asterophoma* y *Phialophora* (Tibell, 1991b, 1995).

C. debilis muestra una serie de caracteres morfológicos comunes con *M. subtile* y *M. albonigrum*. Los rangos de valores relativos a la altura de los apotecios, tamaño y forma de los ascos y esporas son parecidos, siendo los ascos y esporas de *C. debilis* algo más estrechos. Se diferencian en el número de células de las esporas, *C. debilis* presenta esporas con un septo, mientras que *M. subtile* y *M. albonigrum* tienen esporas unicelulares. Del mismo modo comparten la presencia de un excípulo en general bien desarrollado, que en *C. debilis* puede llegar a estar formado por 8 capas de células (Tibell, 1987a). Los anamorfos producidos en cultivo son en las tres especies de tipo celomiceto y muy parecidos entre sí (Tibell, 1995).

Se observa, tanto en los análisis genéticos (Figura 2.6, pag. 102) como químicos (Tabla 2.14, pag. 112), una relación entre las especies *C. savonica* y *C. debilis*. También encontramos relación genética (Figuras 2.6, pag. 102), y no química entre *C. savonica* y *C. nana*, especies con muchas coincidencias morfológicas (Tibell, 1987a). En cualquier caso, se observa una tendencia al establecimiento de relaciones entre estas tres especies, sin un orden claro de relación. Estos resultados son congruentes con sus similitudes morfológicas.

En resumen, la relación entre estas especies de los géneros *Mycocalicium* (*M. subtile*, *M. albonigrum*) y *Chaenothecopsis* (*C. debilis*, *C. nana* y *C. savonica*), sugiere que podrían pertenecer al mismo género, dando lugar a una reorganización en ellos. Sin embargo la relación se manifiesta en la topología de los árboles obtenidos por parsimonia y distancias

(Figuras 2.6, pag. 102) pero en ningún caso se obtienen índices de soporte que de forma inequívoca permita establecer un nivel taxonómico.

El análisis químico se ha mostrado insuficiente para la delimitación entre los géneros *Mycocalicium* y *Chaenothecopsis*, aunque también sugiere algunas tendencias de agrupamiento y parece útil en la discriminación de especies.

Sería necesario el uso de otras regiones del genoma de variabilidad intermedia entre el gen 28S ADNr y las regiones ITS. Estas últimas se mostraron demasiado variables para permitir alineamientos fiables entre géneros (Bloque 1). El gen 28S permite establecer algunas relaciones pero sin buenos índices de soporte. Un gen más conservado, como el 18S ADNr, tampoco permite esclarecer las relaciones entre estas especies conflictivas (Bloque 3), puesto que los resultados son muy parecidos a los obtenidos con el gen 28S (Figuras 3.7, 3.8, Bloque 3, pag. 157-158). Otras posibilidades podrían ser los genes ribosómicos mitocondriales que muestran una mayor variabilidad que los nucleares (O'Donnell et al, 1999), y otros genes como las β tubulinas (Groenewald et al, 2001), actina (Daniel et al, 2001), factor de elongación 1 (EF1)(Gams et al., 1998), etc... que se están empleando actualmente de forma conjunta con los genes ribosómicos para el establecimiento de relaciones filogenéticas en hongos.

Chaenothecopsis haematopus Tibell

Esta especie forma parte de la politomía obtenida en el análisis de la mitad 5' del gen 28S ADNr, en la que se encuentran todas las especies analizadas de la familia *Mycocaliciaceae* excepto *C. viridireagens* (Figura 2.5, pag. 101). Genéticamente no se asocia a ninguna otra especie. Del mismo modo, en los análisis químicos *C. haematopus* forma, en la mayoría de los casos, un grupo independiente (grupo 6 Tabla 2.16, pag. 119, grupo 2 Tabla 2.14, pag. 112), y produce un compuesto (P82) compartido con *P. populneum* Pp01966 tanto en medio líquido como en sólido (grupo 5 Tablas 2.14, 2.16, pag. 112 y 119). La ausencia de la secuencia de este espécimen de *Phaeocalicium populneum* impide apoyar esta relación en función de datos genéticos. Morfológicamente no existen similitudes entre estas dos especies que permitan explicar una posible relación entre ellas.

También se trata de una especie singular en cuanto a su producción de formas asexuales en cultivo. *Catenomyces rosea*, es su anamorfo, y hasta ahora, no se ha encontrado en ninguna otra especie de la familia (Tibell y Constantinescu, 1991).

Su singularidad se pone de manifiesto tanto en las aproximaciones genéticas, como químicas como en su producción de anamorfos, sin embargo sus características morfológicas y ecológicas entran dentro de los rasgos descritos para el género *Chaenothecopsis*.

La introducción de nuevas secuencias de un mayor número de especies de la familia *Mycocaliciaceae* en los análisis filogenéticos, permitirá próximamente el establecimiento de su posición dentro de la misma.

Chaenothecopsis viridireagens (Nádv.) A. Schmidt

En nuestro análisis genético la secuencia que se muestra más distante respecto al resto de las especies de la familia *Mycocaliciaceae*, es la de *C. viridireagens*. Las inferencias realizadas a partir de secuencias exclusivamente de representantes de la familia (Figura 2.6, pag. 102) establece el carácter monofilético del grupo formado por todos los representantes de la familia excepto *C. viridireagens*, con un soporte de 85-87%. Sus características morfológicas no hacen sospechar esta posición aislada y basal respecto del resto de las especies de la familia.

Son dos los anamorfos observados en cultivo, un hifomiceto de tipo *Phialophora* y un celomiceto del género *Asterophoma*, ambos idénticos a los producidos por la especie *Chaenothecopsis savonica* (Tibell, 1991b, 1992). En el análisis morfológico del género realizado por Tibell (Figura 2.1, pag. 90), *C. viridireagens* aparece en un grupo delimitado por el nodo I donde también se encuentra *C. savonica* (Tibell, 1995).

Sus mayores coincidencias se producen en su ecología, ambos, parásitos o parasimbiotes de *Chaenotheca* (*Coniocybaceae*, antiguo orden Caliciales)(Tibell, 1987a) y en su amplia distribución en áreas templadas o frías en ambos hemisferios (Tibell, 1994a).

Los resultados obtenidos en función de los análisis químicos muestran relaciones variables, según los compuestos hayan sido producidos en medio sólido o en medio líquido. Según los análisis realizados a partir de cultivos en medio sólido, *C. viridireagens* es la única especie del género *Chaenothecopsis* que muestra un patrón de compuestos compartido con algunas especies del género *Mycocalicium*, *Mycocalicium* sp. 02173, *M. albonigrum* y *M. victoriae*. Las relaciones de esta especie en función de los compuestos obtenidos en cultivo líquido son muy diferentes, en este caso, la especie se agrupa con otras dos especies de su mismo género, *C. debilis* y *C. savonica*. Esta agrupación se realiza en función del pico P70. En general *C. viridireagens* en medio líquido apenas produce compuestos, lo

mismo que sucede en las especies *C. debilis* y *C. savonica*. Su patrón de producción es más abundante en cultivo sólido.

No hay congruencia entre los datos genéticos, químicos y morfológicos en esta especie.

A pesar de su mayor cercanía a las especies del género *Mycocalicium*, en cuanto a su producción de compuestos en cultivo, sus características morfológicas lo emplazan en el género *Chaenothecopsis*.

Géneros *Phaeocalicium* A. Schmidt y *Stenocybe* (Nyl.) Koerb.

Phaeocalicium populneum (Brond. ex Duby) A. Schmidt - *Stenocybe pullatula* (Brond. ex Duby) A. Schmidt

El género *Stenocybe* fue descrito en 1855 y ha sido caracterizado por ser el género con el mayor tamaño de ascos y esporas en la familia *Mycocaliciaceae* y por la presencia de 3-7 septos en las esporas. Tal como se concibe actualmente al género *Stenocybe*, parece estar formado por varios grupos naturales (Tibell, 1996).

Phaeocalicium fue descrito en 1970 y presenta más coincidencias morfológicas con *Mycocalicium*, de quién se diferencia por su mayor tamaño de ascos y esporas y por la forma de las esporas, además de por su ecología. Las especies de *Stenocybe* y *Phaeocalicium* son en su mayoría específicas de un género de planta hospedadora. *S. pullatula* es específica de *Alnus* y *P. populneum* de *Populus* (Tibell, 1984). No se han descrito anamorfos en ninguna de las dos especies

Se ha descrito una especie de *Phaeocalicium* con características intermedias entre *Phaeocalicium* y *Stenocybe*. Se trata de *Phaeocalicium interruptum* (Tibell, 1991c). La especie de *Stenocybe* más cercana en cuanto a características morfológicas es *Stenocybe pullatula*.

P. populneum y *P. interruptum* presentan algunas características morfológicas comunes como el color oliváceo del pedúnculo y la disposición periclinal de sus hifas, esporas con un septo, su presencia sobre ramas caídas de *Populus tremula*. Pero también importantes diferencias en cuanto a los rangos de valores para el tamaño de apotecios, ascos y esporas, mucho mayores en *P. populneum* (Tibell, 1996).

Nuestro análisis genético muestra una relación monofilética, apoyada con un índice mínimo de soporte del 72%, entre las dos únicas especies incluidas de los géneros

Phaeocalicium y *Stenocybe*. El estudio preliminar basado en la búsqueda de polimorfismos en los patrones generados por digestión del fragmento 5' del gen 28S, no hacía sospechar esta relación, puesto que no se observa ningún patrón compartido entre ellos, con la excepción del producido por el enzima Taq I que es común en 7 de las 8 especies empleadas. Sin embargo este análisis muestra patrones comunes de estas dos especies con *Mycocalicium*.

El análisis químico basado en la producción de compuestos en medio sólido apoya esta relación. Los análisis de agrupamiento realizados a partir de distancias de Jaccard y "matching", muestran un grupo (grupo 6) formado por los replicados de las especies *Stenocybe pullatula* y *Phaeocalicium populneum* Pp19286 (Tabla 2.16, pag. 119).

Su patrón común está constituido por la producción de los compuestos P85 y P86.

La biología de ambos géneros es parecida, siendo ambos saprofitos o parásitos de plantas vasculares (Tibell, 1996). Ambas presentan una amplia distribución por el hemisferio norte (Tibell, 1994a).

Todos estos datos apuntan a que estas dos especies pertenecen al mismo género. Sin embargo, en este análisis se incluye otro espécimen de *P. populneum*, Pp01966, que en ninguno de los métodos de agrupamiento se asocia a Pp19286 ni a *S. pullatula*. En el análisis químico realizado a partir de cultivos en medio líquido, no pudimos disponer del espécimen de *Phaeocalicium populneum* Pp19286, pero sí de Pp01966. De nuevo no se observa ninguna relación entre los compuestos producidos por *S. pullatula* y Pp01966.

Se desconoce la razón sobre la diferencia de comportamiento en los dos especímenes de *P. populneum*. No se ha descrito en la literatura variabilidad dentro de esta especie que pueda explicar esta situación.

En principio los géneros *Phaeocalicium* y *Stenocybe*, especialmente este último, no presentaban grandes problemas taxonómicos. La similitud descrita en la literatura entre *Phaeocalicium interruptum* y *Stenocybe pullatula* (Tibell, 1996), así como la semejanza genética y química encontrada en función de la secuencia de la mitad 5' del gen 28S entre esta última y *P. populneum*, indican la posible pertenencia de *Stenocybe pullatula* al género *Phaeocalicium*. Estos géneros requieren una revisión en función de otros datos que complementen los obtenidos a partir de su morfología y ecología.

CONCLUSIONES

De los análisis realizados se obtienen las siguientes conclusiones:

- 1) El análisis filogenético de la secuencia de la mitad 5' del gen 28S del ADN ribosómico, muestra que el género *Mycocalicium*, tal como se circunscribe en la actualidad, no es monofilético.
- 2) Se sugiere la reevaluación de la especie *M. sequoiae* y su posible introducción en el género *Chaenothecopsis*, en función de sus características morfológicas y del análisis de la secuencia de la mitad 5' del gen 28S ADN ribosomal.
- 3) El análisis filogenético de la secuencia de la mitad 5' del gen 28S del ADN ribosómico, muestra que el género *Chaenothecopsis*, tal como se circunscribe en la actualidad, no es monofilético. Este fragmento de secuencia no permite, sin embargo, establecer relaciones entre especies con buenos soportes.
- 4) Las especies *Chaenothecopsis savonica*, *C. nana* y *C. debilis*, de discriminación complicada respecto a algunas especies del género *Mycocalicium*, muestran posiciones más cercanas a especies de *Mycocalicium* que a *Chaenothecopsis*, en los árboles filogenéticos realizados en función de la mitad 5' del gen 28S del ADN ribosómico.
- 5) Las especies *Chaenothecopsis pusilla*, *C. pusiola* y *C. fennica*, forman un grupo monofilético, según el análisis de las secuencias de la mitad 5' del gen 28S del ADN ribosómico. Este podría constituir un grupo central del género caracterizado por la disposición irregular de las hifas del pedúnculo.
- 6) *Chaenothecopsis viridireagens* y *C. haematopus* aparecen en posiciones aisladas respecto al resto de los representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, según la secuencia de la mitad 5' del gen 28S del ADN ribosómico. No hay congruencia entre los datos de naturaleza morfológica, genética y química, en *C. viridireagens*. Sin embargo, esta posición en *C. haematopus* es congruente con su situación según el análisis químico y con la producción de un anamorfo exclusivo de esta especie.

- 7) Los representantes seleccionados de los géneros *Stenocybe* y *Phaeocalicium* forman un grupo monofilético según la secuencia de la mitad 5' del gen 28S del ADN ribosómico. En el análisis químico muestran un patrón de producción común.

BLOQUE 3. Localización de la familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de Ascomycota.

1. Introducción.

1.1 La sistemática de Ascomycota

Los hongos ascomicetos son aquellos en cuyo proceso de reproducción sexual se producen ascosporas haploides, mediante meiosis de un núcleo diploide, en el interior de un asco. Los ascomicetos cuyos ascos se desarrollan en el interior de un cuerpo fructífero complejo (ascocarpo), se denominan euascomicetos. Si no producen ascocarpos sino ascos libres se denominan hemiascomicetos (Carlile, 1994).

En 1932 Nannfelt dividió los euascomicetos, según la naturaleza de sus ascocarpos y ascos, en cuatro grandes clases: pirenomicetos, discomicetos, plectomicetos y loculoascomicetos (Samuels y Seifert, 1995).

Los pirenomicetos se caracterizan por presentar ascos unitunicados y ascocarpos en forma de botella (peritecio), con un estrecho cuello apical. Los discomicetos tienen ascos unitunicados, que pueden ser operculados o inoperculados, expuestos sobre un ascocarpo en forma de copa (apotecio).

Estas dos clases comparten la característica de desarrollar sus ascos y paráfisis en una capa fértil denominada himenio, de ahí su denominación como himenoascomicetos.

Los plectomicetos presentan un ascocarpo cerrado (cleistotecio), que contiene en su interior ascos con disubordención irregular, con tendencia a ser globosos, sin mecanismo apical de descarga y prototunicados (estructura en la que el asco tiene una sola capa que se destruye antes de la maduración completa de las esporas y que carece de estructuras apicales diferenciadas). Los loculoascomicetos tienen ascos bitunicados que se desarrollan en un estroma o masa de hifas vegetativas. En su mecanismo de descarga, la membrana interna sobresale de la externa, proyectando las ascosporas al exterior. La morfología de sus ascocarpos es variable (Samuels y Seifert, 1995).

Esta clasificación supraordinal de los ascomicetos fue descartada al observar que la morfología de los ascocarpos podía ser un carácter convergente (Berbee y Taylor, 1992), sin validez taxonómica (Eriksson y Hawksworth, 1993). En el último Diccionario de los Hongos

(Hawksworth et al, 1995), la clasificación aceptada queda constituida por 46 órdenes. Dentro de estos 46 órdenes se incluyen los correspondientes a ascomicetos liquenizados. Durante mucho tiempo los líquenes fueron considerados entidades biológicas más relacionadas con las plantas que con cualquier otra forma de vida. Ya en 1869 Schewendener señaló, que los líquenes eran organismos resultantes de una asociación simbiótica parasítica entre un alga o una cianobacteria y un hongo (Ahmadjian, 1993).

El nombre científico del líquen y su clasificación procede exclusivamente del hongo que lo constituye (Hawksworth et al, 1988). A pesar de ello durante mucho tiempo fueron clasificados en un sistema a parte del resto de los hongos. Posteriormente, los líquenes fueron reconocidos como un grupo biológico y no sistemático, por lo que su clasificación fue completamente integrada dentro del sistema de clasificación de los hongos (Hawksworth et al, 1995). La hipótesis más aceptada acerca del origen de la simbiosis liquénica, señala el carácter polifilético de la asociación, establecida independientemente en distintos grupos de hongos (Gargas et al., 1995a, Barinaga, 1995). Sin embargo recientemente se ha planteado una nueva visión en la que se establece un origen antiguo para la asociación liquénica, seguida de múltiples pérdidas del estado simbiótico. Como consecuencia de esto, grandes grupos de ascomicetos no liquenizados procederían de ancestros liquenizados (Lutzoni et al. 2001)

El interés por obtener una clasificación supraordinal que estableciera relaciones filogenéticas entre los distintos órdenes de ascomicetos reconocidos, condujo a la utilización de datos genéticos basados en la secuencia de genes ribosómicos.

La secuencia de la subunidad pequeña del ribosoma (18S), ha permitido evaluar la validez de los caracteres morfológicos, empleados para la delimitación de cada una de las clases definidas por Nannfelt, mediante el examen de la naturaleza monofilética de cada una de ellas (Samuels y Seifert, 1995).

De las cuatro clases sólo los pirenomicetos han demostrado constituir un grupo monofilético, en función de caracteres moleculares (Berbee, 1996, Spatafora, 1995, Gargas y Taylor, 1995). Los discomicetos se han mostrado como un grupo parafilético, que contiene tres grupos monofiléticos: los discomicetos operculados (*Pezizales*), inoperculados (*Leotiales*), e inoperculados liquenizados (*Lecanorales*) (Gargas y Taylor, 1995). Los *Pezizales*, o discomicetos operculados, según los árboles filogenéticos basados en secuencias de genes ribosómicos, se localizan en una rama "hermana" del ancestro común del resto de los euascomicetos (Gargas y Taylor, 1995).

Los estudios morfológicos señalaban que los cuerpos fructíferos cerrados o cleistotecios, considerados característicos de la clase plectomicetos, podrían constituir un carácter convergente, es decir, haber derivado varias veces a partir de apotecios y peritecios. Los estudios moleculares presentan a los ascomicetos con cleistotecio como un grupo polifilético (Berbee y Taylor, 1992). El grupo central que define a este tipo de hongos queda constituido por los órdenes *Eurotiales* y *Onigenales*. Según datos moleculares, otros ascomicetos con cleistotecios incluidos en distintos órdenes, *Monascus* y *Ascosphaera*, forman un grupo con *Eurotiales* y *Onigenales* con alto índice de confianza (Berbee y Taylor, 1992).

Los loculoascomicetos aparecen como un grupo parafilético con dos grupos centrales formados por los órdenes *Pleosporales* y *Dothideales*. Un tercer grupo, los *Chaetothyriales*, con características morfológicas definidas en loculoascomicetos, se localizan junto a las secuencias de *Eurotiales* y *Onigenales* con un índice de confianza del 99%, basado en la secuencia del gen ribosómico 18S (Berbee, 1996).

La secuenciación de un número cada vez mayor de regiones del genoma y el desarrollo de nuevas técnicas informáticas de análisis, suponen un continuo aporte de datos que facilitan la búsqueda de grupos monofiléticos entre las especies de ascomicetos.

El grupo de micología de la universidad de Umea (Suecia) plantea una clasificación de los ascomicetos en órdenes y categorías superiores basándose en criterios tanto morfológicos como moleculares (Tabla 3.1). La última modificación realizada en esta clasificación (Eriksson, 2001), considera al phylum Ascomycota dividido en tres subphylum:

- Taphrinomycotina, que contiene a los ascomicetos más primitivos,
- Saccharomycotina (Hemiascomycotina), con las levaduras del orden Saccharomycetales
- Pezizomycotina (Euascomycotina).

El subphylum Pezizomycotina se organiza en once clases, Arthoniomycetes, Chaetothyriomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Laboulbeniomycetes, Lecanoromycetes, Leotiomycetes, Orbiliomycetes, Pezizomycetes, Sordariomycetes y Spathulosporomycetes (Figura 3.1).

Según la clasificación de Eriksson quedan aún ocho órdenes de posición incierta de dentro de Ascomycotina (Figura 3.1). De ellos, tres son órdenes con representantes liquenizados, *Trichoteliales*, *Pyrenulales* y *Ostropales*. De estos dos últimos se dispone de secuencia del 18S. Los órdenes *Coryneliales*, *Lahmiales*, *Medeolariales* y *Triblidiales* contienen hongos de vida libre. No se dispone de secuencia del gen ribosómico 18S de ninguno de ellos.

Phylum Ascomycota

1) Subphylum Taphrinomycotina

1.1 Clase Neolectomycetes

Orden Neolectales (1 fam)

1.2 Clase Schizosaccharomycetes

Orden Schizosaccharomycetales (1 fam)

1.3 Clase Pneumocystidomycetes

Orden Pneumocystidales (1 fam)

1.4 Clase Taphrinomycetes

Orden Taphrinales (2 fam)

2) Subphylum Saccharomycotina (Hemiascomycotina)

2.1 Clase Saccharomycetes

Orden Saccharomycetales (10 fam)

3) Subphylum Pezizomycotina (Euascomycotina)

3.1 Clase Arthoniomycetes

Orden Arthoniales (4 fam)

3.2 Clase Chaetothyriomycetes

Orden Chaetothyriales (2 fam)

Orden Verucariales (2 fam)

Clase Chaetothyriomycetes: 1 familia de posición incierta

3.3 Clase Dothideomycetes

Orden Capnodiales (4 fam)

Orden Dothideales (1 fam)

Orden Hysteriales (1 fam)

Orden Myriangales (2 fam)

Orden Pleosporales (5 fam)

Orden Patellariales (1 fam)

Clases Dothideomycetes y Chaetothyriomycetes: 52 familias de posición incierta

3.4 Clase Eurotiomycetes

Orden Eurotiales (3 fam)

Orden Onygenales (5 fam)

3.5 Clase Laboulbeniomycetes

Orden Laboulbeniales (4 fam)

Orden Pyxidiophorales (1 fam)

3.6 Clase Lecanoromycetes

Orden Agyriales (4 fam)

Orden Lecanorales

Suborden Acarosporineae (2 fam)

Suborden Lecanorineae (36 fam)

Suborden Peltigerineae (4 fam)

Suborden Teloschistineae (3 fam)

Orden Lecanorales : 4 familias de posición incierta

Orden Lichinales (4 fam)

Orden Gyalectales (1 fam)

Orden Pertusariales (2 fam)

Clase Lecanoromycetes. 2 familias de posición incierta

3.7 Clase Leotiomycetes

Orden Cyttariales (1 fam)

Orden Erysiphales (1 fam)

Orden Helotiales (13 fam)

Orden Rhytismatales (4 fam)

Orden Thelebolales (1 fam)

3.8. Clase Orbiliomycetes

Orden Orbiliales (1 fam)

3.9 Clase Pezizomycetes

Orden Pezizales (16 fam)

3.10 Clase Sordariomycetes

3.10.1 Subclase Hypocreomycetidae

Orden Halosphaeriales (1 fam)

Orden Hypocreales (5 fam)

Orden Microascales (2 fam)

3.10.2 Subclase Sordariomycetidae

Orden Boliniales (2 fam)

Orden Diaporthales (3 fam)

Orden Ophiostomatales (2 fam)

Orden Sordariales (11 fam)

Subclase sordariomycetidae: 1 familia de posición incierta

3.10.3 Subclase Xylariomycetidae

Orden Xylariales (6 fam)

Clase sordariomycetes: 5 ordenes de posición incierta:

Calosphaeriales (1 fam)

Lulworthiales (1 fam)

Meliolales (1 fam)

Phyllacorales (2 fam)

Thricosphaeriales (1 fam)

Clase sordariomycetes: 4 familias de posición incierta

3.11 Clase Spathulosporomycetes

Orden Spathulosporales (2 fam)

Ordenes de posición incierta en el phylum Ascomycota.

Coryneliales (1 fam)

Lahmiales (1 fam)

Medeolariales (1 fam)

Mycocaliciales (2 fam)

Ostropales (7 fam)

Pyrenulales (5 fam)

Triblidiales (1 fam)

Trichotheliales (1 fam)

Familias de posición incierta en el phylum Ascomycota: 27, entre ellas,

Calycidiaceae, Coniocybaceae,

Microcaliciaceae

Figura 3.1. Clasificación actualizada de órdenes y taxones superiores en el phylum Ascomycota, realizada a partir de datos morfológicos y genéticos (Eriksson, 2001).

La secuencia del gen 18S está muy conservada y son pocas las posiciones que permiten definir las clases. Aparecen algunas posiciones con mutaciones comunes entre las distintas clases descritas que permiten establecer relaciones entre ellas (Figura 3.2).

Se mantienen aún un buen número de familias de posición incierta, en muchos casos por falta de secuencias. Se reconocen cincuenta y dos familias cuya localización está por definir entre las clases Dothideomycetes y Chaetothyriomycetes. Otras veintisiete familias quedan sin clasificar dentro del phylum Ascomycota. Entre estas últimas se encuentran las familias *Coniocybaceae*, *Calycidiaceae* y *Microcaliciaceae*, anteriormente pertenecientes al desmembrado orden Caliciales s.l.. De estas tres últimas no había secuencias publicadas del gen 18S.

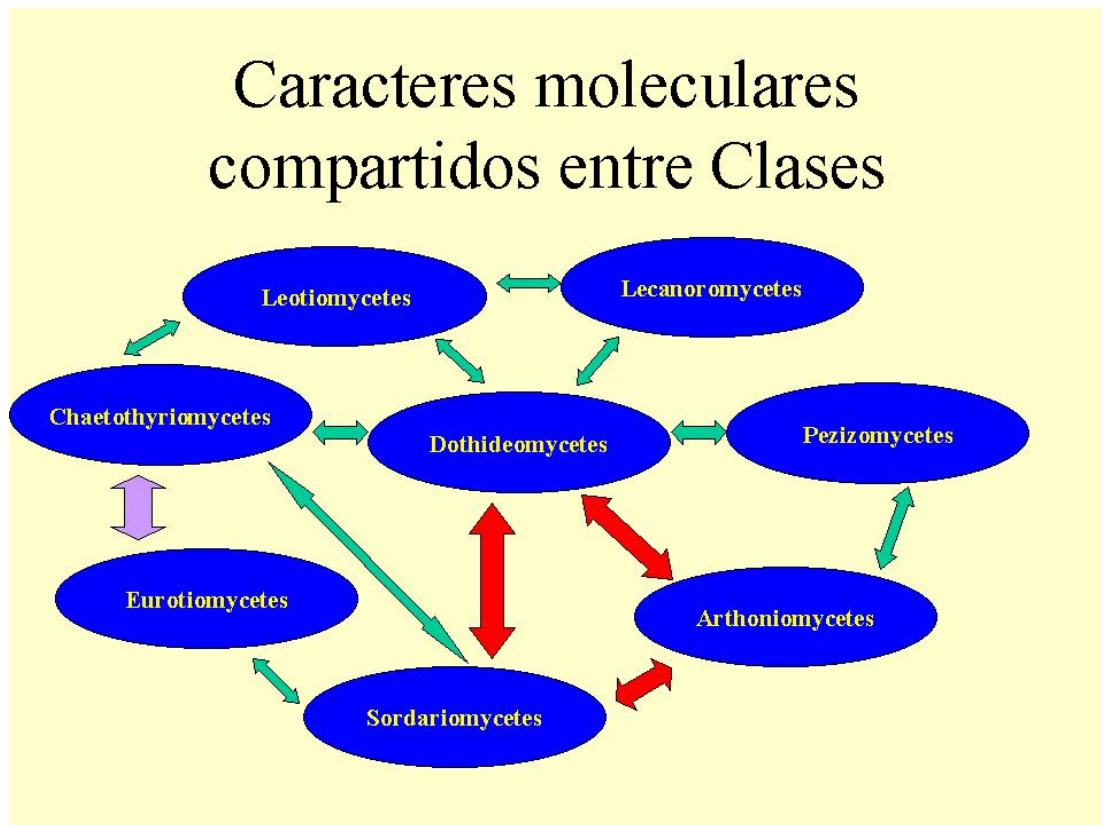


Figura 3.2 Representación de las relaciones establecidas entre las clases de Ascomycota en función de sus caracteres moleculares (mutaciones comunes en la secuencia del gen 18S ADNr). Flecha morada: tres mutaciones comunes. Flechas rojas: dos mutaciones comunes. Flechas verdes: una mutacion en común. (Eriksson, 1999).

1.2 La familia *Mycocaliciaceae* A. Schmidt

La familia *Mycocaliciaceae* A. Schmidt tras ser constituida como tal en 1970, fue definida como un grupo monofilético y quedó acomodada en el orden Caliciales, debido a su semejanza morfológica y ecológica con alguna de las familias que constituían este orden. Sin embargo, desde el siglo XVIII, con las primeras identificaciones de especies posteriormente incluidas en esta familia, ya se exponía la duda acerca de la introducción de estas especies en el orden Caliciales, debido a la presencia de características claramente discrepantes, como la dispersión activa de esporas, ausencia de mazedio y forma de vida saprófita o liquenícola. Por esta razón, *Mycocaliciaceae* se mantuvo en el orden Caliciales de manera provisional (Tibell, 1984), a la espera de nuevos datos que permitieran su localización en la sistemática de ascomicetos.

Durante mucho tiempo el orden Caliciales fue considerado un modelo de grupo monofilético dentro de los ascomicetos, siendo las características principales del grupo, la presencia de mazedio, la dispersión pasiva de esporas y la naturaleza prototunicada del asco (Poelt, 1973)

En 1984 Tibell revisó la taxonomía de Caliciales y describió tres nuevas familias, *Microcaliciaceae*, *Sclerophoraceae* y *Calycidiaceae*, que se sumaban a las ya descritas *Mycocaliciaceae*, *Sphinctrinaceae*, *Caliciaceae*, *Sphaerophoraceae* y *Coniocybaceae*.

En un análisis cladístico (Figura 3.3) realizado a partir de caracteres morfológicos, Tibell propuso el desmembramiento del orden, manteniendo un grupo monofilético formado por las familias *Mycocaliciaceae*, *Sphinctrinaceae* y *Caliciaceae*, considerando al resto de las familias como un agrupamiento extremadamente heterogéneo y por lo tanto polifilético (Tibell, 1984).

Los caracteres por los que se agrupan estas tres familias respecto al resto, son la presencia de hifas oscuras y esclerotizadas en el ascoma, la presencia de pedúnculo y la producción de esporas fuertemente pigmentadas. En este análisis *Caliciaceae* y *Sphinctrinaceae* son monofiléticas y comparten una característica, la presencia de mazedio y por tanto la dispersión pasiva de esporas, a pesar de que el mazedio presente en *Sphinctrinaceae* está poco desarrollado y constituido por un pequeño número de esporas. *Mycocaliciaceae*, sin embargo, carece de mazedio y presenta dispersión activa de esporas.

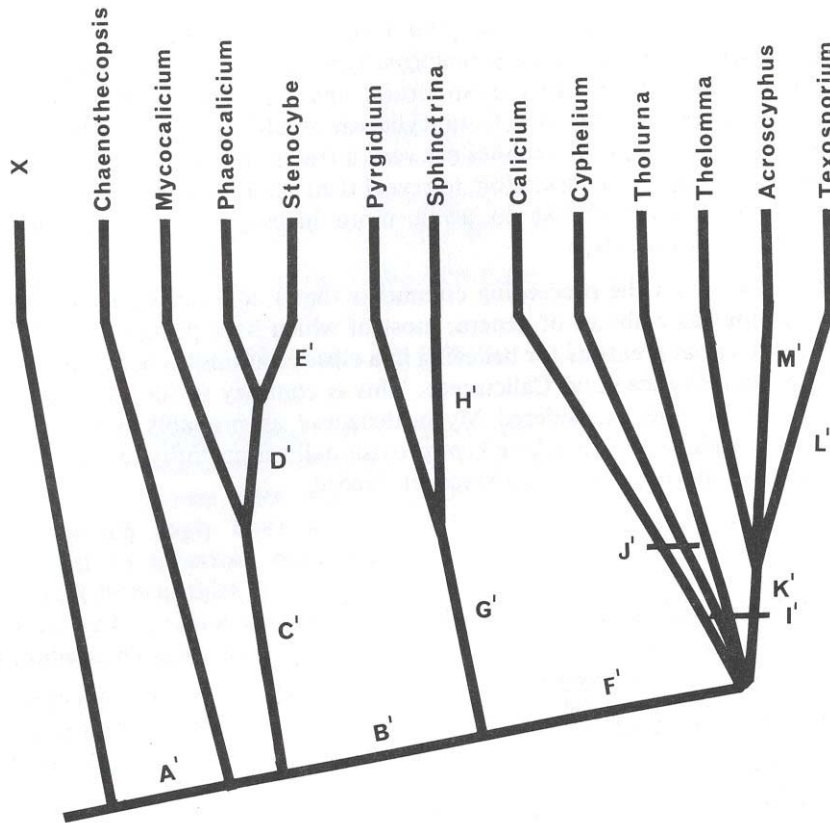


Figura 3.3. Cladograma basado en caracteres morfológicos y químicos de los géneros de *Caliciaceae*, *Sphinctrinaceae* y *Mycocaliciaceae*. Las letras localizadas en las ramas indican los siguientes caracteres compartidos: A' Ascocarpos con estipe, B' Dispersión pasiva de esporas, con macedio, C' Apice del asco no atravesado por un canal, D' Esporas con septos transversales, E' Esporas con 3-7 septos, F' Hongos liquenizados, G' Ornamentación de las esporas originada por irregularidades intraplasmalema, H' Esporas con capa gelatinosa en estadios semimaduros, I' Ascocarpos sin estipe, J' Presencia de ácidos vulpínico y rizocárpico, K' ascocarpos inmersos, L' Ascosporas englobadas por un tejido procedente de las paráfisis, M' Talo dactiliforme. El cladograma está realizado empleando el criterio de parsimonia es decir, el ordenamiento de las ramas es aquel que requiere un menor número de cambios para que se produzca.

Mycocaliciaceae y *Sphinctrinaceae* presentan la característica común de ausencia de liquenización. Exceptuando a la familia *Microcaliciaceae*, el resto de las familias que componían el orden Caliciales s.l. están liquenizadas (Tabla 3.1).

El talo presente en estas familias es de tipo variable (Tabla 3.1). *Calycidiaceae* presenta un talo foliáceo y *Sphaerophoraceae* fruticuloso, el resto tienen talo crustáceo (Tibell, 1984).

La forma de los ascos es cilíndrica en la mayoría de las familias, con excepciones claviformes (*Calycidiaceae*) y elipsoidales (*Microcaliciaceae*). La formación del asco procede de una hifa ascógena con crozier, aunque *Microcaliciaceae* y algunas especies de *Coniocybaceae* producen sus ascos a partir de cadenas de hifas ascógenas sin crozier. Las ascosporas pueden

ser esféricas o elipsoidales con un número variable de septos (Tabla 3.1). La ornamentación de las esporas es variable, al igual que su proceso de formación, debido a la ruptura de su pared, o bien a otras causas (Tabla 3.1).

Para estudiar la hipótesis formulada por Tibell, sobre la naturaleza polifilética del orden y el mantenimiento de un grupo monofilético, constituido por las familias *Mycocaliciaceae-Sphinctrinaceae-Caliciaceae*, se buscaron nuevos conjuntos de datos que permitieran clarificar las relaciones entre estas familias. Se estudió la formación de estructuras de reproducción asexual y la producción de metabolitos secundarios.

En las familias *Calycidiaceae*, *Sclerophoraceae* y *Sphinctrinaceae*, no se ha observado la producción de formas asexuales de reproducción. *Sphaerophoraceae* y *Caliciaceae* producen anamorfos de tipo celomiceto, con picnidios de tipo *Umbilicaria* y conidioforos correspondientes al tipo VI descrito por Vobis (Vobis, 1980). Este mismo tipo de anamorfos es muy abundante en *Lecanorales* y sólo en ellos (Wedin y Tibell, 1997). En *Mycocaliciaceae* y *Coniocybaceae* se observan anamorfos de tipo hifomiceto y celomiceto con picnidios de tipo *Lecanactis* y conidioforos correspondientes al tipo I o II descrito por Vobis (Tibell, 1991b, 1992, 1993, 1995).

Sphaerophoraceae y *Caliciaceae* coinciden, al igual que en sus anamorfos, en el tipo de metabolitos secundarios que producen, que de nuevo son sustancias comunes con las encontradas en *Lecanorales* (Wedin y Tibell 1997).

Algunas especies de *Coniocybaceae* y *Mycocaliciaceae* producen ácido vulpínico (Tibell, 1984). El resto de las familias producen sustancias aún no identificadas.

Los resultados obtenidos en función de datos de producción de anamorfos y metabolitos secundarios, mostraban relaciones entre las familias *Caliciaceae* y *Sphaerophoraceae*, no apoyadas por características morfológicas.

En 1995 se publicó un trabajo sobre filogenia de discomicetos, donde se incluía, por primera vez, la secuencia del gen 18S de un representante de la familia *Mycocaliciaceae*. En este trabajo, la secuencia de este gen de *Mycocalicium albonigrum*, fue comparada con secuencias homólogas en otros ascomicetos productores de apotecios, incluyendo representantes de otras familias del orden Caliciales, *Calicium tricolor* (*Caliciaceae*) y *Sphaerophorus globosus* (*Sphaerophoraceae*) (Gargas et al., 1995). Si el orden Caliciales fuera monofilético, estas familias deberían localizarse en un mismo grupo. Sin embargo ninguna de estas familias se mostró como monofilética con respecto a las demás.

	Caliciaceae	Calycidiaceae	Coniocybaceae	Microcaliciaceae	Mycocaliciaceae	Sphaerophoraceae	Sphinctrinaceae
Géneros*	<i>Acroscyphus</i> <i>Calicium</i> <i>Cyphelium</i> <i>Texosporium</i> <i>Thelomma</i> <i>Tholurna</i>	<i>Calycidium</i>	<i>Chaenotheca</i> <i>Sclerophora</i>	<i>Microcalicium</i>	<i>Mycocalicium</i> <i>Chaenothecopsis</i> <i>Phaeocalicium</i> <i>Stenocybe</i>	<i>Bunodophoron</i> <i>Leifidium</i> <i>Sphaerophorus</i>	<i>Pyrgidium</i> <i>Sphinctrina</i>
Liquenizado	Si	Si	Si	No	No	Si	No
Fotobionte	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia</i>	<i>Dictyochloropsis</i> , <i>Stichococcus</i> , <i>Trebouxia</i> <i>Trentepohlia</i>			<i>Trebouxia</i>	
Tipo de talo	Crustaceo o dactiliforme	Foliaceo	Crustaceo	Crustaceo	Crustaceo	Fruticuloso	Crustaceo
Tipo ascocarpo	Sésil o pedunculado	Sésil	Pedunculado	Sésil o pedunculado	Sésil o pedunculado	Sésil	Sésil o pedunculado
Mazedio presente	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si
Color mazedio	Negro	Marrón	Marrón	Aeruginoso		Negro	Negro
Forma asco	Cilíndrica o claviforme	Claviforme	Cilíndrica a elipsoidal	Elipsoidal	Cilíndrica	Cilíndrica	Cilíndrica
Origen asco	Hifa ascógena simple con crozier	Hifa ascógena simple	Hifa ascógena simple o en cadenas con o sin croziers	Cadenas de hifas ascógenas sin crozier	Hifa ascógena simple con crozier	Hifa ascógena simple con crozier	Hifa ascógena simple con crozier
Forma ascospora	Elipsoidal raro esférica	Esférica	Esféricas raro elipsoidales	Elipsoidales a cilíndricas	Elipsoidales	Esférica	Elipsoidales a esféricas
Nº septos espora	No septada a submuriforme	No septada	0-5 septos	1-7 septos	0-7 septos	No septada	0-1 septos
Color pared espora	Marrón oscura	Marrón	Marrón claro	Aeruginosa	Marrón oscura/clara	Hialina	Marrón oscura
Ornamento pared espora	Si	Lisa o rupturas irregulares	Lisa o rupturas irregulares	Si. Canales en espiral	Lisa o ligera ornamentación	Si	Si
Origen ornamento	Ruptura de la pared	Ruptura de la pared	Ruptura de la pared. Excepto <i>Sclerophora</i>	Ruptura de la pared	No debido a ruptura de la pared	Epiplasma del asco o restos de mazedio	Procede del plasmalema
Anamorfo	Celomicetos. Picnidios tipo <i>Umbilicaria</i> y conidioforos tipo VI	No se han visto	Celomicetos de pared simple. Hifomicetos con conidioforos tipo I	Celomicetos	Celomicetos de pared simple. Hifomicetos con conidioforos tipo I	Celomicetos. Picnidios tipo umbilicaria y conidioforos tipo VI	No se han visto
Metabolitos secundarios	Depsidos y depsidonas de orcinol y B orcinol, xanthonas, anthraquinonas, terpenos, y derivados de ac. vulpínico	Una sustancia no identificada	Depsidos, depsidonas y ac. vulpínico	Pigmento aeruginoso no identificado	Ac. vulpínico	Depsidos y depsidonas de B orcinol, Sphaerophorina y anthraquinonas	No se conocen
DisSubordención	Regiones frías- templadas, ambos hemisferios	Nueva Zelanda	Ambos hemisferios	Regiones frías a templadas, ambos hemisferios	Regiones frías- templadas, ambos hemisferios	Regiones frías a subtropicales, ambos hemisferios	Regiones frías a subtropicales, ambos hemisferios

Tabla 3.1. Características generales morfológicas, anatómicas y químicas y disSubordención de las familias constituyentes del orden Caliciales según Tibell 1984 (Tibell, 1984, Tibell, 1987a, Tibell, 1993, Wedin y Tibell 1997, Wedin et al, 1998). *Géneros aceptados en la revisión de Eriksson (2001).

En este trabajo se sugirió la introducción de la familia *Sphaerophoraceae* en el orden *Lecanorales*, localización que fue posteriormente confirmada en un estudio más completo realizado con varios representantes de las familias constituyentes del orden *Lecanorales* y representantes de la familia *Sphaerophoraceae* (Wedin et al., 1998). *Mycocalicium albonigrum* aparecía en una posición intermedia, entre representantes del orden *Lecanorales* y los órdenes *Eurotiales/Onigenales*. Su localización carecía de un índice de soporte superior al 50%, por lo que no pudo ser considerada sin reticencias. El emplazamiento más “parsimonioso” de *Calicium tricolor* se produjo en las cercanías de representantes del orden *Leotiales*. Estos resultados (Gargas et al, 1995) no apoyaban la hipótesis de Tibell (Tibell, 1984) acerca de la existencia de un grupo monofilético formado por las familias *Caliciaceae*, *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae*.

Posteriormente un nuevo estudio filogenético, basado en la secuencia del gen 18S, para esclarecer las relaciones de las familias *Mycocaliciaceae*, *Caliciaceae* y *Sphinctrinaceae* (Wedin y Tibell, 1997), muestra la formación de un grupo monofilético constituido por las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae*. Este grupo comparte un antecesor común con representantes de los órdenes *Eurotiales* y *Onygenales* aunque, de nuevo, con un soporte muy bajo. Los representantes de la familia *Caliciaceae* aparecen como un grupo monofilético bien soportado dentro del orden *Lecanorales*.

Como se señaló anteriormente, los productos del metabolismo secundario y los anamorfos obtenidos en los cultivos de representantes de la familia *Caliciaceae*, son habituales en *Lecanorales*. Por tanto, distintos conjuntos de datos, químicos, morfológicos y moleculares, apoyan la introducción de la familia *Caliciaceae* en el orden *Lecanorales*. Por otra parte, la escasez de compuestos del metabolismo secundario en apotecios de *Mycocaliciaceae-Sphinctrinaceae* y la variabilidad de los tipos de anamorfos obtenidos en los cultivos de *Mycocaliciaceae* (ninguno en *Sphinctrinaceae*), sin similitudes con los que ocurren en *Eurotiales* y *Onygenales*, hacen de ésta, una relación incierta y poco definida.

Recientemente, ha sido descrito el orden *Mycocaliciales* (Tibell y Wedin, 2000), constituido por las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae*. Para ello, se han tomado como base los resultados genéticos, basados en la secuencia del gen 18S (Wedin y Tibell, 1997), apoyados por semejanzas morfológicas (ascos pedunculados, hifas del excípulo esclerotizadas y de color oscuro, ascos cilíndricas formadas a partir de hifas ascógenas con crozier, esporas fuertemente pigmentadas) y en su biología (hongos no liquenizados que aparecen como parásitos de líquenes o bien como saprófitos).

En la última actualización de la taxonomía de Ascomycetos realizada por Eriksson (Eriksson 2001), en función de las secuencias de ADNr correspondientes a la subunidad pequeña del ribosoma (18S) y de caracteres morfológicos, las familias *Caliciaceae*, y *Sphaerophoraceae* se mantienen en el orden *Lecanorales*. Las familias *Coniocybaceae*, *Microcaliciaceae* y *Calycidiaceae*, se mantienen sin localizar, como familias de posición incierta en la taxonomía de Ascomycota. La familia *Sclerophoraceae* desaparece por fusión con *Coniocybaceae*. *Mycocaliciales* se mantiene como orden de posición incierta en la sistemática de Ascomycota.

2. Objetivos.

El objetivo de este capítulo consiste en profundizar en el estudio de la localización de la familia *Mycocaliciaceae*, respecto al resto de los hongos ascomycetos, analizando especialmente las relaciones con las familias del antiguo orden Caliciales s.l.. Para ello se analizará la secuencia del gen 18S ADNr de especies representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, en comparación con secuencias homólogas de otros ascomycetos

Se aportarán las secuencias de una región no explorada del material genético en las familias *Mycocaliciaceae*, *Caliciaceae*, *Sphaerophoraceae* y *Coniocybaceae*. Esta región es la mitad 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma (28S ADNr).

2.1 La familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de Ascomycota.

2.1.1 Estudio del gen 18S ADNr.

2.1.1.1 Secuenciación del gen 18S ADNr de un conjunto de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, alineamiento con secuencias homólogas de otros ascomycetos y análisis de los alineamientos.

2.1.1.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

2.1.2 Estudio del gen 28S ADNr.

2.1.2.1 Secuenciación la región 5' terminal del gen 28S ADNr de un conjunto de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, alineamiento con secuencias homólogas de otros ascomycetos y análisis de los alineamientos

2.1.2.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

2.2 La familia *Mycocaliciaceae* y su relación con las familias del antiguo orden Caliciales.

2.2.1 Estudio del gen 28S ADNr.

2.2.1.1 Secuenciación la región 5' terminal del gen 28S ADNr de un conjunto de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, *Coniocybaceae*, *Caliciaceae*, y *Sphaerophoraceae*, alineamiento y análisis de los alineamientos

2.2.1.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones

3. Resultados.

3.1 La familia *Mycocaliciaceae* en la sistemática de *Ascomycota*.

3.1.1 Estudio del gen 18S ADNr.

3.1.1.1 Secuenciación del gen 18S ADNr de un conjunto de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, alineamiento con secuencias homólogas de otros ascomicetos y análisis de los alineamientos.

En la realización de este análisis se han empleado un total de 38 especies, nueve de las cuales pertenecen a la familia *Mycocaliciaceae* (Tabla 3.2). El resto de las secuencias corresponden a representantes de las distintas clases del Subphylum Euascomycotina según Eriksson (2001), excepto la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae*, perteneciente al subphylum Hemiascomycotina, que fue utilizada como "outgroup".

En la base de datos Genebank se encuentran secuencias de especies pertenecientes a las siguientes clases: Pezizomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Chaetothyriomycetes, Lecanoromycetes, Leotiomycetes y Sordariomycetes. En el banco de datos hay secuencias del gen 18S ADNr de especies de la clase Arthoniomycetes, pero son secuencias parciales, cuya longitud no es comparable con la del resto de las secuencias. La introducción de especies de esta clase obligaría al análisis de un fragmento muy corto de la secuencia (800 pb aproximadamente). Este hecho unido a la naturaleza altamente conservada de este gen supondría una pérdida de información importante para el análisis filogenético

Desarrollo de trabajo: Bloque3: La familia Mycocaliciaceae

<i>Taxonomía</i>	<i>Código/NºGenebank</i>	<i>Colección</i>
<i>Mycocalicium subtile</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Ms02504	UPSC 2504
<i>Mycocalicium albonigrum</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Ma19038	Tibell 19038
<i>Mycocalicium victoriae</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Mvic00021	Boom 21
<i>Mycocalicium sequoiae</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Mseq92055	Rikinen 92055
<i>Chaenothecopsis debilis</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Cd02080	UPSC 2080
<i>Chaenothecopsis nana</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Cn02083	UPSC 2083
<i>Phaeocalicium populneum</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Pp19286	Tibell 19286
<i>Stenocybe pullatula</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	Sp02448	UPSC 2448
<i>Chaenothecopsis savonica</i> (Mycocaliciaceae, Mycocaliciales)	U86691	
<i>Calicium adpersum</i> (Caliciaceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	U86694	
<i>Cyphelium inquinans</i> (Caliciaceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	U86695	
<i>Texosporium sancti-jacobi</i> (Caliciaceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	U86696	
<i>Thelomma mammosum</i> (Caliciaceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	U86697	
<i>Sphinctrina turbinata</i> (Sphinctrinaceae, Mycocaliciales)	U86693	
<i>Bunodophoron scrobiculatum</i> (Sphaerophoraceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	U70958	
<i>Leifidium tenerum</i> (Sphaerophoraceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	U70959	
<i>Glaziella aurantiaca</i> (Glaziellaceae, Pezizales, Pezizomycetes)	Z49753	
<i>Inermisia aggregata</i> (Otideaceae, Pezizales, Pezizomycetes)	Z30241	
<i>Orbilina auricolor</i> (Orbiliaceae, Orbiliales, Orbiliomycetes)	U72598	
<i>Monacrosporium psychrophilum</i> (Orbiliaceae, Orbiliales, Orbiliomycetes)	AJ001998	
<i>Lecanora dispersa</i> (Lecanoraceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	L37535	
<i>Peltigera neopolydactyla</i> (Peltigeraceae, Lecanorales, Lecanoromycetes)	X89218	
<i>Eurotium rubrum</i> (Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes)	U00970	
<i>Monascus purpureus</i> (Monascaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes)	M832060	
<i>Malbranchea gypsea</i> (Onygenaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes)	L28066	
<i>Coniosporium apollinis</i> (Chaetothyriales, Chaetothyriomycetes)	Y11713	
<i>Capronia mansonii</i> (Herpothrichiellaceae, Chaetothyriales, Chaetothyriomycetes)	X79318	
<i>Ascosphaera apis</i> (Ascosphaeraceae, Onygenales, Eurotiomycetes)	M83264	
<i>Cudonia confusa</i> (Geoglossaceae, Leotiales, Leotiomycetes)	Z30240	
<i>Rhytisma salicinum</i> (Rhytismataceae, Rhytismatales, Leotiomycetes)	U53370	
<i>Blumeria graminis</i> (Erysiphaceae, Erysiphales, Leotiomycetes)	X79318	
<i>Pleospora herbarum</i> (Pleosporaceae, Dothideales, Dothideomycetes)	U05201	
<i>Leptosphaeria bicolor</i> (Leptosphaeriaceae, Dothideales, Dothideomycetes)	U04202	
<i>Neurospora crassa</i> (Sordariaceae, Sordariales, Sordariomycetes)	X04971	
<i>Hypomyces chrysospermus</i> (Hypocreaceae, Hypocreales, Sordariomycetes)	M89993	
<i>Ophiostoma stenoceras</i> (Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetes)	M85054	
<i>Xylaria carpophyla</i> (Xylariaceae, Xylariales, Sordariomycetes)	Z49785	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Saccharomycetaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetes)	J01353	

Tabla 3.2. Relación de especies empleadas en el análisis filogenético, a partir de la secuencia del gen 18S ADNr. En el apartado de taxonomía se indica la especie, la familia a la que pertenece, el orden y la clase en aquellos casos en los que el orden ha sido asignado a alguna clase según Eriksson (2001). La secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada como “outgroup”. UPSC, colección de cultivos de hongos de la universidad de Uppsala.

