

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y QUÍMICA DEL
GÉNERO *RHYTIDHYSTERON* (ASCOMYCOTA,
PATELLARIALES) EN COSTA RICA**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de Magister
Scientiae en Biología.**

CATALINA MURILLO CRUZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2007

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia, quienes incondicionalmente siempre están apoyándome.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fortaleza y la perseverancia necesaria para finalizar con este proyecto.

A mi familia, por su paciencia, comprensión y sacrificio.

Al comité asesor, Dr. Federico Albertazzi, Dra. Giselle Tamayo y Dra. Julieta Carranza por su guía y enseñanza durante el desarrollo de la tesis.

Al Ministerio de Ambiente y Energía por el acceso a los recursos naturales de Costa Rica, bajo los permisos R-006-2005-OT y R-CM-INBIO-05-2006-OT.

A la Dra. Giselle Tamayo y a la MBA Lorena Guevara por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT) y al programa NIDA del gobierno de Holanda a través de la Unidad de Bioprospección del INBio por financiar esta investigación.

Al Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), tanto al personal de la Unidad de Bioprospección como al de Hongos por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de la tesis, especialmente a Luis Acosta, Allan Jiménez y Loengrin Umaña.

Al Dr. Thorsten Lumbsch (The Field Museum, Chicago, IL) por aceptar ser revisor de esta tesis. Sus sugerencias fueron de gran importancia para el análisis del trabajo.

Al Dr. Gary J. Samuels (USDA-ARS, Baltimore, MD) por su lectura crítica y sugerencias.

A la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica por las mediciones de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Al Centro Dana Farber en Harvard, USA por los servicios de secuenciación.

Al New York Botanical Garden, USA por el préstamo de material de referencia del género *Rhytidhysteron*.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Biología.

12.13 L

Ph.D. Ramiro Barrantes Mesén
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



Ph.D. Federico Albertazzi Castro
Director de Tesis



Ph.D. Giselle Tamayo Castillo
Asesor



Ph.D. Julieta Carranza Velásquez
Asesor

Ver anexo I

M.Sc. Andrés Gatica Arias
Representante del Director
Programa de Estudios de Posgrado en Biología



Catalina Murillo Cruz
Candidata

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	ii
Hoja de firmas	iii
Índice	iv
Resumen	v
Introducción	1
Justificación del proyecto	9
Objetivos	11
Materiales y métodos	12
Bibliografía	21
Apéndice 1: Artículo; Preliminary study of the morphology, chemistry and molecular data of <i>Rhytidhysterion rufulum</i> (Ascomycota, Patellariales) in Costa Rica.	26
Anexo 1: Copia del acta de la sesión 2051 del examen de grado.	54

RESUMEN

Rhytidhysteron rufulum es una especie pantropical común pero poco estudiada, con amplio ámbito de substratos y de hábitats; es la única especie de su género que ha sido descrita en Costa Rica. En este estudio se empleó datos morfológicos, moleculares y químicos para determinar la variabilidad y la diferenciación de muestras de esta especie recolectadas en la costa pacífica y atlántica del país. Los análisis filogenéticos de las secuencias nucleares de la región ITS revelaron la presencia de cuatro linajes distintos en el complejo de *R. rufulum*. Al re-examinar la morfología y anatomía de las muestras se notaron diferencias marcadas entre los linajes tanto en el ascocarpo como en las ascas y ascosporas, las cuales previamente se habían definido como variaciones intraespecíficas. Asimismo, los compuestos producidos por los linajes fueron distintos; dos de ellos produjeron las palmarumicinas MK-3018, CJ-12372 y CR1, el Clado III produjo deshidrocurvularina y el Clado IV compuestos no identificados. Los datos obtenidos sugieren la existencia de 4 especies y rechazan las interpretaciones previas de una única especie morfológicamente variable.