El gen 18S ADNr de las especies representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, fue amplificado por PCR a partir del ADN extraído de cultivos vivos en todos los casos. La amplificación se realizó entre los oligonucleótidos cebadores NS17UCB y NS24UCB descritos en Materiales y Métodos. Los productos de PCR fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %.

Los productos de PCR limpios fueron secuenciados automáticamente como se describe en Materiales y Métodos, empleando los oligonucleótidos externos NS17UCB y NS24UCB y los oligonucleótidos internos NS18UCB, NS19UCB, NS20UCB, NS21UCB, NS22UCB, NS23UCB. En algunos casos, en los que la secuencia presenta inserciones se empleó un conjunto distinto de oligonucleótidos, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6, NS7.

Código	Oligonucleótidos empleados	Longitud total	Longitud corregida	Nº de inserciones	Código, longitud y posición de las inserciones respecto a <i>S. cerevisiae</i>
Ms02504	NS17,18,19,20,21 22,23,24UCB. NS7.	2017 pb	1643 pb	1	A) 374 pb, comienza en 1166
Ma19038	NS17,18,19,20,21 22,23,24UCB. NS5,NS8.	2417 pb	1647 pb	2	B) 397 pb, comienza en 565 . C) 373 pb, comienza en 1428
Mv00021	NS17,18,19,20, 21,22,23,24UCB. NS5, NS8.	2769 pb	1646 pb	3	B) 400 pb, comienza en 565 A) 327 pb, comienza en 1166 C) 396 pb, comienza en 1428
Mseq92055	NS17,18,19,20, 21,22,23UCB.	1643 pb	1643 pb	0	
Cd02080	NS17,18,19,20, 21,22,23UCB. NS4, NS5.	2364 pb	1642 pb	2	D) 283 pb, comienza en 999 C) 439 pb, comienza en 1428
Cn02083	NS17,18,19,20, 21,22,23UCB. NS4	1650 pb	1650 pb	0	
Pp19286	NS17,18,20,22, 23,24UCB. NS4, NS5.	1643 pb	1643 pb	0	
Sp02448	NS17,18,19,20, 21,22,23,24UCB.	2412 pb	1645 pb	2	A) 365 pb, comienza en 1166 C) 402 pb, comienza en 1428

Tabla 3.3. Sumario de los tamaños en pares de bases (pb) de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del gen 18S ADNr. Se indica el tamaño de las secuencias que se emplearán en el alineamiento después de haber sido eliminadas las inserciones. Se especifica la posición en la que se localiza el inicio de las inserciones en relación a la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de Genebank : J01353). Las especies se identifican a partir de sus códigos (ver Tabla 3.2).

El alineamiento recoge las secuencias de las 38 especies entre las posiciones 60-1700 del gen 18S de *Saccharomyces cerevisiae* J01353.

El tamaño de las secuencias a alinear, una vez eliminadas las inserciones, se encuentra en el rango de 1629-1650 pares de bases (Tabla 3.3).

Se pueden distinguir cuatro tipos de insertos según su punto de inserción y su longitud (Tabla 3.3).

Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W, revisadas visualmente y arregladas con ayuda del editor GENEDOC, empleando la información procedente de la estructura secundaria de la molécula transcrita, empleando como modelo la estructura del gen 18S de *Saccharomyces cerevisiae* J01353 (Neefs et al, 1993).

Tres regiones de alineamiento ambiguo fueron eliminadas (Figura 3.4).

El alineamiento corregido una vez eliminadas las regiones de alineamiento ambiguo y eliminadas las inserciones se muestra en la Figura 3.5 (Anexo 3, pag. 230-244).

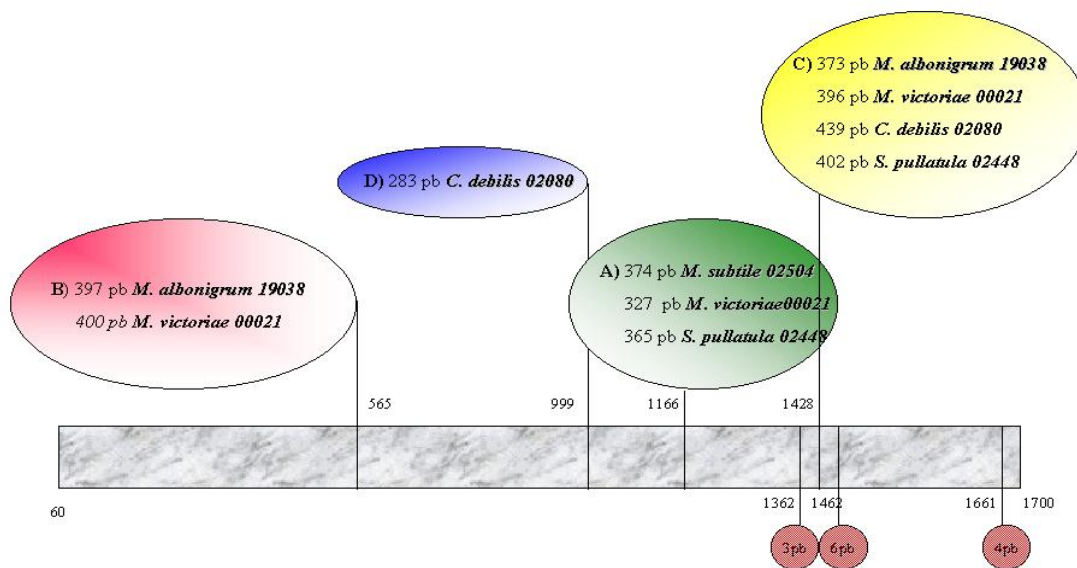


Figura 3.4 Esquema representativo del alineamiento de secuencias del gen que codifica para el ARN constituyente de la subunidad pequeña del ribosoma, de un conjunto de especies de la familia *Mycocaliciaceae* (Tabla 3.3). Las posiciones vienen expresadas en función de la secuencia del gen homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* (Nº acceso Genebank J01353). Los círculos en rojo indican zonas eliminadas por alineamiento ambiguo. Las elipses señalan las posiciones en las que se encontraron inserciones, y el tamaño de las mismas en cada especie.

De las 1671 posiciones incluidas en el alineamiento (Tabla 3.4), un 36 % son variables (Tabla 3.5). Del total de las posiciones variables el 48.6% son sitios significativos para los análisis de filogenéticos basados en el criterio de parsimonia (Tabla 3.6).

El conjunto de las posiciones alineadas se divide en grupos, que representan posiciones que forman parte de "stems", de "loops" y una tercera división que corresponde a una región de estructura secundaria no resuelta.

El porcentaje de posiciones variables en posiciones que forman parte de "stems" es ligeramente superior al encontrado en "loops", (40.2% frente a 36.7%) (Tabla 3.5).

ESTRUCTURA SECUNDARIA						
Sitios totales	Sitios en "stem"		Sitios en "loop"		Sitios no resueltos	
Número	Número	posiciones totales %	Número	posiciones totales %	Número	posiciones totales %
1671	806	48.2	737	44.1	128	7.7

Tabla 3.4. Análisis de las posiciones alineadas totales y en los subgrupos que forman "stems", "loops" y posiciones de estructura secundaria no resuelta del alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244.

ESTRUCTURA SECUNDARIA							
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en loop		Sitios no resueltos	
Número	posiciones totales %	Número	posiciones en "stem" %	Número	posiciones en loop %	Número	posiciones no resueltas %
601	36	324	40.2	230	31.2	47	36.7

Tabla 3.5. Análisis de las posiciones variables encontradas en el alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244.

Sitios totales		
Número	posiciones totales %	posiciones variables %
292	17.5	48.6

ESTRUCTURA SECUNDARIA								
Sitios en "stem"			Sitios en loop			Sitios no resueltos		
Número	posiciones en "stem" %	posiciones variables en "stem" %	Número	posiciones en loop %	posiciones variables en "loop" %	Número	Posiciones no resueltas %	posiciones variables no resueltas %
175	21.7	54	103	14	45	14	11	30

Tabla 3.6. Análisis de los sitios significativos encontrados en el alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244.

Las mutaciones predominantes en este conjunto de secuencias son las transiciones. El porcentaje de transiciones en el conjunto de posiciones variables es muy superior (41%) al de transversiones (18.5%) (Tabla 3.7). Se observa un cociente de transiciones / transversiones de 2.2 en el total del alineamiento. En el grupo de posiciones en "stems" el cociente es algo mayor 2.5, mientras que en "loops" es menor 1.8. Esto indica que las mutaciones de tipo transición son más habituales en las regiones de esta molécula de ARN ribosómico donde existen apareamientos en cadena doble.

Existe un elevado porcentaje de posiciones en las que ocurren fenómenos de transición y transversión (21.5% de las posiciones variables).

La presencia de eventos de inserción /delección supone un 11.5% de las posiciones variables, predominando este tipo de sucesos en "loops".

Una pequeña parte de la variabilidad se explica mediante la presencia de posiciones en las que ocurren dos o más tipos de mutaciones (Tabla 3.7).

	ESTRUCTURA SECUNDARIA							
	Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"		Sitios no resueltos	
	Número	posiciones variables %	Número	posiciones variables en "stem" %	Número	posiciones variables en loop %	Número	posiciones variables no resueltas %
Transiciones	246	41	146	45	78	34	23	49
Transversiones	111	18.5	58	18	41	17.8	12	25.5
Transiciones + transversiones	129	21.5	68	21	56	24.3	5	10.6
"Gaps"	69	11.5	31	9.5	33	14.3	5	10.6
Transiciones + "gaps"	16	2.6	7	2.1	7	3	2	4.2
Transversiones + "gaps"	12	2	4	1.2	8	3.5	0	
Transiciones + transversiones + "gaps"	17	2.8	10	3	7	3	0	

Tabla 3.7. Tipos de mutaciones encontradas en el alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244.

Analizando el alineamiento del gen para los representantes de las familias *Mycolaliciaceae* y *Sphinctrinaceae* (zona sombreada de la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244), se observa que se trata de un gen muy conservado en estas familias, mostrando variabilidad en un 4.3 % del total de las posiciones alineadas (Tabla 3.8).

ESTRUCTURA SECUNDARIA							
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en loop		Sitios no resueltos	
Número	posiciones totales %	Número	posiciones en "stem" %	Número	posiciones en loop %	Número	posiciones no resueltas %
72	4.3	28	3.5	40	5.4	4	3

Tabla 3.8. Análisis de las posiciones variables encontradas en las familias *Mycolaliciaceae* y *Sphinctrinaceae* (región sombreada del alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244).

Las posiciones con variabilidad se localizan mayoritariamente en el grupo de posiciones que se encuentran en "loops".

Las transiciones predominan frente a las transversiones (Tabla 3.9).

Las transiciones son más abundantes en regiones de "stems", mientras que las transversiones ocurren mayoritariamente en "loops".

Existen pocas posiciones altamente variables (transiciones + transversiones). Estas posiciones se localizan mayoritariamente en "loops".

Un 15% de las posiciones variables son originadas por fenómenos de inserción/delección.

	Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"		Sitios no resueltos	
	Número	posiciones variables %	Número	posiciones variables en "stem" %	Número	posiciones variables en loop %	Número	posiciones variables no resueltas %
Transiciones	47	65	20	71.4	25	62	2	50
Transversiones	11	15.3	1	3.6	8	20	2	50
Transiciones + transversiones	3	4.2	1	3.6	2	5	0	
"Gaps"	11	15.3	6	21.4	5	12.5	0	

Tabla 3.9. Tipos de mutaciones encontradas en la región sombreada (familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae*) del alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244.

3.1.1.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

En la búsqueda de grupos monofiléticos realizada mediante el programa 'Parsimony Jackknifing' (Figura 3.6), la familia *Mycocaliciaceae* se mantiene como grupo monofilético con un apoyo del 56%. Las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae* forman un grupo monofilético con un soporte del 99%. Este análisis muestra las clases Lecanoromycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, y Chaetothyriomycetes como grupos monofiléticos independientes con buenos índices de soporte (78%, 100%, 99%, 100%, 100% respectivamente) (Figura 3.6). Estas cinco clases se mantienen como un grupo monofilético único (64%) respecto a la clase Pezizomycetes, que es monofilética con un soporte del 88%. Se mantiene sin resolver la posición de los representantes de la familia *Orbiliaceae*, tradicionalmente incluida en *Leotiales*, pero actualmente considerada familia de posición

incierto en el phylum ascomycota (Eriksson, 2001). Las clases Eurotiomycetes y Chaetothyriomycetes forman un grupo monofilético apoyado por un porcentaje del 83%. En este análisis no se observan relaciones entre otras clases.

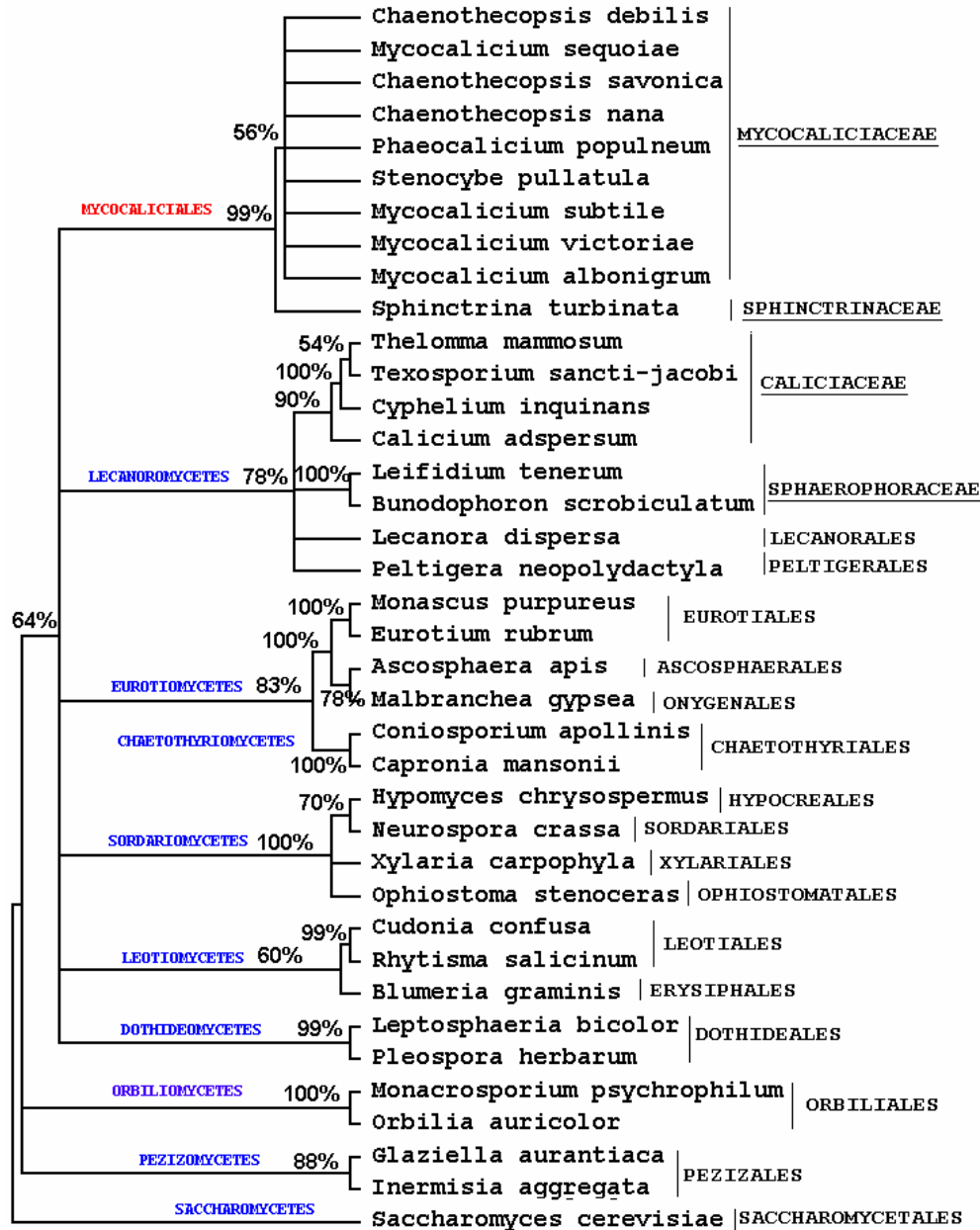


Figura 3.6. Árbol filogenético basado en las secuencias de los genes que codifican para la subunidad pequeña del ribosoma. Este árbol contiene secuencias representantes de las clases aceptadas por Eriksson (2001) en la clasificación del phylum Ascomycotina. El diagrama fue generado por el programa 'Parsimony Jackknifing' empleando 10000 replicaciones y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244. A la derecha de cada especie se indica el orden al que pertenecen, exceptuando los representantes del antiguo orden Caliciales s.l. en los que se indica la familia. A la izquierda de las especies se indican grupos monofiléticos que se corresponden con clases. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como "outgroup".

En el análisis obtenido mediante el método de Parsimonia DNAPARS (Figura 3.7) los representantes de las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae* se muestran como un grupo monofilético con un valor de bootstrap de 98%. Cada una de las clases de ascomicetos incluidas en el análisis son grupos monofiléticos con elevados porcentajes de soporte (Figura 3.7).

La topología de este árbol permite inferir relaciones entre algunas clases, pero sólo en el caso de la relación entre Eurotiomycetes y Chaetothyriomycetes se obtiene un apoyo superior al 50%. Se observa una relación entre las clases Dothideomycetes y Sordariomycetes, y ambas con Leotiomycetes.

En esta inferencia filogenética los representantes de las clases Eurotiomycetes /Chaetothyriomycetes, presentan un ancestro común con las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae* (orden *Mycocaliciales*) apoyado por un valor del 72%. La familia *Caliciaceae* y *Sphaerophoraceae* se localizan junto con los representantes de la clase Lecanoromycetes. Esta clase forma un grupo monofilético con la asociación anteriormente mencionada *Mycocaliciaceae* - *Sphinctrinaceae* - Eurotiomycetes / Chaetothyriomycetes, pero el soporte para este grupo es inferior al 50%. De nuevo la familia *Orbiliaceae* y la clase Pezizomycetes se localizan en una posición más cercana a la raíz que el resto de las clases estudiadas.

En el análisis basado en distancias genéticas realizado mediante DNADIST y NEIGHBOR (Figura 3.8) se observa una topología semejante a la obtenida por DNAPARS, pero el soporte para el grupo formado por *Mycocaliciaceae* - *Sphinctrinaceae* - Eurotiomycetes / Chaetothyriomycetes (54%) es inferior al obtenido por Parsimonia (72%).

Las relaciones dentro de la familia *Mycocaliciaceae* obtenidas mediante el análisis del alineamiento del gen 18S ADNr muestran a tres de las cuatro especies representantes del género *Mycocalicium* (*M. subtile*, *M. albonigrum* y *M. victoriae*) formando un grupo monofilético, con un soporte superior al 50%. Los géneros *Phaeocalicium* y *Stenocybe* forman un grupo monofilético sin soporte. Sólo dos especies del género *Chaenothecopsis*, *C. nana* y *C. savonica*, son monofiléticas, con un soporte del 58% en Neighbor joining, e inferior al 50% en DNAPARS.

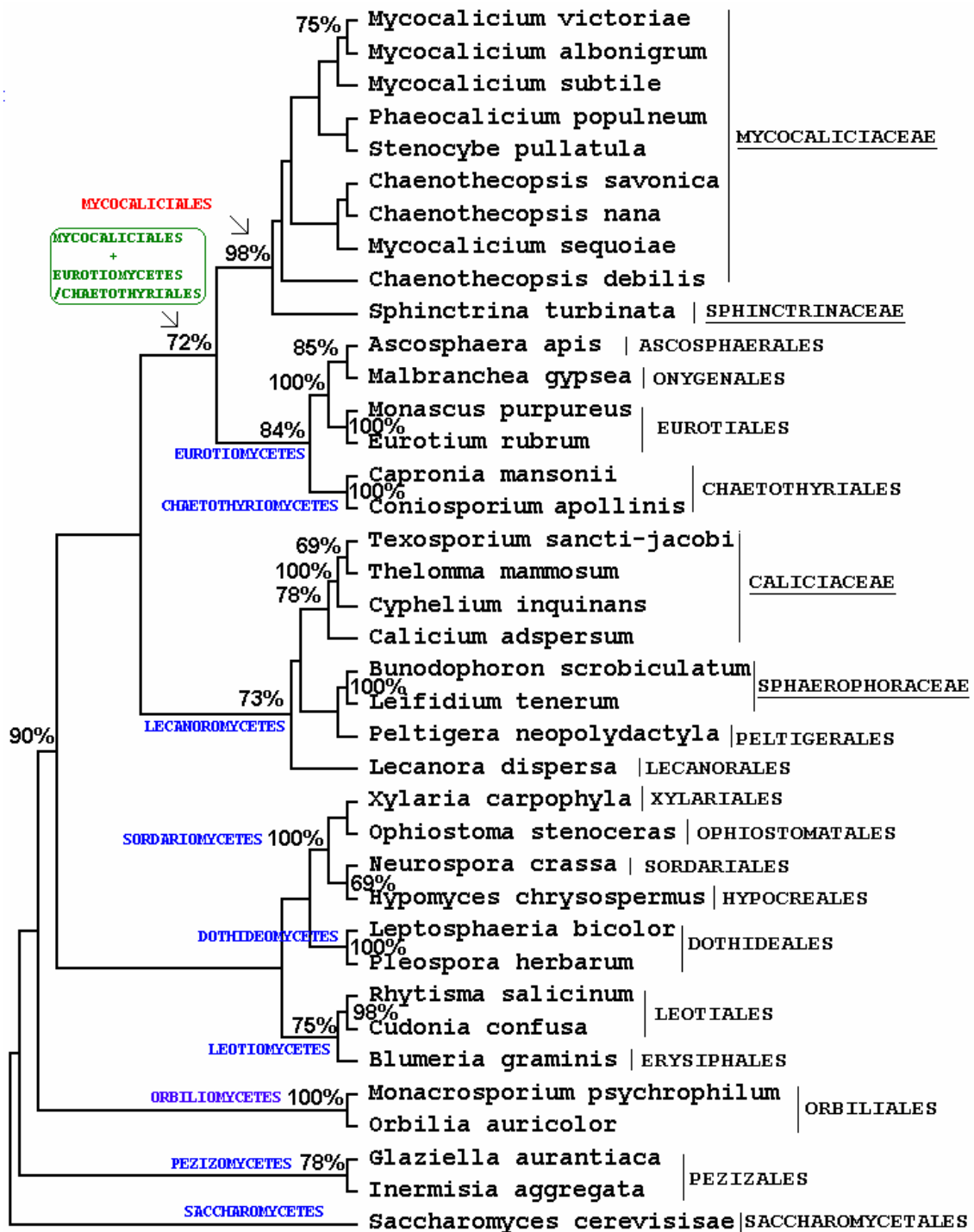


Figura 3.7. Arbol filogenético basado en las secuencias de los genes que codifican para la subunidad pequeña del ribosoma. Este árbol contiene secuencias representantes de las clases aceptadas por Eriksson (2001) en la clasificación del phylum Ascomycotina. El diagrama fue generado por el programa DNAPARS empleando 100 repeticiones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244. A la derecha de cada especie se indica el orden al que pertenecen, exceptuando los representantes del antiguo orden Caliciales s.l, en los que se indica la familia. A la izquierda de las especies se indican grupos monofiléticos que se corresponden con clases. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como “outgroup”.

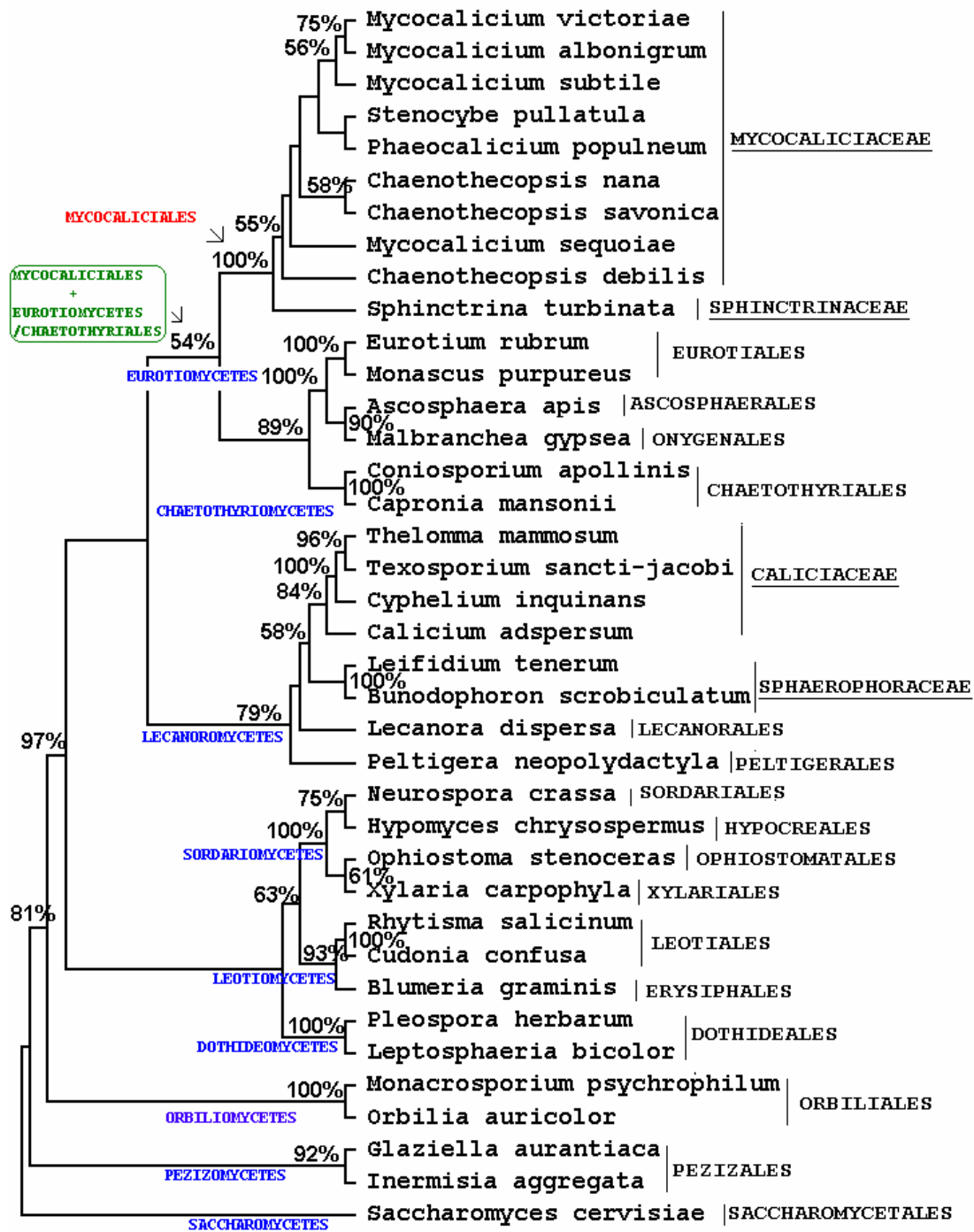


Figura 3.8. Árbol filogenético basado en las secuencias de los genes que codifican para la subunidad pequeña del ribosoma. Este árbol contiene secuencias representativas de las clases aceptadas por Eriksson (2001) en la clasificación del phylum Ascomycotina. El diagrama fue generado por el programa DNADIST seguido de NEIGHBOR empleando 100 repeticiones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.5, Anexo 3, pag. 230-244. A la derecha de cada especie se indica el orden al que pertenecen, exceptuando los representantes del antiguo orden Caliciales s.l., en los que se indica la familia. A la izquierda de las especies se indican grupos monofiléticos que se corresponden con clases. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como "outgroup".

3.1.2 Estudio del gen 28S ADNr

3.1.2.1 Secuenciación la mitad 5' del gen 28S ADNr de un conjunto de representantes de la familia *Mycocaliciaceae*, alineamiento con secuencias homólogas de otros ascomicetos y análisis de los alineamientos.

Para la realización de este análisis se tomaron las secuencias empleadas en el bloque 2 de esta tesis (mitad 5' del gen 28S ADNr de representantes de *Mycocaliciaceae*) y se secuenció la región homóloga de representantes de las familias, *Caliciaceae*, *Sphaerophoraceae*, *Coniocybaceae* y *Sclerophoraceae* del antiguo orden Caliciales s.l.. Representantes de las familias *Calycidiaceae*, *Sphinctrinaceae* y *Microcaliciaceae*, fueron procesadas sin éxito en la amplificación del fragmento a analizar, por lo que su secuencia no ha podido ser incluida en este estudio. Se incluyen además las secuencias de 22 especies representantes de cinco de las once clases establecidas por Eriksson (2001) en el subphylum Euascomycotina, obtenidas de la base de datos de secuencias Genbank. Se empleó la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* como “outgroup” del alineamiento (Tabla 3.10).

<i>Taxonomía</i>	Colección o N° Genbank
<i>Sphaerophorus tener</i> (<i>Sphaerophoraceae</i> , <i>Lecanorales</i> , <i>Lecanoromycetes</i>)	UPSC 2091
<i>Chaenotheca trichialis</i> (<i>Coniocybaceae</i> , familia de localización incierta)	UPSC18431
<i>Chaenotheca chlorella</i> (<i>Coniocybaceae</i> , familia de localización incierta)	UPSC 2301
<i>Sclerophora sanguinea</i> (<i>Coniocybaceae</i> , familia de localización incierta)	UPSC 2090
<i>Aniptodera chesapeakeensis</i> <i>Halosphaeriaceae</i> , <i>Halosphaeriales</i> , <i>Sordariomycetes</i>	U46882
<i>Halosphaeria appendiculata</i> <i>Halosphaeriaceae</i> , <i>Halosphaeriales</i> , <i>Sordariomycetes</i>	U46885
<i>Varicosporina ramulosa</i> <i>Halosphaeriaceae</i> , <i>Halosphaeriales</i> , <i>Sordariomycetes</i>	U44092
<i>Ceratocystis fimbriata</i> <i>Microascaceae</i> , <i>Microascales</i> , <i>Sordariomycetes</i>	U17401
<i>Microascus trigonosporus</i> <i>Microascaceae</i> , <i>Microascales</i> , <i>Sordariomycetes</i>	U47835
<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Hypocreaceae</i> , <i>Hypocreales</i> , <i>Sordariomycetes</i>	M38153

<i>Taxonomía</i>	Colección o Nº Genbank
<i>Ophiostoma piliferum</i>	U47837
Ophiostomataceae, Ophiostomatales, Sordariomycetes	
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	U47830
Valsaceae, Diaporthales, Sordariomycetes	
<i>Neurospora crassa</i>	M38154
Sordariaceae, Sordariales, Sordariomycetes	
<i>Xylaria curta</i>	U47840
Xylariaceae, Xylariales, Sordariomycetes	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	U28902
Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes	
<i>Chaetosartorya cremea</i>	U15501
Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes	
<i>Emericella astellata</i>	U29847
Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes	
<i>Eurotium rubrum</i>	U29544
Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes	
<i>Amauroascus albicans</i>	U17914
Onygenaceae, Onygenales, Eurotiomycetes	
<i>Gymnoascella citrina</i>	U17915
Gymnoascaceae, Onygenales, Eurotiomycetes	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	U81263
Ascosphaeraceae, Onygenales, Eurotiomycetes	
<i>Leptosphaeria doliolum</i>	U43475
Leptosphaeriaceae, Pleosporales, Dothideomycetes	
<i>Ophiobolus herpotrichus</i>	U43471
Lepthosphaeriaceae, Pleosporales, Dothideomycetes	
<i>Pleospora herbarum</i>	U43476
Pleosporaceae, Pleosporales, Dothideomycetes	
<i>Peziza atrovinosa</i>	U40613
Pezizaceae, Pezizales, Pezizomycetes	
<i>Plicaria acanthodictya</i>	U40607
Pezizaceae, Pezizales, Pezizomycetes	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J01355
Saccharomycetaceae, Saccharomycetales, Saccharomycetes	

Tabla 3.10. Relación de especies empleadas en el análisis. En el apartado de taxonomía se indica la especie, la familia a la que pertenece, el orden y la clase en aquellos casos en los que el orden ha sido asignado a alguna clase según Eriksson (Eriksson 2001). La secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada como “outgroup”.

El alineamiento resultante contiene las secuencias de 43 especies, representantes de las principales clases de ascomycetes según Eriksson, con excepción de Arthoniomycetes, Chaetothyriomycetes y Leotiomycetes. Los límites del alineamiento se establecen entre las posiciones 197-645 de la secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* J01355. La longitud de las secuencias parciales del extremo 5' del gen 28S empleadas en el alineamiento oscila entre 438 - 453 pares de bases. Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W, revisadas visualmente y arregladas con el editor GENEDOC utilizando la información obtenida de la estructura secundaria de la molécula transcrita de *Saccharomyces cerevisiae* J01355 (Gutell

et al., 1993). Dos regiones de alineamiento ambiguo fueron eliminadas. Una de seis pares de bases en la posición 52 de alineamiento y otra de siete pares de bases en la posición 158 del alineamiento (Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248). Las secuencias de las 43 especies empleadas producen un alineamiento de 456 posiciones (Tabla 3.11). La variabilidad encontrada en este fragmento del gen en las secuencias alineadas supone un 51% del total de las posiciones (Tabla 3.12). Una gran mayoría (80.7%) de las posiciones variables son significativas para el análisis de parsimonia (Tabla 3.13). Las posiciones con variabilidad predominan en regiones que forman parte de "stems" (59.2%) frente a las que forman "loops" (42.2%) (Tabla 3.12).

ESTRUCTURA SECUNDARIA					
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
Número		Número	% posiciones totales	Número	% posiciones totales
456		245	53.7	211	46.3

Tabla 3.11. Análisis de las posiciones alineadas totales y en los subgrupos que forman "stems" y "loops" del alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248.

ESTRUCTURA SECUNDARIA					
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
Número	% posiciones totales	Número	% posiciones en "stem"	Número	% posiciones en "loop"
233	51	144	59.2	89	42.2

Tabla 3.12 Análisis de las posiciones variables encontradas en el alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248.

ESTRUCTURA SECUNDARIA								
Sitios totales			Sitios en "stem"			Sitios en "loop"		
Número	% posiciones totales	% posiciones variables	Número	% posiciones en "stem".	% posiciones variables en "stem"	Número	% posiciones en "loop"	% posiciones variables en "loop"
188	41.2	80.7	122	49.8	84.7	66	31.3	74.1

Tabla 3.13. Análisis de los sitios significativos encontrados en el alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248.

Predominan las posiciones altamente variables en las que ocurren transiciones y transversiones respecto a la secuencia del outgroup (43.6% de las posiciones variables), seguido de posiciones donde sólo tienen lugar transiciones (28.2%) (Tabla 3.14). El resto de la variabilidad se explica por posiciones en las que ocurren solo transversiones (11.5%), y eventos de inserción/ deleción por sí solos (3.4%) o bien asociados a posiciones con transiciones (3.4%), transversiones (1.7%), o ambas (7.7% de las posiciones variables).

Sólo una de las posiciones en las que ocurre un suceso de inserción /deleción se origina como consecuencia de la secuencia del “outgroup”.

El porcentaje de las posiciones con transiciones es semejante en regiones "stems" y en "loops" (27.6% y 29.2% respectivamente). Sin embargo las posiciones con transversiones son doblemente abundantes en "loops" que en "stems" (Tabla 3.14).

	ESTRUCTURA SECUNDARIA					
	Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
	Número	% posiciones variables	Número	% posiciones variables en "stem"	Número	% posiciones variables en "loop"
Transiciones	66	28.2	40	27.6	26	29.2
Transversiones	27	11.5	12	8.3	15	16.8
Transiciones + transversiones	102	43.6	68	47	34	38.2
"Gaps"	8	3.4	5	3.4	3	3.4
Transiciones + gaps	8	3.4	7	4.8	1	1.1
Transversiones + gaps	4	1.7	1	0.7	3	3.4
Transiciones + transversiones + gaps	18	7.7	11	7.6	7	7.9

Tabla 3.14. Tipos de mutaciones encontradas en el alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248.

3.1.2.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones.

En el análisis realizado con el programa ‘Parsimony Jackknifing’ (Figura 3.10) se observan tres grupos principales, los formados por *Saccharomyces cerevisiae* empleado como “outgroup”,

el grupo con representantes de la clase Pezizomycetes, y un gran grupo que engloba el resto de las clases, apoyado por un índice jackknife de 85%. Dentro de este gran grupo aparecen seis grupos monofiléticos, tres de los cuales se corresponden con las clases Dothideomycetes (100%), Eurotiomycetes (77%) y Sordariomycetes (98%). Las secuencias del fragmento del gen 28S aportadas en este trabajo, procedentes de las familias *Mycocaliciaceae* (67%), *Caliciaceae-Sphaerophoraceae* (77%) (representantes de la clase Lecanoromycetes) y *Coniocybaceae* (100%), forman los tres grupos monofiléticos restantes (Figura 3.10). Este análisis señala la exclusión de la familia *Mycocaliciaceae* de las principales clases establecidas en el subphylum Euascomycotina.

En el análisis obtenido mediante el método de parsimonia DNAPARS (Figura 3.11) las clases principales de Euascomycotina se mantienen con un soporte alto, Sordariomycetes (100%), Eurotiomycetes (97%), Dothideomycetes (100%) y Pezizomycetes (100%). La clase Pezizomycetes se mantiene separada del resto de las clases con un valor de bootstrap del 93%. La familia *Mycocaliciaceae* aparece como grupo monofilético con un soporte bajo (52%). El ancestro más cercano de la familia *Mycocaliciaceae* es común con el de las clases Eurotiomycetes y Sordariomycetes, con un soporte inferior al 50% en este análisis.

En el análisis basado en distancias genéticas realizado mediante DNADIST y NEIGHBOR (Figura 3.12) la topología del árbol obtenido es muy diferente a la producida por DNAPARS. El apoyo para la familia *Mycocaliciaceae* es muy alto (92%). Se observa una relación cercana de esta familia con la clase Lecanoromycetes, representada por especies pertenecientes a las familias *Caliciaceae* y *Sphaerophoraceae*, tradicionalmente incluidas en el orden Caliciales s.l. al igual que *Mycocaliciaceae*. El apoyo para esta relación es sin embargo inferior al 50%. Otros representantes de Caliciales s.l. incluidos en el análisis y pertenecientes a la familia *Coniocybaceae*, quedan localizados formando un grupo monofilético con Eurotiomycetes, pero también con un valor de bootstrap inferior al 50%. Todos los representantes del antiguo orden Caliciales s.l. incluidos en este análisis, forman un grupo monofilético con Eurotiomycetes, apoyado por un valor del 50%. De nuevo las principales clases de Euascomycotina aparecen apoyadas por altos porcentajes, Sordariomycetes (100%), Dothideomycetes (100%), Eurotiomycetes (99%), Lecanoromycetes (90%) y Pezizomycetes (100%).

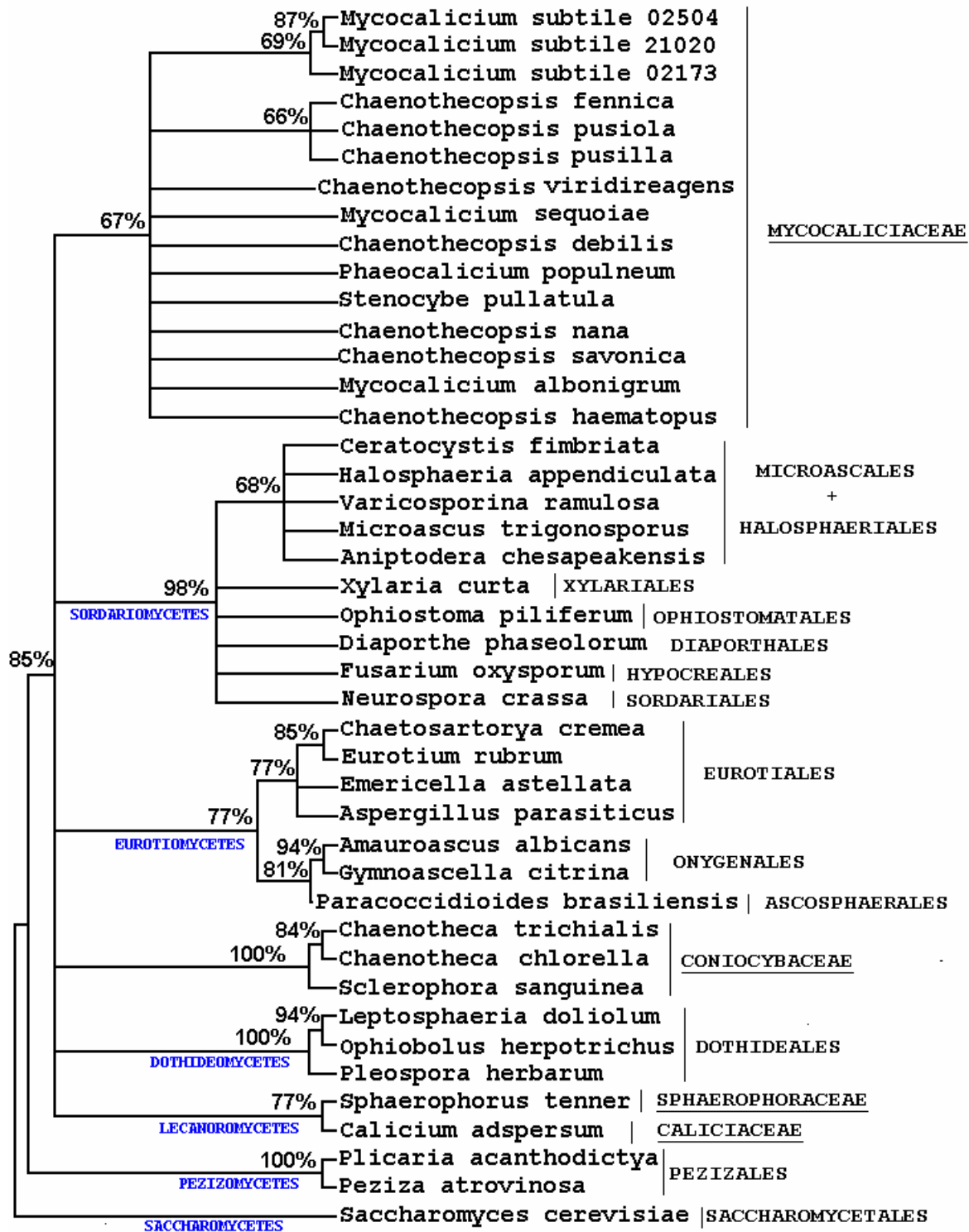


Figura 3.10. Árbol filogenético basado en las secuencias del extremo 5' de los genes que codifican para la subunidad grande del ribosoma. Este árbol contiene secuencias representantes de las clases aceptadas por Eriksson (2001) en la clasificación del phylum Ascomycotina. El diagrama fue generado por el programa "Parsimony Jackknifing" empleando 10000 replicaciones y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248. A la derecha de cada especie se indica el orden al que pertenecen, exceptuando los representantes de Caliciales s.l. en los que se indica la familia (subrayado). A la izquierda de las especies se indican grupos monofiléticos que se corresponden con clases. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como "outgroup".

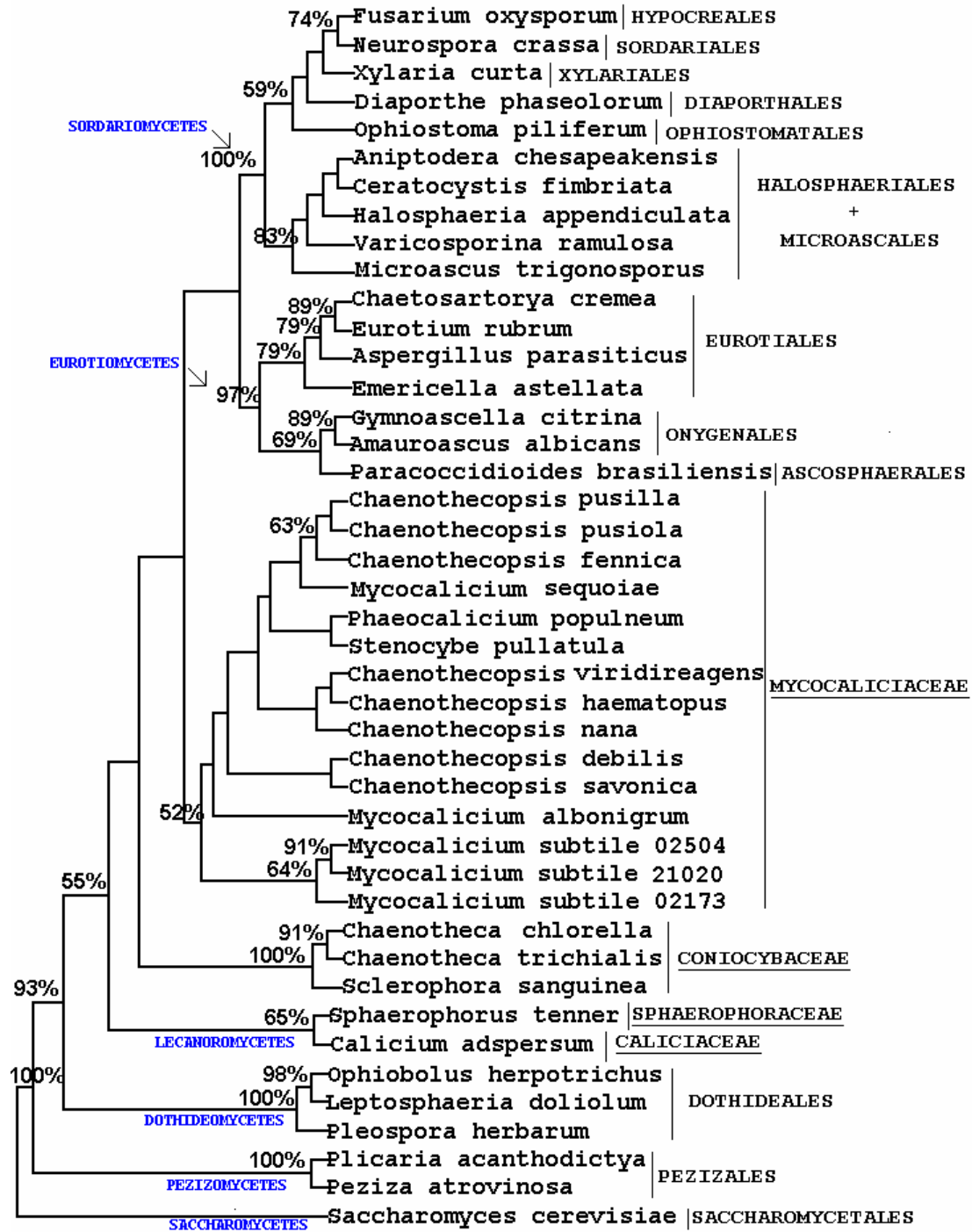


Figura 3.11. Árbol filogenético basado en las secuencias del extremo 5' de los genes que codifican para la subunidad grande del ribosoma. Este árbol contiene secuencias representantes de las clases aceptadas por Eriksson (2001) en la clasificación del phylum Ascomycotina. El diagrama fue generado por el programa DNAPARS empleando 100 replicaciones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248. A la derecha de cada especie se indica el orden al que pertenecen, exceptuando los representantes de Caliciales s.l. en los que se indica la familia (subrayado). A la izquierda de las especies se indican grupos monofiléticos que se corresponden con clases. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como "outgroup".

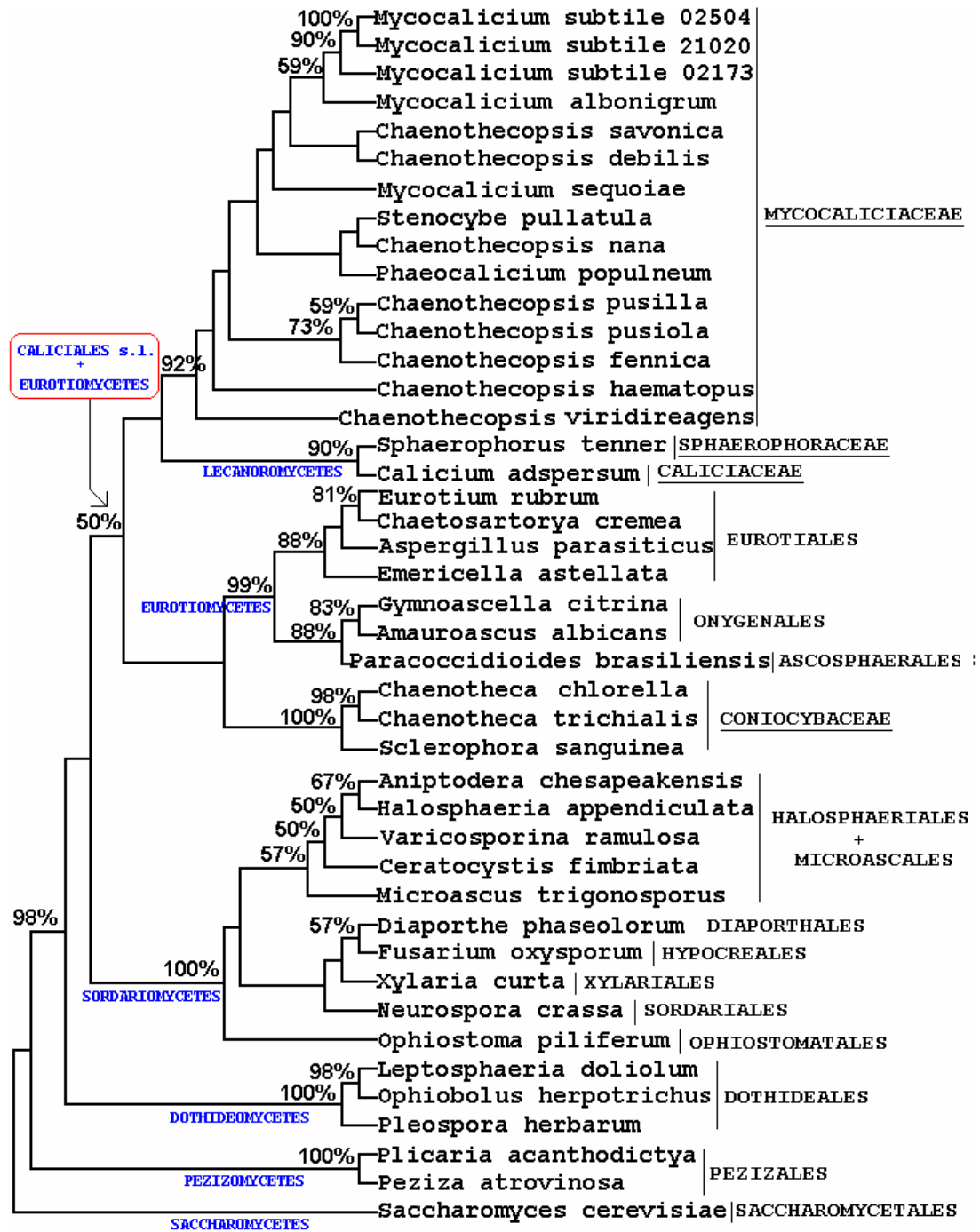


Figura 3.12. Árbol filogenético basado en las secuencias del extremo 5' de los genes que codifican para la subunidad grande del ribosoma. Este árbol contiene secuencias representantes de las clases aceptadas por Eriksson (2001) en la clasificación del phylum Ascomycotina. El diagrama fue generado por el programa DNADIST seguido de NEIGHBOR empleando 100 replicaciones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.9, Anexo 3, pag. 245-248. A la derecha de cada especie se indica el orden al que pertenecen, exceptuando los representantes de Caliciales s.l. en los que se indica la familia (subrayado). A la izquierda de la especies se indican grupos monofiléticos que se corresponden con clases. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como "outgroup".

3.2 La familia Mycocaliciaceae y su relación con las familias del antiguo orden Caliciales.

3.2.1 Estudio del gen 28S ADNr.

3.2.1.1 Secuenciación de la región 5' terminal del gen 28S ADNr de un conjunto de representantes de la familia Mycocaliciaceae, Coniocybaceae, Caliciaceae, y Sphaerophoraceae, alineamiento y análisis de los alineamientos

El alineamiento en el que se basan los anteriores árboles filogenéticos tiene una longitud aproximada de 450 pb. Esto se debe a que en los bancos de secuencias la mayoría de las secuencias disponibles para el gen 28S tienen una longitud corta. Las secuencias obtenidas para esta tesis de la mitad 5' del gen en Mycocaliciaceae y otras familias del antiguo orden Caliciales alcanzan una longitud de 1245 pb. Esto permite la realización de un alineamiento más completo (Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254) para este conjunto de secuencias, con el que se pretende obtener una mejor resolución de la posición de esta familia respecto a otras familias del antiguo orden Caliciales s.l.

<i>Especies/Colección</i>	<i>Oligonucleótidos empleados</i>	<i>Longitud LR7/LR0R</i>	<i>Longitud corregida</i>	<i>Nº de inserciones</i>
<i>Sphaerophorus tener</i> UPSC 2091	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1401 pb	1246 pb	0
<i>Chaenotheca trichialis</i> UPSC 18431	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1409 pb	1245 pb	0
<i>Chaenotheca chlorella</i> UPSC 2301	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1394 pb	1245 pb	0
<i>Sclerophora sanguinea</i> UPSC 2090	LR7, LR0R, JS5m, JS5mR	1418 pb	1250 pb	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nº Genbank ScJ01355		2167 pb	1253 pb	1

Tabla 3.15. Relación de especies pertenecientes a familias del antiguo orden Caliciales, empleadas para la secuenciación de la mitad 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma (28S ADNr). Se especifican los tamaños (pb) de los productos de PCR obtenidos. Se ofrece el tamaño de las secuencias corregidas tras eliminar zonas de alineamiento ambiguo (ver Figura 2.3, bloque 2, pag. 97) y el número de inserciones encontradas a lo largo de la secuencia.

De las 1252 posiciones alineadas (Tabla 3.16), un 27% son variables (Tabla 3.17). De ellas el 53% son posiciones significativas para los análisis de Parsimonia (Tabla 3.18).

Teniendo en cuenta la información obtenida a partir de la estructura secundaria del ARN, se observa que la proporción de posiciones variables es ligeramente superior (29%) en aquellas regiones que forman parte de "stems" que en las que constituyen "loops" (24%) (Tabla 3.17).

ESTRUCTURA SECUNDARIA				
Sitios totales	Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
Número	Número	% Posiciones totales	Número	% Posiciones totales
1252	706	56.4	546	43.6

Tabla 3.16. Análisis de las posiciones alineadas totales y en los subgrupos que forman "stems" y "loops" del alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254.

ESTRUCTURA SECUNDARIA					
Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
Número	% Posiciones totales	Número	% Posiciones en "stem"	Número	% Posiciones en "loop"
339	27	206	29	133	24

Tabla 3.17. Análisis de las posiciones variables encontradas en el alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254.

ESTRUCTURA SECUNDARIA								
Sitios totales			Sitios en "stem"			Sitios en "loop"		
Número	% Posiciones totales	Posiciones variables	Número	% Posiciones en "stem"	% Posiciones variables en "stem"	Número	% Posiciones en "loop"	% Posiciones variables en "loop"
181	14.5	53.4%	114	16.1	55.3	67	12.3	50.4

Tabla 3.18. Análisis de los sitios significativos encontrados en el alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254.

Predominan las mutaciones de tipo transición (48.7%) frente a las transversiones (19%) (Tabla 3.19). El cociente observado de transiciones/transversiones es de 2.6, siendo éste mayor en el subconjunto de datos de posiciones en "stems" (2.8) y menor en el de "loops" (2.1). Las transiciones predominan especialmente en los fragmentos de secuencia que forman parte de "stems". Se observan posiciones del alineamiento en las que el carácter observado de

unas especies, supone una transición respecto de la secuencia del "outgroup", y en otras el carácter observado se genera por transversión respecto del carácter presente en el "outgroup". Esto ocurre en un 25.6 % de las posiciones variables.

La proporción de sucesos de inserción/delección es baja (4.1% de las posiciones variables). De ellos la mitad se introducen debido a la secuencia del "outgroup", *Saccharomyces cerevisiae*.

Una pequeña parte de la variabilidad se explica mediante posiciones altamente variables en las que ocurren transiciones y gaps, transversiones y gaps, y los tres tipos de mutación, transiciones, transversiones y gaps, respecto de la secuencia del "outgroup" (Tabla 3.19).

	ESTRUCTURA SECUNDARIA					
	Sitios totales		Sitios en "stem"		Sitios en "loop"	
	Número	% Posiciones variables	Número	% Posiciones variables en "stem"	Número	% Posiciones variables en "loop"
Transiciones	165	48.7	109	53	56	42
Transversiones	64	19	38	18.4	26	19.5
Transiciones + transversiones	87	25.6	48	23.3	39	29.3
"Gaps"	14	4.1	4	2	10	7.5
Transiciones + gaps	2	0.6	1	0.5	1	0.8
Transversiones + gaps	2	0.6	1	0.5	1	0.8
Transiciones + transversiones + gaps	5	1.5	5	2.4	0	0

Tabla 3.19. Tipos de mutaciones encontradas en el alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254.

3.2.1.2 Inferencia de relaciones filogenéticas según diversas aproximaciones

En el alineamiento realizado a partir de la totalidad de la región secuenciada en representantes del antiguo orden Caliciales s.l. (Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254), observamos en todos los análisis (Figuras 3.14, 3.15, 3.16) una relación estrecha (75%, 76%, 91%) entre las familias *Mycocaliciaceae* y *Coniocybaceae*.

Los representantes de las familias *Sphaerophoraceae* y *Caliciaceae* no muestran relaciones entre sí, ni con el resto de las familias con un soporte superior al 50% según el análisis de

'Parsimony Jackknifing' (Figura 3.14). En la inferencia realizada por parsimonia la familia *Sphaerophoraceae* aparece como un grupo monofilético con el formado por las familias *Mycocaliciaceae-Coniocybaceae* con un soporte del 55% (Figura 3.15). Según el análisis de distancias genéticas las familias *Sphaerophoraceae* y *Caliciaceae* son monofiléticas con un soporte del 80% y aparecen en la base del árbol filogenético (Figura 3.16).

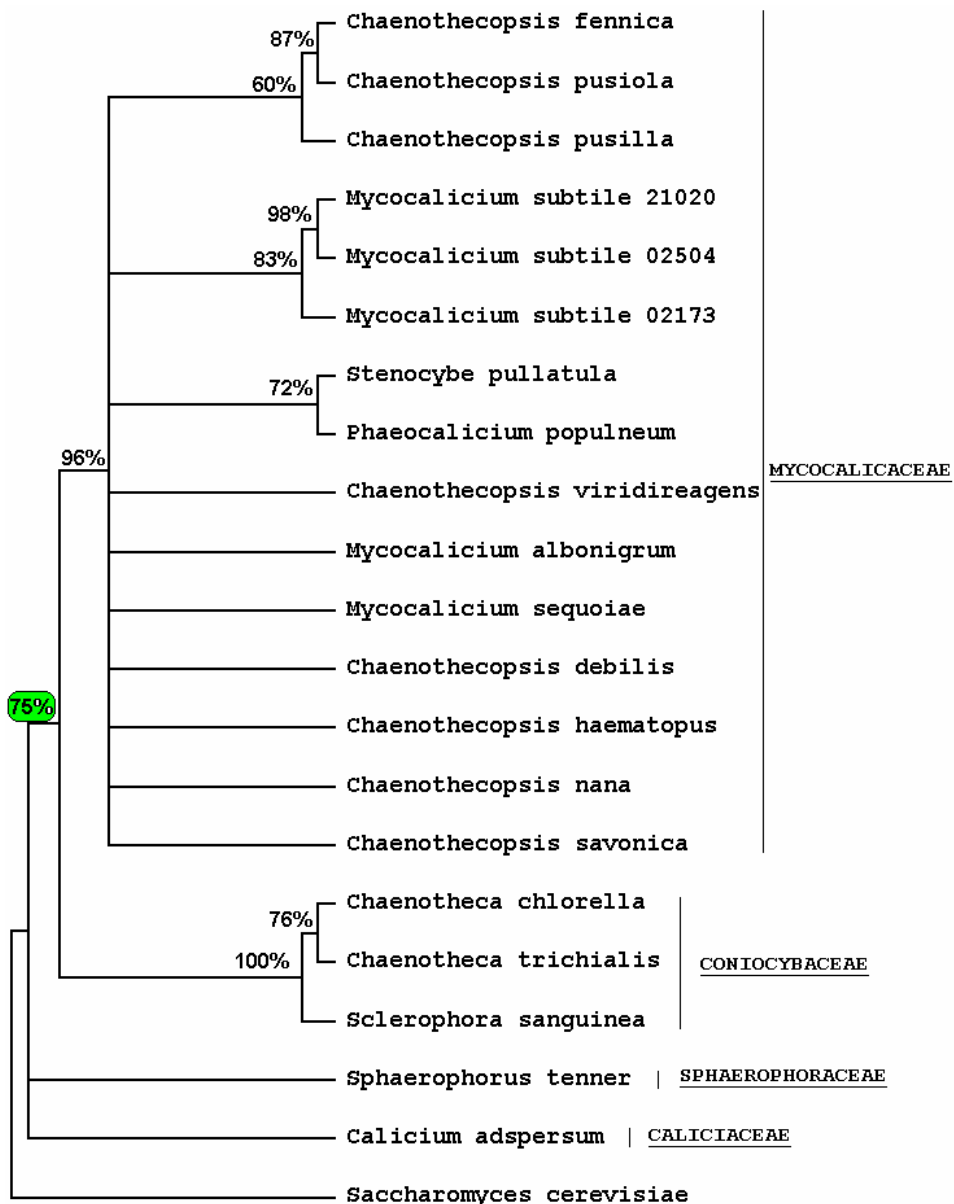


Figura 3.14. Arbol filogenético de las familias constituyentes del antiguo orden Caliciales s.l. generado por el programa 'Parsimony Jackknifing' empleando 10000 replicaciones y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254. A la derecha de cada especie se indica la familia a la que pertenece. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como "outgroup".

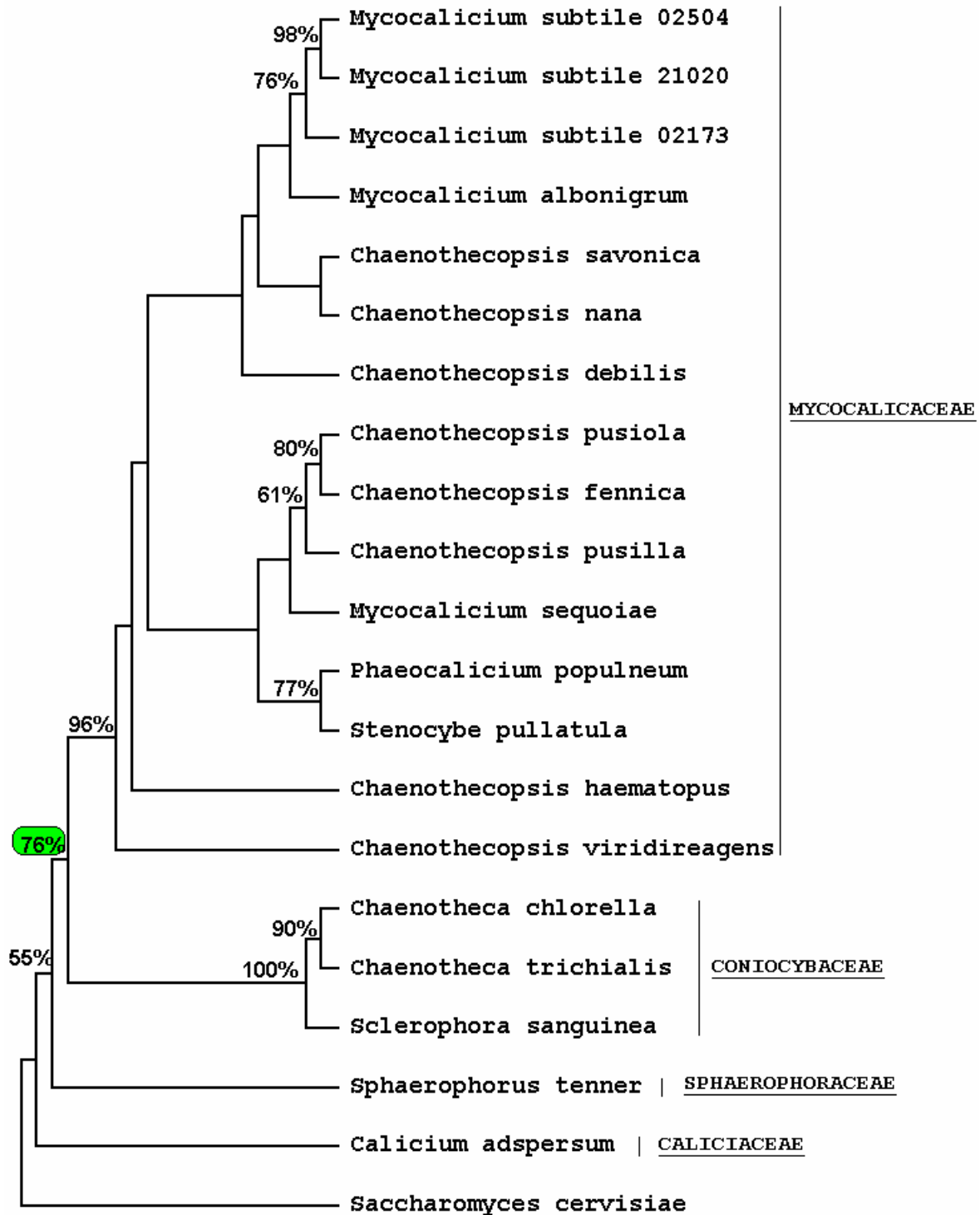


Figura 3.15. Arbol filogenético de las familias constituyentes del orden Caliciales s.l. generado por el programa DNAPARS empleando 100 repeticiones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como “outgroup”.

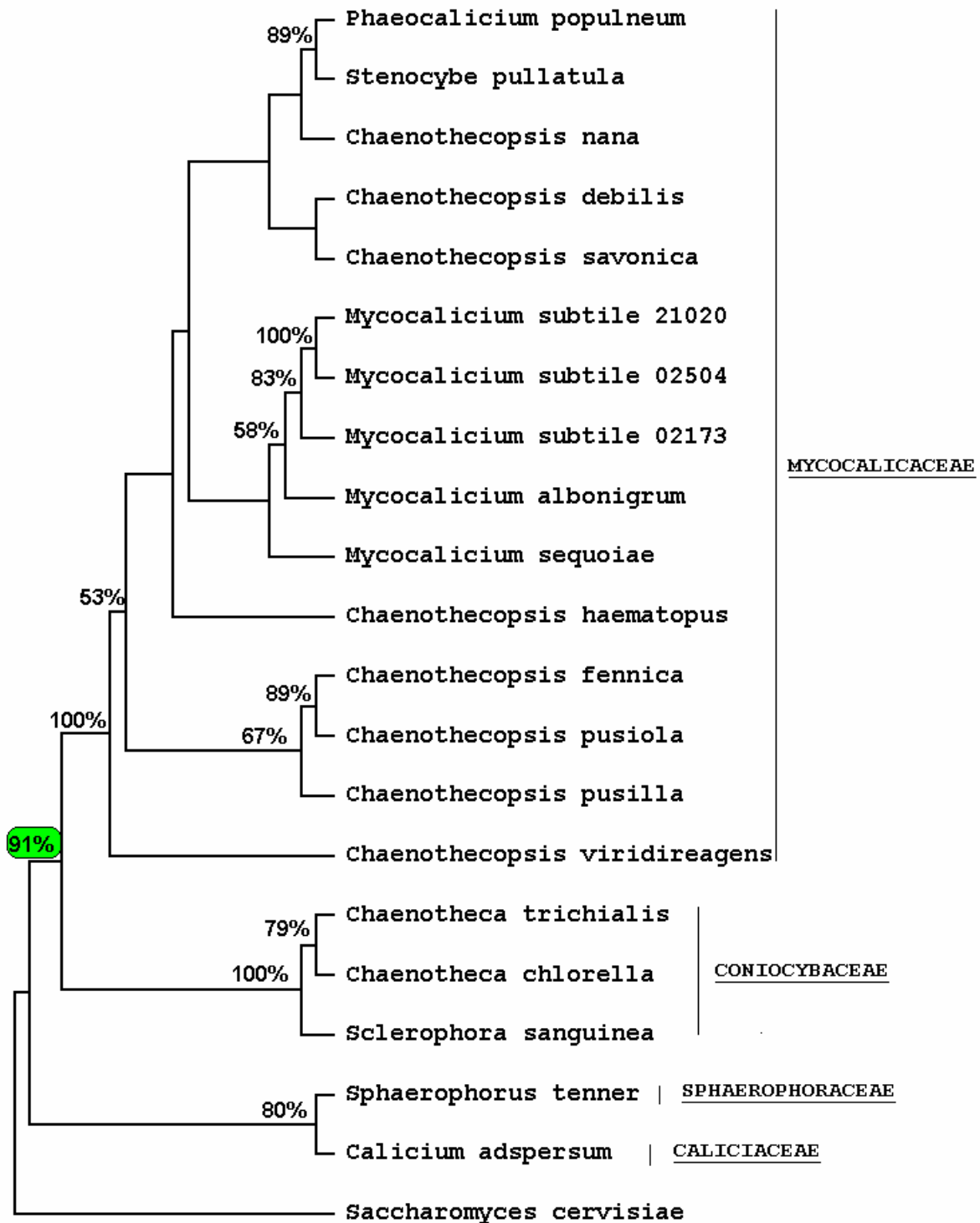


Figura 3.16. Arbol filogenético de la familia *Mycocaliciaceae* generado por los programas DNADIST y NEIGHBOR, empleando 100 repeticiones de bootstrap y un nivel de corte del 50%. El análisis se basa en el alineamiento mostrado en la Figura 3.13, Anexo 3 pag. 249-254. La especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó como “outgroup”.

4. Discusión

4.1 La sistemática de Ascomycota

En la última década, el creciente uso de caracteres moleculares, basados fundamentalmente en la secuencia del gen 18S, y en menor medida en genes que codifican para proteínas como RBP2 (subunidad de la RNA polimerasa II) (Liu et al, 1999), NAD5 (subunidad de la NADH deshidrogenasa mitocondrial)(Paquin et al, 1995), ha permitido el establecimiento de clases en la taxonomía de ascomicetos. Sin embargo, los estudios realizados en función de la secuencia del gen 18S no han permitido hasta ahora el establecimiento de relaciones entre las clases, con buenos índices de soporte. A lo largo de las publicaciones realizadas sobre filogenia de ascomicetos en la última década podemos observar distintas relaciones entre clases, con mayor o menor congruencia respecto a su morfología.

En nuestros análisis, tomamos una representación de todas las clases posibles en función de la disponibilidad de secuencias y añadimos nuestras secuencias pertenecientes a familias que al iniciar esta tesis se clasificaban en el orden Caliciales s.l..

Buscando grupos monofiléticos, encontramos que cada clase aparece con buenos índices de soporte en todos los distintos tipos de acercamiento a la inferencia de relaciones filogenéticas empleados, tanto para los estudios realizados sobre el gen 18S como para el gen 28S (Figuras 3.6, 3.7, 3.8, 3.10, 3.11, 3.12).

En nuestros análisis realizados con el gen 18S, se observa que la clase Eurotiomycetes forma siempre un grupo monofilético con los representantes de la clase Chaetothyriomycetes, con buenos porcentajes de soporte (83%, 84%, 89%) (Figuras 3.6, 3.7, 3.8). Esta misma relación se puede encontrar en trabajos realizados por Spatafora y Berbee (Spatafora, 1995, Berbee, 1996). En la versión de 1997 sobre sistemática de ascomicetos, realizada por Eriksson y Winka (1997), el orden Chaetothyriales (único orden de la clase actualmente reconocida como Chaetothyriomycetes), quedaba incluido en la clase Eurotiomycetes. Posteriormente fue desligado, ortorgando a este orden la categoría de clase (Eriksson, 1998), debido a la falta de similitudes morfológicas con Eurotiomycetes y a la relación que presentaban con otros órdenes, como *Lecanorales/Peltigerales* (Winka, 1998), de nuevo sin soporte superior al 50%. Las bases de datos no contienen secuencias correspondientes al gen 28S ADNr de *Chaetothyriales*, por lo que no se han incluido en nuestros análisis. En general son muy

escasas las secuencias disponibles de este gen para ascomicetos en las bases de datos (Ogawa et al., 1997, Fernández et al., 1999, Lumbsch et al., 2000)

El uso de las secuencias de los genes 18S y 28S apoyan el establecimiento de las superclases Leotiomyceta y Pezizomyceta establecidas por Eriksson y Winka (1998), pero desestimados en la siguiente revisión de la sistemática de ascomicetos (Eriksson, 1999).

4.2 La familia Mycocaliciaceae en la sistemática de Ascomycota

En nuestros análisis se introduce un mayor número de secuencias que representan la variabilidad de la familia, así como una mayor representación de las clases actualmente reconocidas del Subphylum Euascomycotina, con objeto de localizar el grupo de ascomicetos más cercanos filogenéticamente a *Mycocaliciaceae*.

En el análisis realizado en función de las secuencias del gen 18S ADNr, la familia *Mycocaliciaceae* está representada por las secuencias de nueve especies, cuatro del género *Mycocalicium*, tres de *Chaenothecopsis*, una de *Phaeocalicium* y una de *Stenocybe*.

A pesar de que la secuencia del gen 18S ADNr está muy conservada y probablemente no es la mejor opción para el establecimiento de relaciones dentro de la familia *Mycocaliciaceae*, es interesante observar las grandes diferencias de tamaño registradas para este gen, incluso en distintas especies de un mismo género. Esta diferencia de tamaño se produce debido a la introducción de inserciones, a los que hemos denominado con las letras A-D, con objeto de identificarlos según su posición en la secuencia. Se han descrito múltiples sitios de inserción para intrones de tipo I y II en las secuencias del gen 18S ADNr de líquenes (Gargas et al., 1995b). Los cuatro representantes del género *Mycocalicium*, *M. sequoiae*, *M. subtile*, *M. albonigrum*, y *M. victoriae*, contienen en el fragmento secuenciado del gen 18S ADNr, ninguno, uno (tipoA), dos (tipos B y C) y tres (tipos A, B, C) inserciones respectivamente. La secuencia de *Stenocybe pullatula* presenta dos (tipos A y C) de las inserciones observadas en *Mycocalicium*. En una de las tres especies de *Chaenothecopsis* estudiadas, *Chaenothecopsis debilis*, se encuentran dos inserciones del tipo C y D. *Chaenothecopsis nana*, *C. savonica* y *Phaeocalicium populneum* no presentan inserciones en sus secuencias.

La presencia y secuencia de estas inserciones no se tiene en cuenta en el análisis filogenético puesto que son eliminados para permitir el alineamiento, pero ofrecen información adicional sobre las agrupaciones obtenidas en el árbol filogenético inferido.

Dentro de la familia *Mycocaliciaceae* se observan agrupaciones interesantes. Entre ellas la formada por *Mycocalicium victoriae* y *Mycocalicium albonigrum* con un 75% de soporte. La relación entre estas dos especies ya se puso de manifiesto en el análisis químico de la familia puesto que estas especies compartían patrones de producción de metabolitos (Tabla 2.14, 2.16, bloque 2, pag. 112 y 119). La información adicional que nos ofrece la presencia y tipo de inserciones, según su longitud y posición, apoya esta relación puesto que ambas comparten la presencia de inserciones denominadas B y C (Tabla 3.3) (Figuras 3.7 y 3.8).

En la búsqueda de grupos monofiléticos en Euscomycotina, mediante Parsimony Jackknifing a partir de las secuencias del gen 18S ADNr y de un fragmento de 456 pb del extremo 5' del gen 28S ADNr (Figuras 3.6, 3.10), la familia *Mycocaliciaceae* queda excluida de las clases reconocidas en el subphylum y se mantiene como un grupo monofilético con la familia *Sphinctrinaceae* (99%). El carácter monofilético de Mycocaliciales es congruente con la morfología y ecología de ambas familias (Tibell y Wedin, 2000).

Los análisis de Parsimonia y distancias genéticas muestran árboles obligados a la dicotomía por lo que presentan un mayor número de relaciones entre grupos, aunque en muchos casos no hay soporte para el establecimiento de los mismos. A partir de las secuencias del gen 18S ADNr observamos, tanto en el análisis por parsimonia (Figura 3.7) como en el de distancias (Figura 3.8), la formación de un grupo monofilético constituido por *Mycocaliciales* y Eurotiomycetes- Chaetothyriomycetes. La relación entre *Mycocaliciaceae* y Eurotiomycetes ya se describe en la literatura (Gargas et al., 1995, Wedin y Tibell, 1997, Stenroos et al., 1998), pero en ningún caso se obtuvieron porcentajes de soporte superiores al 50%. En nuestro estudio obtenemos por primera vez soportes de 72% y 54% en parsimonia y distancias respectivamente. No se trata de índices de soporte definitivos para establecer relaciones pero si aportan un apoyo mayor a la posible relación filogenética existente entre estos grupos de ascomicetos. Esta mejora en los índices de soporte podría deberse a la mayor representación de la diversidad presente en Euscomycotina, puesto que en nuestro estudio se incluyen secuencias de Chaetothyriomycetes, clase de localización variable que no tiene representación en los trabajos señalados anteriormente.

La introducción en las bases de datos de nuevas secuencias que representen cada vez más la diversidad de los ascomicetos, permitirá clasificar órdenes y familias de posición aún incierta. Igualmente la mejora en las técnicas de biología molecular, especialmente la rapidez en la obtención de secuencias de genomas completos permitirá, en algunos casos, reorganizar de forma imprevisible los resultados filogenéticos aceptados actualmente.

4.3 La familia *Mycocaliciaceae* y su relación con las familias del antiguo orden Caliciales

El desmembramiento del orden Caliciales comenzó en 1995, a partir de la introducción de las primeras secuencias del gen 18S de representantes del orden, en estudios acerca de la sistemática de discomicetos (Gargas y Taylor, 1995).

Actualmente el orden Caliciales no figura como tal en la sistemática de ascomicetos (Eriksson, 2001). Las familias *Caliciaceae* y *Sphaerophoraceae*, han sido incluidas en el orden *Lecanorales* (Wedin y Tibell 1997, Wedin et al., 1998). Ha emergido un nuevo orden, *Mycocaliciales*, que incluye a las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae* (Tibell y Wedin, 2000). El resto de las familias constituyentes del antiguo orden Caliciales (*Coniocybaceae*, *Calycidiaceae*, *Microcaliciaceae*), se mantienen en la sistemática de ascomicetos como familias de posición incierta (Eriksson, 2001).

El establecimiento de estas nuevas relaciones fue realizado en función de datos genéticos (gen 18S ADNr) (Gargas et al., 1995a, Wedin y Tibell, 1997, Wedin et al., 1998), apoyado por análisis morfológicos (Löfgren y Tibell 1979, Tibell, 1975, 1978a, 1978b, 1981, 1982, 1984, 1987a, Wedin, 1993, 1995), químicos (Tibell, 1984, Wedin, 1993) y de producción de anamorfos (Samuels y Buchanan 1983, Tibell, 1991a, 1991b, 1992, 1993, 1995, Wedin y Tibell 1991, Wedin, 1992).

En los bancos de secuencias podemos encontrar el gen 18S ADNr de *Bunodophoron scrobiculatum*, *Leifidium tenerum*, *Sphaerophorus globosus* (*Sphaerophoraceae*), *Mycocalicium albonigrum*, *Chaenothecopsis savonica* (*Mycocaliciaceae*), *Sphinctrina turbinata* (*Sphinctrinaceae*), *Calicium adpersum*, *Cyphelium inquinans*, *Thelomma mammosum*, *Texasporium sancti-jacobi* (*Caliciaceae*). En nuestro estudio se incluyen secuencias que representan los cuatro géneros aceptados en la familia *Mycocaliciaceae*.

Los bancos de secuencias no disponen hasta el momento de ninguna secuencia del gen 28S ADNr de las familias integrantes del antiguo orden Caliciales. En esta tesis, se realiza la secuenciación de la mitad 5' del gen 28S ADNr de 20 especies, representantes de cuatro familias, *Mycocaliciaceae*, *Caliciaceae*, *Sphaerophoraceae* y *Coniocybaceae*, de las siete constituyentes del antiguo orden Caliciales. Se intentó, sin éxito, la amplificación y secuenciación de la región homóloga, en representantes de las familias *Microcaliciaceae*, *Sphinctrinaceae* y *Calycidiaceae* a partir de material de herbario.

En función de la secuencia del gen 28S ADNr, la familia *Mycocaliciaceae* se presenta como un grupo monofilético con un índice de soporte de 96% (Figura 3.14).

Nuestros estudios muestran una relación de proximidad genética (75%, 76%, 91%) entre representantes de la familia *Mycocaliciaceae* y *Coniocybaceae* (Figuras 3.14, 3.15, 3.16).

Nunca había sido sugerida una relación entre estas familias puesto que no existe una aparente relación morfológica. Sin embargo algunas observaciones podrían apoyar esta relación. En un estudio sobre la producción de anamorfos en cultivo realizado por Tibell (1993), observó que *Chaenotheca deludens* (*Coniocybaceae*) desarrolla anamorfos y synanamorfos similares a los observados en *Chaenothecopsis savonica* (*Mycocaliciaceae*) (Tibell, 1991b). Otro dato que apoya esta relación se basa en la producción de metabolitos secundarios comunes como es el ácido vulpínico y derivados (Tibell, 1984). Aunque esta sustancia se produce también en otros líquenes (*Letharia vulpina*, *Cyphelium spp.* *Lecanorales*).

Es necesario contrastar la relación filogenética entre las familias *Coniocybaceae* y *Mycocaliciaceae*, con el uso de nuevas regiones del genoma.

Si esta relación se confirma podríamos plantear la siguiente hipótesis respecto a las relaciones evolutivas entre estas familias:

Mycocaliciaceae es un familia de hongos no liquenizados, que procedería de ancestros liquenizados localizados en la familia *Coniocybaceae* o bien de un ancestro común a ambas. El punto inicial en esta relación se establecería entre los géneros *Chaenotheca* (*Coniocybaceae*) y *Chaenothecopsis* (*Mycocaliciaceae*), como consecuencia de una transición de hongo liquénico a liquenícola.

La información sobre la que se sustenta esta hipótesis procede los resultados obtenidos con el análisis del gen 28S ADNr expuestos en esta tesis, y en hipótesis planteadas en los trabajos de Tibell (1984) y Lutzoni et al. (2001).

Tibell (1984) propuso una tendencia evolutiva dentro de la familia *Mycocaliciaceae*, en la que tiene en cuenta caracteres morfológicos, como el carácter creciente en el tamaño de las esporas y número de septos, así como características ecológicas, desde una forma de vida liquenícola o sobre algas de vida libre hacia un parasitismo o saprofitismo sobre plantas vasculares. De forma que el género más primitivo sería *Chaenothecopsis* seguido de *Mycocalicium*, *Phaeocalicium* y *Stenocybe*.

Chaenothecopsis es un género constituido en gran parte por hongos liquenícolas sobre especies de *Chaenotheca* (Tibell, 1987a). La importancia de este dato en la construcción de la hipótesis evolutiva expuesta, reside en la comparación con la hipótesis planteada por Lutzoni

et al. (2001). Lutzoni propone a los hongos liquenícolas como puente en la transición hacia una "no-liquenización" secundaria. En su análisis filogenético realizado en función de porciones de secuencias de los genes 18S y 28S, se propone un origen antiguo para el proceso de liquenización, seguido de un mínimo de tres pérdidas del mismo. De esta forma, algunos de los hongos no liquenizados procederían de ancestros liquenizados, hipótesis apoyada por evidencias morfológicas (Rambold y Triebel , 1992).

A nivel molecular se ha intentado buscar los parientes cercanos de algunas especies liquenícolas (Sikaroodi et al., 2001), pero no se ha descrito ningún caso de relación genética entre el líquen y la especie liquenícola que lo parasita.

En este contexto, la relación *Coniocybaceae* - *Mycocaliciaceae* detectada mediante la secuencia del gen 28S, sería el primer caso descrito de relación genética entre una familia liquenizada y los hongos que la parasitan.

Sería muy interesante el estudio molecular de formas fósiles de *Chaenothecopsis* como es la especie hallada recientemente en ámbar, *Chaenothecopsis bitterfeldensis* (Rikkinen, 2000), muy semejante a otras especies resinícolas de *Chaenothecopsis* y *Mycocalicium*.

En cuanto al proceso de transición entre el líquen y el hongo liquenícola podríamos plantear otra hipótesis. El género *Chaenotheca* es especialmente sobresaliente por su capacidad de establecer asociaciones con grupos de algas muy distintos, como *Trebouxia* y *Trentepohlia*, además de *Dictyochloropsis* y *Stichococcus*. Esta capacidad podría residir en una variabilidad en los genes involucrados en los mecanismos de reconocimiento. Alguna variante podría resultar en una falta de reconocimiento del ficobionte y por lo tanto no se establecería la asociación, evolucionando hacia una forma de vida "intermedia", como parásito del líquen del que procede, para poder obtener de él las sustancias necesarias para su subsistencia. A partir de la forma liquenícola podrían evolucionar formas saprofitas de vida libre.

CONCLUSIONES

De los análisis realizados se obtienen las siguientes conclusiones:

- 1) La familia *Mycocaliciaceae* es monofilética según la filogenia obtenida a partir de las secuencias de los genes 18S y el fragmento 5' del gen 28S del ADN ribosómico.
- 2) La secuencia del gen 18S del ADN ribosómico muestra a los órdenes *Eurotiales* /*Onigenales* como los más cercanos al orden *Mycocaliciales*, con índices de soporte superiores a los descritos en la literatura hasta el momento.
- 3) La secuencia del fragmento 5' del gen 28S del ADN ribosómico muestra a la familia *Mycocaliciaceae* como un grupo monofilético junto con la familia liquenizada *Coniocybaceae*, con un porcentaje de soporte mínimo del 75%. Es la primera descripción de una relación genética entre estas dos familias.

DISCUSIÓN GENERAL

Sobre la familia *Mycocallicaceae*

El abordaje molecular de la familia *Mycocallicaceae* realizado en esta tesis, en función de las secuencias de los genes 18S y 28S ADNr, muestra que se trata de un grupo monofilético.

En cuanto a sus relaciones externas con otros taxones de Ascomycota, se establece una agrupación estable (18S) con *Sphinctrinaceae*, ya observada previamente (Wedin y Tibell, 1997), que dio lugar a la descripción del orden Mycocaliciales (Tibell y Wedin, 2000). La secuencia de un fragmento de 1250 pb del gen 28S ADNr muestra un agrupamiento con la familia *Coniocybaceae* (antiguo Caliciales, actualmente familia de posición incierta en Ascomycota). Para el establecimiento de esta relación se requiere el análisis de las secuencias de los genes 18S de representantes de *Coniocybaceae*, y 28S de representantes de *Sphinctrinaceae*, que actualmente se está desarrollando en el centro de Biología evolutiva del departamento de Botánica sistemática en la universidad de Uppsala.

Las relaciones internas entre los géneros que componen la familia son complejas. Los datos moleculares obtenidos, coinciden con los datos morfológicos recogidos por Tibell en sus numerosos trabajos (Tibell, 1975, 1978a, 1984, 1987a, 1994b, 1996, Tibell y Titov, 1995), puesto que no han sido suficientes para la delimitación de cada género. Los análisis de las secuencias de la mitad 5' del gen 28S ADNr en *Mycocallicaceae* muestran que los géneros *Chaenothecopsis* y *Mycocallicium* tal como se circunscriben actualmente no son monofiléticos. Se establecen relaciones entre especies con mayor o menor apoyo en datos morfológicos y de producción de metabolitos secundarios en cultivo.

En el nivel taxonómico de especie, el análisis de las secuencias de las regiones ITS, permiten la discriminación genética entre *M. subtile* y *M. albonigrum*, especies de muy complicada discriminación morfológica. La variabilidad en esta región para dos especímenes de *M. subtile* es suficiente como para proponerlos como especie nueva, a pesar de que morfológicamente se encuentran dentro del rango de valores descritos para la especie *M. subtile*. Sin embargo, su patrón de producción de compuestos es semejante al producido por *M. albonigrum*. Los estudios filogenéticos realizados con secuencias de las regiones ITS, 28S y 18S, muestran que los representantes de esta especie críptica se encuentran genéticamente más cercanos a *M. subtile* que a *M. albonigrum*.

Sobre las regiones del genoma y los métodos de inferencia filogenética empleados

Las regiones del genoma analizadas en esta Tesis son las correspondientes al ADN ribosómico, 18S, 28S, 5.8S y regiones intergénicas, según el nivel taxonómico en estudio.

El gen 18S ha sido hasta ahora el más estudiado y del que se tienen registradas un mayor número de secuencias. Esta es una de las razones por las que sigue siendo el gen de referencia en el estudio filogenético. Woese utilizó la secuencia nucleotídica de este gen en un gran número de especies de distintos reinos, para inferir el árbol filogenético de la vida (Woese et al, 1990).

La secuencia de este gen se emplea de forma habitual para la discriminación de especies bacterianas (Otsuka, 1998), lo que indica que su variabilidad en procariotas es mayor que en eucariotas, puesto que estos últimos suele emplearse para delimitar géneros y familias. Las diferencias en la tasa evolutiva de un gen en distintos taxones es importante a la hora de hacer filogenia, puesto que algunos programas están basados en el criterio del reloj molecular, es decir, que la molécula empleada tiene la misma tasa evolutiva en todos los individuos analizados. Si no es así los resultados filogenéticos obtenidos serán erróneos.

La velocidad de sustitución puede variar considerablemente para distintos organismos por distintas causas. Una de ellas es la diferencia en los tiempos de generación. Esto supone una mayor probabilidad de mutación en organismos con tiempos de generación más corto y por tanto con mayor número de replicaciones por año. La distinta eficiencia del sistema de reparación del ADN entre organismos es otra de las causas.

Del mismo modo pueden ocurrir otros efectos derivados de la presencia de tasas diferenciales de evolución en una molécula, como es la atracción de las ramas largas (long branch attraction). Este efecto se produce porque aquellas secuencias que presentan una variabilidad muy alta con respecto al grupo de secuencias analizadas (ramas largas significan elevado número de mutaciones) tienden a aparecer como monofiléticas.

En la secuencia de este gen se han basado análisis filogenéticos que comprenden representantes de todos los dominios de los organismos vivos (Olsen y Woese, 1993). Algunos ejemplos dentro del reino fungi, muestran que este gen se ha empleado en el establecimiento de la filogenia en el reino (Gargas et al., 1995a, en el phylum Ascomycota (Gargas et al., 1995b) en la determinación de clases (Beerbe y Taylor, 1992), órdenes (Tehler, 1995), familias (Beerbe et al., 1995), géneros (Eriksson y Strand, 1995), e incluso en especies (Wingfield et al., 1994).

El gen 28S ha sido hasta ahora explotado en menor medida que el 18S, sin embargo el estudio de su secuencia se ha visto incrementada en los últimos años para el establecimiento de relaciones filogenéticas en cepas de una misma especie (Peterson y Logrieco, 1991), especies (Masclaux et al., 1995, Littlewood y Johnston, 1995) y géneros (Rehner y Samuels, 1994, Moncalvo et al., 1995, Landvik, 1996, Kuldau et al, 1997).

Las regiones espaciadoras han sido empleadas para discriminar géneros (Momol y Kimbrough, 1994), especies (Curran et al, 1994, Yan et al, 1995, Kretzer et al, 1996, Kuhls et al, 1997) y cepas (O'Donnell, 1992, Neuvéglise et al, 1994).

Los genes ribosómicos cumplen una serie de condiciones (esencialidad, alto número de copias, distintos grados de conservación evolutiva, disponibilidad de secuencias en los bancos de datos) que los hacen adecuados para la inferencia de relaciones filogenéticas (Hillis y Dixon, 1991).

En las estimaciones filogenéticas se pueden dar dos tipos de errores, el error al azar y el error sistemático. El error al azar se produce cuando hay un número insuficiente de datos. La falta de secuencias de muchos organismos da lugar a inferencias filogenéticas con errores al azar, que producen agrupaciones poco estables. El error sistemático permanece incluso aumentando el número de datos o bien el número de taxones. Ocurre cuando se asumen premisas inadecuadas, o bien cuando se emplean secuencias que no se ajustan a las premisas establecidas en cada modelo (Smith, 1998). Las premisas constituyentes del modelo evolutivo que se asume en cada tipo de análisis filogenético pueden no ser ciertas en todas las ocasiones. Dos premisas que se asumen en la mayoría de los programas filogenéticos son:

Cada posición en la secuencia evoluciona independientemente.

Los distintos linajes evolucionan independientemente, es decir no acepta la existencia de fenómenos de transferencia horizontal o lateral de genes.

Sin embargo, los cambios en determinadas posiciones dentro del alineamiento no evolucionan independientemente, especialmente en el caso de genes que codifican para ARN con estructura secundaria (Smith, 1998). Se ha observado que la estructura secundaria de los genes ribosómicos está muy conservada, incluso mas que su secuencia, por lo que una mutación puntual ocurrida en una posición de un "stem" de estructura secundaria suele conllevar la mutación compensatoria en el nucleótido correspondiente para mantener constante esa conformación espacial importante en el mantenimiento de la funcionalidad del ribosoma. Se han realizado modelos de estructura secundaria de los genes ribosómicos para un conjunto de especies y, puesto que son estructuras muy

conservadas, se emplean estos modelos para extrapolar las estructuras de especies relacionadas (Neefs et al., 1993). De esta forma es posible analizar un alineamiento en virtud de su hipotética estructura secundaria y delimitar las zonas correspondientes a "stems" y a "loops". Esto permite realizar análisis por separado de cada tipo de nucleótidos o bien seleccionar un conjunto de nucleótidos en los que su evolución sea independiente. Por ejemplo eliminando una de las regiones apareadas en un "stem".

También hay que tener en cuenta que el ARN tiene una conformación terciaria que en muchos casos se desconoce y que puede dar lugar a cambios compensatorios en posiciones que consideramos independientes, cuando no lo son. Por otra parte las distintas moléculas de ARN que se ensamblan para construir el ribosoma, tienen puntos de interacción, por ejemplo el ARN 5,8S forma estructuras de doble cadena con algunas regiones del ARN 28S (Figura 10, pag. 16), estas regiones de ensamblaje tampoco serían zonas de evolución independiente.

La transferencia lateral de genes es un fenómeno que ha ocurrido y ocurre con mayor o menor frecuencia y que tiene una gran importancia en la deriva evolutiva de los organismos. Tanto es así que es probable que la historia de la vida no pueda ser representada con propiedad como un árbol, sino como una red (Doolittle, 1999). En un estudio destinado a evaluar la presencia de genes transferidos horizontalmente en *E. coli* se observó que se trata de un fenómeno abundante puesto que se encontraron 33 genes transferidos de una especie cercana de *Salmonella*. Los genes transferidos horizontalmente se diferencian de los propios por su distinto porcentaje de GC respecto del total del genoma y por sus diferencias en el uso de codones (Lawrence y Ochman, 1998). Para ello es necesario disponer de la secuencia completa del genoma del espécimen. La comparación de genomas completos permitirá un mayor conocimiento de los procesos evolutivos y una mejor clasificación de los organismos (Rivera et al., 1998).

Podría ocurrir transferencia lateral en el ADN ribosómico, como se ha descrito en *E. coli* (Nomura, 1999), sin embargo, lo esencial y ancestral de su función, junto con su interacción con proteínas y otros ARN con los que ha coevolucionado lo hacen menos proclive a sufrir este tipo de fenómenos (Doolittle, 1999).

Existen muchos otros genes en los que al igual que los constituyentes del ADN ribosómico son poco propicios para ser transferidos a otras especies, debido fundamentalmente a su esencialidad, como son los factores de elongación o la RNA polimerasa (Hirt et al., 1999), ambas igualmente válidas que el ADN ribosómico.

Las relaciones filogenéticas obtenidas mediante el análisis de ADN ribosómico son el punto de inicio y la referencia obligada para comenzar el estudio molecular de un taxón. Sin embargo hay que tener en cuenta que esta inferencia puede coincidir o no con la obtenida tomando como base la secuencia de otras moléculas que cumplan los requisitos de esencialidad y baja tasa de transferencia lateral.

Es arriesgado confiar en la filogenia obtenida a partir de la secuencia de un sólo gen, porque tendemos a extrapolar la filogenia de una molécula a la del organismo del que procede.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadjian V.** 1993. The Lichen Symbiosis. New York.
- Aragón G. y Martínez I.** 1997. Contribución al conocimiento de los líquenes epífitos de los montes de Toledo (Toledo, España). *Cryptogamie, Bryologie. Lichénologie.* 18:63-75.
- Barinaga M.** 1995. Origins of lichen fungi explored. *Science* 268:1437
- Berbee M.L.** 1996. Loculoascomycete origins and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 13:462-470.
- Berbee M.L. y Taylor J.W.** 1992. Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. *Molecular Biology and Evolution* 9:278-284.
- Berbee M.L., Yoshimura A., Sugiyama J. y Taylor J.W.** 1995. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 87:210-222.
- Bonar L.** 1971. A new *Mycocalicium* on scarred *Sequoia* in California. *Madroño* 21:62-69.
- Bruns T.D., White T.J. y Taylor J.W.** 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:525-564.
- Carbone I. y Kohn L.M.** 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacers of the *Sclerotiniaceae*. *Mycologia* 85:415-427.
- Carlile M.J.** 1994. Fungal Diversity. En: The fungi. Watkinson S.C. ed London... Harcourt Brace & Company. 39-52.
- Chambers C., Dutta S.K. y Crouch R.J.** 1986. *Neurospora crassa* ribosomal DNA: sequence of internal transcribed spacer and comparison with *N. intermedia* and *N. sitophila*. *Gene* 44:159-164.
- Culberson W.L.** 1986. Chemistry and sibling speciation in the lichen forming fungi: ecological and biological considerations. *Bryologist* 89:123-131.
- Culberson W.L. y Culberson C.F.** 1970. A phylogenetic view of chemical evolution in lichens. *Bryologist* 73:1-31.

- Curran J., Driver F., Ballard J.W.O. y Milner R.J.** 1994. Phylogeny of *Metarrhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 98:547-552.
- Daniel H.M., Sorrell T.C., Meyer W.** 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 51:1593-1606.
- DNASTAR** 1994. Lasergene Sequence Analysis Software for Macintosh and Windows.
- Doolittle W.** 1999. Phylogenetic, classification and the universal tree. *Science* 284:2124-2128.
- Eriksson O.E. y Hawksworth D.L.** 1993. Outline of the ascomycetes. *Systema Ascomycetum* 12:51-257.
- Eriksson O.E. y Strand A.** 1995. Relationships of the genera *Nephroma*, *Peltigera* and *Solorina* (*Peltigerales*, *Ascomycota*) inferred from 18S rDNA sequences. *Systema Ascomycetum* 14:33-39.
- Eriksson O.E.** (ed.) 2001. Outline of Ascomycota. *Myconet*.
- Eriksson O.E. y Winka K.** 1997. Supraordinal taxa of ascomycota. *Myconet* 1(1):1-16.
- Eriksson O.E. y Winka K.** 1998. Families and higher taxa of ascomycota. *Myconet* 1(2):17-24.
- Eriksson O.E.** 1999. Cultive of Ascomycota. *Myconet* 3:1-88.
- Farris J.S., Albert, V.A., Kaellerjo, M., Lipscomb, A. y Kluge A.G.** 1995. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12:99-124.
- Feige G.B. y Lumbsch H.T.** 1995. Some types of chemical variation in lichens. *Cryptogamic Botany* 5:31-35.
- Felsenstein J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum-likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17:368-376.
- Felsenstein J.** 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annual Reviews of Genetics* 22:521-565.
- Felsenstein J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package).

- Fernández F.A., Lutzoni F.M. y Huhndorf S.M.** 1999. Telemorph-anamorph connections: the new pyrenomycetous genus *Carpoligna* and its *Pleurothecium* anamorph. *Mycologia* 91:251-262.
- Forey P.L., Humphries C.J., Kitching I.J., Scotland R.W., Siebert D.J. y Williams D.M.** 1992. Cladistics: A practical course in systematics. Oxford University Press, New York.
- Frisvad J.C.** 1992. Chemometrics and chemotaxonomy: a comparison of multivariate statistical method for the evaluation of binary fungal secondary metabolite data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 14:253-269.
- Frisvad J.C.** 1994. Classification of organisms by secondary metabolites. En: Hawksworth D.L. ed. Wallingford: CAB International.
- Gams W., O'Donnell K., Schroers H.J., Christensen M.** 1998. Generic classification of some more hyphomycetes with solitary conidia borne on phialides. *Canadian Journal of Botany* 76:1570-1583.
- Gargas A., de Priest P.T., Grube M. y Tehler A.** 1995a. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268:1492-1495.
- Gargas A., de Priest P.T. y Taylor J.W.** 1995b. Positions of multiple Insertions in SSU rDNA of lichen -forming fungi. *Molecular Biology and Evolution* 12:208-218.
- Gargas A. y Taylor J.W.** 1992. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84:589-592.
- Gargas A. y Taylor J.W.** 1995. Phylogeny of discomycetes and early radiations of the apothecial Ascomycotina inferred from SSU rDNA sequence data. *Experimental Mycology* 19:7-15.
- Ginsburg M.** 1994. Sequence comparison. In: Bishop M.J. ed. Guide to Human Genome Computing. San Diego, Academic Press INC. 215-248.
- Grube M., de Priest P.T., Gargas A. y Haffelner J.** 1995. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research* 99:1321-1324.

- Guadet J., Julien J., Lafay J.F. y Brygoo Y.** 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology and Evolution* 6:227-242.
- Gutell R.R., Gray M.W. y Schnare M.N.** 1993. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Research* 21:3055-3074.
- Hackstein J.H.P.** 1997. Eukariotic molecular biodiversity: systematic approaches for the assesment of symbiotic associations. *Antoine van Leeuwenhoek* 72:63-76.
- Hafellner J.** 1988. Principles of classification and main taxonomic groups. In: Galun M. ed. *Handbook of lichenology*. Boca Ratón . Florida, CRC Press. 41-52.
- Hawksworth D.L.** 1976. Lichen chemotaxonomy. In: Brown D.H., D.L. Hawksworth and R.H. Bailey, eds. *Lichenology: Progress and Problems*. London, Academic Press. 139-184.
- Hawksworth D.L.** 1988. The fungal partner. In: Galun M. ed. *CRC Handbook of Lichenology*. 35-38.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. y Pegler D.N.** 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. CAB International, Wallingford.
- Hillis D.M. y Dixon M.T.** 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66:411-453.
- Hirt R.P., Logsdon J.M., Haely B., Dorey M.W., Doolittle W.F. y Embley T.M.** 1999. Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:580-585.
- Hutchison L.J.** 1987. Studies on *Phaeocalicium polyporaneum* in north America. *Mycologia* 79:786-789.
- Hyvarinen M., Halonen P. y Kauppi M.** 1992. Influence of stand age and structure on the epiphytic lichen vegetation in the middle-boreal forest of Finland. *Lichenologist* 24:165-180.
- Kretzer A., Li Y., Szaro T. y Bruns T.D.** 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* 88:776-785.