INTRODUCCIÓN

El reino Fungi está compuesto de organismos eucarióticos, algunos de ellos no relacionados cercanamente. Esto ha hecho que algunos autores utilicen el término *fungi* en un sentido muy general y el término Fungi (con F mayúscula) específicamente para los así llamados hongos verdaderos que parecen estar relacionados unos con otros. El reino Fungi incluye 4 Phyla: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Alexopoulos *et al.* 1996).

Entre algunas características de los hongos tenemos:

- Presencia de filamentos o hifas que constituyen el soma o cuerpo del hongo que se alargan por crecimiento apical.
- Dieta: Los hongos son heterótrofos, esto quiere decir que no fijan carbono y que los nutrientes que entran en su cuerpo deben pasar a través de la pared celular y la membrana plasmática. Los hongos primero liberan enzimas digestivas al medio ambiente y éstas desdoblan moléculas grandes y relativamente insolubles, como carbohidratos, proteínas y lípidos en moléculas más pequeñas y más solubles que pueden luego ser absorbidas. Como grupo, los hongos tienen una gran habilidad de utilizar casi cualquier fuente de carbono como alimento. En general, el sustrato que una especie puede utilizar como alimento, depende en gran medida de cuáles enzimas digestivas son capaces de producir y liberar en el ambiente. Muchos hongos son saprófitos y obtienen su alimento al degradar materia orgánica muerta. Se estima que reciclan millones de toneladas de

desechos orgánicos en sus hábitos naturales anualmente (Moore-Landecker 1996).

- **Reproducción:** es la formación de nuevos individuos con todas las características típicas de la especie. En hongos, están presentes dos tipos generales de reproducción, la sexual y la asexual. La reproducción asexual también llamada somática no involucra cariogamia (fusión de núcleos) ni meiosis y no están involucrados ni órganos sexuales ni células sexuales. La reproducción sexual, por otro lado, se caracteriza por la unión de dos núcleos seguida por meiosis. Dentro del ciclo de vida de algunos ascomycetes se presentan tanto la fase sexual (teleomorfo) como la fase asexual (anamorfo).

Los hongos constituyen un grupo grande de organismos que se encuentran virtualmente en todos los nichos ecológicos, debido a su amplia distribución y asociación con sustratos orgánicos e inorgánicos. Hawksworth (2001) estimó para áreas templadas, basado principalmente en una relación de 6:1 de hongos con especies de plantas vasculares de que existen a nivel mundial aproximadamente 1.5 millones de especies de hongos, hasta ese momento se habían descrito únicamente 69.000 especies (5%). Sin embargo, en regiones tropicales no se tiene suficiente información para ni siquiera especular acerca de la riqueza de especies. En la actualidad, existe interés en documentar esta riqueza por su gran importancia ecológica, por ser fuente de químicos (incluidos varios antibióticos) y por presentar un gran potencial como controladores biológicos de muchas plagas. Un mayor entendimiento de la diversidad e historia natural de los hongos va a contribuir al conocimiento y la puesta en marcha de

iniciativas para la protección y uso sostenible de estos recursos naturales (Rossman *et al.* 1998).

Estudios taxonómicos

La sistemática de los hongos se inició hace aproximadamente 250 años, pero las manifestaciones de este grupo de organismos han sido conocidas por miles de años. Para definir la posición taxonómica de un grupo de hongos se deben documentar una serie de caracteres que anteriormente se han establecido como importantes para la identificación de especies del grupo de interés (Kutorga & Hawksworth 1997; Barr & Hundorf 2001; Samuels & Müller 1979). La mayoría de las especies han sido diagnosticadas por medio de caracteres morfológicos (Taylor *et al.* 2000).