- Kuhls K., Lieckfeldt E., Samuels G.J., Meyer W., Kubicek C.P. y Börner T.** 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89:442-460.
- Kuldau G.A., Liu J.S., White J.F., Siegel M.R. y Schardl C.L.** 1997. Molecular systematics of *Clavicipitaceae* supporting monophyly of genus *Epichloë* and form genus *Ephelis*. *Mycologia* 89:431-441.
- Landvik S.** 1996. *Neolecta*, a fruit-body producing genus of the basal ascomycetes, as shown by SSU and LSU rDNA sequences. *Mycological Research* 100:199-202.
- Lawrence J.G. y Ochman H.** 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:9413-9417.
- Lewin B.** 2000. *Genes VII*. Oxford University Press, Oxford.
- Li W. y Graur D.** 2000. Molecular phylogeny. En: *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, INC. 99-135.
- Littlewood D.T. y Johnston D.A.** 1995. Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology* 111:167-175.
- Liu Y.J., Whelen S. y Hall B.D.** 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799-1808.
- Löfgren O. y Tibell L.** 1979. *Sphinctrina* in Europe. *Lichenologist* 11:109-137.
- Lumbsch H.T.** 2000. Phylogeny of filamentous ascomycetes. *Naturwissenschaften* 87:335-342.
- Lutzoni F.M., Pagel M. y Reeb V.** 2001. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411:937-940.
- Mantle P.G.** 1994. Secondary metabolites of some non-lichenized ascomycetes. In: Hawksworth D.L. ed. *Ascomycetes Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. New York, Plenum Press. 145-154.

- Masclaux F., Guého E., Hoog G.S. y Christen R.** 1995. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (*Xylohypha*) species inferred from partial LS rRNA sequences. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 33:327-338.
- Mitchell J.I., Roberts P.J. y Moss S.T.** 1995. Sequence or structure?. A short review on the application of nucleic acid sequences information to fungal taxonomy. *Mycologist* 9:67-75.
- Momol E.A. y Kimbrough J.W.** 1994. Phylogenetic analysis of selected genera of *Pezizales* inferred from 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 sequences. *Systema Ascomycetum* 13:1-12.
- Moncalvo J.M., Wang H.H. y Hseu R.S.** 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87:223-238.
- Möller A.** 1887. Ueber die Cultur flechtenbildender Ascomyceten ohne Algen. Tesis doctoral
- Möller E.M., Bahnweg G., Syermann H. y Geiger H.H.** 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20:6115-6116.
- Mullis K.B. y Fallona F.A.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350
- Musters W., Boon K., van der Sye C.A.F.M., van Heerikhuizen H. y Planta R.J.** 1990. Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO Journal* 9:3989-3996.
- Neefs J.M., van der Peer Y., de Rijk P., Chapelle S. y de Wachter R.** 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research* 21:3025-3049.
- Neuvéglise C., Brygoo Y., Vercambre B. y Riba G.** 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Baeuveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research* 98:322-328.
- Nomura M.** 1999. Engineering of bacterial ribosomes: Replacement of all seven *Escherichia coli* rRNA operons by a single plasmid-encoded operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:1820-1822.

- O'Donnell A.G., Goodfellow M. y Hawksworth D.L.** 1994. Theoretical and practical aspects of the quantitation of biodiversity among microorganisms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. B* 345:65-73.
- O'Donnell K.** 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Giberella pulicaris*). *Current Genetics* 22:213-220.
- O'Donnell K., Gherbawy Y., Schweigkofler W., Adler A., Prillinger H.** 1999. Phylogenetic analysis of DNA sequences and RAPD data compared in *Fusarium oxysporum* and related species from maize. *Journal of Phytopathology* 147:445-452.
- Ogawa H., Yoshimura A. y Sugiyama J.** 1997. Polyphyletic origins of the species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia* 89:756-771.
- Olsen G.J. y Woese C.R.** 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7:113-123.
- Otsuka S., Suba S., Li R., Watanabe M., Oyaizu H., Matsumoto S. y Watanabe M.M.** 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters* 164:119-124.
- Page R.D.M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Paquin B., Roewer I., Wang Z. y Lang B.F.** 1995. A robust fungal phylogeny using the mitochondrially encoded NAD5 protein sequence. *Canadian Journal of Botany* 73:S180-S185.
- Peterson S.W. y Logrieco A.** 1991. Ribosomal RNA sequence variation among interfertile strains of some *Gibberella* species. *Mycologia* 83:397-402.
- Poelt J.** 1969. Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. Cramer J. (Ed.).
- Poelt J.** 1973. Classification. En: *The lichens*. Ahmadjian V. and M.E. Hale, eds. New York, Academic Press. 599-632.
- Pramateftaki P.V., Antoniu P.P. y Typas M.A.** 2000. The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal of the gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region. *Fungal Genetic and Biology* 29:19-27.

- Rambold G. y Triebel D.** 1992. The Inter-lecanoralean associations. *Bibliotheca Lichenologica* 48.
- Raué H.A., Klootwijk J. y Musters W.** 1988. Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 51:77-129.
- Rehner S.A. y Samuels G.J.** 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyses from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98:625-634.
- Rikkinen J. y Poinar G.** 2000. A new species of resinicolous *Chaenothecopsis* (*Mycocaliciaceae*, Ascomycota) from 20 million year old bitterfeld amber, with remarks on the biology of resinicolous fungi. *Mycological Research* 104:7-15.
- Rivera M.C., Jain R., Moore J.E. y Lake J.A.** 1998. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:6239-6244.
- Rogers R.W.** 1989. Chemical variation and the species concept in lichenized ascomycetes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 101:229-239.
- Saitou N. y Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- Samuels G.J. y Buchanan D.E.** 1983. *Mycocalicium shefflerae* sp. nov., its ascal ultrastructure and *Phialophora* anamorph. *New Zealand Journal of Botany* 21:163-170.
- Samuels G.J. y Seifert K.A.** 1995. The impact of molecular characters on Systematics of filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 33:37-67.
- Santesson J.** 1973. Identification and isolation of lichen substances. En: *The Lichens* Ahmadjian V. and M.E. Hale, eds.. New York, Academic Press. 633-652.
- Sarrión F.J., Aragón G. y Burgaz A.R.** 1999. Studies on mazediate lichens and calicioid fungi of the Iberian peninsula. *Mycotaxon* 71:169-198.

Sarrión F.J., Martínez I. y Burgaz A.R. 1993. Líquenes epífitos de Sierra Madrona (Ciudad Real, España). *Cryptogamie, Bryologie Lichénologie*. 14:389-400.

Schmidt A. 1970. Anatomisch-taxonomische Untersuchungen an europäischen Arten der Flechtenfamilie *Caliciaceae*. *Mitt. Staatsinst. Allg. Bot. Hamburg* 13:111-166.

Sikaroodi M., Lawrey J.D., Hawksworth D.L. y de Priest P.T. 2001. The phylogenetic position of selected lichenicolous fungi: *Hobsonia*, *Illosporium*, and *Marchandiomyces*. *Mycological Research* 105:453-460.

Smith J.M. 1998. Reconstructing evolutionary history. En: *Evolutionary Genetics*. New York, Oxford University Press Inc, 299-306.

Spatafora J.W. 1995. Ascomal evolution of filamentous ascomycetes: evidence from molecular data. *Canadian Journal of Botany* 73:S811-S815.

Sreenivasaprasad S., Brown A.E. y Mills P.R. 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporoides*. *Mycological Research* 97:995-1000.

Stackebrandt E. y Rainey F.A. 1995. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.1.1. Kluwer Academic Publisher.

Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H. y Lewontin R.C. 1990. An introduction to genetic analysis. W. H. Freeman and Company, New York.

Swofford D.L., Olsen G.L., Waddell P.J. y Hillis D.M. 1996. Phylogenetic Inference. En: *Molecular Systematics*. Hillis D.M., C. Moritz and B.K. Mable, eds. Sunderland, Massachusetts, Sinauer. 407-509.

Taylor J.W., Swann E.C. y Berbee M.L. 1994. Molecular evolution of ascomycete fungi: Phylogeny and conflict. En: *Ascomycete Systematics*. Hawksworth D.L. ed.: Problems and Perspectives in the Nineties. New York, Plenum Press. 201-212.

Tehler A. 1995. Arthoniales phylogeny as indicated by morphological and rDNA sequence data. *Cryptogamic Botany* 5:82-97.

Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

- Tibell L.** 1975. The Caliciales of Boreal North America. *Symbolae Botanica Upsalienses* 21:1-128.
- Tibell L.** 1978b. The genus *Microcalicium*. *Botanical Notiser* 131:229-246.
- Tibell L.** 1978a. Comments on Caliciales exsiccatae. *Lichenologist* 10:171-178.
- Tibell L.** 1981. Comments on Caliciales exsiccatae II*. *Lichenologist* 13:51-64.
- Tibell L.** 1982. Caliciales of Costa Rica. *Lichenologist* 14:219-254.
- Tibell L.** 1984. A reappraisal of the taxonomy of *Caliciales*. *Beiheft 79 zur Nova Hedwigia* (Abstract)
- Tibell L.** 1987a. Australasian Caliciales. *Symbolae Botanica Upsalienses* 27:1-276.
- Tibell L.** 1987b. Typification of names of infrageneric taxa described by Acharius and placed by him in Caliciales. *Annales Botanici Fennici* 23:257-280.
- Tibell L.** 1990. Anamorphs in *Mycocalicium albonigrum* and *M.subtile*. *Nordic Journal of Botany* 10:221-242.
- Tibell L.** 1991a. Crustose lichens as an indicator of forest continuity in boreal coniferous forest. *Nordic Journal of Botany* 12:427-450.
- Tibell L.** 1991b. The *Asterophoma* anamorph of *Chaenothecopsis savonica* and its phycomycetous synanamorph. *Canadian Journal of Botany* 69:2427-2433.
- Tibell L.** 1991c. Some taxa of Caliciales described by W. Nylander. *Annales Botanici Fennici* 28:117-121.
- Tibell L.** 1992. The anamorphs of *Chaenothecopsis viridireagens*. *Nordic Journal of Botany* 13:331-335.
- Tibell L.** 1993. The anamorphs of *Chaenotheca deludens*. *Nordic Journal of Botany* 13:441-445.
- Tibell L.** 1994a. Distribution patterns and dispersal strategies of Caliciales. *Botanical Journal of the Linnean Society* 116:159-202.

- Tibell L.** 1994b. *Caliciales, Graphidales and Teloschistales*. In: Hawksworth D.L. ed. *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. New York, Plenum Press.
- Tibell L.** 1995. The anamorph of *Chaenothecopsis debilis*. *Mycologia* 87:245-252.
- Tibell L.** 1996. *Phaeocalicium* in northern Europe. *Annales Botanici Fennici* 33:205-221.
- Tibell L. y Constantinescu O.** 1991. *Catenomyopsis rosea* gen. et sp. nov (Hyphomycetes), anamorph of *Chaenothecopsis haematopus*. *Mycological Research* 95:556-560.
- Tibell L. y Titov A.** 1995. Species of *Chaenothecopsis* and *Mycocalicium* (Caliciales) on exudate. *The Bryologist* 98:550-560.
- Tibell L. y Wedin M.** 2000. Mycocaliciales, a new order for nonlichenized calicioid fungi. *Mycologia* 92: 577-581.
- Ueno J., Sawy M. y Ishii K.** 1975. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology* 30:4-9.
- van Nues R.W., Venema J., Rientjes J.M.J., Dirks-Mulder A. y Raué H.A.** 1995. Processing of eucaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. *Biochemistry and Cellular Biology* 73:789-801.
- Vilgalys R. y Hester M.** 1990. Rapid identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238-4246.
- Vinuesa M.A., Sanchez-Puelles J.M. y Tibell L.** 2001. Intraspecific variation in *Mycocalicium subtile* (*Mycocaliciaceae*) elucidated by morphology and the sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA. *Mycological Research* 105:323-330.
- Vobis G.** 1980. Bau und Entwicklung der Flechten-Pycnidien und ihrer Conidien. *Bibliotheca Lichenologica* 14: 1-141.
- Wedin M.** 1992. Taxonomic and distributional notes on the genus *Sphaerophorus* (Caliciales) in the Southern hemisphere. *Lichenologist* 24:119-131.

- Wedin M.** 1993. A phylogenetic analysis of the lichen family *Sphaerophoraceae* (Caliciales); a new generic classification and notes on character evolution. *Plant Systematics and Evolution* 187:213-241.
- Wedin M.** 1995. The lichen family *Sphaerophoraceae* (Caliciales, Ascomycotina) in temperate areas of the Southern Hemisphere. *Symbolae Botanica Upsalienses* 31:1-102.
- Wedin M., Tehler A. y Gargas A.** 1998. Phylogenetic relationships of *Sphaerophoraceae* (Ascomycetes) inferred from SSU rDNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* 209:75-83.
- Wedin M. y Tibell L.** 1991. Two new species of *Sphaerophorus* (Caliciales) from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 29:287-293.
- Wedin M. y Tibell L.** 1997. Phylogeny and evolution of *Caliciaceae*, *Mycocaliciaceae*, and *Sphinctrinaceae* (Ascomycota), with notes on the evolution of the prototunicate ascus. *Canadian Journal of Botany* 75:1236-1242.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B. y Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds.. San Diego , California 92101, Academic Press, INC. 315-322.
- Wingfield B.D., Grant W.S., Wolfaardt J.F. y Wingfield M.J.** 1994. Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis* sensu stricto. *Molecular Biology and Evolution* 11:376-383.
- Winka K., Eriksson O.E. y Bang A.** 1998. Molecular evidence for recognizing the *Chaetothyriales*. *Mycologia* 90: 822-830.
- Woese C.R., Kyler O. y Wheelis M.L.** 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87:4576-4579.
- Yan Z.H., Rogers S.O. y Wang C.J.K.** 1995. Assesment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. *Mycologia* 87:72-83.

Anexo 1

Figura 1.2. Secuencias alineadas de la región ITS1-5.8S-ITS2 entre los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 de los 29 especímenes analizados. La secuencia consenso se muestra sobre el alineamiento. Los guiones designan los “gaps” que han sido introducidos para permitir el alineamiento. Las columnas en negro indican posiciones invariables. Los colores azul, verde y rojo muestran un gradiente de menor a mayor variabilidad. Sobre la secuencia consenso se numeran las posiciones de alineamiento, apareciendo un número cada veinte nucleótidos y un asterisco cada cinco nucleótidos.

PileUp

mshmarreglado con 26mshm, 25mshm, 24mshm, 23mshm, 22mshm, 21mshm
eliminando las columnas con gaps de donde hemos eliminado regiones ambiguas

GDC ***** GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor *****
GDC 010967019000080000400000ff008040ff00000fffffffffffffffffffffffff
GDC ff000000000000f43f000000000000f43f000000000000f03f0000000000
GDC 00f03f00A000000000190000cA54696d6573204e657720526f6d616e00A0
GDC 032000d00000000000000000000284d70752c0d0a437030323532322c0
GDC d0a436e30323038332c0d0a4d737031373630342c0d0a4d7370303039373
GDC 52c0d0a4d76696330303032312c0d0a4d4131393033382c0d0a4d4130323
GDC 038382c0d0a4d4130323038392c0d0a4d4130323038372c0d0a4d5330313
GDC 839362c0d0a4d5330323137332c0d0a4d5332313032302c0d0a4d5331363
GDC 338382c0d0a4d5330313833392c0d0a4d5331363230372a2c0d0a4d53303
GDC 33835302c0d0a4d5330313930342c0d0a4d5331373336312c0d0a4d53323
GDC 03533392c0d0a4d5332303039332c0d0a4d5330323530342c0d0a4d53323
GDC 13030332c0d0a4d5330363734372c0d0a4d5330303030312a2c0d0a4d533
GDC 0333833322c0d0a4d5330313136312c0d0a4d5331393331392c0d0a4d533
GDC 137393133293b0d0a00ABAACAAA0000002a000500040001B20AAA000a203
GDC a2000203a2000000000000000594000000000000000000000c505800000f
GDC fff00004758000ff00ff000041475358000000ffffff0056434147444e5
GDC 3545058000ff00ffff00484b525800ff00000000ff454458000ff00000
GDC 0ff484b5245445800ffffff0000ff48524551444e425a5800ff000000ff0
GDC 05957484b524551444e5354425a5800000000ff00494c56415800ff000
GDC 0808080465957485800000ff808080494c564341474d465957485450580
GDC 0ffffff000000c505800000000000004758000000000000414347535
GDC 80000000000000564147444e535450580000000000000484b52580000
GDC 00000000454458000000000000000484b52454458000000000000048524
GDC 551444e425a5800000000000000435957484b524551444e5354425a5800
GDC 0000000000494c5641580000000000000465957485800000000000004
GDC 94c564341474d4659574854505800000000000000300ffffff0000000f
GDC fffff8080800000000c0c0c00000ABBBBBBBBBBBBB00ff00A001d00010
GDC 001000100010001000100010001000100010001000100010001000100010
GDC 001000100010001000100010001000100010001000100010001A0018AB00
GDC 00000000000000000000003A00ff00A00000000008056400000000008051
GDC 4000000000000049400000020000000000001440A0000000098b20c41000
GDC 000001025064100000000189806410000000078b10b4100AAABB00005374
GDC 616e646172640046464c4c5353535359592a2a43432a574c4c4c4c505050
GDC 5048485151525252524949494d545454544e4e4b4b535352525656565641
GDC 4141414444454547474747002d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d
GDC 2d
GDC 00
GDC 00300000
GDC 0000000BBAB001d000
GDC 000000000000020117B00000000000594000000000000544000000000
GDC 00004e4000DAAB000000ffffff03020141470000ff00ff00000243545500
GDC ff000000ff00020147430000ff00ff00000241545500ff000000ff000501
GDC 4100000000ff000002430000000000ff00035455000000000000ff044700
GDC 000000ffff00054e5800ffffff0000000000000000Affffff80808000A

1.2.msf MSF: 539 Type: N December 26, 2001 20:32 Check: 9701 ..

Name	Len	Check	Weight
Mpu	539	4067	1.00
Cp02522	539	2618	1.00
Cn02083	539	2903	1.00
Msp17604	539	6840	1.00
Msp00975	539	8948	1.00
Mvic00021	539	4941	1.00
MA19038	539	8182	1.00

Name: MA02088	Len: 539	Check: 8182	Weight: 1.00
Name: MA02089	Len: 539	Check: 8229	Weight: 1.00
Name: MA02087	Len: 539	Check: 9132	Weight: 1.00
Name: MS01896	Len: 539	Check: 506	Weight: 1.00
Name: MS02173	Len: 539	Check: 7271	Weight: 1.00
Name: MS21020	Len: 539	Check: 2033	Weight: 1.00
Name: MS16388	Len: 539	Check: 2033	Weight: 1.00
Name: MS01839	Len: 539	Check: 2033	Weight: 1.00
Name: MS16207*	Len: 539	Check: 1336	Weight: 1.00
Name: MS03850	Len: 539	Check: 1291	Weight: 1.00
Name: MS01904	Len: 539	Check: 2183	Weight: 1.00
Name: MS17361	Len: 539	Check: 9194	Weight: 1.00
Name: MS20539	Len: 539	Check: 1574	Weight: 1.00
Name: MS20093	Len: 539	Check: 8857	Weight: 1.00
Name: MS02504	Len: 539	Check: 8857	Weight: 1.00
Name: MS21003	Len: 539	Check: 9011	Weight: 1.00
Name: MS06747	Len: 539	Check: 8262	Weight: 1.00
Name: MS00001*	Len: 539	Check: 29	Weight: 1.00
Name: MS03832	Len: 539	Check: 14	Weight: 1.00
Name: MS01161	Len: 539	Check: 965	Weight: 1.00
Name: MS19319	Len: 539	Check: 7335	Weight: 1.00
Name: MS17913	Len: 539	Check: 2875	Weight: 1.00

//

	1				50
Mpu	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGC..	.GGGTCCCT
Cp02522	TTC.TCAGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTG...	AGGGTCC...
Cn02083	TTCGTATGTG	AGC.TGCGGC	AGGATCATT	CCGAGTGTT.	.GGGTCC...
Msp17604	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGCT.	.GGGTCC...
Msp00975	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGCT.	.GGGTCC...
Mvic00021	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	GGGATCATT	CCGAGCG...	AGGGCCCC.
MA19038	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGGCCACCG.
MA02088	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGGCCACCG.
MA02089	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGGCCACCG.
MA02087	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGGCCACCG.
MS01896	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGCC...T
MS02173	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTA	AGGGCC...T
MS21020	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS16388	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS01839	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS16207*	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS03850	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS01904	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS17361	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGCCC	AGGGTC...T
MS20539	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS20093	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS02504	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS21003	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS06747	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS00001*	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS03832	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T
MS01161	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGCC...T
MS19319	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTGTTT	AGGGCC...T
MS17913	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC...T

	51				100
Mpu	TCGTGGGACC	CAACCTCCC.	ACCCG.TGAT	TATTGTACCT	...CCTGTT
Cp02522	TCGT.GG.CC	CAACCTCCA.	ACCCACTG..	...TTTACCT	GT.CCTTGTT
Cn02083	TCCGGGG.CC	CGATCTCCC.	ACCCTCTG..	...CGTATCT	GT.CTTTGTT
Msp17604	TCCGGGG.CC	CGACCTCCC.	ACCCTGTG..	...CGTACTT	GT.CCAGTTT

Msp00975 TCCGGGG.CC CGACCTCCC. ACCCTGTG.. . . .CGTACTT GT.CCACGTT
Mvic00021GGG.CC CGACCTCTCA ACCCCATG.. . . .TTGCCC GA.CACTGTT
MA19038GGG.CC CGCTCTCCC. ACCCCATG.. . . .TGTACCC GT.CCATGTT
MA02088GGG.CC CGCTCTCCC. ACCCCATG.. . . .TGTACCC GT.CCATGTT
MA02089GGG.CC CGCTCTCCC. ACCCCATG.. . . .TGTACCC GT.CCATGTT
MA02087GGG.CC CGCTCTCCC. ACCCCATG.. . . .TGTACCC GT.CCATGTT
MS01896 TC..GGG.CC CAACCTCCC. ACCCCATG.. . . .TGTATTT GT.CCACGTT
MS02173 TC..GGG.CC CGACCTCTC. ACCCCCTG.. . . .TGTACCC GT.CCACGTT
MS21020 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS16388 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS01839 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS16207* TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS03850 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS01904 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS17361 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS20539 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACTA AAACCATGTT
MS20093 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS02504 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS21003 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS06747 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS00001* TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS03832 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TCTACCA AA.CCATGTT
MS01161 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS19319 CC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT
MS17913 TC..GGG.CC CGACCTCCA. ACCCTTTG.. . . .TATACCA AA.CCATGTT

101

150

Mpu GCTTCGGCGC GGCCCGCCGG AGACATCTTC TCGAACGCTG T.TGCTGTCT
Cp02522 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG AGGATACCTT CAAACTCGTT T.TGTCGTCT
Cn02083 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGATCTGTGC CAAACTCTTG T.TGTCGTCT
Msp17604 GCTTCGGCGG GGTCCGCCGG AGAT.. .ATC TAAACTCTGA A.TGCCGTCT
Msp00975 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG AGACC.. .ATC TAAACTCTGA A.TGCCGTCT
Mvic00021 GCCTCGGGGG CGCCCCCGGT GGACC.. .GT TAAACTCTGC ATTGC.GTCC
MA19038 GCTTCGGCGA GGCCCGCCGG GGACCC.GAT TAAACCCTGG T.TGCCGTCT
MA02088 GCTTCGGCGA GGCCCGCCGG GGACCC.GAT TAAACCCTGG T.TGCCGTCT
MA02089 GCTTCGGCGA GGCCCGCCGG GGACCC.GAT TAAACCCTGG T.TGCCGTCT
MA02087 GCTTCGGCGA GGCCCGCCGG GGACCC.GAT TAAACCCTGG T.TGCCGTCT
MS01896 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGATCT.GTC CAA.CCCTGA A.TGTCGTCT
MS02173 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGATCT.GTG CAA.CCC..A A.TGTCGTCT
MS21020 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS16388 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS01839 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS16207* GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS03850 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS01904 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTGT T.TGATGTCT
MS17361 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS20539 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT C.TGATGTCT
MS20093 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS02504 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS21003 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS06747 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS00001* GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAT CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS03832 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS01161 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAA CAAACCCTAT T.TGATGTCT
MS19319 GCTTCGGCGG GGCCCGCCGG GGACCA.AAC CAAACC.TGT T.TGATGTCT
MS17913 GCTTCGGCGA GGCCCGCCGA GGACCA.AAC CAAACCCTTT T.TGATGTCT

151

200

Mpu GAG.TAAACA TACCAAATCG G..TTAAAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG
Cp02522 GAGCGATGAG AAA.AAAAAT GAATCAAAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG
Cn02083 GAG.TGAGAT TAGCGAATCA AAACATAAAC TTTCAACAAC GGGTCTCTTG

Msp17604	GAG.TATGAT	TAT.CAATCA	AAA.TAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
Msp00975	GAG.TATGAT	TAT.CAATCA	AAA.TAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
Mvic00021	GAG.TCAAAT	GAT.AAATCA	A..TCAAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MA19038	GAG.TATTCT	AGC.GAATCT	AAAATAAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MA02088	GAG.TATTCT	AGC.GAATCT	AAAATAAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MA02089	GAG.TATTCT	AGC.GAATCT	AAAATAAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MA02087	GAG.TATTCT	AGC.GAATCT	AAAATAAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS01896	GAG.TATTCT	AGC.GAATCT	AAA.TAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS02173	GAG.TATTCT	AGC.GAATCT	AAA.TAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS21020	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS16388	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS01839	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS16207*	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS03850	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS01904	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS17361	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS20539	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS20093	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS02504	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS21003	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS06747	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS00001*	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS03832	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS01161	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	AA.TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS19319	GAGCGATTTT	AAC.GAATCA	AAACTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
MS17913	GAGCGATTCT	AGC.GAATTA	A..TTAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG

201

250

Mpu	GTTCCGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
Cp02522	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
Cn02083	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
Msp17604	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
Msp00975	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
Mvic00021	GTTCTGG.AT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MA19038	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MA02088	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MA02089	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MA02087	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS01896	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS02173	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCKAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS21020	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS16388	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS01839	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS16207*	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS03850	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS01904	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS17361	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS20539	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS20093	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS02504	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS21003	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS06747	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS00001*	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS03832	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS01161	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS19319	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
MS17913	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT

251

300

Mpu	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
Cp02522	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG

Cn02083	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCTCTGG
Msp17604	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCTCTGG
Msp00975	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCTCTGG
Mvic00021	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCTCTGG
MA19038	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MA02088	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MA02089	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MA02087	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS01896	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS02173	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS21020	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS16388	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS01839	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS16207*	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS03850	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS01904	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS17361	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS20539	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS20093	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS02504	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS21003	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS06747	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS00001*	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS03832	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS01161	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS19319	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG
MS17913	GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG

301

350

Mpu	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TCCGAGCGTC	ATTACTGCCC	CTCAAGCGCG
Cp02522	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTATCAACC	CTCAAGCTCA
Cn02083	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCACG
Msp17604	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ANTAACACCC	CTCAAGCGCG
Msp00975	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
Mvic00021	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTCA . CCA	CTCCAGCCTG
MA19038	CATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MA02088	CATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MA02089	CATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MA02087	CATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS01896	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCTCG
MS02173	CATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TCCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCACG
MS21020	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS16388	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS01839	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS16207*	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS03850	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS01904	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS17361	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS20539	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCGCG
MS20093	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCCG
MS02504	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCCG
MS21003	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCYG
MS06747	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCCG
MS00001*	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCCG
MS03832	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCCG
MS01161	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCT	CTCAAGCCCG
MS19319	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCACG
MS17913	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTAACACCC	CTCAAGCCCG

351

400

Mpu	GCTTGTGTGT	TGGGCCGCCG	CGGG . GGGAC	GGGCCCGAAA	GGCAGTGCCG
-----	------------	------------	--------------	------------	------------

Cp02522 GCTTG.TTGT TGGGTCCGGG CCGG.GGGAC CGGCCCGCAA GTCAGTGACG
Cn02083 GCTTG.CACT TGGGC.CCGG CCCC.GGGAC CCGCCTCAAA GACGGTGACG
Msp17604 GCTTG.CAGT TGGGC.CCGG CCCC.GGGAC CCGCCTCGAA ATCGGTGACG
Msp00975 GCTTG.CAGT TGGGCTCCGG CCCC.GGGAC CCGCCTCAAA ATCGGTGACG
Mvic00021 GCTGG.GTAT TGGGCGTCGC CGCGTCGG.C GCGCCCCAAT GTCTCCGGCT
MA19038 GCTTG.CGGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTGAAA AGCAGTGACG
MA02088 GCTTG.CGGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTGAAA AGCAGTGACG
MA02089 GCTTG.CGGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGC.TGAAA AGCAGTGACG
MA02087 GCTTG.CGGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTGAAA AGCAGTGACG
MS01896 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTGAAA ACCAGTGACG
MS02173 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTGAAA ATCAGTGACG
MS21020 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS16388 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS01839 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS16207* GCTTG.CAAT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS03850 GCTTG.CAAT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS01904 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS17361 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ACCAGTGACG
MS20539 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTTAAA ATCAGTGACG
MS20093 GCTTG.CAGT TGGGCGCCGT CGGG.CGGAC GCGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS02504 GCTTG.CAGT TGGGCGCCGT CGGG.CGGAC GCGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS21003 GCTTG.CAGT TGGGCGCCGT CGGG.CGGAC GCGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS06747 GCTTG.CAGT TGGGCGCCGT CGGG.CGGAC GCGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS00001* GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GCGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS03832 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GCGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS01161 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS19319 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTCAAA ATCAGTGACG
MS17913 GCTTG.CAGT TGGGCGTCGT CGGG.CGGAC GTGCCTCAAA ATCAGTGACG

401

450

Mpu GCNCCGCGTC CGGTCCCTCGA GCGTATGG.G GCTT...GTC ACCCGCTCAG
Cp02522 ..GCCCGGAC CGTTCTCC.A GCGTAGTACA GACTTG.ATC TCCCGCTG.A
Cn02083 ..GTCGTGTT CGATCCCA.A GCGCAGTA.A GATTCAAATC GTC.GCTT.C
Msp17604 ..GTCGTGTT CGATCTCA.A GCGCAGTA.A GGTTCAAATC GTC.GCTT.C
Msp00975 ..GTCGTGTT CGATCTCA.A GCGCAGTA.A GATTCAAATC GTC.GCTT.C
Mvic00021 GAGCCGT... CCGTCTCAAA GCGTTGTG.G CAACTCAATC .C.GCTT.G
MA19038 ..GCCGTGCC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCCGCATC ATC.GCTT.T
MA02088 ..GCCGTGCC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCCGCATC ATC.GCTT.T
MA02089 ..GCCGTGCC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCCGCATC ATC.GCTT.T
MA02087 ..GCCGTGCC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCCGCATC ATC.GCTT.T
MS01896 ..GCCGCGTT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS02173 ..GCTTCGTT TGGCCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS21020 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS16388 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS01839 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS16207* ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCTCAATC ATC.GCTT.C
MS03850 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCTCAATC ATC.GCTT.C
MS01904 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS17361 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS20539 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS20093 ..ACCGTGGC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS02504 ..ACCGTGGC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS21003 ..ACCGTGGC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS06747 ..ACCGTGGC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATCTCAATC ATC.GCTT.C
MS00001* ..ACCGTGGC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS03832 ..ACCGTGGC CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS01161 ..GCCGTGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS19319 ..GCCGCGGT CGGTCCCC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.C
MS17913 ..GCCGCGGT CGATCCTC.A GCGTAGTA.C GATTTCAATC ATC.GCTT.T

451

500

Mpu	T.AGGTC.GG	GCCGGGG...	CCTTTGCCCT	CGGTTGACCT	CGGATCAGGT
Cp02522	T.GGGAA.CG	GCCCCGTGTG	CCGGCAGCCC	CGATTGACCT	CGGATCAGGT
Cn02083	C.GGGTC.GG	GCGCGGGG..	CCGGTCAACA	AGGTTGATCT	CGGCTCAGGT
Msp17604	C.GGGTCCGG	GCCTGCA...	CCGGTCAGCA	AGGTTGACCT	CGGATCAGGT
Msp00975	CAGGGTC.GG	GCCCCGA...	CCGGTCAGCA	AGGTTGACCT	CGGATCAGGT
Mvic00021	T.GGGAC.GC	G.....	TCGGTTCGAC	GGGTTGACCT	CGGATCAGGA
MA19038	C.GGGTC.GG	GCGCCGTG..	CCGGTCAGAA	.GGTTGACCT	CGGATCAGGT
MA02088	C.GGGTC.GG	GCGCCGTG..	CCGGTCAGAA	.GGTTGACCT	CGGATCAGGT
MA02089	C.GGGTC.GG	GCGCCGTG..	CCGGTCAGAA	TGGTTGACCT	CGGATCAGGT
MA02087	C.GGGTC.GG	GCGCCGTG..	CCGGTCAGAA	TGGTTGACCT	CGGATCAGGT
MS01896	C.GGGTC.GG	ACGGGCG...	CCGGTCAAAA	CGGTTGACCT	CGGATCAGGT
MS02173	C.GGGTC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAAAA	CGGTTGACCT	CGGATCAGGT
MS21020	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS16388	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS01839	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS16207*	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS03850	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS01904	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS17361	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS20539	G.GGGCC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS20093	G.GGGTC.GG	GCGCGCG...	CCGGTCAAAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS02504	G.GGGTC.GG	GCGCGCG...	CCGGTCAAAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS21003	G.GGGTC.GG	GCGCGCG...	CCGGTCAAAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS06747	G.GGGTC.GG	GCGCGCG...	CCGGTCAAAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS00001*	G.GGGTC.GG	GCGCGCG...	CCGGTCAAAA	A.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS03832	G.GGGTC.GG	GCGCGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS01161	C.GGGTC.GG	GCACGCGA...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS19319	G.GGGCC.GG	GCGGGCG...	CCGGTCAGAA	.GTTGACCT	CGGATCAGGT
MS17913	C.GGGTC.GG	GCGTGCG...	CCGGTCAAAA	CGGTTGACCT	CGGATCAGGT

501

539

Mpu	AGGGATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
Cp02522	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
Cn02083	AGGGATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAATGCGNN
Msp17604	AGGGATACCC	G.TGAA..TA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
Msp00975	AGGGATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
Mvic00021	TGGGATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MA19038	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MA02088	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MA02089	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MA02087	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS01896	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS02173	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS21020	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS16388	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS01839	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS16207*	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS03850	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	ANCATATCAA	NAAGCGGAG
MS01904	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS17361	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS20539	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS20093	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS02504	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS21003	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS06747	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS00001*	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS03832	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS01161	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS19319	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG
MS17913	AGGAATACCC	GCTGAACTTA	AGCATATCAA	TAAGCGGAG

PileUp

```
GDC ***** GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor *****
GDC 010903019000080000000000ff008040ff0000ffffffffffffffffffffffff
GDC ff000000000000f03f000000000000f03f000000000000f03f0000000000
GDC 00f03f00A000000000190000cA54696d6573204e657720526f6d616e00A0
GDC 0320002000000000000000000000601444e000245510003535400044b520
GDC 005465957000064c49564d00284d4131393033382c0d0a4d4130323038382
GDC c0d0a4d4130323038392c0d0a4d4130323038372c0d0a4d5330313833392
GDC c0d0a4d5332313032302c0d0a4d5331363338382c0d0a4d5331363230372
GDC c0d0a4d5330333835302c0d0a4d5330313930342c0d0a4d5331373336312
GDC c0d0a4d5332303533392c0d0a4d5332303039332c0d0a4d5330323530342
GDC c0d0a4d5332313030332c0d0a4d5330363734372c0d0a4d5330303030312
GDC c0d0a4d5330333833322c0d0a4d5330313136312c0d0a4d5331393331392
GDC c0d0a4d5331373931332c0d0a4d5330313839362c0d0a4d5330323137332
GDC c0d0a53503032343438293b0d0a00ABAADAAA0000002a000500040001B20
GDC AAA000a203a2000203a20000000000000000594000000000000000000c5
GDC 058000000ffff000047580000ff00ff000041475358000000ffff00564
GDC 34147444e53545058000ff00ffff00484b525800ff00000000ff4544580
GDC 000ff000000ff484b5245445800ffff0000ff48524551444e425a5800f
GDC f000000ff005957484b524551444e5354425a580000000000ff00494c564
GDC 15800ff00008080804659574858000000ff808080494c564341474d46595
GDC 74854505800ffff000000c5058000000000000047580000000000000000
GDC 041434753580000000000000564147444e53545058000000000000484
GDC b525800000000000004544580000000000000484b524544580000000000
GDC 0000048524551444e425a5800000000000000435957484b524551444e535
GDC 4425a580000000000000494c56415800000000000000465957485800000
GDC 00000000494c564341474d4659574854505800000000000000300fffff
GDC f00000000fffff8080800000000c0c0c00000ABBBBBBBBBBBBBB00ff00
GDC A00180001000100010001000100010001000100010001000100010001000
GDC 10001000100010001000100010001000100010001A0018AB000000000000
GDC 00000000003A00ff00A000000000080564000000000080514000000000
GDC 000049000002000000000001440A0000000098b20c410000000010250
GDC 6410000000018980641000000078b10b4100AAABB00005374616e646172
GDC 640046464c4c5353535359592a2a43432a574c4c4c4c5050505048485151
GDC 525252524949494d545454544e4e4b4b5353525256565656414141414444
GDC 454547474747002d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d4d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d00BBBBB000000000000001800000000000000
GDC 000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 00000000000000000000000003000000000000BBAB001800000000000000
GDC 0000000000000000000000000000000000201b7B00000000000059400000
GDC 000000005440000000000004e4001DAAB000000ffff0302014445484b
GDC 524e5153540000ff00ff0000024c49564d4659574147435000ff000000ff
GDC 0004014445484b520000ff00ff0000024e5153540000ff00ff8000034c49
GDC 564d46595700ff000000ff0004414700ff00000800008014445000ff00
GDC ff000002484b5200ffffffffff0000034e510000ff00ff800004535400ffff
GDC ffff8000054c495600ff000000ff000646595700ffff00ff0007414700
GDC ff000008000084d4300ffff0080000000000000Affffff80808000A
```


Name: MA19038	Len: 613	Check: 9007	Weight: 1.00
Name: MA02088	Len: 613	Check: 9007	Weight: 1.00
Name: MA02089	Len: 613	Check: 8787	Weight: 1.00
Name: MA02087	Len: 613	Check: 869	Weight: 1.00
Name: MS01839	Len: 613	Check: 6974	Weight: 1.00
Name: MS21020	Len: 613	Check: 6974	Weight: 1.00
Name: MS16388	Len: 613	Check: 6974	Weight: 1.00
Name: MS16207*	Len: 613	Check: 6259	Weight: 1.00
Name: MS03850	Len: 613	Check: 6229	Weight: 1.00
Name: MS01904	Len: 613	Check: 7316	Weight: 1.00
Name: MS17361	Len: 613	Check: 3717	Weight: 1.00
Name: MS20539	Len: 613	Check: 6664	Weight: 1.00
Name: MS20093	Len: 613	Check: 1406	Weight: 1.00
Name: MS02504	Len: 613	Check: 1406	Weight: 1.00
Name: MS21003	Len: 613	Check: 2396	Weight: 1.00
Name: MS06747	Len: 613	Check: 1015	Weight: 1.00
Name: MS00001*	Len: 613	Check: 2972	Weight: 1.00
Name: MS03832	Len: 613	Check: 2362	Weight: 1.00
Name: MS01161	Len: 613	Check: 3525	Weight: 1.00
Name: MS19319	Len: 613	Check: 568	Weight: 1.00
Name: MS17913	Len: 613	Check: 8597	Weight: 1.00
Name: MS01896	Len: 613	Check: 6860	Weight: 1.00
Name: MS02173	Len: 613	Check: 3500	Weight: 1.00
Name: SP02448	Len: 613	Check: 3187	Weight: 1.00

//

1

50

MA19038	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGG..CC...
MA02088	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGG..CC...
MA02089	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGG..CC...
MA02087	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTTCTG	TGG..CC...
MS01839	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS21020	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS16388	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS16207*	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS03850	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS01904	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS17361	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGCCC	AGGGTC..TT
MS20539	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS20093	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS02504	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS21003	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS06747	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS00001*	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS03832	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS01161	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGG.CC.TT
MS19319	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	TCGAGTGTTT	AGGG.CC.TC
MS17913	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGTTT	AGGGTC..TT
MS01896	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTT	AGGG.CC.TT
MS02173	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CCGAGTGTTA	AGGG.CC.TT
SP02448	TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CAGAGCGTTC	AGGGTCCCTA

51

100

MA19038	ACCGGGGCC	GCTCTCCCAC	CCCATGTGTA	CCCGT..CCAT	GTTGCTTCGG
MA02088	ACCGGGGCC	GCTCTCCCAC	CCCATGTGTA	CCCGT..CCAT	GTTGCTTCGG
MA02089	ACCGGGGCC	GCTCTCCCAC	CCCATGTGTA	CCCGT..CCAT	GTTGCTTCGG
MA02087	ACCGGGGCC	GCTCTCCCAC	CCCATGTGTA	CCCGT..CCAT	GTTGCTTCGG
MS01839	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS21020	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS16388	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG

MS16207*	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS03850	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS01904	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS17361	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS20539	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CTAAAACCAT	GTTGCTTCGG
MS20093	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS02504	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS21003	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS06747	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS00001*	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS03832	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTCTA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS01161	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS19319	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS17913	..CGGG.CCC	GACCTCCAAC	CCTTTGTATA	CCAAA.CCAT	GTTGCTTCGG
MS01896	..CGGG.CCC	AACCTCCCAC	CCCATGTGTA	TTTGT.CCAC	GTTGCTTCGG
MS02173	..CGGG.CCC	GACCTCTCAC	CCCCTGTGTA	CCCGT.CCAC	GTTGCTTCGG
SP02448	ACCGGGGCC	GACCTCCAAC	CCCATGTGTA	TTTGT.CCAT	GTTGCTTCGG

101

MA19038	CGAGGCTCGA	CGTCCCCTCC	CCCCGGGAGC	CGTGGACGGC	GAGCGCCCCG
MA02088	CGAGGCTCGA	CGTCCCCTCC	CCCCGGGAGC	CGTGGACGGC	GAGCGCCCCG
MA02089	CGAGGCTCGA	CGTCCCCTCC	CCCCGGGAGC	CGTGGACGGC	GAGCGCCCCG
MA02087	CGAGGCTCGA	CGTCCCCTCC	CCCCGGGAGC	CGTGGACGGC	GAGCGCCCCG
MS01839	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS21020	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS16388	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS16207*	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS03850	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS01904	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS17361	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS20539	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGAGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS20093	CGGGGTCCGA	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS02504	CGGGGTCCGA	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS21003	CGGGGTCCGA	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS06747	CGGGGTCCGA	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS00001*	CGGGGTCCGA	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS03832	CGGGGTCCGA	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS01161	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS19319	CGGGGTCCGG	G...CCTCC	CTTCGGGGG.	.GTG..CA..	...CGCCCCG
MS17913	CGAGGTTTGA	G...CCTCC	TTTCGGGGG.	.GT...CT..	...CGCCCCG
MS01896	CGGGGCCGGA	C...GCTCC	CCTCACGGG.	.GAGGGTA..	...CGCCCCG
MS02173	CGGGGTCTG.A	A...GCCCC	CTTCGTTGG.	.G.GGTCA..	...GGCCCCG
SP02448	TGGCCCTGGC	C...CCTTT	TCACAGGGG.A..	...CACCCCCG

150

151

MA19038	CGGGGACCCG	ATTAAACCCT	GGTATGTACC	GTGCCGTCTG	AGT.ATTCTA
MA02088	CGGGGACCCG	ATTAAACCCT	GGTATGTACC	GTGCCGTCTG	AGT.ATTCTA
MA02089	CGGGGACCCG	ATTAAACCCT	GGTATGTACC	GTGCCGTCTG	AGT.ATTCTA
MA02087	CGGGGACCCG	ATTAAACCCT	GGTATGTACC	GTGCCGTCTG	AGT.ATTCTA
MS01839	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS21020	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS16388	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS16207*	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS03850	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS01904	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	GTTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS17361	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS20539	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATCTTATAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS20093	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTT.TAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS02504	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTT.TAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS21003	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTT.TAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA
MS06747	CGGGGACCAA	ACCAAACCCT	ATTTT.TAAC	GTGATGTCTG	AGCGATTCTA

200

MS00001* CGGGGACCAA ATCAAACCCT ATTTT.TAAC GTGATGTCTG AGCGATTCTA
MS03832 CGGGGACCAA ACCAAACCCT ATTTT.TAAC GTGATGTCTG AGCGATTCTA
MS01161 CGGGGACCAA AACAAACCCT ATTTT.TAAC GTGATGTCTG AGCGATTCTA
MS19319 CGGGGACCAA ACCAAACC.T GTTTTTTAAAC GTGATGTCTG AGCGATTTTA
MS17913 CGAGGACCAA ACCAAACCCT TTTATTTAAC GTGATGTCTG AGCGATTCTA
MS01896 CGGGGATCTG TCCAACCCTG AATGTA.CA. GTGTCGTCTG AGT.ATTCTA
MS02173 CGGGGATCTG TGCAACCCA. ACTGTATCA. GTGTCGTCTG AGT.ATTCTA
SP02448 CGAGGATTAT ATAAAACTCT GGTATGTATT GTGCCGTCTG AGT.CTTTTA

201

250

MA19038 GCGAATCTAA AATAAACTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MA02088 GCGAATCTAA AATAAACTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MA02089 GCGAATCTAA AATAAACTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MA02087 GCGAATCTAA AATAAACTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS01839 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS21020 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS16388 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS16207* GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS03850 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS01904 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS17361 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS20539 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS20093 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS02504 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS21003 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS06747 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS00001* GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS03832 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS01161 GCGAATTTAA T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS19319 ACGAATCAAA ACTAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS17913 GCGAATTTAA. T.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS01896 GCGAATCTAA A.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
MS02173 GCGAATCTAA A.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG
SP02448 GTGAATTTAA A.TAAAACCTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG

251

300

MA19038 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MA02088 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MA02089 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MA02087 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS01839 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS21020 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS16388 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS16207* ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS03850 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS01904 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS17361 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS20539 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS20093 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS02504 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS21003 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS06747 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS00001* ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS03832 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS01161 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS19319 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS17913 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS01896 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
MS02173 ATGAAGAACG CAGCKAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT
SP02448 ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT

301

MA19038	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGCA	TTCCGGGGGG
MA02088	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGCA	TTCCGGGGGG
MA02089	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGCA	TTCCGGGGGG
MA02087	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGCA	TTCCGGGGGG
MS01839	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS21020	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS16388	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS16207*	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS03850	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS01904	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS17361	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS20539	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS20093	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS02504	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS21003	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS06747	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS00001*	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS03832	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS01161	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS19319	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS17913	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS01896	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG
MS02173	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGCA	TTCCGGGGGG
SP02448	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC	GCACATTGCG	CCCCCTGGTA	TTCCGGGGGG

350

351

MA19038	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCGGTTGG
MA02088	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCGGTTGG
MA02089	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCGGTTGG
MA02087	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCGGTTGG
MS01839	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAGTTGG
MS21020	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAGTTGG
MS16388	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAGTTGG
MS16207*	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAATTGG
MS03850	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAATTGG
MS01904	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAGTTGG
MS17361	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAGTTGG
MS20539	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCGCGGC	TTGCAGTTGG
MS20093	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS02504	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS21003	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCYGGC	TTGCAGTTGG
MS06747	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS00001*	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS03832	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS01161	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCTCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS19319	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCACGGC	TTGCAGTTGG
MS17913	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCCCGGC	TTGCAGTTGG
MS01896	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCTCGGC	TTGCAGTTGG
MS02173	CATGCCTGTC	CGAGCGTCAT	TAACACCCCT	CAAGCACGGC	TTGCAGTTGG
SP02448	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT	TAACACACTT	CAAGCCTGGC	TTGCAGTTGG

400

401

MA19038	GCGTCGTCCC	.CGTCTCCAC	GGGCGGACGT	GCCTGAAAAG	CAGTGACGGC
MA02088	GCGTCGTCCC	.CGTCTCCAC	GGGCGGACGT	GCCTGAAAAG	CAGTGACGGC
MA02089	GCGTCGTCCC	.CGTCTCCAC	GGGCGGACGT	GC.TGAAAAG	CAGTGACGGC
MA02087	GCGTCGTCCC	.CGTCTCCAC	GGGCGGACGT	GCCTGAAAAG	CAGTGACGGC
MS01839	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC
MS21020	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC
MS16388	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC
MS16207*	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC

450

MS03850	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC
MS01904	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC
MS17361	GCGTCGTCCC	CCGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAC	CAGTGACGGC
MS20539	GCGTCGTCCC	CTGGGATTCC	GGGCGGACGT	GCCTTAAAAT	CAGTGACGGC
MS20093	GCGCCGTCCC	CCGGACCTCC	GGGCGGACGC	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGAC
MS02504	GCGCCGTCCC	CCGGACCTCC	GGGCGGACGC	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGAC
MS21003	GCGCCGTCCC	CCGGACCTCC	GGGCGGACGC	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGAC
MS06747	GCGCCGTCCC	CCGGACCTCC	GGGCGGACGC	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGAC
MS00001*	GCGTCGTCCC	CCGGACCTCC	GGGCGGACGC	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGAC
MS03832	GCGTCGTCCC	CCGGATCTCC	GGGCGGACGC	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGAC
MS01161	GCGTCGTCCC	CCGGACCTCC	GGGCGGACGT	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGGC
MS19319	GCGTCGTCCC	CCGNCTCC	GGGCGGACGT	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGGC
MS17913	GCGTCGTCCC	TCGGATCTCC	GGGCGGACGT	GCCTCAAAAAT	CAGTGACGGC
MS01896	GCGTCGTCCC	CCGGGCTTCC	GGGCGGACGT	GCCTGAAAAC	CAGTGACGGC
MS02173	GCGTCGTCCC	CCGTCCT.CC	GGGCGGACGT	GCCTGAAAAT	CAGTGACGGC
SP02448	GCGTCGTCTT	CC..CCTCCG	GGGAAGACGT	GCCTGGAAAAT	TGGTGACGGC

451

500

MA19038	CGTGCCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	TCTCGCA.TC	ATCGCTTTTCG
MA02088	CGTGCCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	TCTCGCA.TC	ATCGCTTTTCG
MA02089	CGTGCCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	TCTCGCA.TC	ATCGCTTTTCG
MA02087	CGTGCCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	TCTCGCA.TC	ATCGCTTTTCG
MS01839	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS21020	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS16388	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS16207*	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS03850	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS01904	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS17361	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS20539	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS20093	CGTGGCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS02504	CGTGGCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS21003	CGTGGCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS06747	CGTGGCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATC.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS00001*	CGTGGCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS03832	CGTGGCCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	TATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS01161	CGTGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS19319	GGCCGGTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS17913	CGCCGGTCGAT	CCTC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTTCG
MS01896	CGCGTTCGGT	CCCC.AGCGT	AGTACGATT.	CATTTCAATC	ATCGCTTTCGG
MS02173	TTCGTTTGG.	CCCCCAGCGT	AGTACGATTG	CCTTTCAATC	ATCGCTTTCGG
SP02448	CGCGTCCGGT	CCCCCAGCGT	AGTAAGATT.	..TTCCAATC	ACCGCTTTCGG

501

550

MA19038	GGTCGGGGCGC	CGTGCCGGTTC	AGAA..CCCC	CCC.....	.TTT.TT..C
MA02088	GGTCGGGGCGC	CGTGCCGGTTC	AGAA..CCCC	CCC.....	.TTT.TT..C
MA02089	GGTCGGGGCGC	CGTGCCGGTTC	AGAA.TCCCC	CCC.....	.TTT.TT..C
MA02087	GGTCGGGGCGC	CGTGCCGGTTC	AGAA.TCCCC	CCC.....	.TTT.TT.TC
MS01839	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS21020	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS16388	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS16207*	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS03850	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS01904	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS17361	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TTTATGA	ATTT.T...C
MS20539	GGCCGGGGCGT	GCG.CCGGTC	AGAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS20093	GGTCGGGGCGC	GCG.CCGGTC	AAAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS02504	GGTCGGGGCGC	GCG.CCGGTC	AAAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS21003	GGTCGGGGCGC	GCG.CCGGTC	AAAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS06747	GGTCGGGGCGC	GCG.CCGGTC	AAAA.TC...	...TT.ATGA	ATTT.TT..C
MS00001*	GGTCGGGGCGC	GCG.CCGGTC	AAAAATC...	...TTAATGA	ATTT.TT..C

MS03832 GGTCTGGGCGC GCG.CCGGTC AGAA.TCC.. . . .T.ATGA ATTT.TT..C
MS01161 GGTCTGGGCAC GCGACCGGTC AGAA.TC... . .TT.ATGA ATTT.TT..C
MS19319 GGCCGGGCGG GCG.CCGGTC AGAA.TC... . .TT.ATGA ATTT.TT..C
MS17913 GGTCTGGGCGT GCG.CCGGTC AAAA..CCCC CC..T.A.GA ATTTATTCTC
MS01896 GGTCTGGACGG GCG.CCGGTC AAAA..CCCC CC.TT..TGA ATT..TTCT.
MS02173 GGTCTGGGCGT GGG.CCGGTC AAAA..CCCC C..TT...A ATTT.TTCT.
SP02448 GGTCTGGGCGT GCTGCCGGTC AGAAA.CCCC . . .TT.ATAT ATT..TTAT.

551

600

MA19038 AAAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MA02088 AAAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MA02089 AAAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MA02087 AAAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS01839 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS21020 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS16388 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS16207* AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS03850 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAANCATATC
MS01904 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS17361 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS20539 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS20093 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS02504 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS21003 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS06747 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS00001* AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS03832 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS01161 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS19319 AT..GTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS17913 C..GGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS01896 .AAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
MS02173 .AAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC
SP02448 CAAGGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC

601

613

MA19038 AATAAGCGGA GGA
MA02088 AATAAGCGGA GGA
MA02089 AATAAGCGGA GGA
MA02087 AATAAGCGGA GGA
MS01839 AATAAGCGGA GGA
MS21020 AATAAGCGGA GGA
MS16388 AATAAGCGGA GGA
MS16207* AATAAGCGGA GGA
MS03850 AANAAGCGGA GGA
MS01904 AATAAGCGGA GGA
MS17361 AATAAGCGGA GGA
MS20539 AATAAGCGGA GGA
MS20093 AATAAGCGGA GGA
MS02504 AATAAGCGGA GGA
MS21003 AATAAGCGGA GGA
MS06747 AATAAGCGGA GGA
MS00001* AATAAGCGGA GGA
MS03832 AATAAGCGGA GGA
MS01161 AATAAGCGGA GGA
MS19319 AATAAGCGGA GGA
MS17913 AATAAGCGGA GGA
MS01896 AATAAGCGGA GGA
MS02173 AATAAGCGGA GGA
SP02448 AATAAGCGGA GGA

Figura 1.5. Secuencias alineadas de la región ITS1-5.8S-ITS2 entre los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 de 19 especímenes de *Mycocalicium subtile* y 4 especímenes de *Mycocalicium albonigrum*. La secuencia consenso se muestra sobre el alineamiento. Los guiones designan los “gaps” que han sido introducidos para permitir el alineamiento.

Muestra	P5	P5.5	P6	P7	P8.5	P9	P10	P11	P15	P15.5	P16	P17	P19	P20	P22	P23.5	P26	P26.5	P27.5	P28
Ms01161-S1	2.67	0	0	0	0	1.01	0.11	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms01161-S2	3.99	0	0.54	0	0	0.82	0.19	0.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms01161-S3	10.25	0	0.93	0	0	2.54	0.65	1.83	0	0	1.01	0.74	0	0	0	0	0	0	0.80	0
Ms01896-S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.61	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0
Ms01896-S2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms01896-S3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ma19038-S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.80	0	0	0	0.67	0	1.68	0	1.58	0	1.34
Ma19038-S2	0	1.66	0	0	0	0	0	0	0	4.36	0	0	0	0.80	0	2.77	0	0.97	0	2.58
Ma19038-S3	0	0	0	2.34	0	0	0	0	0	7.13	0	0	1.65	0	0	2.42	0	1.33	0	1.73
Ms20093-S1	29.97	0	0	1.43	2.67	6.31	2.46	1.77	0	0	0	0	2.31	0.82	1.59	2.66	0	0	0	0
Ms20093-S2	27.63	0	0	0	2.28	8.20	2.91	1.37	0	0	0.41	0	1.71	0.89	0	0	0	0	0	0
Ms20093-S3	22.05	0	0	0	2.38	5.16	2.27	2.07	0	0	0	0	2.37	0.88	1.37	0	0	0	0	0
Ms21020-S1	41.99	0	0	0	0	2.01	0.60	1.90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-S2	42.60	0	1.17	0	0	6.39	1.40	3.55	0	0	0	1.12	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-S3	36.82	0	0	0	0	1.93	0.54	1.90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02173-S1	0	0.35	0	0	0	0	0	0	0	5.34	0	0	0	0	0	0	2.38	1.01	0	0
Ms02173-S2	0	0.61	0	0	0	0	0	0	0	6.31	2.66	0	0	0	0	0	1.96	1.69	0	0
Ms02173-S3	0	0.27	0	0	0	0	0	0	0	4.55	0.41	0	0	0	0	0	1.65	0.80	0	0
Ms02504-S1	25.11	0	0.93	0	0	1.54	0.74	4.11	0.98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02504-S2	10.94	0	3.33	1.90	0	0	0.91	1.88	2.23	0	0	0	1.58	0	0	0	0	0	0	0
Ms02504-S3	20.31	0	1.20	0	0	1.46	0.52	4.15	0.81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms06747-S1	14.62	0	0	0	0	2.00	0.84	1.74	7.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms06747-S2	32.56	0	0	0	0	2.03	1.15	2.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms06747-S3	15.09	0	0	0	0	1.01	0.61	0.75	2.41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 1.7. Matriz de compuestos producidos en medio MEYE sólido. La matriz contiene tantas columnas como el total de picos identificados en el conjunto de los cromatogramas, y tantas filas como muestras. En cada celda se especifica el valor del porcentaje de altura que cada pico supone en cada cromatograma. La ausencia de un pico se expresa con valor 0. Continúa en la página siguiente

Muestra	P29.5	P32	P36	P39	P40	P42	P48	P56	P59	P60	P70	P71	P72	P73	P75	P113	P127	P137	P138	P139
Ms01161-S1	0	0	0	0	0.11	0	0.19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms01161-S2	0	0	0	0	0.16	0	0.19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms01161-S3	0	0	0	0.81	0	0	4.67	0	0	1.32	0	0	0	0	0	0	0	1.38	0	0
Ms01896-S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.37	0	0	0.17	0.14	0.15	0	0	0	0	0	0
Ms01896-S2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.44	0	0.26	0.22	0.16	0.17	0	0	0	0	0	0
Ms01896-S3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ma19038-S1	2.24	0	0	0	0	1.43	0	0	0.99	0	0	0	0	0	1.52	0	0	1.78	1.70	1.17
Ma19038-S2	1.02	0	0	0	0	2.76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ma19038-S3	1.99	0	0	0	0	0	0	0	1.48	0	0	0	0	0	0	0	0	1.95	1.56	0
Ms20093-S1	0	2.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.05	1.92	0	0	0
Ms20093-S2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms20093-S3	0	2.48	0	0	0	1.49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.65	2.54	0	0	0
Ms21020-S1	0	0	0	0	0	0	0	0.29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-S2	0	0	0	0	0	0	0	0.37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-S3	0	0	0	0	0	0	0	0.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02173-S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02173-S2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02173-S3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02504-S1	0	0	1.51	0.67	1.38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.21	0	0	0	0	0
Ms02504-S2	0	0	4.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms02504-S3	0	0	1.12	0.57	1.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.72	0	0	0	0	0
Ms06747-S1	0	0	13.41	0	0.80	0	0	0.39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms06747-S2	0	0	1.16	0	1.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms06747-S3	0	0	9.56	0	0.62	0	0	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 1.7. Continuación

Muestra	P141	P142	P144	P145
Ms01161-S1	0	0	0	0
Ms01161-S2	0	0	0	0
Ms01161-S3	0	0	0	0
Ms01896-S1	0	0	0	0
Ms01896-S2	0	0	0	0
Ms01896-S3	0	0	0	0
Ma19038-S1	1.91	0.89	0	0
Ma19038-S2	0	0	0	0
Ma19038-S3	1.77	1.38	0	0
Ms20093-S1	0	0	0	0
Ms20093-S2	0	0	0	0
Ms20093-S3	0	0	0	0
Ms21020-S1	0	0	0	0
Ms21020-S2	0	0	0	0
Ms21020-S3	0	0	0	0
Ms02173-S1	0	0	0	0
Ms02173-S2	0	0	0	0
Ms02173-S3	0	0	0	0
Ms02504-S1	0	0	0	0
Ms02504-S2	0	0	0	0
Ms02504-S3	0	0	0	0
Ms06747-S1	0	0	5.15	1.28
Ms06747-S2	0	0	0	0
Ms06747-S3	0	0	2.66	0.95

Tabla 1.7. Continuación

Muestra	P5	P5.5	P6	P9	P10	P11	P15.5	P15.75	P26.5	P29.5	P43	P47	P59
Ms01161-L1	5.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms01161-L2	15.34	0	0.61	1.93	0	0.99	0	0	0	0	0	0	0
Ms01161-L3	5.97	0	0	0.37	0	0.51	0	0	0	0	0	0	0
Ma19038-L1	0	0	0	0	0	0	5.81	0	0.51	0.66	0	0	0.50
Ma19038-L2	0	0	0	0	0	0	13.22	0	2.00	2.34	0	0	0.77
Ma19038-L3	0	0.61	0	0	0	0	13.92	0	2.18	2.45	0	0	0.89
Ms20093-L1	23.90	0	0	7.07	3.30	0.99	0	0.31	0	0	2.19	0.80	0
Ms20093-L2	25.27	0	0	7.78	3.47	1.29	0	0	0	0	3.70	2.00	0
Ms20093-L3	4.38	0	0	0.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-L1	5.72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-L2	31.30	0	1.03	16.45	2.51	2.69	0	0	0	0	0	0	0
Ms21020-L3	0	0	1.06	9.98	3.37	2.68	0	0	0	0	1.37	1.22	0
Ms02173-L1	0	0.22	0	0	0	0	3.46	0	0	0.53	0	0	0.23
Ms02173-L2	0	0.31	0	0	0	0	4.62	0	0	0.99	0	0	0.21
Ms02173-L3	0	0	0	0	0	0	1.96	0	0	0.28	0	0	0
Ms02504-L1	5.79	0	0	0	0	0.56	0	0	0	0	0	0	0
Ms02504-L2	35.15	0	1.09	2.69	2.25	3.36	0	0.54	0	0	0	0	0
Ms02504-L3	7.71	0	0	0.46	0	0.65	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 1.8. Matriz de compuestos producidos en medio MEYE líquido. La matriz contiene tantas columnas como el total de picos identificados en el conjunto de los cromatogramas, y tantas filas como muestras. En cada celda se especifica el valor del porcentaje de altura que cada pico supone en cada cromatograma. La ausencia de un pico se expresa con valor 0 de un pico se expresa con valor 0.

Picos	Muestras en medio sólido Grupo 1
P40	Ms01161(s1,s2); Ms06747(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s3);
P6	Ms02504(s1,s2,s3), Ms01161(s2,s3); Ms21020(s2)
P15	Ms02504(s1,s2,s3), Ms06747(s1,s3)
P36	Ms02504(s1,s2,s3) Ms06747(s1,s2,s3);
P39	Ms02504(s1,s3); Ms01161(s3)
P56	Ms06747(s1,s3); Ms21020(s1,s2,s3)
P17	Ms21020(s2); Ms01161(s3)
P48	Ms01161(s1,s2,s3)
P147	Ms01161(s3)
P27.5	Ms01161(s3);
P9.5	Ms02504(s2)
P34	Ms02504(s2)
P35	Ms02504(s2)
P37	Ms02504(s2)
P21.75	Ms06747(s1)
P52	Ms06747(s1)
P146	Ms06747(s1)
P83	Ms06747(s1)
P144	Ms06747(s1,s3)
P145	Ms06747(s1,s3)
P8.5	Ms20093(s1,s2,s3)
P127	Ms20093(s1,s3)
P113	Ms20093(s1,s3)
P22	Ms20093(s1,s3)
P32	Ms20093(s1,s3)
P24.75	Ms20093(s3)

Picos	Mezcla de grupos
P19	Ms20093(s1,s2,s3); Ma19038(s3); Ms02504(s2)
P16	Ms20093(s2); Ms02173(s2,s3); Ms01161(s3)
P7	Ms20093(s1) ;Ms02504(s2); Ma19038(s3)
P137	Ms01161(s3); Ma19038(s1,s3)
P75	Ma19038(s1); Ms02504(s1,s3)
P42	Ma19038(s1,s2), Ms20093(s3)
P23.5	Ma19038(s1,s2,s3);Ms20093(s1)
P20	Ma19038(s1,s2), Ms20093(s1,s2,s3)
P60	Ms02173(s2); Ms01161(s3)

Tabla 1.11. Tabla que muestra la distribución de los picos minoritarios en los representantes de cada grupo. Análisis realizado a partir de cultivo en medio MEYE sólido. Continúa en la página siguiente

Picos	Muestras Grupo 2 Medio sólido
P5.5	Ma19038(s2); Ms02173(s1,s2,s3)
P59	Ma19038(s1,s3); Ms01896(s1,s2)
P90	Ms02173(s1); Ms01896(s1)
P28	Ma19038(s1,s2,s3)
P29.5	Ma19038(s1,s2,s3)
P138	Ma19038(s1,s3)
P141	Ma19038(s1,s3)
P142	Ma19038(s1,s3)
P43	Ma19038(s1)
P139	Ma19038(s1)
P143	Ma19038(s1)
P11.5	Ma19038(s2)
P12.5	Ma19038(s3)
P21	Ma19038(s3)
P24.5	Ma19038(s3)
P81	Ma19038(s3)
P119	Ma19038(s3)
P71	Ms01896(s1,s2)
P72	Ms01896(s1,s2)
P73	Ms01896(s1,s2)
P70	Ms01896(s2,s3)
P78	Ms01896(s1)
P26	Ms02173(s1,s2,s3)
P4.5	Ms02173 (s2)
P18	Ms02173 (s2)
P24	Ms02173 (s2)
P61	Ms02173 (s2)
P62	Ms02173 (s2)
P63	Ms02173 (s2)
P64	Ms02173 (s2)
P46	Ms02173(s1)
P65	Ms02173(s2)
P66	Ms02173(s2)
P67	Ms02173(s2)
P68	Ms02173(s2)
P69	Ms02173(s2)

Tabla 1.11. Continuación

Picos	Muestras en medio líquido Grupo 1
P6	Ms02504(12), Ms01161(12); Ms21020(12,13)
P10	Ms21020(12,13); Ms20093(11,12); Ms02504(12)
P15.75	Ms20093(11) Ms02504(12)
P43	Ms20093(11,12); Ms21020(13)
P47	Ms20093(11,12); Ms21020(13)
P48	Ms01161(11, 13)
P39	Ms01161(12, 13)
P40	Ms02504(11, 12, 13)
P41	Ms02504(12)
P44	Ms20093(11)
P134	Ms20093(11)
P23.5	Ms20093(11, 12)
P46	Ms20093(12)
P70	Ms20093(13);
P53	Ms21020(11)
P118	Ms21020(11,13)
P17	Ms21020(12)
P55.5	Ms21020(12)
P54	Ms21020(12, 13)
P56	Ms21020(12, 13)
P23	Ms21020(13)
P32	Ms21020(13)
P94	Ms21020(13)

Picos	Muestras en medio líquido Grupo 2
P26,5	Ma19038(11,12,13)
P143	Ma19038(12)
P14	Ma19038(12);
P8.75	Ma19038(13)
P59.5	Ma19038(13)
P58	Ms02173(11, 12)
P26	Ms02173(11, 12, 13)

Tabla 1.12. Tabla que muestra la distribución de los picos minoritarios en los representantes de cada grupo. Análisis realizado a partir de cultivo en medio MEYE líquido.

Anexo 2

Figura 2.4. Alineamiento de secuencias de la mitad 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma. Las especies empleadas se describen en la Tabla 2.3. La secuencia *de Calicium adpersum* fue empleada como “outgroup” para los posteriores análisis filogenéticos. Continúa en la página siguiente.

PileUp
Procede de C28-2

ORDEN CALICIALES CON 28S. Usando Sacaromyces como outgroup. Alineamiento por Clustal sin tener en cuenta estructura secundaria
Eliminando Cr
arreglado con estructura secundaria. Elimino columnas de gaps que me señalan algunos stems o loops de alineamiento complicado
Elimino tres zonas de alineamiento ambiguo.
Elimino saccharomyces y otros caliciales que no sean Mycocaliciaceae. Dejo Calicium adspersum como outgroup.

```
GDC ***** GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor *****
GDC 01081701900008000000000000ff008040ff0000ffffffffff
GDC ff000000000000f43f000000000000f43f000000000000f03f0000000000
GDC 00f03f00A000000000190000cA54696d6573204e657720526f6d616e00B0
GDC 08c0002000000000000000000000601444e000245510003535400044b520
GDC 00546595700064c49564d00284d5330323530342c0d0a4d5332313032302
GDC c0d0a4d5330323137332c0d0a4d6131393033382c0d0a4d7365713932303
GDC 5352c0d0a43733032323032c0d0a436e30323038332c0d0a43643032303
GDC 8302c0d0a507031393238362c0d0a537030323434382c0d0a43683032303
GDC 8322c0d0a437031393235382c0d0a436630383139302c0d0a43703032353
GDC 2322c0d0a437630323130352c0d0a43613032323939293b0d0a00AABADAA
GDC A0000002a000a00010001B20AAA000a203a2000203a200000000000000005
GDC 9400000000000000000000c505800000ffff000047580000ff00ff00004
GDC 147535800000ffff0056434147444e535450580000ff00ffff00484b5
GDC 25800ff00000000ff4544580000ff000000ff484b5245445800ffff0000
GDC 0ff48524551444e425a5800ff000000ff005957484b524551444e5354425
GDC a58000000000ff00494c56415800ff0000808080465957485800000ff8
GDC 08080494c564341474d4659574854505800ffff000000c50580000000
GDC 0000000475800000000000004143475358000000000000564147444e5
GDC 3545058000000000000000484b525800000000000004544580000000000
GDC 000484b52454458000000000000048524551444e425a58000000000000
GDC 0435957484b524551444e5354425a580000000000000494c56415800000
GDC 0000000046595748580000000000000494c564341474d4659574854505
GDC 8000000000000000300ffff00000000ffff8080800000000c0c0c00
GDC 000ABBBBBBBBBBBBBB00ff00A00100001000100010001000100010001000
GDC 100010001000100010001000100010001A0018AA00000000000000000000
GDC 0003A00ff00A000000000008056400000000000805140000000000004940
GDC 00000200000000000001440A0000000098b20c41000000001025064100000
GDC 000189806410000000078b10b4100AAABB00005374616e64617264004646
GDC 4c4c5353535359592a2a43432a574c4c4c4c505050504848515152525252
GDC 4949494d545454544e4e4b4b535352525656565641414141444445454747
GDC 4747002d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d00BBBBB00000000000000100000000000000000000000
GDC 000000000000000000000000000000000000000000000000300000000000BBA
GDC A00100000000000000000000000000000000000000201b7B000000000005940
GDC 00000000000054400000000000004e4000DAAB000000ffff0302014445
GDC 484b524e5153540000ff00ff0000024c49564d4659574147435000ff0000
GDC 00ff0004014445484b520000ff00ff0000024e5153540000ff00ff800003
GDC 4c49564d46595700ff000000ff0004414700ff0000008000080144450000
GDC ff00ff000002484b5200ffffffffff0000034e510000ff00ff800004535400
GDC ffffffff8000054c495600ff000000ff000646595700ffff00ff000741
GDC 4700ff0000008000084d4300ffff0080000000000000Affffff8080800
GDC 0A
```

2.4.msf MSF: 1246 Type: N December 26, 2001 19:42 Check: 4544 ..

Name: MS02504	Len: 1246	Check: 3910	Weight: 1.00
Name: MS21020	Len: 1246	Check: 3604	Weight: 1.00
Name: MS02173	Len: 1246	Check: 5088	Weight: 1.00
Name: Ma19038	Len: 1246	Check: 818	Weight: 1.00

Name: Mseq92055	Len: 1246	Check: 651	Weight: 1.00
Name: Cs02200	Len: 1246	Check: 7217	Weight: 1.00
Name: Cn02083	Len: 1246	Check: 8014	Weight: 1.00
Name: Cd02080	Len: 1246	Check: 5207	Weight: 1.00
Name: Pp19286	Len: 1246	Check: 3660	Weight: 1.00
Name: Sp02448	Len: 1246	Check: 2518	Weight: 1.00
Name: Ch02082	Len: 1246	Check: 8725	Weight: 1.00
Name: Cp19258	Len: 1246	Check: 8090	Weight: 1.00
Name: Cf08190	Len: 1246	Check: 9229	Weight: 1.00
Name: Cp02522	Len: 1246	Check: 8565	Weight: 1.00
Name: Cv02105	Len: 1246	Check: 903	Weight: 1.00
Name: Ca02299	Len: 1246	Check: 8345	Weight: 1.00

//

	1				50
MS02504	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
MS21020	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
MS02173	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Ma19038	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Mseq92055	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cs02200	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cn02083	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cd02080	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Pp19286	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Sp02448	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Ch02082	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cp19258	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cf08190	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cp02522	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Cv02105	ATTGCCTTAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT
Ca02299	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAAA	TTTGAAATCT

	51				100
MS02504	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTGCGGCAG
MS21020	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTGCGGCAG
MS02173	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGGGCGGTCCG
Ma19038	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGGGCGGCAG
Mseq92055	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTTCCGGCCA
Cs02200	GGCCTCGGGG	CCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTACGGCGG
Cn02083	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGCACGGCTG
Cd02080	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTACGGCGG
Pp19286	GGCCCCAGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTACGGCTG
Sp02448	GGTCCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTACGGCTG
Ch02082	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATGCTTCG	GGTACGGCAG
Cp19258	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGCAGA	GGATGCTTCG	GGTTCAGCTG
Cf08190	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGCAGA	GGATGCTTCG	GGTTCGGCTG
Cp02522	GGCCCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGCAGA	GGATGCTTCG	GGTTCGGCTG
Cv02105	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGCAGTTTCG	GGTCCGGCCC
Ca02299	GGCCCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGAAGA	GGGTGCTTCG	GGTGAGGCAC

	101				150
MS02504	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
MS21020	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
MS02173	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Ma19038	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Mseq92055	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cs02200	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cn02083	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cd02080	CGGTCTAAGT	TCTTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Pp19286	CAGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT

Sp02448	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Ch02082	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cp19258	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cf08190	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cp02522	CGGTCTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Cv02105	CGGTGTAAGT	TCCTTGGAAC	AGGACGTCAT	GGAGGGTGAG	AATCCCGTGT
Ca02299	CGGCCTAAGT	CCCTTGGAAC	AGGGCGTCAT	AGAGGGTGAG	AATCCCGTCT

151

200

MS02504	GGGACTGCCC	GCCAAACCCA	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
MS21020	GGGACTGCCC	GCCAAACCCA	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
MS02173	GAGACCGATG	GCCAATCCCA	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Ma19038	GGGACCGCCG	GCCAAACCCG	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Mseq92055	GGGACCGCCG	GCCACGCCCG	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cs02200	GGGACCGCCG	GCCACGCCCG	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cn02083	GGGACCGTCC	GCCACGCCCG	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cd02080	GGGACCGCCG	GCCACGCCCG	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Pp19286	GGGACTGTCT	GCCACGCCCG	TGTGAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Sp02448	GGGACCGTCC	GCCACGCCCG	TGTAAAGCGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Ch02082	GAGACCGTCC	GCCACGCCCG	TGTGAAACGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cp19258	GGGACCGCCG	GCCACGCCCG	TGTGAAACGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cf08190	AGGACCGCCG	GCCACGCCCG	TGTGAAACGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cp02522	GGGACTGCCG	GCCACGCCCG	TGTGAAACGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Cv02105	GAAACCGGTG	GCTACGCCCA	TGTGAAACGC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT
Ca02299	GCGGCCGGTG	ACCGAGTCCA	TGTGAAACCC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT

201

250

MS02504	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATATT
MS21020	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATATT
MS02173	TGGGAATGCA	GCTCTAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATATT
Ma19038	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Mseq92055	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Cs02200	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Cn02083	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTACAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Cd02080	TGGGAATGCA	GCTCTAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Pp19286	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTATAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Sp02448	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTATAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Ch02082	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Cp19258	TGGGAATGCA	GCTCCAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACT
Cf08190	TGGGAATGCA	GCTCCAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Cp02522	TGGGAATGCA	GCTCCAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Cv02105	TGGGAATGCA	GCTCAAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC
Ca02299	TGGGAATGCA	GCTCTAAATG	GGTGGTATAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACC

251

300

MS02504	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
MS21020	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
MS02173	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Ma19038	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Mseq92055	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cs02200	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cn02083	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cd02080	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Pp19286	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Sp02448	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Ch02082	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cp19258	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cf08190	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cp02522	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Cv02105	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC
Ca02299	GGCCAGAGAC	CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC

301

350

MS02504	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
MS21020	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
MS02173	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Ma19038	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Mseq92055	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Cs02200	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Cn02083	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Cd02080	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Pp19286	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Sp02448	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Ch02082	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Cp19258	TTTGGAAAGA	GAGTTAAACA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTG
Cf08190	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Cp02522	TTTGAAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT
Cv02105	TTTGAAAAGA	GAGTTAAAAA	GCATGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCAA
Ca02299	TTTGGAAAGA	GAGTTAAAAA	GTACGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT

351

400

MS02504	GCAACCAGAC	TTGCCCCCGG	GTGCTCAACC	GGCGTTCTC.	GCCGGTGCAC
MS21020	GCAACCAGAC	TTGCCCCCGG	GTGCTCAACC	GGCGTTTTTC.	GCCGGTGCAC
MS02173	GCAACCAGAC	TTGCCCCCGG	GTGCTCAACC	GGCGTTTTTC.	GCCGGTGCAC
Ma19038	GCCACCAGAC	TTGCCCCCGG	GTGTTCCCCC	GGCGTTCTC.	GCCGGCTCAC
Mseq92055	GCCACCAGAC	TTGCTCCCGG	GTGTTCCAGCC	GGCGTTCTC.	GCCGGTGCAT
Cs02200	GCAACCAGAC	TCGTCCCCGG	GTGCTCACCC	GGCGTTTTTC.	GCCGGCGCAC
Cn02083	GCAACCAGAC	TTGCTCCCGG	GGTTCCACCC	GGCGTTTTTC.	GCCGGCGCAC
Cd02080	GCGATCAGAC	TTGTCTCCGG	GTGTTCCAGCC	GGCGTTTTTC.	GCCGGTGCAC
Pp19286	GAAACCAGAC	TTGTCCCCGG	GTGTTCCAGCC	GGCGTTCTC.	GCCGGTGCAC
Sp02448	GCAACCAGAC	TTGCTCCCGG	GTGTTCCAGCC	GGCGTTTTTC.	GCCGGTGCAC
Ch02082	GCAACCAGAC	TTGCTCCCAG	GTGTTCCACCC	GGCGTTCTC.	GCCGGGGCAC
Cp19258	GCCACCAGAC	TTGGCCCCAG	GTGCTCACCC	GGCGTTCCGC	GCCGGGGCAC
Cf08190	GCCACCAGAC	TTGGATCCGG	GTGTTCCGCC	GGCGTTTTTC.	GCCGGCGTAC
Cp02522	GCAACCAGAC	TTGGTCCCGG	GTGCTCCAGCC	GGCGTTCTC.	GCCGGTGCAC
Cv02105	GCAACCAGAC	TCGCTTCCGG	GTGTTCCAGCC	GGTGTTCCTCC	ACCGGTGCAT
Ca02299	GCCACCAGAC	CTGTCGTCCG	GTGATCCAGCC	GTCGTTCTC.	GACGGTGCAC

401

450

MS02504	TCGCCCCGGG	TCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCGGAG	AAAGACCCTT
MS21020	TCGCCCCGGG	TCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCGGAG	AAAGACCCTT
MS02173	TCGCCCCGGG	TCGGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGTTGGAG	AAAGGCCTCT
Ma19038	TCGCCCCGGG	TCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCGGAT	AAAGGCCTCT
Mseq92055	TCGCCCCGGG	TCAGGCCAGC	ATCGGTTCAA	GCGGCCGGAT	AAAGCCCCC
Cs02200	TCGCCCCGGG	TCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCGGAT	ATAGGTCCTT
Cn02083	TCCCCCGGGA	TCAGGCCAGC	ATCGGCTTCAG	GCGACCAGGAC	AAAGGCCCTT
Cd02080	TCGCCCCGGG	GCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGTCGGAT	AAAGGCCCTT
Pp19286	TCGCCCCGGG	CCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCGGAT	AAAGGTCCTT
Sp02448	TCGCCCCGGG	TCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCGGAC	AAAGGCCCTT
Ch02082	TCGCTGGGA	TCAGGCCAGC	ATCGGTTTTTC	GCGGCCAGAC	AAAGGCTCCG
Cp19258	TCGCCCCGGG	ACAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCAGCCGGAC	AAAGGCCCTT
Cf08190	TCAGCTGGGA	ACAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCTGGAC	AAAGGCCCTT
Cp02522	TCGCCCCGGG	ACAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCTTCAC	AAAGGCCCTT
Cv02105	TCGCCCCGGT	TCGGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGCCAGAT	AAAGGCCCTT
Ca02299	TCGCCCCGTT	GCAGGCCAGC	ATCGGTTTCAG	GCGGTCGGAT	AAAGGCCCTT

451

500

MS02504	GGAATGTAGC	TC.CCTTCGG	GGA.GTGTTA	TAGCCAGGGG	TGCAATGCGG
MS21020	GGAATGTAGC	TC.CCTTCGG	GGA.GTGTTA	TAGCCAGGGG	TGTAATGCGG
MS02173	GGAATGTAGC	TC.CTCTCGG	GGA.GTGTTA	TAGCCAGGGG	CGCAATGCGA
Ma19038	GGAATGTAGC	TC.CCCTCGG	GGA.GTGTTA	TAGCCAGGGG	TGTCATGCGG
Mseq92055	GGAATGTGGC	TC.CTCTCGG	GGA.GTGTTA	TAGCCAGGGG	TGCAATGCGG

Cs02200	GGAATGTGGC	TC .CCCTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCAGGGG	CGCAGTGC GG
Cn02083	GGAATGTAGC	TT .CTTTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCAGGGG	TGCAATGC GG
Cd02080	GGAATGTAGC	TT .CCCTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCGGGGG	TGCAATGC GG
Pp19286	GGAATGTAGC	TC .CTCTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCAGGGG	TGCAATGC GG
Sp02448	GGAATGTAGC	TC .CTGTCCG	GGA .GTGTTA	TAGCCGGGGG	TGCAATGC GG
Ch02082	GGAATGTAGC	TC .CTCTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCCGGGG	TGCAATGTGG
Cp19258	GGAATGTAGC	TT .CCTCCGG	GAA .GTGTTA	TAGCCGGGGG	TGCAATGC GG
Cf08190	GGAACGTAGC	TT .CCTTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCGGGGG	TGCCATGCAG
Cp02522	GGAATGTAGC	TC .CTCTCGG	GGA .GTGTTA	TAGCCGGGGG	TGCAATGTGG
Cv02105	GGAATGTAGC	TTTCTTCGG	GGAAGTGTTA	TAGCCCGGGG	TGCCATGTGG
Ca02299	GGAATGTAGC	TT .CCTCCGG	GGA .GTCTTA	TAGCCCGGGG	TGCAATGC GG

501

550

MS02504	CCTGCTTGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCTCG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
MS21020	CCTGCCTGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCTCG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
MS02173	CCTGCCTGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCTCG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Ma19038	CCCGCCCGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCTCG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Mseq92055	CCCGCCTGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Cs02200	CCTGCCCGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Cn02083	CCCGCCCGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCTCG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Cd02080	CCCGCCCGGA	CTGAGGAACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Pp19286	CCCGCCCGGA	CCGAGGTACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Sp02448	CCCGCTCGGA	CCGAGGTACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Ch02082	CCCGCGGGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Cp19258	TTCGCCCGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCTCG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Cf08190	TCAGCCCGGA	CCGAGGATCG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Cp02522	CCCGCCCGGA	CCGAGGTTCG	CGCTGGCACG	GATGCGGGCG	GTGTTTGGGT
Cv02105	CCCGACCGGA	CCGAGGAACG	CGCTGGCACG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT
Ca02299	CCAGCCGGGA	CCGAGGACCG	CGCTGGCAAG	GATGCTGGCG	GTGTTTGGGT

551

600

MS02504	GTCAAACCCA	TACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
MS21020	GTCAAACCCA	TACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
MS02173	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Ma19038	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Mseq92055	GTCAAACCCA	TACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Cs02200	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCGCAAGGC
Cn02083	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Cd02080	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Pp19286	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCTTCCGGC
Sp02448	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Ch02082	GTCAAACCCA	CACGCGAAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Cp19258	GTCAAACCCA	TGCGCGAAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCGGGGC
Cf08190	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTCGGGC
Cp02522	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	GCCCTGGGGC
Cv02105	GTCAAACCCA	CACGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGAGA	ACCCTGGGGC
Ca02299	GTCAAACCCG	TGCGCGGAAT	GAAAGTGAAC	GGAGGTGGGA	ACCCAGGGC

601

650

MS02504	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
MS21020	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
MS02173	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Ma19038	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Mseq92055	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Cs02200	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCACA
Cn02083	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Cd02080	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Pp19286	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Sp02448	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Ch02082	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Cp19258	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCGTA

Cf08190	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCGTA
Cp02522	GCACCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCACA
Cv02105	GCATCATCGA	CCGATCCTGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA
Ca02299	GCACCATCGA	CCGATCCAGA	TGTCTTCGGA	TGGATTTGAG	TAAGAGCATA

651

700

MS02504	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
MS21020	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
MS02173	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Ma19038	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Mseq92055	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cs02200	GCTGTTCCGA	CCCGAAAAAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cn02083	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cd02080	GCTGTTTCGA	CCCGAAAGAT	GGTGAATCTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Pp19286	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Sp02448	GCCGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Ch02082	GCTGGTCTGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cp19258	ACTGATGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cf08190	GCTGATGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAATCTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cp02522	GCTGGTCTGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA
Cv02105	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTAATAG	GGTGAAGCCA
Ca02299	GCTGTTGGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAACTAT	GCCTGAATAG	GGTGAAGCCA

701

750

MS02504	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
MS21020	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
MS02173	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Ma19038	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Mseq92055	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cs02200	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cn02083	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cd02080	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Pp19286	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Sp02448	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Ch02082	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cp19258	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	CCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cf08190	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cp02522	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Cv02105	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG
Ca02299	GAGGAAACTC	TGGTGGAGGC	TCGCAGCGGT	TCTGACGTGC	AAATCGATCG

751

800

MS02504	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
MS21020	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
MS02173	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Ma19038	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Mseq92055	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Cs02200	TCAAATTTGG	GTATAGGTTA	GTAGCTGGTT	CCTGCCGAAG	TTTCCCTCA.
Cn02083	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Cd02080	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Pp19286	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCCGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Sp02448	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Ch02082	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCCGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Cp19258	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCAA
Cf08190	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Cp02522	TCAAATTTGG	GCATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Cv02105	TCAAAGTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	TCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.
Ca02299	TCAAATTTGG	GTATAGGCTA	GTAGCTGGTT	CCTGTCTGAAG	TTTCCCTCA.

801

850

MS02504	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
---------	------------	------------	------------	------------	------------

MS21020	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
MS02173	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Ma19038	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Mseq92055	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cs02200	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cn02083	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cd02080	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAA . GCGAA	TGATTAGAGG
Pp19286	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Sp02448	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Ch02082	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cp19258	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cf08190	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cp02522	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Cv02105	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGG
Ca02299	GGATAGCAGT	AACGTTTTCA	GTTTTATGAG	GTAAAGCGAA	TGATTAGAGT

851

900

MS02504	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
MS21020	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
MS02173	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Ma19038	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Mseq92055	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cs02200	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cn02083	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cd02080	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Pp19286	CCTTGGGGAT	GAAACATCCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Sp02448	CCTTGGGGAT	GAAACATCCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Ch02082	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cp19258	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cf08190	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cp02522	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Cv02105	CCTTGGGGTT	GAAACAACCT	TAACCTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG
Ca02299	CCTTGGGGAT	GAAACATCCT	TAAACTATTC	TCAAACCTTTA	AATATGTAAG

901

950

MS02504	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
MS21020	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
MS02173	AAGTCCTTGT	TACTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Ma19038	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Mseq92055	AAGTCCTTGT	TACTTAATTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Cs02200	AAGTCCTTGT	TACTTAGTTG	AACGTGGACA	CTCGAATGTA	TCGTTACTAG
Cn02083	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	CTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Cd02080	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Pp19286	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Sp02448	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Ch02082	AAGTCCTTGT	TGCTTAATTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Cp19258	AAGTCCTTGT	TGCTTCGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Cf08190	AAGTCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Cp02522	AAGTCCTTGT	TGCTTAATTG	AACGTGGACA	TTCGAATGTA	TCGTTACTAG
Cv02105	AAGCCCTTGT	TGCTTAGTTG	AACGTGGGCA	TTTGAATGTA	TCGTTACTAG
Ca02299	AAGTCCTTGT	TACTTAGTTG	AACGTGGACA	TTTGAATGCA	CCGTTACTAG

951

1000

MS02504	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
MS21020	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
MS02173	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Ma19038	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Mseq92055	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Cs02200	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGCG
Cn02083	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGCG
Cd02080	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG

Pp19286	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Sp02448	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Ch02082	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Cp19258	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Cf08190	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Cp02522	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG
Cv02105	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGCG
Ca02299	TGGGCCATTT	TTGGTAAGCA	GAACTGGCGA	TGCGGGATGA	ACCGAACGTG

1001

1050

MS02504	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
MS21020	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
MS02173	AGGTAAAGGT	GCCAGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Ma19038	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Mseq92055	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cs02200	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cn02083	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cd02080	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Pp19286	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Sp02448	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Ch02082	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cp19258	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cf08190	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cp02522	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Cv02105	AGGTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAG
Ca02299	GGTTAAAGGT	GCCGGAATGC	ACGCTCATCA	GACACCACAA	AAGGTGTTAA

1051

1100

MS02504	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
MS21020	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
MS02173	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Ma19038	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Mseq92055	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Cs02200	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAC	CCGCTAAGGA
Cn02083	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Cd02080	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Pp19286	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Sp02448	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Ch02082	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAA	CCGCTAAGGA
Cp19258	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAC	CCGCTAAGGA
Cf08190	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAC	CCGCTAAGGA
Cp02522	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAC	CCGCTAAGGA
Cv02105	TTCATCTAGA	CAGCCGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAC	CCGCTAAGGA
Ca02299	TTCATCCAGA	CAGCAGGACG	GTGGCCATGG	AAGTCGGAAC	CCGCTAAGGA

1101

1150

MS02504	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
MS21020	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
MS02173	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Ma19038	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Mseq92055	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cs02200	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cn02083	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cd02080	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Pp19286	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Sp02448	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Ch02082	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cp19258	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cf08190	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cp02522	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG
Cv02105	TCGTGTAACA	ACTCACCGGC	CGAATGAACT	AGCCCTGAAA	ATGGATGGCG

Ca02299 GTGTGTAACA ACTCACCTGC CGAATGAATT AGCCCTGAAA ATGGATGGCG

1151

1200

MS02504 CTCAAGCGTG TTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
MS21020 CTCAAGCGTG TTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
MS02173 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Ma19038 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Mseq92055 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Cs02200 CTCAAGCGTG CTACCCATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Cn02083 CTCAAGCGTG CTACCCATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Cd02080 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Pp19286 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Sp02448 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Ch02082 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Cp19258 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGACAC GATGCCCCGA
Cf08190 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCACCGTCG GGGTAGACAC GATGCCCCGA
Cp02522 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CTCGCCGTCG GGGTAGATAC GATGCCCCGA
Cv02105 CTCAAGCGTG CTACCCATAC CTCGCCGTCG GGGCAGATAC GATGCCCCGA
Ca02299 CTCAAGCGTG CTACCTATAC CCCGCCGCA GGGTAGAAAC GATGCCCTGG

1201

1246

MS02504 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
MS21020 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
MS02173 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
Ma19038 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGGGA GTGATC
Mseq92055 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGGGA GTGATC
Cs02200 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
Cn02083 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
Cd02080 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
Pp19286 CGAGTAGGCG GGCCTGGAGG TCCGTGACGA AGCCTTGGGA GTGATC
Sp02448 CGAGTAGGCA GGCCTGGAGG TCCGTGACGA AGCCTCGGGA GTGATC
Ch02082 CGAGTAGGCG GGCCTGGAGG TCCGTGACGA AGCCTCGGGG GTGACC
Cp19258 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGGGC GTGAGC
Cf08190 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGAGC GTGAGC
Cp02522 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGAGA GTGATC
Cv02105 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGGGC GTGAGC
Ca02299 CGAGTAGGCA GGCCTGGGGG TCCGTGACGA AGCCTCGCGA GTGATC

Tabla 2.11. Ver pie de tabla en la página 223

Picos	Muestras en medio sólido	Muestras en medio líquido
P4,5	Ms02173 (s2)	
P5	Ms21020(s1,s2,s3); Ms01161(s1,s2,s3); Ms20093(s1,s2,s3) Ms06747(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s2,s3)	Ms21020(11,12); Ms01161(11,12,13); Ms20093(11,12,13); Ms02504(11,12,13)
P5,5	Ma19038(s2); Mvic(s1); Ms02173(s1,s2,s3)	Ma19038(13); Ms02173(11,12)
P6	Ms02504(s1,s2,s3), Ms01161(s2,s3); Ms21020(s2)	Ms02504(12), Ms01161(12); Ms21020(12,13)
P7	Ms02504(s2); Mvic(s2); Ma19038(s3); Ms20093(s1); Pp19286(s1)	
P8,5	Ms20093(s1,s2,s3)	
P8,75		Ma19038(13)
P9	Ms21020(s1,s2,s3); Ms01161(s1,s2,s3); Ms20093(s1,s2,s3); Ms06747(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s3)	Ms21020(12,13); Ms01161(12,13); Ms20093(11,12,13); Ms02504(12,13)
P9,5	Ms02504(s2)	
P10	Ms01161(s1,s2,s3); Ms21020(s1,s2,s3); Ms20093(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s2,s3); Ms06747(s1,s2,s3)	Ms21020(12,13); Ms20093(11,12); Ms02504(12)
P11	Ms21020(s1,s2,s3); Ms01161(s1,s2,s3); Ms20093(s1,s2,s3); Ms06747(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s2,s3)	Ms21020(12,13); Ms01161(12,13); Ms20093(11,12); Ms02504(11,12,13)
P11,5	Ma19038(s2)	
P12,5	Ma19038(s3)	Cd02080(12)
P13.5		Cd02080(11); Cn02083(12); Cs02200(12); Sp02448(11)
P14		Ma19038(11); Cs02200(11,12)
P14,2		Pp01966(11)
P15	Ms02504(s1,s2,s3), Ms06747(s1,s3)	
P15,5	Ma19038(s1,s2,s3); Ms01896(s1,s2,s3); Ms02173(s1,s2,s3); Mvic(s1,s2,s3); Cv02105(s1,s2,s3)	Ma19038(11,12,13); Ms02173(11,12,13); Mvic(11,12,13)
P15,75		Ms20093(11); Cv02105(11); Ms02504(12)
P16	Ms20093(s2); Ms02173(s2,s3); Ms01161(s3)	
P17	Sp02448(s1,s2,s3); Ms21020(s2); Ms01161(s3)	Ms21020(12)
P18	Ms02173 (s2)	
P19	Ms20093(s1,s2,s3); Ma19038(s3); Ms02504(s2)	Ch02082(11)
P19,5	Mvic(s1)	
P20	Ma19038(s1,s2), Ms20093(s1,s2,s3)	Ch02082(11)
P21	Ma19038(s3)	
P21,75	Ms06747(s1)	
P22	Ms20093(s1,s3)	
P23		Ms21020(13)

Picos	Muestras en medio sólido	Muestras en medio líquido
P23,5	Ma19038(s1,s2,s3);Ms20093(s1)	Ms20093(11, 12)
P24	Ms02173 (s2)	
P24,5	Ma19038(s3)	
P24,75	Ms20093(s3)	
P26	Ms02173(s1,s2,s3)	Ms02173(11, 12, 13)
P26,5	Ma19038(s1,s2,s3); Ms01896(s1); Ms02173(s1,s2,s3); Mvic(s1,s2,s3)	Ma19038(11,12,13); Mvic(11,12,13)
P27,5	Ms01161(s3); Mvic(s3)	
P28	Ma19038(s1,s2,s3)	
P28,5	Mvic(s1,s2,s3)	
P29,5	Cv02105(s1,s2,s3); Mvic(s1,s2,s3); Ma19038(s1,s2,s3)	Ma19038(11,12,13); Ms02173(11,12,13); Mvic(11,12,13)
P32	Ms20093(s1,s3)	Ms21020(13)
P32,5	Mvic(s1,s2,s3)	
P34	Ms02504(s2)	Pp01966(11); Mvic(11,13)
P34,2		Cn02083(11)
P34,5	Cd02080(s2); Ch02082(s1,s2)	Cd02080(11); Ch02082(11); Cn02083(11,12,13); Cs02200(11,12); Sp02448(11,12,13)
P35	Ms02504(s2)	
P36	Ms06747(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s2,s3)	
P37	Ms02504(s2)	
P39	Ms02504(s1,s3); Ms01161(s3)	Ms01161(12, 13)
P40	Ms01161(s1,s2); Ms06747(s1,s2,s3); Ms02504(s1,s3); Cn02083(s3)	Ms02504(11, 12, 13)
P40,2		Cv02105(11)
P41		Ms02504(12)
P42	Ma19038(s1,s2), Ms20093(s3)	
P43	Ma19038(s1)	Ms20093(11,12); Ms21020(13)
P44		Ms20093(11)
P46	Cv02105(s2,s3); Ms02173(s1)	Ms20093(12)
P47		Ms20093(11,12); Ms21020(13)
P48	Ms01161(s1,s2,s3)	Ms01161(11,12,13)
P50		Cd02080(11); Cs02200(11)
P51	Cn02083(s1, s3)	

Picos	Muestras en medio sólido	Muestras en medio líquido
P52	Ms06747(s1)	
P53		Ms21020(11)
P54		Ms21020(12, 13)
P55.5		Ms21020(12)
P56	Ms06747(s1,s3); Ms21020(s1,s2,s3)	Ms21020(12, 13)
P58		Ms02173(11, 12)
P59	Ms01896(s1,s2); Ma19038(s1,s3); Mvic(s1)	Ma19038(11,12,13); Ms02173(11,12)
P59.5		Ma19038(13)
P60	Pp01966(s3); Ms02173(s2); Ms01161(s3)	Pp01966(11,12,13)
P61	Ms02173 (s2)	
P62	Ms02173 (s2)	
P63	Ms02173 (s2)	
P64	Ms02173 (s2)	
P65	Ms02173(s2)	
P66	Ms02173(s2)	
P67	Ms02173(s2)	
P68	Ms02173(s2)	
P69	Ms02173(s2)	
P70	Pp19286(s1,s2,s3); Ms01896(s2,s3); Mseq(s1,s3); Pp01966(s1,s3); Cs02200(s1,s3); Mvic(s1); Msp00975(s1,s3)	Pp01966(12,13); Cs02200(11,13); Ms20093(13); Cd02080(11,12,13); Cv02105(12,13); Sp02448(12)
P71	Ms01896(s1,s2)	
P72	Ms01896(s1,s2)	
P73	Ms01896(s1,s2)	
P74	Mvic(s1,s2,s3)	Mvic(11)
P75	Ma19038(s1); Mvic(s2,s3); Ms02504(s1,s3)	
P76	Mvic(s1,s2,s3)	
P77	Msp00975(s1,s2,s3); Sp02448(s2); Mseq (s2,s3); Cd02080(s1,s2,s3)	
P78	Ms01896(s1); Mseq(s2,s3), Pp01966(s3); Cs02200(s1,s3); Msp00975(s1,s2,s3)	Cd02080(13)
P79	Pp01966(s1,s2)	Pp01966(12)
P80	Pp01966(s1,s2,s3)	Pp01966(12,13)
P81	Ma19038(s3),Ch02082(s1,s2); Pp1966(s3)	Pp01966(11,12)
P82	Ch02082(s1); Pp01966(s3)	Ch02082(11,12,13); Pp01966(11,12,13)

Picos	Muestras en medio sólido	Muestras en medio líquido
P83	Pp01966(s1,s2); Ms06747(s1)	Sp02448(11,12,13)
P84	Msp00975(s1,s2); Cs02200(s1,s2); Sp02448(s2); Pp19286(s2)	Cd02080(11)
P85	Sp02448(s1,s2,s3); Pp19286(s2)	
P86	Pp19286(s2,s3); Sp02448(s1,s2,s3)	
P87	Pp19286(s2,s3)	
P88	Pp19286(s2)	
P89	Pp19286(s1,s2,s3)	
P90	Ms02173(s1); Ms01896(s1); Pp1966(s3); Cn02083(s2); Ch02082(s1); Cd02080(s1,s2,s3); Cs02200(s1,s2,s3); Msp00975(s1,s2,s3)	
P91	Sp02448(s1,s2,s3)	Sp02448(11,12,13)
P92	Sp02448(s1,s2,s3)	Sp02448(11,12,13)
P93	Sp02448(s1,s2,s3)	Sp02448(11,13); Ch02082(11)
P94	Cn02083(s1,s2,s3)	Cn02083(12,13); Ms21020(13)
P95	Pp19286(s1); Cn02083(s2)	Cn02083(12); Sp02448(11,12,13)
P96	Cn02083(s2,s3)	
P97	Cv02105(s2); Msp00975(s2)	Pp01966(11); Cs02200(11)
P98	Cn02083(s2,s3)	Cn02083(11,12,13); Sp02448(13)
P99	Cn02083(s2)	Cn02083(12,13)
P101	Cn02083(s3)	Cn02083(13)
P102		Cn02083(12)
P103	Cn02083(s2,s3)	Cn02083(11,12,13)
P104	Cn02083(s1,s2,s3)	Cn02083(11,12,13)
P105		Cn02083(11,12)
P106	Cn02083(s1,s2,s3)	
P107	Cn02083(s1,s2,s3)	Ch02082(11)
P108	Cn02083(s1,s2)	
P109	Cn02083(s2, s3)	
P110	Cn02083(s1,s2,s3)	Cn02083(13)
P111	Cn02083(s1,s2,s3)	Cn02083(11)
P112	Ch02082(s2,s3)	Ch02082(11,12,13)
P113	Ch02082(s1,s2); Ms20093(s1,s3)	Ch02082(13)
P114	Ch02082(s1,s2)	

Picos	Muestras en medio sólido	Muestras en medio líquido
P115	Ch02082(s1,s2)	
P116	Ch02082(s1,s2)	Ch02082(11,12,13)
P117	Ch02082(s1,s2)	
P118		Ch02082(11,12,13); Ms21020(11,13)
P119	Ma19038(s3)	Ch02082(11,12,13)
P120		Ch02082(11,12,13)
P122	Cd02080(s1,s2)	
P123	Cn02083(s1); Cd02080(s2); Cs02200(s2); Cv02105(s2); Msp00975(s2)	
P124		Cv02105(12,13)
P125	Cv02105(s2)	
P126	Cv02105(s2,s3)	
P127	Cv02105(s2,s3); Ms20093(s1,s3)	
P128	Cv02105(s2,s3)	
P129	Msp00975(s1,s2,s3)	
P130	Msp00975(s1,s2,s3)	
P133	Ch02082(s1)	
P134	Cn02083(s3)	Cn02083(12,13); Ms20093(11)
P135	Mvic(s1,s3)	
P136	Mvic(s1,s3)	
P137	Ms01161(s3); Ma19038(s1,s3)	
P138	Ma19038(s1,s3)	
P139	Ma19038(s1); Mseq(s1,s3); Pp1966(s1)	
P141	Ma19038(s1,s3)	
P142	Ma19038(s1,s3)	
P143	Ma19038(s1)	Ma19038(12)
P144	Ms06747(s1,s3)	
P145	Ms06747(s1,s3)	
P146	Ms06747(s1)	
P147	Ms01161(s3)	
P148		Mvic(11,13)
P150		Ch02082(11,13)

Picos	Muestras en medio sólido	Muestras en medio líquido
P150,5		Ch02082(11)
P152		Ch02082(13)
P152.5		Ch02082(11,13)
P153		Ch02082(11,13)
P153,5		Ch02082(13)
P154		Ch02082(13)
P155		Pp01966(11)
P156		Pp01966(11)

Tabla 2.11. Tabla resumen de los picos obtenidos en el conjunto de los cromatogramas, y las muestras en las que aparece cada uno. Código de los replicados: s (cultivo sobre medio sólido), l (cultivo sobre medio líquido), 1, 2, 3 es el número de replicado.