El Phylum Ascomycota con 56 Órdenes agrupados en 7 Clases, 226 Familias, 3409 géneros y 32739 especies, es el grupo de hongos más grande (Kirk *et al.* 2001). Los ascomycetes deben su nombre a la presencia de una estructura reproductiva microscópica llamada **asca**. El cigoto, que es el único núcleo diploide del ciclo de vida, se forma dentro del asca. La reproducción asexual es por conidios, muchos de los cuales son multinucleados. En este grupo se encuentran hongos económicamente importantes como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, el hongo comestible *Morchella esculenta*, patógenos de plantas como *Ceratocystis ulmi*, *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. y *Botryosphaeria* spp. (Raven & Johnson 1989).

Uno de los Órdenes dentro de Ascomycetes es Patellariales que incluye la familia Patellariaceae, sus miembros en general son saprófitos y se caracterizan por presentar **ascoma** elongado o redondeado que se abre en forma de apotecio. La familia fue

revisada en 1997 por Kutorga y Hawksworth quienes aceptaron 12 géneros dentro de los cuales se encuentra *Rhytidhysterion* (Barr & Huhndorf 2001). Samuels & Müller (1979) con base en la morfología del anamorfo y teleomorfo establecen que las relaciones taxonómicas de *Rhytidhysterion* no son claras y se considera la reubicación del género e incluso la conformación de una familia propia (Kutorga & Hawksworth 1997); sin embargo estudios de cultivo, citológicos y de desarrollo relacionan *Rhytidhysterion rufulum* con la familia Patellariaceae (Bezerra & Kimbrough, 1982). Blackwell *et al.* (2006) lo incluyen en Dothideomycetes (Patellariales) en una posición incierta.

El género *Rhytidhysterion* se distingue porque el ascocarpo al principio es histeriforme y cambia a discooidal en la madurez, además de poseer paráfisis cubiertas por una capa gelatinosa. Samuels y Müller (1979) realizaron una revisión del género y comunicaron solo 2 especies: *Rhytidhysterion rufulum* un saprófito o parásito débil que se encuentra en una gran variedad de plantas vivas o muertas con distribución pantropical, principalmente se ha reportado en climas tropicales y subtropicales de América del Norte y del Sur y *Rhytidhysterion hysterinum* que habita comúnmente en madera de *Buxus* spp., y en menor frecuencia en *Ilex* spp., *Diospyros* spp. y *Prosopis* spp; se encuentra principalmente distribuido en climas cálidos en latitudes norte, pero también hay reportes de especímenes en Venezuela. Los anamorfos descritos para estas especies se definen como “tipo Diplodia” o “tipo Aposphaeria”, sin embargo, no existen estudios que relacionen estas estructuras con la biología y la historia evolutiva de estos grupos. Otras especies comunicadas aparecen citadas en la base de datos del Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>, Custodias CABI Bioscience, CBS and Landcare Research, Abril 2007) y son las siguientes:

- *Rhytidhysteron rufulum* (Spreng.) Speg. 1920
- *Rhytidhysteron beccarianum* (Ces.) Bat & Valle (1964), *Rhytidhysteron guaraniticum* Speg. (1888), *Rhytidhysteron javanicum* Penz. & Sacc. (1897), *Rhytidhysteron prosopidis* Peck (1894), *Rhytidhysteron scortechinii* Sacc. & Berl. (1885), *Rhytidhysteron brasiliense* Speg. (1881) y *Rhytidhysteron viride* Speg. (1881). Samuels and Müller (1979) consideran todas estas especies como sinónimos de *Rhytidhysteron rufulum*.
- *Rhytidhysteron hysterinum* (Dufour) Samuels & E. Müller. (1980).

Recientemente se han descrito *Rhytidhysteron opuntiae* (J.G. Brown.) M.E. Barr (1990) que se caracteriza por la presencia de ascosporas con (1-)3-(4-5) septos y un septo longitudinal en el centro de las células (Barr 1990) y *Rhytidhysteron dissimile* (P.Karst.) Magnes (1997) que presenta ascosporas con 5 septos (Magnes 1997).