Tabla 2.12. Matriz de datos obtenida a partir de cultivos crecidos en medio MEYE sólido.

Tabla 2.13 Matriz de datos obtenida a partir de cultivos crecidos en medio MEYE líquido.

Anexo 3

Figura 3.5. Alineamiento de secuencias del gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma. Las especies empleadas pertenecen al subphylum Euscomycotina. Sus números de acceso en el Genebank se encuentran en la Tabla 3.3. La región sombreada del alineamiento corresponde a las secuencias de los representantes de las familias *Mycocaliciaceae* y *Sphinctrinaceae*. La secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* (Subphylum Hemiascomycotina) fue empleada como “outgroup” para los posteriores análisis filogenéticos.

PileUp

Alineamiento a318 arreglando algunos gaps y eliminando zonas de alineamiento ambiguo.

arreglado con estructura secundaria de Neef 1993

```
GDC ***** GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor *****
GDC 010ac1019000080000000000ff008000ff0000ffffffffffffffffffffffff
GDC ff000000000000f43f000000000000f43f000000000000f03f0000000000
GDC 00f03f00A000000000190000cA54696d6573204e657720526f6d616e00A0
GDC 0320002000000000000000000000601444e000245510003535400044b520
GDC 00546595700064c49564d00285465786f73702c0d0a5468656c6f6d6d612
GDC c0d0a43797068656c69752c0d0a42756e6f646f70682c0d0a4c656966696
GDC 469752c0d0a4d7365712c0d0a4373323230302c0d0a507031393238362c0
GDC d0a53702c0d0a4d6131393033382c0d0a4d73323530342c0d0a4d7669632
GDC c0d0a436e323038332c0d0a6364323038302c0d0a537068696e6374722c0
GDC d0a4d616c6272616e632c0d0a5f5f4173636f737068612c0d0a4575726f7
GDC 469756d2c0d0a4d6f6e61736375732c0d0a436170726f6e69612c0d0a436
GDC f6e696f73706f2c0d0a506c656f73706f722c0d0a4c6570746f7370682c0
GDC d0a4e6575726f73706f2c0d0a4879706f6d7963652c0d0a4f7068696f737
GDC 46f2c0d0a58796c617269612c0d0a5268797469736d612c0d0a50656c746
GDC 96765722c0d0a4375646f6e6961632c0d0a426c756d657269612c0d0a496
GDC e65726d6973732c0d0a476c617a69656c6c2c0d0a4f726269617572692c0
GDC d0a4d6f6e6163726f732c0d0a536163636861726f2c0d0a4c6563616e6f7
GDC 2612c0d0a43616c696369756d293b0d0a00ABBADAEA0000002a000a00020
GDC 001B20AAA000a203a2000203a2000000000000000059400000000000000
GDC 0000c505800000ffff000047580000ff00ff000041475358000000ffff
GDC f0056434147444e535450580000ff00ffff00484b525800ff00000000ff4
GDC 544580000ff000000ff484b5245445800ffff0000ff48524551444e425
GDC a5800ff000000ff005957484b524551444e5354425a580000000000ff004
GDC 94c56415800ff00008080804659574858000000ff808080494c564341474
GDC d4659574854505800ffff000000c5058000000000000047580000000
GDC 000000041434753580000000000000564147444e535450580000000000
GDC 000484b5258000000000000004544580000000000000484b52454458000
GDC 0000000000048524551444e425a580000000000000435957484b5245514
GDC 44e5354425a580000000000000494c5641580000000000000465957485
GDC 800000000000000494c564341474d465957485450580000000000000030
GDC 0ffffff0000000ffff8080800000000c0c0c00000ABBBBBBBBBBBBBBB
GDC 00ff00A00260001000100010001000100010001000100010001000100010
GDC 001000100010001000100010001000100010001000100010001000100010
GDC 0010001000100010001000100010001000100010001A0018AA000000000
GDC 0000000000003A00ff0A0000000000080564000000000000805140000000
GDC 0000004940000002000000000001440A0000000098b20c410000000102
GDC 506410000000018980641000000078b10b4100AAABB00005374616e6461
GDC 72640046464c4c5353535359592a2a43432a574c4c4c4c50505050484851
GDC 51525252524949494d545454544e4e4b4b53535252565656564141414144
GDC 44454547474747002d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d4d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d00BBBB0000000000000026000000000000
GDC 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 000000000000000000000003000000000000BBAB00260000000000000000
GDC 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 201c7B00000000000594000000000005440000000000004e4000DAAB
GDC 000000ffffff0302014445484b524e5153540000ff00ff0000024c49564d
GDC 4659574147435000ff000000ff0004014445484b520000ff00ff0000024e
GDC 5153540000ff00ff8000034c49564d46595700ff000000ff0004414700ff
GDC 00000800008014445000ff00ff000002484b5200ffffff0000034e51
GDC 0000ff00ff800004535400ffffff8000054c495600ff000000ff000646
GDC 595700ffffff00ff0007414700ff000008000084d4300ffffff00800053
```

GDC 6163636861726f0000000000Affffff80808000A0301e5B0000000000005
 GDC 9400000000000005440000000000004e4000DAAB000000c0c0c00302014
 GDC 1470000ff00ff00000243545500ff000000ff00020147430000ff00ff000
 GDC 00241545500ff000000ff00005014100000000ff00000243000000000ff0
 GDC 003545500000000000ff044700000000ffff00054e5800ffffff0000000
 GDC 000004d79636f63616c6963696163656165000a4d7365713932303535004
 GDC 373303232303000507031393238360053703032343438004d61313930333
 GDC 8004d733032353034004d766963303030323100436e30323038330043643
 GDC 03230383000532e74757262696e61746100Affffff80808000A

3.5.msf MSF: 1672 Type: N December 26, 2001 20:28 Check: 5765 ..

Name: O.auricolor	Len: 1672	Check: 7519	Weight: 1.00
Name: M.psychrophilum	Len: 1672	Check: 6701	Weight: 1.00
Name: L.dispersa	Len: 1672	Check: 7714	Weight: 1.00
Name: P.neopolydactyla	Len: 1672	Check: 2815	Weight: 1.00
Name: T.sancti-jacobi	Len: 1672	Check: 6981	Weight: 1.00
Name: T.mammosum	Len: 1672	Check: 5484	Weight: 1.00
Name: C.inquinans	Len: 1672	Check: 7436	Weight: 1.00
Name: B.scrobiculatum	Len: 1672	Check: 4124	Weight: 1.00
Name: L.tenerum	Len: 1672	Check: 6110	Weight: 1.00
Name: C.adspersum	Len: 1672	Check: 5081	Weight: 1.00
Name: S.turbinata	Len: 1672	Check: 3695	Weight: 1.00
Name: Mseq92055	Len: 1672	Check: 5139	Weight: 1.00
Name: Cs02200	Len: 1672	Check: 4741	Weight: 1.00
Name: Pp19286	Len: 1672	Check: 7814	Weight: 1.00
Name: Sp02448	Len: 1672	Check: 4779	Weight: 1.00
Name: Ma19038	Len: 1672	Check: 6887	Weight: 1.00
Name: Ms02504	Len: 1672	Check: 7266	Weight: 1.00
Name: Mvic00021	Len: 1672	Check: 941	Weight: 1.00
Name: Cn02083	Len: 1672	Check: 7324	Weight: 1.00
Name: Cd02080	Len: 1672	Check: 9323	Weight: 1.00
Name: M.gypsea	Len: 1672	Check: 2796	Weight: 1.00
Name: A.apis	Len: 1672	Check: 1476	Weight: 1.00
Name: E.rubrum	Len: 1672	Check: 5548	Weight: 1.00
Name: M.purpureus	Len: 1672	Check: 288	Weight: 1.00
Name: C.mansonii	Len: 1672	Check: 4427	Weight: 1.00
Name: C.apollinis	Len: 1672	Check: 2158	Weight: 1.00
Name: P.herbarum	Len: 1672	Check: 1966	Weight: 1.00
Name: L.bicolor	Len: 1672	Check: 196	Weight: 1.00
Name: N.crassa	Len: 1672	Check: 7524	Weight: 1.00
Name: H.chrysospermus	Len: 1672	Check: 2454	Weight: 1.00
Name: O.stenoceras	Len: 1672	Check: 1625	Weight: 1.00
Name: X.carpophyla	Len: 1672	Check: 2793	Weight: 1.00
Name: R.salicinum	Len: 1672	Check: 5967	Weight: 1.00
Name: C.confusa	Len: 1672	Check: 6651	Weight: 1.00
Name: B.graminis	Len: 1672	Check: 8736	Weight: 1.00
Name: I.aggregatta	Len: 1672	Check: 5950	Weight: 1.00
Name: G.aurantiaca	Len: 1672	Check: 5712	Weight: 1.00
Name: S.cerevisiae	Len: 1672	Check: 1624	Weight: 1.00

//

	1		50
O.auricolor	TAAGTATAAG	CAA.CTA.TA	CAGTGAAACT GCGAAATGGC TCATTAAATC
M.psychrophilum	TAAGTATAAG	CAA.CTA.TA	CAGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTAAATC
L.dispersa	TAAGTATAAG	CAATCT..TA	CGGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTATATC
P.neopolydactyla	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CAGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTAAATC
T.sancti-jacobi	TAAGTATAAG	CAA.CTA.TA	CGGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTAAATC
T.mammosum	TAAGTATAAG	CAA.CTA.TA	CGGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTAAATC
C.inquinans	TAAGTATAAG	CAA.CTA.TA	CGGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTAAATC
B.scrobiculatum	CAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CCGTGAAACT GCGAA.TGGC TCATTAAATC

L.tenerum	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
C.adspersum	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
S.turbinata	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Mseq92055	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Cs02200	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Pp19286	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Sp02448	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Ma19038	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Ms02504	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Mvic00021	TAAGTTTAAG	CAATCTAATA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Cn02083	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
Cd02080	TAAGTTTAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
M.gypsea	TAAGTATAAG	CAATTAG.TA	TGGTGAAACT	GCGAA.CGCG	TCATTAAATC
A.apis	TAAGTATAAC	CAATCTG.TA	CTGAGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
E.rubrum	TAAGTATAAG	CACTTTA.TA	CTGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
M.purpureus	TAAGTGTAAG	CAATTTA.TA	CTGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
C.mansonii	TAAGTATAAG	CAATC.A.TA	CTGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
C.apollinis	TAAGTATAAG	CAATC.A.TA	CTGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
P.herbarum	TAAGTATAAG	CAAT.TA.TA	CCGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
L.bicolor	TAAGTATAAG	CAAT.TA.TA	CCGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
N.crassa	TAAGTTTAAG	CAAT.TA.AA	CCGCGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
H.chrysospermus	TAAGTATAAG	CAAT.TA.TA	CCGCGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTATATA
O.stenoceras	TAAGTATAAG	CAAT.TA.TA	CCGCGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAACC
X.carpophyla	TAAGTATAAG	CAAT.TA.TA	CCGCGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
R.salicinum	TAAGTATAAG	CAATATA.TA	CCGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
C.confusa	TAAGTATAAG	CAAATA.TA	CCGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
B.graminis	NNNNNNNNNN	CAATTTA.TA	CCGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
I.aggregatta	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CAGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
G.aurantiaca	TAAGTATAAG	CAATCTA.TA	CGGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC
S.cerevisiae	TAAGTATAAG	CAATTTA.TA	CAGTGAAACT	GCGAA.TGGC	TCATTAAATC

51

100

O.auricolor	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
M.psychrophilum	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
L.dispersa	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	.CC.GTGGTA
P.neopolydactyla	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.CCT	ACTTGG.ATA	ACCTGTGGTA
T.sancti-jacobi	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	ACC.GTGGTA
T.mammosum	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	ACC.GTGGTA
C.inquinans	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	ACC.GTGGTA
B.scrobiculatum	AGTTGTCGTC	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	.CCTGTGGCA
L.tenerum	AGTTGTCGTC	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	.CCTGTGGTA
C.adspersum	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGGGATA	ACC.GTGGTA
S.turbinata	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTC.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Mseq92055	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACTTC.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Cs02200	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTC.ATT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Pp19286	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Sp02448	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Ma19038	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.CTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Ms02504	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Mvic00021	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Cn02083	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
Cd02080	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTC.TTT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
M.gypsea	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	CCC.GTGGTA
A.apis	AGTTAT.GTT	TATTTGATAG	TACCTTTACT	ACATGG.ATA	CCC.GTGGTA
E.rubrum	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	CCT.GTGGTA
M.purpureus	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	CCT.GTGGTA
C.mansonii	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT...T	ACCTGG.ATA	ACC.GTGGTA
C.apollinis	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT...T	ACCTGG.ATA	ACC.GTGGTA
P.herbarum	AGTTATCGTT	TATTTGATAA	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
L.bicolor	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	CCT.GTGGTA
N.crassa	AGTTATAGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	ACC.GTGGTA

H.chrysospermus	AGTTATCGTT	TATTTGATAA	TACTTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
O.stenoceras	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
X.carpophyla	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
R.salicinum	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACATGG.ATA	ACC.GTGGTA
C.confusa	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACTTT.ACT	ACATGG.ATA	ACC.GTGGTA
B.graminis	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
I.aggregatta	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTT.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
G.aurantiaca	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TACCTC.ACT	ACTTGG.ATA	ACC.GTGGTA
S.cerevisiae	AGTTATCGTT	TATTTGATAG	TTCCTTTACT	ACATGGTATA	ACC.GTGGTA

101

150

O.auricolor	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.TC	CCGACC.TCC	.GGAAGGGAT
M.psychrophilum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.TC	CCGACC.TCT	.GGAAGGGAT
L.dispersa	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
P.neopolydactyla	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTACAAACCC	CCCAGACTAA	A.GAAGGGGC
T.sancti-jacobi	ATTCTAGAGC	TAATACG.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGAGGT
T.mammosum	ATTCTAGAGC	TAATACG.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
C.inquinans	ATTCTAGAGC	TAATACGATG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
B.scrobiculatum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCAAC..TTC	.GGAAGGGGT
L.tenerum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
C.adspersum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CT	CCGAC..TTC	.GGGAGGGGT
S.turbinata	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CCAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
Mseq92055	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCAAC..TTC	.GGGAGGGGT
Cs02200	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGGAGGGGT
Pp19286	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGGAGGGGT
Sp02448	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCAAC..TTC	.GGGAGGGGT
Ma19038	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGGAGGGGT
Ms02504	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCAAC..TTC	.GGGAGGGGT
Mvic00021	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCAAC..TTC	.GGGAGGGGT
Cn02083	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCAAC..TTC	.GGGAGGGGT
Cd02080	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCAAC..TTC	.GGGAGGGGT
M.gypsea	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
A.apis	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
E.rubrum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
M.purpureus	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
C.mansonii	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
C.apollinis	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.TC	CCGAC..TTC	.GGAGGGGAT
P.herbarum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTGAAAA.TC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGAT
L.bicolor	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CAAAC..TTC	.GGAATGGGT
N.crassa	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
H.chrysospermus	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.TC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGTT
O.stenoceras	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTGAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGAT
X.carpophyla	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.TC	CCGAC..TTA	.CGAAGGGAT
R.salicinum	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	TCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
C.confusa	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGG.T
B.graminis	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAG.CC	CCGAC..TTC	.GGAAGGGGT
I.aggregatta	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTAAAAA.TC	CCGACC.TCT	.GGAAGGGAT
G.aurantiaca	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTTAAAA.TC	CCGACC.CCC	.GGAAGGGAT
S.cerevisiae	ATTCTAGAGC	TAATACA.TG	CTTAAAA.TC	TCGACCCTTT	.GGAAGAGAT

151

200

O.auricolor	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCC.TT	CGG.GCTC.C	TTGGTGATTC
M.psychrophilum	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCC.TT	CGG.GCTC.C	TTGGTGATTC
L.dispersa	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
P.neopolydactyla	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCC.TT	CGG.GCTC.C	TTGGTGATTC
T.sancti-jacobi	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
T.mammosum	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
C.inquinans	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
B.scrobiculatum	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	CTGGTGATTC
L.tenerum	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	CTGGTGATTC
C.adspersum	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.T	GTGGTGATTC

<i>S. turbinata</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
Mseq92055	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
Cs02200	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.T	TTGGTGAATC
Pp19286	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CTGGGCTC.C	TTGGTGAATC
Sp02448	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGCGAATC
Ma19038	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
Ms02504	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
Mvic00021	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
Cn02083	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
Cd02080	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
<i>M. gypsea</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
<i>A. apis</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.T	TTGGTGACTC
<i>E. rubrum</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAACGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
<i>M. purpureus</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAACGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGAATC
<i>C. mansonii</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	TGG.GCTC.C	TTGGTGATTC
<i>C. apollinis</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
<i>P. herbarum</i>	GTGTTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTT.T	TTGGTGATTC
<i>L. bicolor</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
<i>N. crassa</i>	GTATTTATTA	GATTA AAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTA.A	CTGGTGATTC
<i>H. chrysospermus</i>	GTATTTATTA	GATTA AAAAC	CAATGCCCTC	T.GGGCTC.T	CTGGTGAATC
<i>O. stenoceras</i>	GTATTTATTA	GATTA AAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTC.C	CTGGTGATTC
<i>X. carpophyla</i>	GTATTTATTA	GATTA AAAAC	CAATGCCCTT	CGGGGCTTTT	CTGGTGATTC
<i>R. salicinum</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGG.GCTC.C	CTGGTGATTC
<i>C. confusa</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTT	CGGNNCTC.C	CTGGTGATTC
<i>B. graminis</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCCCTC	CGGGGCTC.C	TTGGTGATTC
<i>I. aggregata</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGCC.TT	CGG.GCTC.C	CTGGTGATTC
<i>G. aurantiaca</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAATGTC.TT	CGG.ACTC.T	CTGGTGATTC
<i>S. cerevisiae</i>	GTATTTATTA	GATAAAAAAT	CAATGTC.TT	CGG.ACTC.T	TTGATGATTC

201

250

<i>O. auricolor</i>	ATGATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>M. psychrophilum</i>	ATGATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>L. dispersa</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>P. neopolydactyla</i>	ATAATAACTC	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>T. sancti-jacobi</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>T. mammosum</i>	ATAATAACTC	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>C. inquinans</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>B. scrobiculatum</i>	ATAATAACTT	AACGGATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCGA
<i>L. tenerum</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCGA
<i>C. adspersum</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>S. turbinata</i>	ATGATAACTT	TACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Mseq92055	ATGATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Cs02200	ATGATAACTT	CACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Pp19286	ATGATAACTT	TACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Sp02448	ATGATAACTT	CACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Ma19038	ATGATAACTT	CACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Ms02504	ATGATAACTT	TACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Mvic00021	ATGATAACTT	CACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Cn02083	ATAATAACTT	CACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
Cd02080	ATGATAACTT	TACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>M. gypsea</i>	ATAATAACTT	CTCGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCGGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>A. apis</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGT	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>E. rubrum</i>	ATAATAACTA	AGCGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>M. purpureus</i>	ATAATAACTA	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>C. mansonii</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>C. apollinis</i>	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>P. herbarum</i>	ATGATAACTT	TACGGATCGC	ATAGCCTTGC	GCTGGCGACG	GTTTCATTCAA
<i>L. bicolor</i>	ATAATAACTT	CTCAGATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGACG	GTTTCATTCAA
<i>N. crassa</i>	ATAATAACTT	CTCGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCTGGCGATG	GTTTCATTCAA
<i>H. chrysospermus</i>	ATAATAACTT	GTCGAATCGA	CAGGCCTTGT	GCCGGCGATG	GCTCATTCAA
<i>O. stenoceras</i>	ATAATAACTT	CTCGAATCGC	ACGGCCTTGC	GCCGGCGATG	GTTTCATTCAA

X.carpophyla	ATAATAACTT	CTCGAATCGC	ATGGCCTTGT	GCCGGCGATG	G TTCATTCAA
R.salicinum	ATAATAACTC	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCG.CGATG	G TTCATTCAA
C.confusa	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGC	GC.GGTGATG	G TTCATTCAA
B.graminis	ATAATAACTT	AACGAATCGC	ATGGCCTTGT	GCCGGCGATG	G TTCATTCAA
I.aggregatta	ATGATAACTT	TACGAATCGC	ATGGCCTTGT	GC.GGCGATG	G TTCATTCAA
G.aurantiaca	ATGATAACTT	TGCGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	G TTCATTCAA
S.cerevisiae	ATAATAACTT	TTCGAATCGC	ATGGCCTTGT	GCTGGCGATG	G TTCATTCAA

251

300

O.auricolor	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
M.psychrophilum	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
L.dispersa	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTGG
P.neopolydactyla	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
T.sancti-jacobi	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
T.mammosum	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGCTAGG	GTAGTGGCCT	AGCATGGTTT
C.inquinans	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTACT	ATAGTGGACT	ACCATGGTTT
B.scrobiculatum	GCTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAAT	ATAGTGGATT	ACCATGGTTT
L.tenerum	GCTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAAT	GTAGTGGATT	ACCATGGTTT
C.adspersum	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTTAG	GTAGTGGCTA	ACCATGGTTT
S.turbinata	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Mseq92055	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Cs02200	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Pp19286	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Sp02448	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Ma19038	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Ms02504	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Mvic00021	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Cn02083	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
Cd02080	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
M.gypsea	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTGG
A.apis	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTGG
E.rubrum	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTGG
M.purpureus	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTGG
C.mansonii	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATTGTAAA	ATAGAGGTTT	ACAATGGTTT
C.apollinis	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTCT
P.herbarum	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAAG	GTATTGGCTT	ACCATGGTTT
L.bicolor	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAAG	GTATTGGCTT	ACCATGGTGG
N.crassa	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGACGGCTGG	GTCTTGGCCA	GCCATGGTGA
H.chrysospermus	ATTTCTTCCC	TATCAACTTT	CGATGTTTGG	GTATTGGCCA	AACATGGTGG
O.stenoceras	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGACGGCTGG	GTCTTGGCCA	GCCATGGTGA
X.carpophyla	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGCAGG	GTCTTGGCCT	GCCATGGTTA
R.salicinum	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
C.confusa	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
B.graminis	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGT	ATATGGGACT	ACCATGGTTT
I.aggregatta	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
G.aurantiaca	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT
S.cerevisiae	ATTTCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGTGGCCT	ACCATGGTTT

301

350

O.auricolor	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
M.psychrophilum	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
L.dispersa	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
P.neopolydactyla	CTACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
T.sancti-jacobi	CTACGGGTAA	CGGGGAGATTA	GGGTTTGGACT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
T.mammosum	CTACGGGTAA	CGGGGAGATTA	GGGTTTGGACT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
C.inquinans	CTACGGGTAA	CGGGGAGATTA	GGGTTTGGACT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
B.scrobiculatum	CTACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
L.tenerum	CTACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
C.adspersum	CTACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
S.turbinata	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Mseq92055	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA

Cs02200	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGACT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Pp19286	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Sp02448	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Ma19038	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Ms02504	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Mvic00021	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Cn02083	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
Cd02080	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
M.gypsea	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
A.apis	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
E.rubrum	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
M.purpureus	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
C.mansonii	TAACGGGTAA	CGGAGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
C.apollinis	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
P.herbarum	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
L.bicolor	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGTT	AGCCTGAGAA
N.crassa	CAACGGGTAA	CGGAGGGTTA	GGGCTCGACC	CCGGAGAAGG	AGCCTGAGAA
H.chrysospermus	CAACGGGTAA	CGGAGGGTTA	GGGCTCGACC	CCGGAGAAGG	AGCCTGAGAA
O.stenoceras	CAACGGGTAA	CGGAGGGTTA	GGGCTCGACC	CCGGAGAAGG	AGCCTGAGAA
X.carpophyla	CAACGGGTAA	CGGAGGGTTA	GGGCTCGACC	CCGGAGAAGG	AGCCTGAGAA
R.salicinum	CAACGGGTAA	CGGGATTTTA	GGGAATGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
C.confusa	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
B.graminis	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
I.aggregatta	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTCTATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
G.aurantiaca	CAACGGGTAA	CGGGGAATTA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
S.cerevisiae	CAACGGGTAA	CGGGGAATAA	GGGTTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA

351

400

O.auricolor	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
M.psychrophilum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
L.dispersa	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
P.neopolydactyla	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
T.sancti-jacobi	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
T.mammosum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
C.inquinans	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
B.scrobiculatum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
L.tenerum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
C.adspersum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
S.turbinata	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Mseq92055	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Cs02200	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Pp19286	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Sp02448	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Ma19038	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Ms02504	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Mvic00021	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Cn02083	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
Cd02080	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
M.gypsea	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
A.apis	ACGGCTACCA	CATCTAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
E.rubrum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
M.purpureus	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
C.mansonii	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATGCT
C.apollinis	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
P.herbarum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
L.bicolor	ACGGCTAACA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
N.crassa	ACGGCTACTA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
H.chrysospermus	ACGGCTACTA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
O.stenoceras	ACGGCTACTA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
X.carpophyla	ACGGCTACTA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
R.salicinum	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC

<i>C.confusa</i>	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCN
<i>B.graminis</i>	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
<i>I.aggregatta</i>	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
<i>G.aurantiaca</i>	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCN
<i>S.cerevisiae</i>	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCT

401

450

<i>O.auricolor</i>	GATTCGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>M.psychrophilum</i>	AATTCGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>L.dispersa</i>	GATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>P.neopolydactyla</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATGCGAGAGC	TCTTTTGGGT
<i>T.sancti-jacobi</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGAGC	TCTTTTGGGT
<i>T.mammosum</i>	GATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGAGC	TCTTTTGGGT
<i>C.inquinans</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGAGC	TCTTTTGGGT
<i>B.scrobiculatum</i>	GACCCGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATGA.GCGGC	TCTTTCGGGC
<i>L.tenerum</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATGA.GCGGC	TCTTTCGGGC
<i>C.adspersum</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATGC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>S.turbinata</i>	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Mseq92055</i>	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Cs02200</i>	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Pp19286</i>	AATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Sp02448</i>	AATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Ma19038</i>	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Ms02504</i>	AATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Mvic00021</i>	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Cn02083</i>	AACGCGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>Cd02080</i>	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>M.gypseae</i>	GATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATATTG	ATCC.GGGGC	TCTTTCGGGT
<i>A.apis</i>	GATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTCGGGT
<i>E.rubrum</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.GGGGC	TCTTTTGGGT
<i>M.purpureus</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.GGGGC	TCTTTCGGGT
<i>C.mansonii</i>	AATTCAGCGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.GGGGC	TCTTTCGGGT
<i>C.apollinis</i>	AATT.GGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>P.herbarum</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>L.bicolor</i>	GATACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>N.crassa</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>H.chrysospermus</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>O.stenoceras</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>X.carpophyla</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>R.salicinum</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>C.confusa</i>	GACACGGGGA	GGTAGTTACA	ATAAATACAG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>B.graminis</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	TCTTTTGGGT
<i>I.aggregatta</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATAC.AGGGC	C.TTTCGGGT
<i>G.aurantiaca</i>	GACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATACTG	ATGT.AGGGC	CATTTATGGT
<i>S.cerevisiae</i>	AATTCAGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATAACG	ATAC.AGGGC	CCATTCGGGT

451

500

<i>O.auricolor</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>M.psychrophilum</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	TCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>L.dispersa</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>P.neopolydactyla</i>	TTTCTAGTTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATT	TCTTAATGAG	GAACAATTGG
<i>T.sancti-jacobi</i>	TTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>T.mammosum</i>	TTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>C.inquinans</i>	TTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATGTAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>B.scrobiculatum</i>	CGTTCAATTG	GAATGAGTAC	AATGTAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>L.tenerum</i>	CGTTCAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>C.adspersum</i>	CTTGCAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>S.turbinata</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>Mseq92055</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>Cs02200</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
<i>Pp19286</i>	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG

Sp02448	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
Ma19038	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
Ms02504	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
Mvic00021	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
Cn02083	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
Cd02080	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
M. gypsea	CTCGGAATTC	GAATGAGAAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
A. apis	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	TAACAATTGG
E. rubrum	CTCGTAATTG	GAATGAGTAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
M. purpureus	CTCGTAATCG	GAATGAGAAC	GACCTAAATA	ACCTAACGAG	GAACAATTGG
C. mansonii	CTCGTAATTG	GAATGAGTAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
C. apollinis	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATCTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
P. herbarum	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAACC	TCTTAACGAG	GAACAATTGG
L. bicolor	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAACC	TCTTAACGAG	GAACAATTGG
N. crassa	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
H. chrysospermus	CTTGTAATCG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
O. stenoceras	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAATTC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
X. carpophyla	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
R. salicinum	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
C. confusa	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
B. graminis	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
I. aggregata	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CATTAACGAG	GAACAATTGG
G. aurantiaca	CTTGCAATCG	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GAACAATTGG
S. cerevisiae	CTTGTAATTG	GAATGAGTAC	AATGTAAATA	CCTTAACGAG	GAACAATTGG

501

550

O. auricolor	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
M. psychrophilum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
L. dispersa	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
P. neopolydactyla	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
T. sancti-jacobi	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
T. mammosum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
C. inquinans	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
B. scrobiculatum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
L. tenerum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
C. adspersum	AGGGCAAGTC	TGGTGAACA.	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
S. turbinata	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Mseq92055	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Cs02200	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Pp19286	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Sp02448	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Ma19038	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Ms02504	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Mvic00021	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Cn02083	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
Cd02080	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
M. gypsea	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
A. apis	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
E. rubrum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
M. purpureus	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
C. mansonii	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
C. apollinis	AGGGCAAGTC	TG. TG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
P. herbarum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
L. bicolor	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
N. crassa	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
H. chrysospermus	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
O. stenoceras	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
X. carpophyla	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
R. salicinum	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAGTAGCGT
C. confusa	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CSGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
B. graminis	AGGGCAAGTC	TGGTG. CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT

<i>I. aggregata</i>	AGGGCAAGTC	TGGTG .CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
<i>G. aurantiaca</i>	AGGGCAAGTC	TGGTG .CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT
<i>S. cerevisiae</i>	AGGGCAAGTC	TGGTG .CCAG	CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT

551

600

<i>O. auricolor</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTTTGG
<i>M. psychrophilum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTTTGG
<i>L. dispersa</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>P. neopolydactyla</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TCAGGCCTGG
<i>T. sancti-jacobi</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>T. mammosum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>C. inquinans</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>B. scrobiculatum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>L. tenerum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>C. adspersum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>S. turbinata</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Mseq92055</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>Cs02200</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Pp19286</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Sp02448</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Ma19038</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Ms02504</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Mvic00021</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Cn02083</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>Cd02080</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>M. gypsea</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>A. apis</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>E. rubrum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>M. purpureus</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>C. mansonii</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCCGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGATCTGG
<i>C. apollinis</i>	ATATTAAAGT	TGTTGC .GTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>P. herbarum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAAAC	TTGGGCCTGG
<i>L. bicolor</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTTGGCCTGG
<i>N. crassa</i>	ATATTAAAGT	TGTTGAGGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGC .TCG
<i>H. chrysospermus</i>	ATATTAAAGT	TGTTGTGGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>O. stenoceras</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>X. carpophyla</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>R. salicinum</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>C. confusa</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>B. graminis</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>I. aggregata</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGTCTGG
<i>G. aurantiaca</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACC	TTGGGCCTGG
<i>S. cerevisiae</i>	ATATTAAAGT	TGTTGCAGTT	AAAAAGCTCG	TAGTTGAACT	TTGGGCCCGG

601

650

<i>O. auricolor</i>	CTGCTCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGAT . . . G	CGGCCGGATC	TTTCCTTCTG
<i>M. psychrophilum</i>	CTGCTCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGAT . . . G	CGGCCGGATC	TTTCCTTCTG
<i>L. dispersa</i>	CTGTCCGGTC	CG .CGCGTGT	ACTGGT . . . C	CGGGCCGGCC	TTTCCTTCTG
<i>P. neopolydactyla</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGAGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCT	TTTCCTTCTG
<i>T. sancti-jacobi</i>	CTGTCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>T. mammosum</i>	CTGTCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>C. inquinans</i>	CTGTCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>B. scrobiculatum</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . T	CGTCCGGGCC	TTTCCTCCTG
<i>L. tenerum</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>C. adspersum</i>	CTGTCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>S. turbinata</i>	YTGGCCGGTC	CG .CGCGAGC	ACTGGT . . . T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>Mseq92055</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . C	CGGCCGGACC	TTTCCTTCTG
<i>Cs02200</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>Pp19286</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>Sp02448</i>	CTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
<i>Ma19038</i>	TTGGCCGGTC	CG .CGCGTGC	ACTGGT . . . C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG

Ms02504	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
Mvic00021	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
Cn02083	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
Cd02080	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGACC	TTTCCTTCTG
M.gypsea	CTGGTCGGTC	CG.CGCGTGT	ACTGAT...C	CGGCCGGACC	TTTCCTTCTG
A.apis	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGT	ACTGGT...C	CGGCTGGACC	TTTCCTTCTG
E.rubrum	CTGGCCGGTC	CG.CGCGAGT	ACTGGT...C	CGGCTGGACC	TTTCCTTCTG
M.purpureus	CTGGCCGGTC	CG.CGCGAGT	ACTGGT...C	CGGCCGGACC	TTTCCTTCTG
C.mansonii	CTGATCTGTC	CT.CGAGCGT	ACGGAT...T	CGGTCGGATC	TTTCCTTCTG
C.apollinis	CTGATCTGTC	CT.CGAGCGC	ACGGAT...T	CGGTCGGGCC	TTTCCTTCTG
P.herbarum	CTGGCGGGTC	CG.CGCGTGC	ACTCGT...C	CGGCCGGGCC	TTC.CTTCTG
L.bicolor	CTGGCAGGTC	CG.CGCGTGC	ACTTGT...C	CGGCCGGGCC	TTTTCTTCTA
N.crassa	GCCGTCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGAC...T	GGGTGGGCC	TTTTTTCTG
H.chrysospermus	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGT	ACTGGT...C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
O.stenoceras	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGGTC	TTTCCTTCTG
X.carpophyla	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
R.salicinum	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
C.confusa	TTGGCNGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGACCGGGCC	TTTCCTTCTA
B.graminis	CTGGCCGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGT...C	CGGCCGGGTC	TTTCCTCTG
I.aggregata	CTACCNGGTC	CG.CGCGTGC	ACTGGA...A	ACCCCGGATC	TTTCCTTCTG
G.aurantiaca	CTGACCGGTC	CGGCGCGTGT	ACTGGT...T	CGGCCGGGCC	TTTCCTTCTG
S.cerevisiae	TTGGCCGGTC	CG.ATCGTGT	ACTGGATTTC	CAACGGGGCC	TTTCCTTCTG

651

700

O.auricolor	GCTAACCTCA	TGCCCTTTAC	TGGGTGTGCT	GGGGATCCAN	GACTT.TTAC
M.psychrophilum	GCTAACCCCA	TGCCCTTTAT	TGGGTGTGGT	GGGGATCCAG	GACTT.TTAC
L.dispersa	GGGAACCGCA	TGCC.TTCAT	TGGCCGTGTT	GGGGATCCAG	GACTT.TTAC
P.neopolydactyla	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGCGTT	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
T.sancti-jacobi	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAT	TGGGTGTGCC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
T.mammosum	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAT	TGGGTGTGCC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
C.inquinans	GGGAGCCGCA	TGCCCTTTAT	TGGGTGTGCC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
B.scrobiculatum	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCGT	TGGGTGTGTC	GGGGATCCAG	GACTTCTTAC
L.tenerum	GGGAACCGCA	TGCCCTTCAT	TGGGTGTGTC	GGGGATCCAG	GACTT.TTAC
C.adspersum	GNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
S.turbinata	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGCGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Mseq92055	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGCGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Cs02200	GGGAGCCGCA	TGTCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Pp19286	GGAATCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Sp02448	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Ma19038	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGCC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Ms02504	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGCC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Mvic00021	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAT	TGGGTGTGCT	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Cn02083	GGGAGCCGCA	TGCCCTTTAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
Cd02080	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
M.gypsea	GGGAGCCCTA	TGGCCTTCAC	TGGCTGTAG.	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
A.apis	GGGAACCCCTA	TGGCCTTCAC	TGGCTGTAGG	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
E.rubrum	GGGAACCTCA	TGGCCTTCAC	TGGCTGTGG.	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
M.purpureus	GGGAACCTCA	TGGCCTTCAC	TGGCTGTGG.	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
C.mansonii	GGGAACCG.A	TGCCCTTTAC	TGGGTGTGCT	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
C.apollinis	GGGAGCCCGA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
P.herbarum	AAGAACCTCA	TGCCCTTCAC	TGGGCGTGTT	GGGGAATCAG	GACTT.TTAC
L.bicolor	GAGAACCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTT	GGGGAC.TAG	GACTT.TTAC
N.crassa	GAGAACCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
H.chrysospermus	TGGAACCCCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGGC	GGGGAACAG	GACTT.TTAC
O.stenoceras	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
X.carpophyla	GGGAGCCCGA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGGC	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
R.salicinum	GGGAGCCTCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTT	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
C.confusa	GGGAGCCGCA	TGCCCTTCAT	TGGGTGTGTT	GGGGAACCTAG	GACTT.TTAC
B.graminis	GGGAGCCACA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTT	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC
I.aggregata	GCTAACCTCA	TGCCCTTTAC	TGGGTGTGCT	GGGGATCCAG	GACTT.TTAC
G.aurantiaca	GCGAACCGCA	TGCCCTTCAC	TGGGTGTGTT	GGGGAACCAG	GACTT.TTAC

S.cerevisiae GCTAACCTTG AGTCCTTG.. TGGCTCT..T GGCGAACCAG GACTT.TTAC

701

750

<i>O.auricolor</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GYTNC	GAATACATTA
<i>M.psychrophilum</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAACAGGC	CTTT.GCT.C	GAATACATTA
<i>L.dispersa</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>P.neopolydactyla</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAA.GCAG.C	ATAT.GCT.C	GGATACATTA
<i>T.sancti-jacobi</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	ATAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>T.mammosum</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	ATAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>C.inquinans</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	ATAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>B.scrobiculatum</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>L.tenerum</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>C.adspersum</i>	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
<i>S.turbinata</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Mseq92055</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Cs02200</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Pp19286</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Sp02448</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Ma19038</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Ms02504</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Mvic00021</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Cn02083</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>Cd02080</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>M.gypsea</i>	TGTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GGATACATTA
<i>A.apis</i>	TGTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GGATACATTA
<i>E.rubrum</i>	TGTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GAATACATTA
<i>M.purpureus</i>	TGTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GAATACATTA
<i>C.mansonii</i>	CTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GAATACATTA
<i>C.apollinis</i>	CTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GAATACATTA
<i>P.herbarum</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GAATACGTTA
<i>L.bicolor</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTTT.GCT.C	GAATATTACA
<i>N.crassa</i>	CGTGAACAAA	TCAGATCGCT	CAAAGAAGGC	CTAT.GCT.C	GAATGTACTA
<i>H.chrysospermus</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGCT	CAAGGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>O.stenoceras</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	TTAT.GCT.C	GGATACATTA
<i>X.carpophyla</i>	TGTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATCA
<i>R.salicinum</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	ATAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>C.confusa</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>B.graminis</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	CTAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>I.aggregata</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	ATTT.GCT.C	GAATACATTA
<i>G.aurantiaca</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	ATAT.GCT.C	GAATACATTA
<i>S.cerevisiae</i>	TTTGAAAAA	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	GTATTGCT.C	GAATATATTA

751

800

<i>O.auricolor</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CG.GCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>M.psychrophilum</i>	ACATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CG.GCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>L.dispersa</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>P.neopolydactyla</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	AACGTGTGGT	TCTCTTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>T.sancti-jacobi</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTKGT	TGGTTTCTAG
<i>T.mammosum</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTGGT	TGGTTTCTAG
<i>C.inquinans</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTKGT	TGGTTTCTAG
<i>B.scrobiculatum</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>L.tenerum</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>C.adspersum</i>	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	TGGTTTCTAG
<i>S.turbinata</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>Mseq92055</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>Cs02200</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGTTTCTAG
<i>Pp19286</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>Sp02448</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>Ma19038</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>Ms02504</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
<i>Mvic00021</i>	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A.CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG

Cn02083	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
Cd02080	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. TGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
M. gypsea	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
A. apis	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
E. rubrum	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
M. purpureus	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
C. mansonii	GCATGGAATA	ATAAAATAGG	A. CGCGCAGT	TTTATTTTGT	TGGTTTCTAG
C. apollinis	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CA. GAGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
P. herbarum	GCATGGAATA	ATAAAATAGG	G. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
L. bicolor	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
N. crassa	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
H. chrysospermus	GCATGGAATA	ATAAAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
O. stenoceras	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
X. carpophyla	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
R. salicinum	GCATGGAATA	ATGAAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
C. confusa	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
B. graminis	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
I. aggregata	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTGTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
G. aurantiaca	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGCGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG
S. cerevisiae	GCATGGAATA	ATAGAATAGG	A. CGTTTGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG

801

850

O. auricolor	AGCCACCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
M. psychrophilum	AGCCACCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
L. dispersa	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
P. neopolydactyla	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
T. sancti-jacobi	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTTG	GGGGCATCAG	TATTCAACTG
T. mammosum	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTTG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
C. inquinans	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTTG	GGGACGTCAG	TATTCAATTG
B. scrobiculatum	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCCG	TATTCAATTG
L. tenerum	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCCG	TATTCAATTG
C. adspersum	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
S. turbinata	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATTAG	TATTTAATTG
Mseq92055	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
Cs02200	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
Pp19286	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTTAATTG
Sp02448	GACCGCCGTA	ATGATTATTA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTTAATTG
Ma19038	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTTAATTG
Ms02504	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTTAATTG
Mvic00021	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTTAATTG
Cn02083	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
Cd02080	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTTAATTG
M. gypsea	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATGGTCG	GGGGCGTCAG	TATTCAGCTG
A. apis	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCGTCAG	TATTCAGCTG
E. rubrum	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCGTCAG	TATTCAGCTG
M. purpureus	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCGTCAG	TATTCAGCTG
C. mansonii	AACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCGTCAG	TATTCAATTG
C. apollinis	GACCGCTGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCGTCCG	TATTCAATTG
P. herbarum	AGACGCCGCA	ATGATTAACA	GGAACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAGTTG
L. bicolor	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
N. crassa	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
H. chrysospermus	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
O. stenoceras	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
X. carpophyla	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	AGGACAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
R. salicinum	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCGTCAG	TATTCCGTTG
C. confusa	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGTGTGTCAG	TATTGCGTTG
B. graminis	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCAG	TATTCAATTG
I. aggregata	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCCG	TATTCAATTG
G. aurantiaca	GACCGCCGTA	ATGATTAATA	GGGATAGTCG	GGGGCATCCG	TATTCAATTG
S. cerevisiae	GACCATCGTA	ATGATTAATA	GGGACGGTCG	GGGGCATCCG	TATTCAATTG

<i>O. auricolor</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>M. psychrophilum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>L. dispersa</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>P. neopolydactyla</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>T. sancti-jacobi</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>T. mammosum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>C. inquinans</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>B. scrobiculatum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACGAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>L. tenerum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACGAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>C. adspersum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>S. turbinata</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Mseq92055	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Cs02200	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Pp19286	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Sp02448	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Ma19038	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Ms02504	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Mvic00021	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Cn02083	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
Cd02080	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>M. gypsea</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTGCTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>A. apis</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTGCTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>E. rubrum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTGCTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>M. purpureus</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTGCTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>C. manonii</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>C. apollinis</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACGAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>P. herbarum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTACTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>L. bicolor</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>N. crassa</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>H. chrysospermus</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>O. stenoceras</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>X. carpophyla</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>R. salicinum</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTACGGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>C. confusa</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTACGCAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>B. graminis</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>I. aggregata</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACGAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>G. aurantiaca</i>	TCAGAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACGAACTACT	GCGAAAGCAT
<i>S. cerevisiae</i>	TC.GAGGTGA	AATTCTTGGA	TTTATTGAAG	ACTAACTACT	GCGAAAGCAT

<i>O. auricolor</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>M. psychrophilum</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>L. dispersa</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>P. neopolydactyla</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>T. sancti-jacobi</i>	TTTCCRAAGA	TGTTTTTCATT	AATCAGGGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>T. mammosum</i>	TTGCCAAGA	TGTTTTTCATT	AATCAGGGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>C. inquinans</i>	TCGTCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>B. scrobiculatum</i>	TTGCCAAGAA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>L. tenerum</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>C. adspersum</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGGGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
<i>S. turbinata</i>	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Mseq92055	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Cs02200	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Pp19286	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Sp02448	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Ma19038	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Ms02504	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Mvic00021	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Cn02083	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
Cd02080	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG

M.gypsea	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
A.apis	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
E.rubrum	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGGGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
M.purpureus	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGGGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
C.mansonii	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
C.apollinis	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
P.herbarum	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
L.bicolor	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
N.crassa	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAG.GAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
H.chrysospermus	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAG.GAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
O.stenoceras	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAG.GAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
X.carpophyla	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAG.GAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
R.salicinum	TCGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
C.confusa	TCACCAAGGA	TGNTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
B.graminis	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAGTGAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG
I.aggregatta	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAG.GAA	CGAAAGTTGA	GGGATCGAAG
G.aurantiaca	TTGCCAAGGA	TGTTTTTCATT	AATCAG.GAA	CGAAAGTTGA	GGGATCGAAG
S.cerevisiae	TTGCCAAGGA	CGTTTTTCATT	AATCAA.GAA	CGAAAGTTAG	GGGATCGAAG

951

1000

O.auricolor	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
M.psychrophilum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
L.dispersa	ACGATTGG.T	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACT.GGGAT
P.neopolydactyla	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
T.sancti-jacobi	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
T.mammosum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
C.inquinans	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTAT.CC	GACTAGGGAT
B.scrobiculatum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAAGGAT
L.tenerum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
C.adspersum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
S.turbinata	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Mseq92055	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Cs02200	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Pp19286	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Sp02448	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Ma19038	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Ms02504	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Mvic00021	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Cn02083	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
Cd02080	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GATTAGAGAT
M.gypsea	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
A.apis	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
E.rubrum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
M.purpureus	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
C.mansonii	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
C.apollinis	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
P.herbarum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCGT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
L.bicolor	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
N.crassa	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GATTAGGGAT
H.chrysospermus	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
O.stenoceras	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
X.carpophyla	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
R.salicinum	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACGATGCC	GACTAGGGAT
C.confusa	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
B.graminis	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
I.aggregatta	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTCAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
G.aurantiaca	ACGATCAGAT	ACCGTCGTAG	TCTCAACCAT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT
S.cerevisiae	ATGATCTGGT	ACCGTCGTAG	TCTTAACCAT	AAACTATGCC	GACTAG..AT

1001

1050

O.auricolor	CGGGCGGTGT	TCAACTTATG	ACCCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAATTCAAA
-------------	------------	------------	------------	------------	------------

M. psychrophilum	CGGGCGGTGT	TCAACTTATG	ACCCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
L. dispersa	CGGACGGTGT	TATTATTT.G	ACC.GTTCGG	CACCT.AC GA	GAAA.TCAAA
P. neopolydactyla	CGGACGGTGT	TACTATATTG	ACCCGTCCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
T. sancti-jacobi	CGGACGGTGT	TACTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
T. mammosum	CGGACGGTGT	TACTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
C. inquinans	CGGACGGTGT	TACTATTATG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
B. scrobiculatum	CGGACGGTGT	TATTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
L. tenerum	CGGACGGTGT	TATTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
C. adspersum	CGGACGGTGT	TATTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
S. turbinata	CGGACGGTGT	TAGTATTATG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Mseq92055	CGGACGGTGT	TGTTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Cs02200	CGGACGGTGT	TGTTTTTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Pp19286	CGGACGGTGT	TGTTTTATTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Sp02448	CGGACGGTGT	TGTTTTATTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Ma19038	CGGACGGTGT	TGTTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Ms02504	CGGACGGTGT	TGTTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Mvic00021	CGGACGGTGT	TGTTATTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Cn02083	CGGACGGTGT	TGTTTATTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
Cd02080	CGGACGGTGT	TAGCTTTATG	ACCCGTTCGG	CATCTTACGA	GAAA.TCAAA
M. gypsea	CGGACGGGGT	TTTTTTAATG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
A. apis	CGGGCGGGCT	TTAACTAATG	ACCCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
E. rubrum	CGGGCGGTGT	TTCTATAATG	ACCCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
M. purpureus	CGGACGG.GT	TTCTATGATG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
C. mansonii	CGGACGGTGG	TTTTTTTATG	CCCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
C. apollinis	CGGACGGTGG	TTTTTTTATG	CCCCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
P. herbarum	CGGGCGATGT	TCTTTTTCTG	ACTCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
L. bicolor	CGGGCGGTGT	TACTATTTTG	ACTCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
N. crassa	CGGACGGTGT	TAT.TTTTTG	ACCCGTTCGG	CACCTTACGA	TAAA.TCAAA
H. chrysospermus	CGGACGATGT	TACATTTTTG	ACGCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
O. stenoceras	CGGACGATGT	TAT.TTTTTG	ACTCGTTCGG	CACCTTACAC	GAAAAGTACAA
X. carpophyla	CGGACGATGT	TAT.TTTTTG	ACTCGTTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
R. salicinum	CGGGCGATGT	TATCTTTTTG	ACTCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
C. confusa	CAGGCGATGT	TATCTTTTTG	ACTCGCTTGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
B. graminis	CGGGCGATGT	TATTTTTTTG	ACTCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
I. aggregata	CGGGCGATGT	TTTATTC.TG	ACTCGCTCGG	CACCTTACGA	GAAA.TCAAA
G. aurantiaca	CGGGCGATGT	TTTTCTTTTG	ACTCGCTCGG	AACCTTGCGA	GAAA.TCAAA
S. cerevisiae	CGGGTGGTGT	TTTTTTAATG	ACCCACTCGG	TACCTTACGA	GAAA.TCAAA

	1051				1100
O. auricolor	GTTTTTGGGT	TTCTGGGGGG	AGTATGGTTC	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGG
M. psychrophilum	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGG
L. dispersa	GTCTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
P. neopolydactyla	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
T. sancti-jacobi	GTCTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	CCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
T. mammosum	GTCTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
C. inquinans	GTCTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
B. scrobiculatum	GTTTTTGGGT	T.CCGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
L. tenerum	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
C. adspersum	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
S. turbinata	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Mseq92055	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Cs02200	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Pp19286	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Sp02448	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Ma19038	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Ms02504	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Mvic00021	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Cn02083	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
Cd02080	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
M. gypsea	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
A. apis	GTTTTTGGGT	T.CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA

E. rubrum	GTTTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
M. purpureus	GTTTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
C. mansonii	GTTTTTGGGC	T. CGGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
C. apollinis	GTTTTTGGGC	T. CGGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
P. herbarum	GTTTTTGGGT	T. CTGGGGGG	ATTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
L. bicolor	GTGTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
N. crassa	ATGTTTGGGC	T. CCTGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
H. chrysospermus	GTGCTTGGGC	T. CCAGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
O. stenoceras	GTTTCTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
X. carpophyla	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
R. salicinum	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
C. confusa	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
B. graminis	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGA
I. aggregatta	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGG
G. aurantiaca	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGG
S. cerevisiae	GTCTTTGGGT	T. CTGGGGGG	AGTATGGT.C	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGG

1101

1150

O. auricolor	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGANNNNNN	NCCTGCGGCT	TAATTTGACT
M. psychrophilum	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGATGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
L. dispersa	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAG.GGT	GACTGCG.CT	TAATTTGATT
P. neopolydactyla	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
T. sancti-jacobi	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	ACCTGCGGCT	TAATTTGACT
T. mammosum	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	ACCTGCGGCT	.AATTTGACT
C. inquinans	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	ACCTGCGGCT	TAATTTGACT
B. scrobiculatum	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
L. tenerum	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
C. adspersum	CATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
S. turbinata	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATT.GACT
Mseq92055	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Cs02200	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	ACCTGCGGCT	TAATTTGACT
Pp19286	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Sp02448	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Ma19038	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Ms02504	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGG.GTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Mvic00021	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Cn02083	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
Cd02080	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
M. gypsea	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
A. apis	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
E. rubrum	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
M. purpureus	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
C. mansonii	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
C. apollinis	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	AAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
P. herbarum	AATTGACGGA	AGGTACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
L. bicolor	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGCGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
N. crassa	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGGGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
H. chrysospermus	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGGGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
O. stenoceras	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGGGTGGA	ATCTGCGGCT	TAATTTGACT
X. carpophyla	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAGTGGA	. .CTGCGGCT	TAATTTGACT
R. salicinum	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
C. confusa	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAGTGGA	NNGTGCGGCT	TAATTTGACT
B. graminis	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAGTG.A	GCCTGCG.CT	TAATTTGACT
I. aggregatta	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAGTGGA	NNNTGCGGCT	TAATTTGACT
G. aurantiaca	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	CAGGAGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT
S. cerevisiae	AATTGACGGA	AGGGCACCAC	TAGGAGTGGA	GCCTGCGGC.	TAATTTGACT

1151

1200

O. auricolor	CAACACGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
M. psychrophilum	CAACACGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
L. dispersa	CAACACGGG	AAACTCAC.A	GGTC.AGACA	TAGGAAGGAT	TGACAGATTG

P.neopolydactila	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
T.sancti-jacobi	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGATT	TGATAAGGAT	TGACAGATTG
T.mammosum	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGATT	TGATAAGGAT	TGACAGATTG
C.inquinans	CAACACGGGG	AWACTCACCA	GGTCCAGATT	TGATAAGGAT	TGACAGATTG
B.scrobiculatum	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
L.tenerum	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
C.adspersum	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGATT	TGATAAGGAT	TGACAGATTG
S.turbinata	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Mseq92055	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Cs02200	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Pp19286	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Sp02448	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Ma19038	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Ms02504	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Mvic00021	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Cn02083	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
Cd02080	CAACACGGGG	AAACTCACCG	GGTCCGGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
M.gypsea	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
A.apis	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
E.rubrum	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
M.purpureus	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
C.mansonii	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	TGCTTAGGAT	TGACAGATTG
C.apollinis	CAACACGGGG	AAACTCACCA	AGTCCAGACA	TGCTTAGGAT	TGACAGATTG
P.herbarum	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGATG	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
L.bicolor	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGATG	AAATAAGGAT	TGACAGATTG
N.crassa	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CGATGAGGAT	TGACAGATTG
H.chrysospermus	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CAATGAGGAT	TGACAGATTG
O.stenoceras	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CGATGAGGAT	TGACAGATTG
X.carpophyla	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CAATGAGGAT	TGACAGATTG
R.salicinum	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CAATAAGGAT	TGACAGATTG
C.confusa	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CAATAAGGAT	TGACAGATTG
B.graminis	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CAATAAGGAT	TGACAGATTG
I.aggregatta	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
G.aurantiaca	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CATTAAGGAT	TGACAGATTG
S.cerevisiae	CAACACGGGG	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	CAATAAGGAT	TGACAGATTG

1201

1250

O.auricolor	AGAGCTCTTT	CTTGATTA.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
M.psychophilum	AGAGCTCTTT	CTTGATTA.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
L.dispersa	ATAGCTCTTT	CTTGATTTCT	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
P.neopolydactila	AGCGTTCTTT	CATGATCA.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
T.sancti-jacobi	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.C	AAAGTTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
T.mammosum	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.C	AAAGTTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
C.inquinans	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.C	ANAGTTGGTG	GTGAATGGCC	GTT.CTTAGT
B.scrobiculatum	AGAGCTCTTT	CTTGATCA.T	GTGAATGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
L.tenerum	AGAGCTCTTT	CTTGATCA.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
C.adspersum	AGAGCTCTTT	CTTGATCT.C	AAAGTTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
S.turbinata	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Mseq92055	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Cs02200	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	T.GGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Pp19286	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Sp02448	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Ma19038	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Ms02504	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Mvic00021	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Cn02083	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
Cd02080	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
M.gypsea	AGAGCTCTTT	CTTGATCT.T	TTGGATGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
A.apis	AGAGCTCTTT	CTTGATCT.T	TTGGATGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
E.rubrum	AGAGCTCTTT	CTTGATCT.T	TTGGATGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
M.purpureus	AGAGCTCTTT	CTTGATCT.T	TTGGATGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CCTAGT

<i>C.mansonii</i>	ATAGCTCTTT	CTTGATTG.T	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>C.apollinis</i>	ATAGCTCTTT	CTTGATTG.T	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.TTTAGT
<i>P.herbarum</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TCAGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>L.bicolor</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	TCAGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>N.crassa</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.C	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>H.chrysospermus</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>O.stenoceras</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.C	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>X.carpophyla</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>R.salicinum</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>C.confusa</i>	AGNNCTCTTT	CTTGATTT.T	GTGNGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>B.graminis</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>I.aggregatta</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATCA.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>G.aurantiaca</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATCA.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTT.CTTAGT
<i>S.cerevisiae</i>	AGAGCTCTTT	CTTGATTT.T	GTGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTTCTCAGT

1251

1300

<i>O.auricolor</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>M.psychrophilum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>L.dispersa</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>P.neopolydactyla</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>T.sancti-jacobi</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>T.mammosum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>C.inquinans</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>B.scrobiculatum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>L.tenerum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>C.adspersum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>S.turbinata</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Mseq92055</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Cs02200</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Pp19286</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Sp02448</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Ma19038</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Ms02504</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Mvic00021</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Cn02083</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>Cd02080</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>M.gypsea</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>A.apis</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>E.rubrum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTCGGCC
<i>M.purpureus</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTCGGCC
<i>C.mansonii</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTGACC
<i>C.apollinis</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTGACC
<i>P.herbarum</i>	TCGTGGGGTG	ACTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAGCGA	GACCTTACTC
<i>L.bicolor</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>N.crassa</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>H.chrysospermus</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>O.stenoceras</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	CTAATCGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>X.carpophyla</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACATTTACC
<i>R.salicinum</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>C.confusa</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>B.graminis</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>I.aggregatta</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>G.aurantiaca</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC
<i>S.cerevisiae</i>	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGC	TTAATTGCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC

1301

1350

<i>O.auricolor</i>	TGCTAAATAT	CCT.GGCTAN	CTTTTGCT.G	GTCACCGGCT	.TCTTAGAGG
<i>M.psychrophilum</i>	TGCTAAATAG	CCA.GGCTAG	CTTTTGCT.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
<i>L.dispersa</i>	TGCTAAATAG	CCA.GGTCAG	CTATGGGT.G	GTGGCTGGCT	.TCTTAGAGG
<i>P.neopolydactyla</i>	TGCTAAATAG	CCACGGTCAG	CTTAGGCTGA	GTCGCCGGCT	CTCTTAGAGG
<i>T.sancti-jacobi</i>	TGCTAAATAG	CCA.GGTCAG	CTTTGGCT.G	GCCGCCGGCT	.TCTTAGAGG

T.mammosum	TGCTAAATAG	CCA.GGTCAG	CTTTGGCT.G	GCCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
C.inquinans	TGCTAAATAG	CCA.GGTCAG	CTTTGGCT.G	GCCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
B.scrobiculatum	TGCTAAATAG	CCC.GGTCAG	CTTTGGCT.G	GCCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
L.tenerum	TGCTAAATAG	CCC.GGTCAG	CTTTGGCT.G	GCCGCTGGCT	.TCTTAGAGG
C.adspersum	TGCTAAATAG	CCA.GGTCAG	CTTTGGCT.G	GCCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
S.turbinata	TGCTAAATAG	CTA.GGCTCA	CTTCTGTG.G	GTCGCCAGCT	.TCTTAGAGG
Mseq92055	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTTTTGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Cs02200	TGCTAAATAG	CCC.GGCTCA	CTTTGGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Pp19286	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTCCGGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Sp02448	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTTTTGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Ma19038	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTTTTGTG.G	GTCGTCGGCT	.TCTTAGAGG
Ms02504	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTTTTGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Mvic00021	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTTTTGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Cn02083	TGCTAAATAG	CCC.GGCTCA	CTTTGGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
Cd02080	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCA	CTTTTGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
M.gypsea	TGCTAAATAG	CCC.GGTCCA	CGTTTGTG.G	GCCGCTGGCT	.TCTTAGAGG
A.apis	TGCTAAATAG	CCC.GGTCGA	CGTTTGTG.G	GCTGCTGGCT	.TCTTAGAGG
E.rubrum	CT.TAAATAG	CCC.GGTCCG	CATTTGC.G	GCCGCTGGCT	.TCTTAGAGG
M.purpureus	CT.TAAATAG	CCC.GGTCCG	CATTTGC.G	GCCGCTGGCT	.TCTTAGAGG
C.mansonii	TGCTAAATAG	CCA.GGTTGA	CTTTTGTG.G	GCCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
C.apollinis	TGCTAAATAG	CCC.AACTCA	CTTTTGTG.G	GTTGCTGGCT	.TCTTAGAGG
P.herbarum	TGCTAAATAG	CCA.GGCTAG	CTTTGGCT.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
L.bicolor	TGCTAAATAG	CCA.GGCTAG	CTTTGGCT.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
N.crassa	TGCTAAATAG	CCC.GTATTG	CTTTGGCA.G	TACGCTGGCT	.TCTTAGAGG
H.chrysospermus	TGCTAAATAG	CCC.GTATTG	CTTTGGCA.G	TACGCTGGCT	.TCTTAGAGG
O.stenoceras	TGCTAAATAG	CCC.GCGTTG	CTTTGGCA.G	GCGCTGGCT	.TCTTAGAGG
X.carpophyla	TGCTAAATAG	CCC.GTATTG	CTTTGGCA.G	TACGCTGGCT	.TCTTAGAGG
R.salicinum	TGCTAAATAG	CCA.GGCTAG	CTTTGGCT.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
C.confusa	TGCTAAATAG	CCA.GGCTAG	CTTTGGCT.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
B.graminis	TGCTAAATAG	CTC.GACTAG	CTTTGGCT.G	GTTGCTAGCT	.TCTTAGAGG
I.aggregatta	TGCTAAATAG	CCA.GGCC.G	CTTTTGTG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
G.aurantiaca	TGCTAAATAG	CCA.GGCTCG	CTTC.GCG.G	GTCGCCGGCT	.TCTTAGAGG
S.cerevisiae	TACTAAATAG	TGG.TGCTAG	CATTTGCT.G	GTTATCCACT	.TCTTAGAGG

1351

1400

O.auricolor	GACTATCGGC	TCAAGCC.GA	TGGAAAGTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
M.psychrophilum	GACTATCGGC	TCAAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
L.dispersa	GACTATCGGC	TCAA...GA	TCGGAAGTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
P.neopolydactyla	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
T.sancti-jacobi	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
T.mammosum	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
C.inquinans	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
B.scrobiculatum	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
L.tenerum	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
C.adspersum	GACTATCGGC	TCAAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
S.turbinata	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Mseq92055	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Cs02200	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Pp19286	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Sp02448	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Ma19038	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Ms02504	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Mvic00021	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Cn02083	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
Cd02080	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTTCTGT
M.gypsea	.ACTATCGGC	T.AAGCCGA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
A.apis	GACTATCGGT	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
E.rubrum	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTGC	GCGGCAATAA	CAGGTC.TGT
M.purpureus	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTGC	GCGGCAATAA	CAGGTC.TGT
C.mansonii	GACTTTTGGC	T.AAGCC.AA	TGGAA.GTAC	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
C.apollinis	GACTTTTGGC	T.AAGCC.AA	TGGAA.GTAC	GAGGCAAAAA	CAGGTC.TGT

P.herbarum	GACTATCAAC	T.AAGTT.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
L.bicolor	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
N.crassa	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
H.chrysospermus	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
O.stenoceras	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
X.carpophyla	GACTATCCGC	T.AAGCG.GG	TGGAA.GTTG	GATGCAATAA	CAGGTC.TGT
R.salicinum	GACTATCGGC	T.AAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
C.confusa	GACTANNNGC	TCAAG...NN	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CANNNN.NNN
B.graminis	GACTATCGGC	TCAAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
I.aggregatta	GACTATCGGA	TCAAGTC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
G.aurantiaca	GACTATCGGA	TCAAGAC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT
S.cerevisiae	GACTATCGGT	TCAAGCC.GA	TGGAA.GTTT	GAGGCAATAA	CAGGTC.TGT

1401

1450

O.auricolor	GAATGCCCTT	ANA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.N
M.psychrophilum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
L.dispersa	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
P.neopolydactyla	GA.TGCCCTT	AGA.TGCTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
T.sancti-jacobi	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGTTACA	CTGACAGA.G
T.mammosum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGTTACA	CTGACAGA.G
C.inquinans	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGTTACA	CTGACAGA.G
B.scrobiculatum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
L.tenerum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
C.adspersum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
S.turbinata	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
Mseq92055	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
Cs02200	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGTTACA	CTGACAGA.G
Pp19286	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
Sp02448	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
Ma19038	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCAAC	GCGCGCTACA	CTGACAGAAG
Ms02504	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGNACA	CTGACAGA.G
Mvic00021	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGGATAACA	CTGACAGA.G
Cn02083	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
Cd02080	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCC	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
M.gypsea	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGG.G
A.apis	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGG.G
E.rubrum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGG.G
M.purpureus	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGG.G
C.mansonii	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
C.apollinis	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGG.G
P.herbarum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
L.bicolor	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
N.crassa	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
H.chrysospermus	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
O.stenoceras	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGTTACA	CTGACAGA.G
X.carpophyla	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGTTACA	CTGACAGA.G
R.salicinum	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGG.G
C.confusa	NN.NNNNNNN	NNN.NNNNNNN	NNNNNNNN.N	NNNNNNNNNN	GTGACAGA.G
B.graminis	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
I.aggregatta	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
G.aurantiaca	GA.TGCCCTT	AGA.TGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACAGA.G
S.cerevisiae	GA.TGCCCTT	AGAACGTTCT	GGGCCGCA.C	GCGCGCTACA	CTGACGGA.G

1451

1500

O.auricolor	CCAACGAGTA	TCCTTAGCCG	AGAGGTTTGT	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
M.psychrophilum	CCAACGAGTA	TCCTTAACCG	AGAGGTTTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
L.dispersa	ACAACGAGTT	CCCTTGCCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
P.neopolydactyla	CCAACGAGTG	TCCTTGCCCG	AAAGGTCCGG	GTAATTTGGT	TAAACTCTGT
T.sancti-jacobi	ACAACGAGTT	CCCTTGCCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
T.mammosum	ACAACGAGTT	CCCTTGCCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
C.inquinans	ACAACGAGTT	CCCTTGCCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT

B.scrobiculatum	TCAACGAGTT	CCCTTGGCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
L.tenerum	ACAACGAGTT	CCCTTGGCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
C.adspersum	ACAACGAGTT	CCCTTGGCCG	GAAGGTTTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
S.turbinata	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Mseq92055	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Cs02200	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Pp19286	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Sp02448	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Ma19038	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Ms02504	CCAANNAGTA	NCCTTGGNCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Mvic00021	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
Cn02083	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTNTGG	KTAATCTTGW	TNAACTCNGT
Cd02080	TCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
M.gypsea	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	AGAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACCCTGT
A.apis	TCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	AGAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACCCTGT
E.rubrum	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	AGAGGTCCGG	GTAATCTTGT	TAAACCCTGT
M.purpureus	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	AGAGGCCTGG	GTAATCTTGT	TAAACCCTGT
C.mansonii	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
C.apollinis	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACCCTGT
P.herbarum	CCAACGAGTT	CCCTTGGCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
L.bicolor	CCAACGAGTT	TCCTTGTCCG	AAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
N.crassa	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	GAAGGTCCGG	GTAATCTTGT	TAAACTGTGT
H.chrysospermus	CCAGCGAGTA	CCCTTGGCCG	GAAGGCCCGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
O.stenoceras	CCAGCGAGTT	CCCTTGGCCG	AAAGGCCTGG	GTAATCTTGT	GAAACTCTGT
X.carpophyla	ACAGCGAGTA	CCCTTAGTAG	AGATACTTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
R.salicinum	CCAACGAGTT	CCCTTAGCCG	AAAGNNNNGG	GTAATCTTGT	TAAACCCTGT
C.confusum	CCAACGAGTT	CCCTTAGCCG	AAAGNTTTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
B.graminis	CCAACGAGTT	TCCTTGGTCG	AAAGACCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
I.aggregatta	CCAACGAGTA	CCCTTGGCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
G.aurantiaca	CCAACGAGTT	CCCTTGGCCG	GAAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACTCTGT
S.cerevisiae	CCAGCGAGTC	TCCTTGGCCG	AGAGGTCTTG	GTAATCTTGT	GAAACTCCGT

1501

1550

O.auricolor	CGTGC.TGGG	GATAGGGCAT	TGCAATTATT	GCCCTTCAAC	NAGGAATATC
M.psychrophilum	CGTGC.TGGG	GATAGGGCAT	TGCAATTATT	GCCCTTCAAC	GAGGAATATC
L.dispersa	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
P.neopolydactyla	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
T.sancti-jacobi	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
T.mammosum	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
C.inquinans	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
B.scrobiculatum	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
L.tenerum	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
C.adspersum	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
S.turbinata	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
Mseq92055	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
Cs02200	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
Pp19286	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
Sp02448	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
Ma19038	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCT
Ms02504	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
Mvic00021	CGTGC.TGGG	GATNGAGCAT	TGCAATNATT	GCTCTTNAAN	GAGGAATGCT
Cn02083	CGTGNNTGGG	GATASASCAT	NGCAATTATT	GYTCTTNAAS	GAGGMATRCY
Cd02080	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAN	GAGGAATGCT
M.gypsea	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
A.apis	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
E.rubrum	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
M.purpureus	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
C.mansonii	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
C.apollinis	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC
P.herbarum	CGTGC.TGGG	GATAAAGCAT	TGCAATTATT	GCTTTTCAAC	GAGGAATGCC
L.bicolor	CGTGC.TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATGCC

N. crassa	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATCCC
H. chrysospermus	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATCCC
O. stenoceras	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATCCC
X. carpophyla	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATTCC
R. salicinum	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATTCC
C. confusa	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATTCC
B. graminis	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATTCC
I. aggregata	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATTCC
G. aurantiaca	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATT..
S. cerevisiae	CGTGC .TGGG	GATAGAGCAT	TGTAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATTCC

1551

1600

O. auricolor	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
M. psychrophilum	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
L. dispersa	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
P. neopolydactyla	TAGTAAGCGC	.AAGTAGT.C	ATCAGCNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
T. sancti-jacobi	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTATGTCC	CT.GCCCTTTT
T. mammosum	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTATGTCC	CT.GCCCTTTT
C. inquinans	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTATGTCC	CT.GCCCTTTT
B. scrobiculatum	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
L. tenerum	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
C. adspersum	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
S. turbinata	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGCT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Mseq92055	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Cs02200	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Pp19286	TAGTAAGCGC	.GAGTCAT.C	AGCTCGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Sp02448	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Ma19038	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Ms02504	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GACTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Mvic00021	TAGTANGCGC	.AAGTCAT.C	AGCNTGCGTT	GANTACGTCC	CT.GCCCTTTT
Cn02083	TAGTARGCGC	TMANTCNTTC	AGCTTGCGTT	GASTACGTCC	CTTGYYCCWTW
Cd02080	TAGTANGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GANTACGTCC	CT.GCCCTTNT
M. gypsea	TAGTAGGCAC	.AAGTCAT.C	AGCTTGTGCC	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
A. apis	TAGTAGGCAC	.AAGTCAT.C	AGCTTGTGCC	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
E. rubrum	TAGTAGGCAC	.GAGTCAT.C	AGCTCGTGCC	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
M. purpureus	TAGTAGGCAC	.GAGTCAT.C	AGCTCGTGCC	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
C. mansonii	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
C. apollinis	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
P. herbarum	TAGTAAGCGC	.GTGTCAT.C	AGCATGCGTT	GATTACGTCC	CT.GACCTTTT
L. bicolor	TAGTAAGCGC	.GTGTCAT.C	AGCACGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
N. crassa	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
H. chrysospermus	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
O. stenoceras	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AACTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
X. carpophyla	TAGTAAGCGT	.AAGTCAT.C	AACTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
R. salicinum	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGCT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
C. confusa	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGNNNT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
B. graminis	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGCT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
I. aggregata	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
G. aurantiaca	.GTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT
S. cerevisiae	TAGTAAGCGC	.AAGTCAT.C	AGCTTGCGTT	GATTACGTCC	CT.GCCCTTTT

1601

1650

O. auricolor	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
M. psychrophilum	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
L. dispersa	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTCG
P. neopolydactyla	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
T. sancti-jacobi	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
T. mammosum	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
C. inquinans	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
B. scrobiculatum	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
L. tenerum	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC

<i>C. adspersum</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
<i>S. turbinata</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Mseq92055	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Cs02200	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Pp19286	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Sp02448	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Ma19038	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Ms02504	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCCTTC
Mvic00021	GTACACACCG	CCCGTCGNTA	CNACNGATTG	AATGGNTAAG	TGAGGCCTTC
Cn02083	GTACACACCG	CCCGTNGYTA	CYACCGATTG	AATGGNTNAG	C. AGNCCTTC
Cd02080	GNACACACCG	CCCGTCGNTA	CTACCGATTG	AATGGNTAAG	TNAGGCCTNC
<i>M. gypsea</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
<i>A. apis</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
<i>E. rubrum</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCGG	TGAGGCCTTC
<i>M. purpureus</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTCC
<i>C. mansonii</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTG
<i>C. apollinis</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTG
<i>P. herbarum</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTTC
<i>L. bicolor</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCATC
<i>N. crassa</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCTTCC
<i>H. chrysospermus</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCCTCC
<i>O. stenoceras</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCTTCC
<i>X. carpophyla</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTCAG	TGAGGCTTCC
<i>R. salicinum</i>	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
<i>C. confusa</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCTTTC
<i>B. graminis</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTAAG	TGAGGCTTTC
<i>I. aggregata</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	AATGGCTTAG	TGAGGCTTCA
<i>G. aurantiaca</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	A. TGGCTTAG	TGAGGCTTCG
<i>S. cerevisiae</i>	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	GTACCGATTG	AATGGCTTAG	TGAGGCCTCA

1651 1672

<i>O. auricolor</i>	GGACTGGCTC	GAGGTTGGCA	A.
<i>M. psychrophilum</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
<i>L. dispersa</i>	G. ACTG. CCT	GAG. TCGGCA	A.
<i>P. neopolydactyla</i>	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	N.
<i>T. sancti-jacobi</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
<i>T. mammosum</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
<i>C. inquinans</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
<i>B. scrobiculatum</i>	GGACTGGCCT	GAGGTCGGCA	A.
<i>L. tenerum</i>	GGACTGTCCT	GAGGTCGACA	A.
<i>C. adspersum</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	N.
<i>S. turbinata</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
Mseq92055	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
Cs02200	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
Pp19286	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
Sp02448	AGACTGGCCC	GAGGTCGGCA	A.
Ma19038	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
Ms02504	GGACTGGCTC	GAGGTCGGAA	A.
Mvic00021	GGACTGGNTC	GNNNNNNNNNN	N.
Cn02083	GGACTGGNTC	GAGGTCGGCA	A.
Cd02080	GGACTGNCCC	GAGGTTGGCA	A.
<i>M. gypsea</i>	GGACTGGCTC	GGGGTTGGCA	A.
<i>A. apis</i>	GGACTGGCTC	GAGGCTGGAA	A.
<i>E. rubrum</i>	GGACTGGCTC	GGGGTTGGCA	A.
<i>M. purpureus</i>	GGACTGGCCC	GAGGTTGGCA	A.
<i>C. mansonii</i>	GGACTGGCTC	GAGGTCGGCA	A.
<i>C. apollinis</i>	GGATTGGCCA	GAGATGGGCG	A.
<i>P. herbarum</i>	GGACTGGCTC	GAGGTTGGCA	A.
<i>L. bicolor</i>	GGACTGGCCC	GAGGTTGCCA	A.
<i>N. crassa</i>	GGACTGGCCC	GAGGTCGGCA	A.
<i>H. chrysospermus</i>	GGACTGGCCC	GTGGTGGGCA	A.

O.stenoceras	GGACTGGCCC	GGGGTGGGAA	A.
X.carpophyla	GGACTGGCCC	GGAGTCGGCA	A.
R.salicinum	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	N.
C.confusa	GGACTGGCTC	CAGATTGGCA	A.
B.graminis	GGACTGGCCC	GAGAGTGGTA	A.
I.aggregatta	GGACT.GTCC	NAGATCGGCA	A.
G.aurantiaca	GGACT.GATC	GTCGTCGGCA	A.
S.cerevisiae	GGATCTGCTT	GAAGGGGGCA	A.

Figura 3.9. Alineamiento de secuencias de la región 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma. Las especies empleadas pertenecen al subphylum Euscomycotina. Sus números de acceso en el Genebank se encuentran en la Tabla 3.11. La secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* (Subphylum Hemiascomycotina) fue empleada como “outgroup” para los posteriores análisis filogenéticos.

PileUp

t2805
como t2804 pero eliminando por alineamiento ambiguo el loop 1 del stem 9 y moviendo

T de 4 sordariomycetes en el loop entre los stem 14

```

GDC ***** GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor *****
GDC 010b970190000800000000000ff008000ff0000fffffffffffffffffffffffffff
GDC ff000000000000f43f000000000000f43f00000000000f03f000000000
GDC 00f03f00A000000000190000cA54696d6573204e657720526f6d616e00A0
GDC 032000d00000000000000000000002848414c4f53504841455249412c0d0
GDC a414e4950544f444552412c0d0a56415249434f53504f52494e412c0d0a4
GDC d4943524f41534355532c0d0a43455241544f4359535449532c0d0a4f504
GDC 8494f53544f4d412c0d0a444941504f525448452c0d0a58594c415249412
GDC c0d0a465553415249554d2c0d0a4e4555524f53504f52412c0d0a4d53455
GDC 12c0d0a434430323038302c0d0a505031393238362c0d0a5350303234343
GDC 82c0d0a4d5332313032302c0d0a4d5330323530342c0d0a4d53303231373
GDC 32c0d0a4d4131393033382c0d0a435330323230302c0d0a434e303230383
GDC 32c0d0a435031393235382c0d0a436630303030302c0d0a4350303235323
GDC 22c0d0a434830323038322c0d0a435630323130352c0d0a4341303232393
GDC 92c0d0a53707430323039312c0d0a434330323330312c0d0a43543138343
GDC 8312c0d0a535330323039302c0d0a47594d4e4f415343454c4c412c0d0a4
GDC 14d4155524f41534355532c0d0a50415241434f43434944494f494445532
GDC c0d0a4555524f5449554d2c0d0a43484145544f534152544f5259412c0d0
GDC a415350455247494c4c55532c0d0a454d45524943454c4c412c0d0a4f504
GDC 8494f424f4c55532c0d0a4c4550544f53504841455249412c0d0a504c454
GDC f53504f52412c0d0a50455a495a412c0d0a504c4943415249412c0d0a534
GDC 14341524f293b0d0a00ABBADAAA000002a000a00020001B20AAA000a203
GDC a2000203a2000000000000005940000000000000000c505800000ff
GDC fff00004758000ff00ff00004147535800000ffffff0056434147444e5
GDC 3545058000ff00ffff00484b525800ff0000000ff454458000ff00000
GDC 0ff484b5245445800ffff0000ff48524551444e425a5800ff00000ff0
GDC 05957484b524551444e5354425a5800000000ff00494c56415800ff00
GDC 0808080465957485800000ff808080494c564341474d465957485450580
GDC 0ffffff000000c50580000000000000475800000000000414347535
GDC 80000000000000564147444e53545058000000000000484b52580000
GDC 00000000454458000000000000484b524544580000000000048524
GDC 551444e425a58000000000000435957484b524551444e5354425a5800
GDC 000000000494c5641580000000000004659574858000000000004
GDC 94c564341474d465957485450580000000000300ffffff0000000ff
GDC fffff8080000000c0c0c00000ABBBBBBBBBBBBBB00ff00A002b00010
GDC 00100010001000100010001000100010001000100010001000100010001
GDC 00100010001000100010001000100010001000100010001000100010001
GDC 0010001000100010001000100010001000100010001A0018AA00000
GDC 00000000000000003A00ff00A0000000008056400000000080514000
GDC 00000000049400000200000000001440A000000098b20c410000000
GDC 010250641000000018980641000000078b10b4100AAABB00005374616e
GDC 646172640046464c4c5353535359592a2a43432a574c4c4c5050505048
GDC 485151525252524949494d545454544e4e4b4b5353525256565656414141
GDC 41444445454747477002d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d4d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d00BBBBB00000000000002b00000000
GDC 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 00000000000000000000000000000000000000000000300000000000B
GDC BAB002b000000000000000000000000000000000000000000000000000
GDC 000000000000000000000000000000020117B0000000000059400000
GDC 0000000544000000000004e4000DAAB00000ffffff03020141470000
GDC fff00ff00000243545500ff00000ff00020147430000ff00ff0000024154

```

GDC 5500ff000000ff0005014100000000ff000002430000000000ff00035455
 GDC 000000000000ff044700000000ffff00054e5800ffffff00000000000000
 GDC 00Affffff80808000A

3.9.msf MSF: 456 Type: N December 26, 2001 22:41 Check: 625 ..

Name: H.appendiculata	Len: 456	Check: 4750	Weight: 1.00
Name: A.chesapeakeensis	Len: 456	Check: 7753	Weight: 1.00
Name: V.ramulosa	Len: 456	Check: 9049	Weight: 1.00
Name: M.trigonosporus	Len: 456	Check: 7279	Weight: 1.00
Name: C.fimbriata	Len: 456	Check: 5376	Weight: 1.00
Name: O.piliferum	Len: 456	Check: 3691	Weight: 1.00
Name: D.phaseolorum	Len: 456	Check: 3653	Weight: 1.00
Name: X.curta	Len: 456	Check: 2089	Weight: 1.00
Name: F.oxysporum	Len: 456	Check: 8521	Weight: 1.00
Name: N.crassa	Len: 456	Check: 3222	Weight: 1.00
Name: Mseq92055	Len: 456	Check: 8349	Weight: 1.00
Name: CD02080	Len: 456	Check: 2124	Weight: 1.00
Name: PP19286	Len: 456	Check: 2107	Weight: 1.00
Name: SP02448	Len: 456	Check: 573	Weight: 1.00
Name: MS21020	Len: 456	Check: 8557	Weight: 1.00
Name: MS02504	Len: 456	Check: 8727	Weight: 1.00
Name: MS02173	Len: 456	Check: 2275	Weight: 1.00
Name: MA19038	Len: 456	Check: 9337	Weight: 1.00
Name: CS02200	Len: 456	Check: 8720	Weight: 1.00
Name: CN02083	Len: 456	Check: 7526	Weight: 1.00
Name: CP19258	Len: 456	Check: 7532	Weight: 1.00
Name: Cf00001	Len: 456	Check: 9711	Weight: 1.00
Name: CP02522	Len: 456	Check: 8352	Weight: 1.00
Name: CH02082	Len: 456	Check: 8804	Weight: 1.00
Name: CV02105	Len: 456	Check: 9916	Weight: 1.00
Name: CA02299	Len: 456	Check: 9425	Weight: 1.00
Name: Spt02091	Len: 456	Check: 5717	Weight: 1.00
Name: CC02301	Len: 456	Check: 4737	Weight: 1.00
Name: CT18481	Len: 456	Check: 4820	Weight: 1.00
Name: SS02090	Len: 456	Check: 1663	Weight: 1.00
Name: G..citrina	Len: 456	Check: 8765	Weight: 1.00
Name: A.albicans	Len: 456	Check: 1921	Weight: 1.00
Name: P.brasiliensis	Len: 456	Check: 7249	Weight: 1.00
Name: E.rubrum	Len: 456	Check: 3587	Weight: 1.00
Name: C.cremaea	Len: 456	Check: 5002	Weight: 1.00
Name: A.parasiticus	Len: 456	Check: 2915	Weight: 1.00
Name: E.astellata	Len: 456	Check: 2008	Weight: 1.00
Name: O.herpotrichus	Len: 456	Check: 323	Weight: 1.00
Name: L.doliolum	Len: 456	Check: 7104	Weight: 1.00
Name: P.herbarum	Len: 456	Check: 6316	Weight: 1.00
Name: P.atrovinosa	Len: 456	Check: 778	Weight: 1.00
Name: P.acanthodictya	Len: 456	Check: 7657	Weight: 1.00
Name: S.cerevisiae	Len: 456	Check: 2645	Weight: 1.00

//

	1		50
H.appendiculata	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGAAAT CTGG...CGT
A.chesapeakeensis	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGAAAT CTGG...CG.
V.ramulosa	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGAAAT CTGG...CCC
M.trigonosporus	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGNNAT CTGGNNTCCC
C.fimbriata	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGAAAT CTGG...CTA
O.piliferum	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGNNAT CTGG...CCT
D.phaseolorum	AGTAACGGAG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGNNAT CTGG...CCT
X.curta	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGNNAT CTGG...CC
F.oxysporum	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA AATTTGAAAT CTGG...CT

N.crassa	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CT
Mseq92055	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
CD02080	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
PP19286	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
SP02448	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
MS21020	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
MS02504	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
MS02173	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
MA19038	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
CS02200	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
CN02083	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
CP19258	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAGAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
Cf00001	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
CP02522	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
CH02082	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCT
CV02105	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
CA02299	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
Spt02091	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
CC02301	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
CT18481	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
SS02090	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAGCAGCCA	AATTTGAAAT	CTGG...TCC
G.citrina	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAAAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
A.albicans	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAAAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
P.brasiliensis	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAGAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
E.rubrum	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAGAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
C.crema	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAGAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
A.parasiticus	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAGAGCTCA	AATTTGAAAG	CTGG...CTC
E.astellata	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAGAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CCC
O.herpotrichus	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
L.doliolum	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
P.herbarum	AGTAACGGCG	AGTGAAGCG.	CAACAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...CTC
P.atrovinosa	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAAAGCTCA	GATTTGAAAT	CTGG...TGT
P.acanthodictya	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAAAGCTCA	GATTTGAAAT	CTGG...CGT
S.cerevisiae	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAAAAGCTCA	AATTTGAAAT	CTGG...TAC

51

100

H.appendiculata	CGGCGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTTTGCG	ACGC.GCCTT
A.chesapeakeensis	CG.CGCCCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTCTTGCG	CGGT.GCCTT
V.ramulosa	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTTGCGCG	AGGC.GCCTT
M.trigonosporus	CGGGGCCCGA	GTTGTAATTT	GAAGAGGATG	.NTTCTGGCA	AGGT.GCNGT
C.fimbriata	CGTAGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTTGGGTG	AGGT.GCCTT
O.piliferum	CGGG..CCGA	GTTGTAATTT	GGAGAGGATG	.CCTCTGGCG	CGGC.GCNGT
D.phaseolorum	CG.G..CCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.NTTCTGGCG	CGGT.GCCTT
X.curta	CGGG.TCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.NTTTTGCG	CGGT.GCCTT
F.oxysporum	CGGG.CCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATA	.CTTTTGATG	CGGT.GCCTT
N.crassa	..GG.CCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGAAG	.CTTTTGGTG	AGGC.ACCTT
Mseq92055	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGT	CGGCCACGGT
CD02080	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGT	CGGCGCGGT
PP19286	CAGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGT	CGGCTGCAGT
SP02448	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTTGGGT	CGGCTGCAGT
MS21020	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGT	CGGCAGCGGT
MS02504	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGT	CGGCAGCGGT
MS02173	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGG	CGGTCGCGGT
MA19038	CGGGGTCCGA	GTTGTATTTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGG	CGGCGCGGT
CS02200	CGGGGCCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGT	CGGCGCGGT
CN02083	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGCA	CGGCTGCAGT
CP19258	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.TTTCGGGT	CAGCTGCAGT
Cf00001	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.TTTCGGGT	CGGCTGCAGT
CP02522	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.TTTCGGGT	CGGCTGCAGT
CH02082	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.TTTCGGGT	CGGCAGCGGT
CV02105	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGCAG	.TTTCGGTC	CGGCCCCGT

CA02299	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GAAGAGGGTG	.TTTCGGGTG	AGGCACCGGC
Spt02091	CGGGGCCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGACG	.TTTCGGGTG	CGGC.CCGGT
CC02301	TAGG.CCCGA	GTTGTAATTG	GCAGAGGATG	.CCTCGGGCG	CGTCGCCGGT
CT18481	TAGG.CCCGA	GTTGTAATTG	GCAGAGGATG	.CCTCGGGTG	CGACGCCGGT
SS02090	CGGGGCCCGA	GTTGTAATTG	GCAGAGGACG	.CCTCGGGTG	CGGTACCGGT
G..citrina	TAGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTCGGGAG	CGGCGGCGGT
A.albicans	TGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GAAGAGGATG	.CTTCGGGTG	CGACCGCGGC
P.brasiliensis	CGGGGCCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGCG	TGGCCCGGGT
E.rubrum	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GTAGAGGATG	.CTTCGGGTG	CGGCCCGGT
C.cremaea	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTCGGTTG	CAGCCCCCAT
A.parasiticus	CGGGGTCCGC	ATTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTCGGGTG	CGGCCCTGT
E.astellata	CGGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGATG	.CTTCGGGTG	CGGCCCTGT
O.herpotrichus	TAGNGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGGCG	.CTTTGGCGT	TGGCAGCGGT
L.doliolum	TAGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGGCG	.CTTTGGCGT	TGGCAGCGGT
P.herbarum	TAGGGTCCGA	GTTGTAATTT	GCAGAGGGCG	.CTTTGGCTT	TGGCAGCGGT
P.atrovinosa	CGGCATCCGA	GTTGTAGTCT	GTAGAGGTGT	.ATTTCGAGTG	TGGCTCTGGC
P.acanthodictya	CGGCGTCCGA	GTTGTAATCT	GTAGAGGAGT	.ATTTCGAGTG	TAGCTTTGGC
S.cerevisiae	CGGTGCCCGA	GTTGTAATTT	GGAGAGGGCA	ACTTTGGGGC	CGTTCCTTGT

101

150

H.appendiculata	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCGCAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGTG
A.chesapeakeensis	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCATAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGTC
V.ramulosa	CCGAGTGCCC	TGGAACGGGC	CGCCGGAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGTA
M.trigonosporus	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCGCAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGTC
C.fimbriata	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCATAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGTT
O.piliferum	CCGAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGCCATAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGCC
D.phaseolorum	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCACAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTATGGTC
X.curta	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCTTAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTACGGTT
F.oxysporum	CCGAGTTCCC	TGGAACGGGA	CGCCATAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTCTGGTT
N.crassa	CTGAGTCCCC	TGGAACGGGG	CGCCATAGAG	GGTGAGAGCC	CCGTATAGTC
Mseq92055	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
CD02080	CTAAGTTCTT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
PP19286	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
SP02448	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
MS21020	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
MS02504	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
MS02173	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGAGA
MA19038	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
CS02200	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
CN02083	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
CP19258	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
Cf00001	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTAGGA
CP02522	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGGGA
CH02082	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGAGA
CV02105	GTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATGGAG	GGTGAGAATC	CCGTGTGAAA
CA02299	CTAAGTCCCT	TGGAACAGGG	CGTCATAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGCGG
Spt02091	CTAAGTCCCT	TGGAACAGGG	CGTCATAGAG	GGTGAGAATC	CCGTATGTGA
CC02301	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGCGA
CT18481	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCATAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGCGA
SS02090	CTAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCAGAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGCGA
G..citrina	CTAAGTCCCC	TGGAACGGGG	CGTCGCAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTTGGA
A.albicans	GCAAGTCCCC	TGGAACGGGG	CGTCGCAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTTGAG
P.brasiliensis	CTAAGTCCCC	TGGAACGGGG	CGTCGCAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTTCGG
E.rubrum	CTAAGTGCTC	TGGAACGGGC	CATCGGAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGGGA
C.cremaea	CTAAGTGCTC	TGGAACGGGC	CGTCATAGAG	GGTGAGAATC	CCGTATGGGA
A.parasiticus	CTAAGTGCCC	TGGAACGGGC	CGTCAGAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGGGA
E.astellata	CTAAGTGCCC	TGGAACGGGC	CGTCAGAGAG	GGTGAGAATC	CCGTCTGGG
O.herpotrichus	CCAAGTTCTT	TGGAACAGGA	CGTCACAGAG	GGTGAGAATC	CCGTACGTGG
L.doliolum	CCAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCACAGAG	GGTGAGAATC	CCGTACGTGG
P.herbarum	CCAAGTTCCCT	TGGAACAGGA	CGTCACAGAG	GGTGAGAATC	CCGTACGTGG
P.atrovinosa	TTAAGTTCTT	TGGAACAGGA	CGTCATAGAG	GGTGAGAACC	CCGTTAACGG

P.acanthodictya TTAAGTTCCT TGGAACAGGG CGTCATAGAG GGTGAGAACC CCGTTAACGG
S.cerevisiae CTATGTTTCCT TGGAACAGGA CGTCATAGAG GGTGAGCATC CCGTGT..GG

151

200

H.appendiculata T.GGC..CCG AGCCCCTGTA AAGCTCCTTC TACGAGTCGA GTAGTTTGGG
A.chesapeakeensis G.GTA..CTA AGCTATTGTG TAGCACCTTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
V.ramulosa G.GAC..CCG AGCCGGTGTG AAGCTCCCTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
M.trigonosporus G.GAC..CCG AGCCTCTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
C.fimbriata G.GAC..CCA AACCTCTGTA TAGCTCCTTC AACGAGTCGA GTAGTTTGGG
O.piliferum G.CCC..CCT AGCCTTTGCG AAGNTCCTTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
D.phaseolorum G.GAC..CCA AGCCTGTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
X.curta G.GAC..CCT TGCCTCTGTA AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
F.oxysporum G.GAT..CCA AATCTCTGTA AAGTTCCTTC AACGAGTCGA GTAGTTTGGG
N.crassa G.GCT..CCG ATCCAATGTA AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTAGTTTGGG
Mseq92055 C.CGC..CCA CGCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CD02080 C.CGC..CCA CGCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
PP19286 C.TGT..CCA CGCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
SP02448 C.CGT..CCA CGCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
MS21020 C.TGC..CCA AACCCATGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
MS02504 C.TGC..CCA AACCCATGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
MS02173 C.CGA..CCA ATCCCATGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
MA19038 C.CGC..CCA ACCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CS02200 C.CGC..CCA CGCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CN02083 C.CGT..CCA CGCCCCTGTG AAGCGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CP19258 C.CGC..CCA CGCCCCTGTG AAACGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
Cf00001 C.CGC..CCA CGCCCCTGTG AAACGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CP02522 C.TGC..CCA CGCCCCTGTG AAACGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CH02082 C.CGT..CCA CGCCCCTGTG AAACGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CV02105 C.CGG..CTA CGCCCCTGTG AAACGCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CA02299 C.CGG..CCG AGTCCATGTG AAACCCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
Spt02091 C.CGG..CCA ACCCCATGTG AAACCCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CC02301 C.CTG..CCG CGTCCGTGTG AGGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
CT18481 C.CTG..TGG CGCCCCTGTG AGGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
SS02090 C.CGG..CCA ACCCCTCACG AGGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
G..citrina C.CGCATCCG TGACCGTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
A.albicans T.CGCTG.CG CGCCCCTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
P.brasiliensis C.CG...CCC CGCCCCTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
E.rubrum CGGGGTGCCG CGTCCATGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
C.crema TGGGGTGTCTG CGTCCGTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
A.parasiticus TGGGGTGCCG CGCCCCTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
E.astellata CAGGGTGCCG TGCCCCTGTG AAGCTCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
O.herpotrichus T.CGCT.CCT TCGCCGTGTA AAGCCCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
L.doliolum T.CGCT.CCT TCGCCGTGTA AAGCCCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
P.herbarum T.CGCT.CTA TCGCCGTGTA AAGCCCCTTC GACGAGTCGA GTTGTTTGGG
P.atrovinosa C.CTTTGTTA TGCTCATGTG AATCTCCTTC AACGAGTCGA GTTGTTTGGG
P.acanthodictya C.CTTAGTTA TGCTCATGTG AATCTCCTTC AACGAGTCGA GTTGTTTGGG
S.cerevisiae C.GAGGAGCG GTTCTTTGTA AAGTGCCTTC GAAGAGTCGA GTTGTTTGGG

201

250

H.appendiculata AATCCTGCTC TAAATGGGAG GTAAACTCCT TCTAAAGCTA AATATAGGCC
A.chesapeakeensis AATNCTGCTC TAAATGGGAG GTAAACTCCT TCTAAAGCTA AATATTGGCC
V.ramulosa AATGCTGCTC TAAACGGGAG GTAAACCCCT TCTAAAGCTA AATACCGGCC
M.trigonosporus AATGCTGCTC AAAATGGGAG GTAAACCCCT TCTAAAGCTA AATACCGGCC
C.fimbriata AATGCTGCTC TAAATGGGAG GTATATCTCT TCTAAAGCTA AATATAGGCT
O.piliferum AATGCTGCTC AAAATGGGAG GTAAATTTCT TCTAAAGCTA AATACCGGCC
D.phaseolorum AATGCTGCTC TAAATGGGAG GTAAATCTCT TCTAAAGCTA AATACCGGCC
X.curta AATGCTGCTC TAAATGGGAG GTAAATTTCT TCTAAAGCTA AATATTGGCC
F.oxysporum AATGCTGCTC TAAATGGGAG GTATATGTCT TCTAAAGCTA AATACCGGCC
N.crassa AATGCTGCTC AAAATGGGAG GTAAATTTCT TCTAAAGCTA AATATTGGCC
Mseq92055 AATGCAGCTC AAAATGGGTG GTAAATTTCA TCTAAAGCTA AATACCGGCC
CD02080 AATGCAGCTC TAAATGGGTG GTAAATTTCA TCTAAAGCTA AATACCGGCC

PP19286	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTATATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
SP02448	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTATATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
MS21020	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATATTGGCC
MS02504	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATATTGGCC
MS02173	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATATTGGCC
MA19038	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CS02200	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CN02083	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTACATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CP19258	AATGCAGCTC	CAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
Cf00001	AATGCAGCTC	CAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CP02522	AATGCAGCTC	CAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CH02082	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CV02105	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
CA02299	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTATATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
Spt02091	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
CC02301	AATGCAGCTC	TAAGCGGGTG	GTAAATTCCA	TCTAAGGCTA	AATACCGGCC
CT18481	AATGCAGCTC	TAAGTGGGTG	GTAAATTCCA	TCTAAGGCTA	AATACCGGCC
SS02090	AATGCAGCTC	TAAGCGGGTG	GTAAATTCCA	TCTAAGGCTA	AATACCGGCC
G. .citrina	AATGCAGCTC	AAAATGGGTG	GCAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCT
A.albicans	AATGCAGCTC	TAAGCGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATATTGGCC
P.brasiliensis	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGTC
E.rubrum	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
C.crema	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
A.parasiticus	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
E.astellata	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCA	TCTAAAGCTA	AATACCGGCC
O.herpotrichus	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTTCT	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
L.doliolum	AATGCAGCTC	TAAATGGGAG	GTAAATTTCT	TCTAAAGCTA	AATACTGGCC
P.herbarum	AATGCAGCTC	TAAATGGGAG	GTAAATTTCT	TCTAAAGCTA	AATATTGGCC
P.atrovinosa	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTCCA	TCTAAAGCTA	AATATTGGCA
P.acanthodictya	AATGCAGCTC	TAAATGGGTG	GTAAATTCCA	TCTAAAGCTA	AATACTGGCA
S.cerevisiae	AATGCAGCTC	TAAGTGGGTG	GTAAATTCCA	TCTAAAGCTA	AATATTGGCG

251

300

H.appendiculata	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
A.chesapeakeensis	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
V.ramulosa	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
M.trigonosporus	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
C.fimbriata	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
O.piliferum	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
D.phaseolorum	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACCTTG
X.curta	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
F.oxysporum	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
N.crassa	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
Mseq92055	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CD02080	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
PP19286	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
SP02448	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
MS21020	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
MS02504	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
MS02173	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
MA19038	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CS02200	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CN02083	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CP19258	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
Cf00001	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CP02522	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CH02082	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CV02105	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CA02299	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
Spt02091	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
CC02301	AGAGACCGAT	AGCGCACAAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG

CT18481	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
SS02090	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
G.citrina	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGGTTAA	AAGCACCTTG
A.albicans	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGGTTAA	AAGCACCTTG
P.brasiliensis	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
E.rubrum	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
C.crema	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
A.parasiticus	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
E.astellata	GGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
O.herpotrichus	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
L.doliolum	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
P.herbarum	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG
P.atrovinosa	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGAACTCTG
P.acanthodictya	AGAGACCGAT	AGCGCACAAG	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGAACTCTG
S.cerevisiae	AGAGACCGAT	AGCGAACAAG	TACAGTGATG	GAAAGATGAA	AAGAACTTTG

301

350

H.appendiculata	AAAAGAGAGT	TAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTATGA
A.chesapeakeensis	AAAAGAGAGT	CAAATAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGTGA
V.ramulosa	AAAAGAGAGT	CAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGTGG
M.trigonosporus	AAAAGAGAGT	TAAAAAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
C.fimbriata	AAAAGAGAGT	TAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCCTATGA
O.piliferum	AAAAGAGGGT	TAAAAAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCCTGTGA
D.phaseolorum	AAAAGGGGGT	TAAATAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCACTTATGA
X.curta	AAAAGAGGGT	TAAATAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGTTTGCGA
F.oxysporum	AAAAGAGAGT	CAAAAAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGTTTATGA
N.crassa	AAAAGAGAGT	CAAAAAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGTTTGTGA
Mseq92055	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCCA
CD02080	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
PP19286	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGAAA
SP02448	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
MS21020	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
MS02504	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
MS02173	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
MA19038	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCCA
CS02200	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
CN02083	AAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
CP19258	GAAAGAGAGT	TAAACAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCCA
Cf00001	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCCA
CP02522	AAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
CH02082	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
CV02105	AAAAGAGAGT	TAAAAAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCAAGCAA
CA02299	GAAAGAGAGT	TAAAAAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCCA
Spt02091	GAAAGAGAGT	TAAAAAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTGGCAA
CC02301	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAAG
CT18481	GAAAGAGAGT	TAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAAG
SS02090	GAAAGAGAGT	CAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAAG
G.citrina	AAAAGGGAGT	TAAATAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA
A.albicans	AAAAGGGAGT	TAAATAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGG
P.brasiliensis	AAAAGAGAGT	TAAACAGCAT	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
E.rubrum	AAAAGAGAGT	TAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
C.crema	AAAAGAGAGT	TAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
A.parasiticus	AAAAGAGAGT	TAAAAAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
E.astellata	AAAAGAGAGT	TAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCGA
O.herpotrichus	GAAAGAGAGT	CAAATAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAAG
L.doliolum	GAAAGAGAGT	CAAATAGCAC	GTGAAATTGT	TAAAAGGGAA	GCGCTTGCAAG
P.herbarum	GAAAGAGAGT	CAAACAGCAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAAG
P.atrovinosa	AACAGAGAGT	TAAATAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCACTTGCGA
P.acanthodictya	AACAGAGAGT	TAAATAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GCACTTGCGA
S.cerevisiae	AAAAGAGAGT	GAAAAAGTAC	GTGAAATTGT	TGAAAGGGAA	GGGCATTTGA

<i>H. appendiculata</i>	CCAGACTTGG	GCCC.GGTGG	TTCAGCCGTC	CCTCGCGGGC	GG.TG..CAC
<i>A. chesapeakeensis</i>	CCAGACTTGG	GCCT.GGTAG	TTCAGCCGTC	CTTCT.GGGC	GG.TG..CAT
<i>V. ramulosa</i>	CCAGACTTGC	GCCCCGGCAG	CTCAGCCGTC	CCTCGCGGGC	GG.TG..CAC
<i>M. trigonosporus</i>	CCAGACTCGC	GCCC.GTNGG	ATCAGCCGTC	GCTCGTCGGC	GG.CG..CAC
<i>C. fimbriata</i>	CCAGACTTGT	TTCT.GGCAG	TTTCGTTAGC	CCTCG..GGC	..TGATTTAC
<i>O. piliferum</i>	CCAGACTTGC	NNNN.NNAGG	ATCATCCGGT	GTTCTCACC	GG.TG....C
<i>D. phaseolorum</i>	CCAGACTTGG	GCCG.GGCGG	CTCATCAGGG	GTTCT.CCCC	TG.TG..CAC
<i>X. curta</i>	CCAGACCTTT	TCCT.AGCGG	ATCATCCGGT	GTTCT.CACC	GG.TG..CAC
<i>F. oxysporum</i>	CCAGACTTGG	GCTT.GGTTA	ATCATCTGGG	GTTCT.CCCC	AG.TG..CAC
<i>N. crassa</i>	CCAGACTTCG	CCTT.CCATC	ATCATGTGCT	GTTCT.CACC	GG.TG..CAC
Mseq92055	CCAGACTTGC	TCCC.GGGTG	TTCAGCCGGC	GTTCT.CGCC	GG.TG..CAT
CD02080	TCAGACTTGT	CTCC.GGGTG	TTCAGCCGGC	GTTTT.CGCC	GG.TG..CAC
PP19286	CCAGACTTGT	CCCC.GGGTG	TTCAGCCGGC	GTTCT.CGCC	GG.TG..CAC
SP02448	CCAGACTTGC	TCCC.GGGTG	TTCAGCCGGC	GTTTT.CGCC	GG.TG..CAC
MS21020	CCAGACTTGC	CCCC.GGGTG	CTCAACCGGC	GTTTT.CGCC	GG.TG..CAC
MS02504	CCAGACTTGC	CCCC.GGGTG	CTCAACCGGC	GTTCT.CGCC	GG.TG..CAC
MS02173	CCAGACTTGC	CCCC.GGGTG	CTCAACCGGC	GTTTT.CGCC	GG.TG..CAC
MA19038	CCAGACTTGC	CCCC.GGGTG	TCCCCCGGC	GTTCT.CGCC	GG.CT..CAC
CS02200	CCAGACTCGT	CCCC.GGGTG	CTCACCCGGC	GTTTT.CGCC	GG.CG..CAC
CN02083	CCAGACTTGC	TCCC.GGGGG	TTCACCCGGC	GTTTT.CGCC	GG.CG..CAC
CP19258	CCAGACTTGG	CCCC.AGGTG	CTCACCCGGC	GTTCCGCGCC	GG.GG..CAC
Cf00001	CCAGACTTGG	ATCC.GGGTG	TTCCGCCGGC	GTTTT.CGCC	GG.CG..TAC
CP02522	CCAGACTTGG	TCCC.GGGTG	CTCAGCCGGC	GTTCT.CGCC	GG.TG..CAC
CH02082	CCAGACTTGC	TCCC.AGGTG	TTCACCCGGC	GTTCT.CGCC	GG.GG..CAC
CV02105	CCAGACTCGC	TTCC.GGGTG	TTCAGCCGGT	GTTCTCCACC	GG.TG..CAT
CA02299	CCAGACCTGT	CGTC.GGGTG	ATCAGCCGTC	GTTCT.CGAC	GG.TG..CAC
Spt02091	CCAGACCTGC	CC.C.GGGTG	ATCAACGGTT	GTTCT.CAAC	CG.TG..CAC
CC02301	TCAGACTCGC	CCGC.GGCCG	ATCAGCCGGT	GTTTT.CACC	GG.TG..CAC
CT18481	TCAGACTCGT	CCGC.GGCCG	ATCAGCCGGT	GTTCT.CACC	GG.TG..CAC
SS02090	TCAGACTCGC	CCGC.GGCCG	ATCAGCCGGT	GTTCT.CACC	GG.TG..CAC
<i>G. citrina</i>	CCAGACTCGG	CCGT.GGAGG	CTCAGTGGGC	ACGTG.TGCC	CA.TG..CAC
<i>A. albicans</i>	CCAGACTCGG	GTGC.GGGGG	TTCAGCGGCC	ATTCG.TGGT	CG.TG..TAC
<i>P. brasiliensis</i>	CCAGACTCGG	CCGC.GGGGG	CTCAGCGGCC	ACTCGTTGCC	CG.TG..CAC
<i>E. rubrum</i>	CCAGACTCGC	TTCC.GG.GG	TTCAGCCGGC	TTTCG.GGCC	GG.TG..TAC
<i>C. cremea</i>	CCAGACTCGC	CTAC.GG.GG	TTCAGCCGGC	TTTCG.GGCC	GG.TG..TAC
<i>A. parasiticus</i>	CCAGACTCGC	CTCC.AG.GG	TTCAGCCGGC	ATTCG.TGCC	GG.TG..TAC
<i>E. astellata</i>	CCAGACTCGG	CCCT.GG.GG	TTCAGCCAGC	ACTCG.TGCT	GG.TG..TAC
<i>O. herpotrichus</i>	CCAGACTTGC	CNGT.AGTTG	CTTNTCCGGA	CTTTT.GTCC	GG.TG..CAC
<i>L. doliolum</i>	CCAGACTTGC	CCGT.AGTTG	CTCATCCAGG	CTTTT..GCC	TG.TG..CAT
<i>P. herbarum</i>	CCAGACTTGC	TTGC.AGTTG	CTCATCCGGG	CTTTT..G.C	GGCTG..CAC
<i>P. atrovinosa</i>	CCAGACGCAC	TTGC.AAGCC	ATCAATCCTC	ATTCT.TGGG	GG.TG..CAC
<i>P. acanthodictya</i>	CCAGACACAC	TTGC.AATTG	ATCAACCTCC	ATTTT.TGGT	GG.TG..CAC
<i>S. cerevisiae</i>	TCAGACATGG	TGTT.TTGTG	CCCTCTGCTC	CTTGT..GGG	TAGGGGAATC

<i>H. appendiculata</i>	TCCGCCGGCC	..CAGGCCAG	CATCAGTTGC	CGGTTGGGG.	AGAAAGGCAG
<i>A. chesapeakeensis</i>	TCTGCCGGTT	..CAGGCCAG	CATCAGTTGT	CGGTTGGGG.	AGAAAGATGG
<i>V. ramulosa</i>	TCTGCCGGGC	G.CAGGCCAG	CATCAGCTCG	TGGCGGGGG.	AGAAAGGCGG
<i>M. trigonosporus</i>	TCCGGCGGGC	T.CGGGCCAG	CATCAGTTCG	CCTCGGGGGG	AGAAAGGCNG
<i>C. fimbriata</i>	TCTGTCCAGT	A.CAGGCCAG	CATCAGTTTG	CTGTCCGGG.	AGAAAGGCTC
<i>O. piliferum</i>	TCNG.CGGNN	NNNAGGCCAG	CATCGGCTCT	CCCCGGGGG.	ACAAAGGTCG
<i>D. phaseolorum</i>	TCCGCCCGGC	A.CAGGCCAG	CATCGGTTTT	CGCGGGGGG.	ATAAGACCAA
<i>X. curta</i>	TTCGCTAAGT	T.TAGGCCAG	CATCGGTTTC	TGTAGGGGG.	ATAAAAGCTC
<i>F. oxysporum</i>	TTTTCCAGTC	..CAGGCCAG	CATCAGTTTT	CCCCGGGGG.	ATAAAGGCGG
<i>N. crassa</i>	TCGGACAGCT	..CAGGCCAG	CATCGGTTTT	GGC.GGGGG.	ATAAAGGTCC
Mseq92055	TCGCCCGGGG	T.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	AGCGGCCGG.	ATAAAGGCCC
CD02080	TCGCCCGGGA	G.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGTCCG.	ATAAAGGCCC
PP19286	TCGCCCGGGG	C.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGCCGG.	ATAAAGGTCC
SP02448	TCGCCCGGGG	T.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGCCGG.	ACAAAGGCCC
MS21020	TCGCCCGGGG	T.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGCCGG.	AGAAAGACCC

MS02504	TCGCCC	GGGG	T.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGCCGG.	AGAAAGACCC
MS02173	TCGCCC	GGGG	T.CGGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCGGTTGG.	AGAAAGGCCT
MA19038	TCGCCC	GGGG	T.CAGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCGGCCGG.	ATAAAGGCCT
CS02200	TCGCCC	GGGA	T.CGGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCGGCCGG.	ATATAGGTCC
CN02083	TCCCCC	GGGA	T.CAGGCCAG	CATCGGCTCG	GGCGACCGG.	ACAAAGGCCC
CP19258	TCGCCC	GGGG	A.CAGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCAGCCGG.	ACAAAGGCCC
Cf00001	TCACTC	GGGA	A.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGCTGG.	ACAAAGGCCC
CP02522	TCGCCC	GGGG	A.CAGGCCAG	CATCGGTTCA	GGCGGCCTC.	ACAAAGGCCC
CH02082	TCGCCT	GGGA	T.CAGGCCAG	CATCGGTTTT	CGCGGCCAG.	ACAAAGGCTC
CV02105	TCGCCC	GGTC	T.CGGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCGGCCAG.	ATAAAGGCCC
CA02299	TCGCCC	GTTC	G.CAGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCGGTCGG.	ATAAAGGCCC
Spt02091	TCGCCC	GTGA	T.CAGGCCAG	CATCGGTTTC	GGCGGTCGG.	ATACAGACCC
CC02301	TGGGT	CGCGG	A.CGGGCCAG	CATCGGTTCC	GGCGGCGGG.	ACAAAGGCCC
CT18481	TGGGT	CGTGG	A.CGGGCCAG	CATCGGTTTC	GGCGGCGGG.	ACAAAGGCCC
SS02090	TGGGCC	CGCGG	T.CGGGCCAG	CATCGGTTCC	GACGGCGGG.	AGAAGGGCCC
G..citrina	TCCTT	CGCGG	C.CGGGCCAG	CATCAGTTCT	GACGGCCGG.	TCAAAGGCCC
A.albicans	TCCCCC	CGCTG	CTCGGGCCAG	CATCGGTTCCG	GGCGGTCGG.	TCAAAGGCCC
P.brasiliensis	TCCCCC	GTGG	T.CGGGCCAG	CGTCGGTTTC	GACGGCCGG.	TCAAAGGCCC
E.rubrum	TTCCCC	GGGG	G.CGGGCCAG	CGTCGGTTTG	GGCGGCCGG.	TCAAAGGCCC
C.cremea	TTCCCC	GTGG	G.CGGGCCAG	CGTCGGTTTG	GGCGGCCGG.	TCAAAGGCCC
A.parasiticus	TTCCCT	GGGG	G.CGGGCCAG	CGTCGGTTTG	GGCGGCCGG.	TCAAAGGCTC
E.astellata	TTCCCC	AGGG	G.CGGGCCAG	CGTCGGTTTG	GGCGGCCGG.	TCAAAGGCCC
O.herpotrichus	TCTTCT	NNGG	G.CAGGCCAG	CATCAGTTTA	GGCGGTTGG.	ATAAAGGTCT
L.doliolum	TCTTCT	ATGG	G.CAGGCCAG	CATCAGTTTG	GGCGGTTGG.	ATAAAGGTCT
P.herbarum	TCTTCT	GTAG	G.CAGGCCAG	CATCAGTTTG	GGCGGTGGG.	ATAAAGGTCT
P.atrovinosa	TCGGTT	GTAT	G.TGGGTCAG	CATCAGTTAT	GGTGGTGGG.	AAAAAGACTA
P.acanthodictya	TCGGTT	GTAG	G.TGGGTCAG	CATCAGTTAC	GGCGGTGGG.	AAAAAGACCA
S.cerevisiae	TCGCATT	TCA	C.TGGGCCAG	CATCAGTTTT	GGTGGCAGG.	ATAAAT.CCA

451 456

H.appendiculata	CGGGAA
A.chesapeakeensis	CGGGAA
V.ramulosa	CGGGAA
M.trigonosporus	CGGGAA
C.fimbriata	TGGGAA
O.piliferum	CGGGAA
D.phaseolorum	CGGGAA
X.curta	TGGGAA
F.oxysporum	CGGGAA
N.crassa	GGGGAA
Mseq92055	CCGGAA
CD02080	TCGGAA
PP19286	TTGGAA
SP02448	CCGGAA
MS21020	CTGGAA
MS02504	TTGGAA
MS02173	CTGGAA
MA19038	CTGGAA
CS02200	CTGGAA
CN02083	CTGGAA
CP19258	CCGGAA
Cf00001	CCGGAA
CP02522	CCGGAA
CH02082	CGGGAA
CV02105	CGGGAA
CA02299	CGGGAA
Spt02091	GGGGAA
CC02301	TGGGAA
CT18481	TGGGAA
SS02090	GGGGAA
G..citrina	CTGGAA

A.albicans	CAGGAA
P.brasiliensis	CCGGAA
E.rubrum	CTGGAA
C.crema	TGGGAA
A.parasiticus	CCGGAA
E.astellata	CAGGAA
O.herpotrichus	CTATCA
L.doliolum	CTGTCA
P.herbarum	CTGTCA
P.atrovinosa	AGGGAA
P.acanthodictya	AGGGAA
S.cerevisiae	TAGGAA

Figura 3.13 Alineamiento de secuencias de la mitad 5' del gen que codifica para la subunidad grande del ribosoma, en especies representativas de las familias del antiguo orden Caliciales s.l. encuentran en la Tabla 3.11. La secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* (Subphylum Hemiascomycotina) fue empleada como "outgroup" para los posteriores análisis filogenéticos.

PileUp
Procede de C28-2

ORDEN CALICIALES CON 28S. Usando Sacaromyces como outgroup. Alineamiento por Clustal sin tener en cuenta estructura secundaria
Eliminando Cr
arreglado con estructura secundaria. Elimino columnas de gaps que me señalan algunos stems o loops de alineamiento complicado
Elimino tres zonas de alineamiento ambiguo.

```
GDC ***** GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor *****
GDC 01089d019000080000000000ff008040ff0000ffffffffffffffffffff
GDC ff000000000000f43f00000000000f43f00000000000f03f000000000
GDC 00f03f00A00000000190000cA54696d6573204e657720526f6d616e00B0
GDC 046000200000000000000000000601444e000245510003535400044b520
GDC 00546595700064c49564d0028437431383438312c0d0a436330323330312
GDC c0d0a537330323039302c0d0a4d5330323530342c0d0a4d5332313032302
GDC c0d0a4d5330323137332c0d0a4d6131393033382c0d0a4d7365712c0d0a4
GDC 37330323230302c0d0a436e30323038332c0d0a436430323038302c0d0a5
GDC 07031393238362c0d0a537030323434382c0d0a436830323038322c0d0a4
GDC 37031393235382c0d0a436630303030302c0d0a437030323532322c0d0a4
GDC 37630323130352c0d0a436130323239392c0d0a536630323039312c0d0a5
GDC 3633238293b0d0a00CBAADAAA0000002a000a00010001B20AAA000a203a2
GDC 000203a2000000000000000594000000000000000000c505800000fff
GDC f000047580000ff00ff000041475358000000ffffff0056434147444e535
GDC 450580000ff00ffff00484b525800ff00000000ff4544580000ff000000f
GDC f484b5245445800ffffff0000ff48524551444e425a5800ff000000ff005
GDC 957484b524551444e5354425a5800000000ff00494c56415800ff00008
GDC 08080465957485800000ff808080494c564341474d4659574854505800f
GDC fffff0000000c50580000000000000475800000000000041434753580
GDC 000000000000564147444e535450580000000000000484b5258000000
GDC 000000045445800000000000000484b5245445800000000000004852455
GDC 1444e425a580000000000000435957484b524551444e5354425a580000
GDC 00000000494c564158000000000000046595748580000000000000494
GDC c564341474d465957485450580000000000000300ffffff0000000fff
GDC fff8080800000000c0c0c00000ABBBBBBBBBBBBBB00ff00A00150001000
GDC 100010001000100010001000100010001000100010001000100010001000
GDC 10001000100010001A0018AA0000000000000000000000003A00ff00A000
GDC 0000008056400000000000805140000000000004940000002000000000
GDC 001440A0000000098b20c410000000010250641000000001898064100000
GDC 00078b10b4100AAABB00005374616e646172640046464c4c535353535959
GDC 2a2a43432a574c4c4c4c5050505048485151525252524949494d54545454
GDC 4e4e4b4b5353525256565656414141414444454547474747002d2d2d2d2d
GDC 2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d
GDC 4d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d2d0
GDC BBBB00000000000001500000000000000000000000000000000000000
GDC 000000000000000000000000000000000000000000000000000000003000000000
GDC 0BBAB001500000000000000000000000000000000000000000000000201b7B00
GDC 00000000059400000000000005440000000000004e4000DAAB000000ff
GDC ffff0302014445484b524e5153540000ff00ff0000024c49564d46595741
GDC 47435000ff000000ff0004014445484b520000ff00ff0000024e51535400
GDC 00ff00ff8000034c49564d46595700ff000000ff0004414700ff00000080
GDC 00080144450000ff00ff000002484b5200ffffff0000034e510000ff00
GDC ff800004535400ffffff8000054c495600ff000000ff000646595700ff
GDC ffff00ff0007414700ff0000008000084d4300ffffff0080000000000000
GDC Affffff80808000A
```

3.13.msf MSF: 1252 Type: N December 26, 2001 22:45 Check: 2997 ..

Name: Ct18481	Len: 1252	Check: 618	Weight: 1.00
Name: Cc02301	Len: 1252	Check: 1565	Weight: 1.00
Name: Ss02090	Len: 1252	Check: 767	Weight: 1.00
Name: MS02504	Len: 1252	Check: 2180	Weight: 1.00

Name: MS21020	Len: 1252	Check: 1823	Weight: 1.00
Name: MS02173	Len: 1252	Check: 3587	Weight: 1.00
Name: Ma19038	Len: 1252	Check: 8693	Weight: 1.00
Name: Mseq92055	Len: 1252	Check: 8825	Weight: 1.00
Name: Cs02200	Len: 1252	Check: 4823	Weight: 1.00
Name: Cn02083	Len: 1252	Check: 5447	Weight: 1.00
Name: Cd02080	Len: 1252	Check: 2266	Weight: 1.00
Name: Pp19286	Len: 1252	Check: 570	Weight: 1.00
Name: Sp02448	Len: 1252	Check: 9168	Weight: 1.00
Name: Ch02082	Len: 1252	Check: 6756	Weight: 1.00
Name: Cp19258	Len: 1252	Check: 5942	Weight: 1.00
Name: Cf00001	Len: 1252	Check: 7809	Weight: 1.00
Name: Cp02522	Len: 1252	Check: 6029	Weight: 1.00
Name: Cv02105	Len: 1252	Check: 8711	Weight: 1.00
Name: Ca02299	Len: 1252	Check: 4355	Weight: 1.00
Name: Sf02091	Len: 1252	Check: 1515	Weight: 1.00
Name: S.cerevisiae	Len: 1252	Check: 1548	Weight: 1.00

//

	1				50
Ct18481	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCCCAAA	TTTGAAATCT
Cc02301	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCCCAAA	TTTGAAATCT
Ss02090	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	GCAGCCCAAA	TTTGAAATCT
MS02504	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
MS21020	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
MS02173	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Ma19038	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Mseq92055	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cs02200	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cn02083	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cd02080	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Pp19286	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Sp02448	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Ch02082	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cp19258	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	AGAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cf00001	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cp02522	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Cv02105	ATTGCCTTAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Ca02299	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
Sf02091	ATTGCCTCAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	ACAGCTCAA	TTTGAAATCT
S.cerevisiae	ATTGCCTTAG	TAACGGCGAG	TGAAGCGGCA	AAAGCTCAA	TTTGAAATCT

	51				100
Ct18481	GG..CCGG..	CCCAGTTGT	AATTGGCAGA	GGATG.CCTC	GGGTGCGACG
Cc02301	GG..CCGG..	CCCAGTTGT	AATTGGCAGA	GGATG.CCTC	GGGCGCGTTCG
Ss02090	GGTCCCAGGG	CCCAGTTGT	AATTGGCAGA	GGACG.CCTC	GGGTGCGGTA
MS02504	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGTGCGGCA
MS21020	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGTGCGGCA
MS02173	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGGCGGTC
Ma19038	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGGCGGCG
Mseq92055	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGTTCCGCC
Cs02200	GGCCTCGGGG	CCCAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGTACGGCG
Cn02083	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGCACGGCT
Cd02080	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGTACGGCG
Pp19286	GGCCCCAGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTC	GGGTACGGCT
Sp02448	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.CTTT	GGGTACGGCT
Ch02082	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGATG.TTTC	GGGTACGGCA
Cp19258	GGCCTCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGCAGA	GGATG.TTTC	GGGTTTCAGCT
Cf00001	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGCAGA	GGATG.TTTC	GGGTTCCGCT
Cp02522	GGCCCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGCAGA	GGATG.TTTC	GGGTTCCGCT

Cv02105	GGCTCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	GGCAG .TTTC	GGGTCCGGCC
Ca02299	GGCCCCGGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGAAGA	GGGTG .TTTC	GGGTGAGGCA
Sf02091	GGCTCCGGGG	CCCAGTTGT	AATTTGCAGA	GGACG .TTTC	GGGTGCGGC .
<i>S.cerevisiae</i>	GGTACCGGTG	CCCAGTTGT	AATTTGGAGA	GGGCAACTTT	GGGGCCGTTT

101

150

Ct18481	CCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TAGAGGGTGA	GAATCCCGTC
Cc02301	CCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TAGAGGGTGA	GAATCCCGTC
Ss02090	CCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	GAGAGGGTGA	GAATCCCGTC
MS02504	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
MS21020	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
MS02173	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Ma19038	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Mseq92055	ACGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cs02200	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cn02083	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cd02080	GCGGTCTAAG	TTCTTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Pp19286	GCAGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Sp02448	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Ch02082	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cp19258	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cf00001	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cp02522	GCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Cv02105	CCGGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TGGAGGGTGA	GAATCCCGTG
Ca02299	CCGGCCTAAG	TCCCTTGGAA	CAGGGCGTCA	TAGAGGGTGA	GAATCCCGTC
Sf02091	CCGGTCTAAG	TCCCTTGGAA	CAGGGCGTCA	TAGAGGGTGA	GAATCCCGTA
<i>S.cerevisiae</i>	CTTGTCTATG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TAGAGGGTGA	GCATCCCGTG

151

200

Ct18481	TGCGACCTGG	CGTGGCGCCC	GTGCGAGGCT	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cc02301	TGCGACCTGG	CGCCGCGTCC	GTGTGAGGCT	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Ss02090	TGCGACCGGC	CACCAACCCC	TCACGAGGCT	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
MS02504	TGGGACTGCC	CGCCAAACCC	ATGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
MS21020	TGGGACTGCC	CGCCAAACCC	ATGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
MS02173	TGAGACCGAT	GGCCAATCCC	ATGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Ma19038	TGGGACCGCC	GGCCAACCCC	GTGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Mseq92055	TGGGACCGCC	GGCCACGCCC	GTGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cs02200	TGGGACCGCC	CGCCACGCCC	ATGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cn02083	TGGGACCGTC	CGCCACGCCC	ATGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cd02080	TGGGACCGCC	CGCCACGCCC	ATGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Pp19286	TGGGACTGTC	TGCCACGCCC	GTGTGAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Sp02448	TGGGACCGTC	CGCCACGCCC	GTGTAAAGCG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Ch02082	TGAGACCGTC	CGCCACGCCC	ATGTGAAACG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cp19258	TGGGACCGCC	GGCCACGCCC	GTGTGAAACG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cf00001	TAGGACCGCC	GGCCACGCCC	ATGTGAAACG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cp02522	TGGGACTGCC	GGCCACGCCC	GTGTGAAACG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Cv02105	TGAAACCGGT	GGCTACGCCC	ATGTGAAACG	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Ca02299	TGCGGCCGGT	GACCGAGTCC	ATGTGAAACC	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
Sf02091	TGTGACCGGT	GACCAACCCC	ATGTGAAACC	CCTTCGACGA	GTCGAGTTGT
<i>S.cerevisiae</i>	TG.GCGAGGA	GTGCGGTTCT	TTGTAAAGTG	CCTTCGAAGA	GTCGAGTTGT

201

250

Ct18481	TTGGGAATGC	AGCTCTAAGT	GGGTGGTAAA	TTCCATCTAA	GGCTAAATAC
Cc02301	TTGGGAATGC	AGCTCTAAGC	GGGTGGTAAA	TTCCATCTAA	GGCTAAATAC
Ss02090	TTGGGAATGC	AGCTCTAAGC	GGGTGGTAAA	TTCCATCTAA	GGCTAAATAC
MS02504	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAT
MS21020	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAT
MS02173	TTGGGAATGC	AGCTCTAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAT
Ma19038	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Mseq92055	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Cs02200	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC

Cn02083	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTACA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Cd02080	TTGGGAATGC	AGCTCTAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Pp19286	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTATA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Sp02448	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTATA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Ch02082	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Cp19258	TTGGGAATGC	AGCTCCAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Cf00001	TTGGGAATGC	AGCTCCAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Cp02522	TTGGGAATGC	AGCTCCAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Cv02105	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Ca02299	TTGGGAATGC	AGCTCTAAAT	GGGTGGTATA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
Sf02091	TTGGGAATGC	AGCTCAAAAT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAC
<i>S.cerevisiae</i>	TTGGGAATGC	AGCTCTAAGT	GGGTGGTAAA	TTTCATCTAA	AGCTAAATAT

251

300

Ct18481	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cc02301	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Ss02090	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
MS02504	TGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
MS21020	TGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
MS02173	TGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Ma19038	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Mseq92055	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cs02200	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cn02083	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cd02080	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Pp19286	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Sp02448	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Ch02082	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cp19258	TGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cf00001	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cp02522	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Cv02105	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Ca02299	CGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
Sf02091	TGGCCAGAGA	CCGATAGCGC	ACAAGTAGAG	TGATCGAAAG	ATGAAAAGCA
<i>S.cerevisiae</i>	TGGCCAGAGA	CCGATAGCGA	ACAAGTACAG	TGATGGAAAG	ATGAAAAGAA

301

350

Ct18481	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAC	AGCACGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cc02301	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCACGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Ss02090	C'TTTGGAAAG	AGAGTCAAAC	AGCACGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
MS02504	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
MS21020	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
MS02173	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Ma19038	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Mseq92055	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cs02200	C'TTTGGAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cn02083	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cd02080	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Pp19286	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Sp02448	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Ch02082	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cp19258	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAC	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cf00001	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cp02522	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Cv02105	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGCATGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCA
Ca02299	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGTACGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
Sf02091	C'TTTGAAAAG	AGAGTTAAAA	AGTACGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGCGCT
<i>S.cerevisiae</i>	C'TTTGAAAAG	AGAGTAAAA	AGTACGTGAA	ATTGTTGAAA	GGGAAGGGCA

351

400

Ct18481	TGCAGTCAGA	CTCGTCCGCG	GCCGATCAGC	CGGTGTTCTC	.ACCGGTGCA
---------	------------	------------	------------	------------	------------

Cc02301	TGCAGTCAGA	CTCGCCCGCG	GCCGATCAGC	CGGTGTTTTC	.ACCGGTGCA
Ss02090	TGCAGTCAGA	CTCGCCCGCG	GCCGATCAGC	CGGTGTTCTC	.ACCGGTGCA
MS02504	TGCAACCAGA	CTTGCCCCCG	GGTGCTCAAC	CGGCGTTCTC	.GCCGGTGCA
MS21020	TGCAACCAGA	CTTGCCCCCG	GGTGCTCAAC	CGGCGTTTTC	.GCCGGTGCA
MS02173	TGCAACCAGA	CTTGCCCCCG	GGTGCTCAAC	CGGCGTTTTC	.GCCGGTGCA
Ma19038	TGCCACCAGA	CTTGCCCCCG	GGTGTTCCCC	CGGCGTTCTC	.GCCGGCTCA
Mseq92055	TGCCACCAGA	CTTGCTCCCC	GGTGTTCCAGC	CGGCGTTCTC	.GCCGGTGCA
Cs02200	TGCAACCAGA	CTCGTCCCCG	GGTGCTCACC	CGGCGTTTTC	.GCCGGCGCA
Cn02083	TGCAACCAGA	CTTGCTCCCC	GGGTTTCACC	CGGCGTTTTC	.GCCGGCGCA
Cd02080	TGCGATCAGA	CTTGTCTCCG	GGTGTTCCAGC	CGGCGTTTTC	.GCCGGTGCA
Pp19286	TGAAACCAGA	CTTGTCCCCG	GGTGTTCCAGC	CGGCGTTCTC	.GCCGGTGCA
Sp02448	TGCAACCAGA	CTTGCTCCCC	GGTGTTCCAGC	CGGCGTTTTC	.GCCGGTGCA
Ch02082	TGCAACCAGA	CTTGCTCCCA	GGTGTTCCACC	CGGCGTTCTC	.GCCGGGGCA
Cp19258	GGCCACCAGA	CTTGGCCCCA	GGTGCTCACC	CGGCGTTCCG	CGCCGGGGCA
Cf00001	TGCCACCAGA	CTTGGATCCG	GGTGTTCCGC	CGGCGTTTTC	.GCCGGCGTA
Cp02522	TGCAACCAGA	CTTGGTCCCC	GGTGCTCAGC	CGGCGTTCTC	.GCCGGTGCA
Cv02105	AGCAACCAGA	CTCGTTCGCG	GGTGTTCCAGC	CGGTGTTCTC	CACCGGTGCA
Ca02299	TGCCACCAGA	CCTGTCGTCCG	GGTGATCAGC	CGTCGTTCTC	.GACGGTGCA
Sf02091	GGCAACCAGA	CCTG.CCCCC	GGTGATCAAC	GGTTGTTCTC	.AACCGTGCA
S.cerevisiae	TTTGATCAGA	CATGGTGTTC	TGTGCCCTCT	GTCCTTGT.	.GGGTAGGGG

401

450

Ct18481	...CTGGGTC	GTGGACGGGC	CAGCATCGGT	TTCGGCGGCG	GGACAAAGGC
Cc02301	...CTGGGTC	GCGGACGGGC	CAGCATCGGT	TCCGGCGGCG	GGACAAAGGC
Ss02090	...CTGGGTC	GCGGTCGGGC	CAGCATCGGT	TCCGACGGGC	GGAGAAGGGC
MS02504	...CTCGCCC	GGGGTCAGGC	CAGCATCGGT	TCAGGCGGCC	GGAGAAAGAC
MS21020	...CTCGCCC	GGGGTCAGGC	CAGCATCGGT	TCAGGCGGCC	GGAGAAAGAC
MS02173	...CTCGCCC	GGGGTCGGGC	CAGCATCGGT	TCGGGCGGTT	GGAGAAAGGC
Ma19038	...CTCGCCC	GGGGTCAGGC	CAGCATCGGT	TCGGGCGGCC	GGATAAAGGC
Mseq92055	...TTCGCCC	GGGGTCAGGC	CAGCATCGGT	TCAAGCGGCC	GGATAAAGGC
Cs02200	...CTCGCCC	GGGATCGGGC	CAGCATCGGT	TCGGGCGGCC	GGATATAGGT
Cn02083	...CTCCCCC	GGGATCAGGC	CAGCATCGGC	TCGGGCGACC	GGACAAAGGC
Cd02080	...CTCGCCC	GGGAGCAGGC	CAGCATCGGT	TCAGGCGGTC	GGATAAAGGC
Pp19286	...CTCGCCC	GGGGCCAGGC	CAGCATCGGT	TCAGGCGGCC	GGATAAAGGT
Sp02448	...CTCGCCC	GGGGTCAGGC	CAGCATCGGT	TCAGGCGGCC	GGACAAAGGC
Ch02082	...CTCGCCT	GGGATCAGGC	CAGCATCGGT	TTTCGCGGCC	AGACAAAGGC
Cp19258	...CTCGCCC	GGGGACAGGC	CAGCATCGGT	TCGGGCGACC	GGACAAAGGC
Cf00001	...CTCACTC	GGGAACAGGC	CAGCATCGGT	TCAGGCGGCT	GGACAAAGGC
Cp02522	...CTCGCCC	GGGGACAGGC	CCGCATCGGT	TCAGGCGGCC	TCACAAAGGC
Cv02105	...TTCGCCC	GGTCTCGGGC	CAGCATCGGT	TCGGGCGGCC	AGATAAAGGC
Ca02299	...CTCGCCC	GTTCGCAGGC	CAGCATCGGT	TCGGGCGGTC	GGATAAAGGC
Sf02091	...CTCGCCC	GTGATCAGGC	CAGCATCGGT	TTTCGGCGGTC	GGATACAGAC
S.cerevisiae	AATCTCGCAT	TTCCTGGGC	CAGCATCAGT	TTTGGTGGCA	GGATAA.TC

451

500

Ct18481	CCTGGGAATG	TGGCCC.CCC	TCGGGGG.GT	GTTATAGCCC	GGGGTGCAAT
Cc02301	CCTGGGAATG	TGGCCC.CTC	TCGGGGG.GT	GTTATAGCCC	GGGGTGCAAT
Ss02090	CCGGGAATG	TGGCCC.CCT	TCGGGGG.GT	GTTATAGCCC	CGGGTGTTCAT
MS02504	CCTTGGGAATG	TAGCTC.CCT	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGGTGCAAT
MS21020	CCCTGGAATG	TAGCTC.CCT	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGGTGTAAT
MS02173	CTCTGGAATG	TAGCTC.CTC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGGCGCAAT
Ma19038	CTCTGGAATG	TAGCTC.CCC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGGTGTTCAT
Mseq92055	CCCCGGAATG	TGGCTC.CTC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCG	GGGGTGCAAT
Cs02200	CCCTGGAATG	TGGCTC.CCC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGGCGCAGT
Cn02083	CCCTGGAATG	TAGCTT.CTT	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGGTGCAAT
Cd02080	CCTCGGAATG	TAGCTT.CCC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCG	GGGGTGCAAT
Pp19286	CCTTGGGAATG	TAGCTC.CTC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCA	GGGATGCAAT
Sp02448	CCCCGGAATG	TAGCTC.CTG	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCG	GGGGTGCAAT
Ch02082	TCCGGGAATG	TAGCTC.CTC	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCC	GGGGTGCAAT
Cp19258	CCCCGGAATG	TAGCTT.CCT	CCGGGAA.GT	GTTATAGCCG	GGGGTGCAAT
Cf00001	CCCCGGAACG	TAGCTT.CCT	TCGGGGA.GT	GTTATAGCCG	GGGGTGCCAT

Cp02522	CCCCGGAATG	TAGCTC .CTC	TCGGGGA .GT	GTTATAGCCG	GGGGTGCAAT
Cv02105	CCCCGGAATG	TAGCTTTCCT	TCGGGGAAGT	GTTATAGCCC	GGGGTGCCAT
Ca02299	CCCCGGAATG	TAGCTT .CCT	CCGGGGA .GT	CTTATAGCCC	GGGGTGCAAT
Sf02091	CCGGGGAATG	TAGCTC .TCT	TCGGAGA .GT	GTTATAGCCC	CGGGTGCAAT
<i>S.cerevisiae</i>	CATAGGAATG	TAGCTT .GCC	TCGGTAA .GT	ATTATAGCCT	GTGGG . .AAT

501

550

Ct18481	GCCGCCTGCC	GGGACCGAGG	CCCGCGCTGG	CGAGGATGCT	GGCGGTGCTT
Cc02301	GCCGCCTGCC	GGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CGAGGATGCT	GGCGGTGCTT
Ss02090	GCCGCCTGCC	GGGACCGAGG	ACCGCGCTGG	CGAAGATGCT	GGCGGTGCTT
MS02504	GCGGCCTGCT	TGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CTCGGATGCT	GGCGGTGTTT
MS21020	GCGGCCTGCC	TGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CTCGGATGCT	GGCGGTGTTT
MS02173	GCGACCTGCC	TGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CTCGGATGCT	GGCGGTGTTT
Ma19038	GCGGCCCGCC	CGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CTCGGATGCT	GGCGGTGTTT
Mseq92055	GCGGCCCGCC	TGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Cs02200	GCGGCCTGCC	CGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Cn02083	GCGGCCCGCC	CGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CTCGGATGCT	GGCGGTGTTT
Cd02080	GCGGCCCGCC	CGGACTGAGG	AACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Pp19286	GCGGCCCGCC	CGGACCGAGG	TACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Sp02448	GCGGCCCGCT	CGGACCGAGG	TACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Ch02082	GTGGCCCGCG	GGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Cp19258	GCGGTTCGCC	CGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CTCGGATGCT	GGCAGTGTTT
Cf00001	GCAGTCAGCC	CGGACCGAGG	ATCGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Cp02522	GTGGCCCGCC	CGGACCGAGG	TTCGCGCTGG	CACGGATGCG	GGCGGTGTTT
Cv02105	GTGGCCCGAC	CGGACCGAGG	AACGCGCTGG	CACGGATGCT	GGCGGTGTTT
Ca02299	GCGGCCAGCC	GGGACCGAGG	ACCGCGCTGG	CAAGGATGCT	GGCGGTGTTT
Sf02091	GCGGCCAGCC	GGGACCGAGG	ACCGCGCTGG	CTAGGATGCT	GGCGGTGTTT
<i>S.cerevisiae</i>	ACTGCCAGCT	GGGACTGAGG	ACTGCGACGT	CAAGGATGCT	GGCAGTGTTT

551

600

Ct18481	GGGCATCAAA	CCCACGCGCG	CAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAACCCTA
Cc02301	GGGCGTTAAC	CCCACGCGCG	CAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAACCCTA
Ss02090	GGGCGTCAAC	CCCACGCGCG	CAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAACCCTA
MS02504	GGGTGTCAAA	CCCATACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
MS21020	GGGTGTCAAA	CCCATACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
MS02173	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Ma19038	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Mseq92055	GGGTGTCAAA	CCCATACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Cs02200	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCGCA
Cn02083	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Cd02080	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Pp19286	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCTTC
Sp02448	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Ch02082	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	AAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Cp19258	GGGTGTCAAA	CCCATGCGCG	AAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCCG
Cf00001	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTC
Cp02522	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTG
Cv02105	GGGTGTCAAA	CCCACACGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GAGAACCCTG
Ca02299	GGGTGTCAAA	CCCGTGCGCG	GAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAACCCCA
Sf02091	GGGTGTCAAA	CCCATACGCG	TAATGAAAGT	GAACGGAGGT	GGGAGCCCTA
<i>S.cerevisiae</i>	GGGTGTAAAA	CCCATACGCG	TAATGAAAGT	GAACGTAGGT	TGGGGCCTCG

601

650

Ct18481	GGGTGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAGGA
Cc02301	GGGTGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAGGA
Ss02090	GGGTGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGGGATGGAT	TTGAGTAGGA
MS02504	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAAGA
MS21020	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAAGA
MS02173	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAAGA
Ma19038	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAAGA
Mseq92055	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG .ATGGAT	TTGAGTAAGA

Cs02200	AGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Cn02083	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Cd02080	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Pp19286	CGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Sp02448	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Ch02082	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Cp19258	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Cf00001	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Cp02522	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Cv02105	GGGCGCATCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Ca02299	GGGCGCACCA	TCGACCGATC	CAGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA
Sf02091	GGGTGCACCA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTATGA
<i>S.cerevisiae</i>	AGGTGCACAA	TCGACCGATC	CTGATGTCTT	CGG.ATGGAT	TTGAGTAAGA

651

700

Ct18481	GCGTAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cc02301	GCGTAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Ss02090	GCGTAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
MS02504	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
MS21020	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
MS02173	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Ma19038	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Mseq92055	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cs02200	GCACAGCTGT	TCCGACCCGA	AAAATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cn02083	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cd02080	GCATAGCTGT	TTCGACCCGA	AAGATGGTGA	TCTATGCCTG	AATAGGGTGA
Pp19286	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Sp02448	GCATAGCCGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Ch02082	GCATAGCTGG	TCTGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cp19258	GCGTAACTGA	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cf00001	GCGTAGCTGA	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	TCTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cp02522	GCACAGCTGG	TCTGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Cv02105	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTA	ACTAGGGTGA
Ca02299	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA
Sf02091	GCATAAATGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATACCTG	AATAGGGTGA
<i>S.cerevisiae</i>	GCATAGCTGT	TGGGACCCGA	AAGATGGTGA	ACTATGCCTG	AATAGGGTGA

701

750

Ct18481	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cc02301	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Ss02090	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
MS02504	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
MS21020	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
MS02173	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Ma19038	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Mseq92055	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cs02200	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cn02083	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cd02080	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Pp19286	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Sp02448	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Ch02082	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cp19258	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCCCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cf00001	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cp02522	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Cv02105	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Ca02299	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
Sf02091	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGCA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC
<i>S.cerevisiae</i>	AGCCAGAGGA	AACTCTGGTG	GAGGCTCGTA	GCGGTTCTGA	CGTGCAAATC

751

800

Ct18481	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGC	CGAAGTTTCC
Cc02301	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGC	CGAAGTTTCC
Ss02090	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGC	CGAAGTTTCC
MS02504	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
MS21020	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
MS02173	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Ma19038	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Mseq92055	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Cs02200	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGTTAGTAGC	TGGTTCCTGC	CGAAGTTTCC
Cn02083	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Cd02080	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Pp19286	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Sp02448	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Ch02082	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Cp19258	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Cf00001	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Cp02522	GATCGTCAAA	TTTGGGCATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Cv02105	GATCGTCAAA	GTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTTCTGT	CGAAGTTTCC
Ca02299	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGT	CGAAGTTTCC
Sf02091	GATCGTCAAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGC	CGAAGTTTCC
<i>S.cerevisiae</i>	GATCGTCGAA	TTTGGGTATA	GGCTAGTAGC	TGGTTCCTGC	CGAAGTTTCC

801

850

Ct18481	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	CT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cc02301	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	CT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Ss02090	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	CT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
MS02504	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
MS21020	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
MS02173	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Ma19038	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Mseq92055	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cs02200	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cn02083	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cd02080	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	.GCGAATGAT
Pp19286	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Sp02448	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Ch02082	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cp19258	CTCAAGGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cf00001	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cp02522	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Cv02105	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Ca02299	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
Sf02091	CTCA.GGATA	GCAGTAACGT	TT.TCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT
<i>S.cerevisiae</i>	CTCA.GGATA	GCAGAAGCTC	GTATCAGTTT	TATGAGGTAA	AGCGAATGAT

851

900

Ct18481	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cc02301	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Ss02090	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTGAATA
MS02504	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
MS21020	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
MS02173	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Ma19038	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Mseq92055	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cs02200	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cn02083	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cd02080	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Pp19286	TAGAGGCCTT	GGGGATGAAA	CATCCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Sp02448	TAGAGGCCTT	GGGGATGAAA	CATCCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Ch02082	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cp19258	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA

Cf00001	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cp02522	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Cv02105	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Ca02299	TAGAGTCCTT	GGGGATGAAA	CATCCTTAAA	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
Sf02091	TAGAGGCCTT	GGGGTTGAAA	CAACCTTAAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA
<i>S.cerevisiae</i>	TAGAGGTTCC	GGGGTCGAAA	TGACCTTGAC	CTATTCTCAA	ACTTTAAATA

901

950

Ct18481	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACACTCG	AATGTATCGT
Cc02301	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACACTCG	AATGTATCGT
Ss02090	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACACTCG	AATGTATCGT
MS02504	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
MS21020	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
MS02173	TGTAAGAAGT	CCTTGTTACT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Ma19038	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Mseq92055	TGTAAGAAGT	CCTTGTTACT	TAATTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Cs02200	TGTAAGAAGT	CCTTGTTACT	TAGTTGAACG	TGGACACTCG	AATGTATCGT
Cn02083	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACACTTG	AATGTATCGT
Cd02080	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Pp19286	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Sp02448	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Ch02082	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAATTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Cp19258	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TCGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Cf00001	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGTATCGT
Cp02522	TGTAAGAAGT	CCTTGTTGCT	TAATTGAACG	TGGACATTG	AATGTATCGT
Cv02105	TGTAAGAAGC	CCTTGTTGCT	TAGTTGAACG	TGGGCAATTTG	AATGTATCGT
Ca02299	TGTAAGAAGT	CCTTGTTACT	TAGTTGAACG	TGGACATTTG	AATGCACCGT
Sf02091	TGTAAGAAGT	CCTTGTTACT	TAATTGAACG	TGGACATTTG	AATGCACCGT
<i>S.cerevisiae</i>	TGTAAGAAGT	CCTTGTTACT	TAATTGAACG	TGGACATTTG	AATGAAGAGC

951

1000

Ct18481	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cc02301	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Ss02090	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
MS02504	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
MS21020	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
MS02173	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Ma19038	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Mseq92055	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cs02200	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cn02083	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cd02080	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Pp19286	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Sp02448	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Ch02082	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cp19258	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cf00001	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cp02522	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Cv02105	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Ca02299	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
Sf02091	TACTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG
<i>S.cerevisiae</i>	TTTTAGTGGG	CCATTTTTGG	TAAGCAGAAC	TGGCGATGCG	GGATGAACCG

1001

1050

Ct18481	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cc02301	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Ss02090	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
MS02504	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
MS21020	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
MS02173	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCA	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Ma19038	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG

Mseq92055	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cs02200	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cn02083	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cd02080	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Pp19286	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Sp02448	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Ch02082	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cp19258	AACGTGAGGT	TACGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cf00001	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cp02522	AACGTGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Cv02105	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Ca02299	AACGTGGGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
Sf02091	AACGCGAGGT	TAAGGTGCCG	GAATGCACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG
<i>S.cerevisiae</i>	AACGTAGAGT	TAAGGTGCCG	GAATACACGC	TCATCAGACA	CCACAAAAGG

1051

1100

Ct18481	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAATCCGC
Cc02301	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAATCCGC
Ss02090	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAATCCGC
MS02504	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
MS21020	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
MS02173	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Ma19038	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Mseq92055	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cs02200	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cn02083	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cd02080	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Pp19286	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Sp02448	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Ch02082	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cp19258	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cf00001	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cp02522	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Cv02105	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Ca02299	TGTTAATTCA	TCCAGACAGC	AGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAAACCCG
Sf02091	TGTTGATTCA	TCCAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAATCCGC
<i>S.cerevisiae</i>	TGTTAGTTCA	TCTAGACAGC	CGGACGGTGG	CCATGGAAGT	CGGAATCCGC

1101

1150

Ct18481	TAAGAAGTGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cc02301	TAAGAAGTGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Ss02090	TAAGAAGTGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
MS02504	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
MS21020	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
MS02173	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Ma19038	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Mseq92055	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cs02200	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cn02083	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cd02080	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Pp19286	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Sp02448	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Ch02082	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cp19258	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cf00001	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cp02522	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Cv02105	TAAGGATCGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG
Ca02299	TAAGGAGTGT	GTAACAACCT	ACCTGCCGAA	TGAATTAGCC	CTGAAAATGG
Sf02091	TAAGGAGTGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAATCAGCC	TTGAAAATGG
<i>S.cerevisiae</i>	TAAGGAGTGT	GTAACAACCT	ACCGGCCGAA	TGAACTAGCC	CTGAAAATGG

	1151				1200
Ct18481	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CCATACCTCG	CCGCCGGGGT	AGAAACGATG
Cc02301	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGCCGGGGT	AGAAGCGATG
Ss02090	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CCATACCTCG	CCGCCGGGGT	AGAAACGATG
MS02504	ATGGCGCTCA	AGCGTGTTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
MS21020	ATGGCGCTCA	AGCGTGTTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
MS02173	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Ma19038	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Mseq92055	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Cs02200	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CCATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Cn02083	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CCATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Cd02080	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Pp19286	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Sp02448	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Ch02082	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Cp19258	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGACACGATG
Cf00001	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCA	CCGTCGGGGT	AGACACGATG
Cp02522	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCTCG	CCGTCGGGGT	AGATACGATG
Cv02105	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CCATACCTCG	CCGTCGGGGC	AGATACGATG
Ca02299	ATGGCGCTCA	AGCGTGCTAC	CTATACCCCG	CCGCCAGGGT	AGAAACGATG
Sf02091	ATGGCGCTCA	AGCGTGTTAC	CCATACCTCG	CCGCCAGGGT	AGAAACGATG
<i>S.cerevisiae</i>	ATGGCGCTCA	AGCGTGTTAC	CTATACTCTA	CCGTCAGGGT	TGATATGATG

	1201				1250
Ct18481	CCCCGGCGAG	TAGGCAGGCG	CGGAGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Cc02301	CCCCGGCGAG	TAGGCAGGCG	CGGAGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Ss02090	CCCCGGCGAG	TAGGCAGGCG	CGGAGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
MS02504	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
MS21020	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
MS02173	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Ma19038	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGAGTGA
Mseq92055	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGAGTGA
Cs02200	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Cn02083	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Cd02080	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Pp19286	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTGGGAGTGA
Sp02448	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGAGTGA
Ch02082	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGGGTGA
Cp19258	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGGGTGA
Cf00001	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGGGTGA
Cp02522	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGGGTGA
Cv02105	CCCCGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGGGTGA
Ca02299	CCCTGGCGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TGGGGGTGA
Sf02091	CCCTGGCGAG	TAGGCAGGCG	TGGGGGTCCG	TGACGAAGCC	TTG.GAGTGA
<i>S.cerevisiae</i>	CCCTGACGAG	TAGGCAGGCG	TGGAGGTCAG	TGACGAAGCC	TGGGGGTAA

	1251	1252
Ct18481	TC	
Cc02301	TC	
Ss02090	TC	
MS02504	TC	
MS21020	TC	
MS02173	TC	
Ma19038	TC	
Mseq92055	TC	
Cs02200	TC	
Cn02083	TC	
Cd02080	TC	
Pp19286	TC	
Sp02448	TC	
Ch02082	CC	

Cp19258	GC
Cf00001	GC
Cp02522	TC
Cv02105	GC
Ca02299	TC
Sf02091	TC
<i>S.cerevisiae</i>	AC