Estudios moleculares

En los últimos años, se han utilizado secuencias de ácidos nucleicos como caracteres que apoyan la clasificación de grupos taxonómicos. Diferencias morfológicas algunas veces se interpretan como variaciones intraespecíficas sin el conocimiento de estudios de filogenia molecular que podrían ayudar a evaluar la importancia taxonómica de los caracteres morfológicos. Se han documentado casos en los que se han descubierto especies filogenéticas crípticas en una especie morfológica, con la ayuda de la filogenética y de la variación en ácidos nucleicos (Taylor *et al.* 2000) como es el caso de

un amplio ámbito de ascomycetes, incluidos los hongos liquenizados (Seymour *et al.* 2007).

En Ascomycota, las técnicas moleculares han sido ampliamente utilizadas para definir relaciones dentro del phylum por medio de secuencias de genes mitocondriales (Lindemuth *et al.* 2001, Prado *et al.* 2006) o de genes nucleares involucrados en la duplicación, transcripción y traducción de la información genética que codifican proteínas. Por ejemplo, se ha utilizado la subunidad II de ARN polimerasa (RBP2) (Yajuan *et al.* 1999; Yajuan & Hall 2004, Shenoy *et al.* 2006), el factor de elongación (EF-1), la beta tubulina (Miller & Huhndorf 2004) y genes nucleares ribosomales (Berbee 1996; Berbee & Taylor 1992; Liew *et al.* 2000; Huhndorf *et al.* 2004). En los últimos años se ha considerado apropiado utilizar varios de estos marcadores para llevar a cabo los análisis filogenéticos.

Muchos estudios de filogenética y caracterización molecular se han focalizado en genes nucleares ribosomales por varias consideraciones prácticas, entre ellas, el alto número de copias, la disponibilidad de imprimadores o “primers”, y las diferentes regiones dentro de los genes ribosomales que evolucionan a diferentes tasas y proporcionan resolución a varios niveles taxonómicos, incluso para determinar relaciones entre géneros y especies (Acero *et al.* 2004; Dodd *et al.* 2003; Verkley *et al.* 2004). Otra ventaja que presenta el estudio de estas regiones, es que existen bases de datos con información acumulada que se pueden consultar gratuitamente.

Estudios químicos

Algunos de los compuestos orgánicos que producen los hongos tienen funciones únicas; sin embargo, también producen una gran cantidad de otros compuestos que no están directamente involucrados en proveer energía ni son componentes estructurales de la célula, sino que son productos del metabolismo secundario (Moore-Landecker 1996). La producción de estos metabolitos también se ha utilizado en la clasificación de algunos grupos de hongos (Taylor *et al.* 2000), basada en sus diferencias a nivel bioquímico, por ejemplo, en el género *Stachybotrys* spp. (Andersen *et al.* 2003) o en el género *Morinia* (Collado *et al.* 2006) y en algunos géneros de la familia Xylariaceae, donde se detectaron compuestos 1,1'-binaftaleno-4,4'-5,5'-tetroles (BNT) que se derivan de la ruta de 1,8 dihydronaphthaleno de la biosíntesis de la melanina. Es posible que esta ruta surgió temprano en la evolución de los hongos, debido a su amplia distribución en grupos de ascomycetes aparentemente no relacionados o lejanamente relacionados (Stadler *et al.* 2004).

Los policétidos son una clase de metabolitos secundarios que presentan una gran diversidad, tanto en términos de estructura como de función. Se han descrito en organismos tan diversos como bacterias, hongos, plantas, insectos y esponjas. Dentro de los hongos, la habilidad de producir policétidos no está distribuida homogéneamente, son muy comunes en Ascomycetes pero relativamente raros en Basidiomycetes (Turner 1971).

La síntesis de policétidos es llevada a cabo por las sintetasas policétidas, las cuales se clasifican en tres tipos con base en la arquitectura molecular de los genes: las sintetasas tipo I que consisten en grandes proteínas multidominio, las tipo II que son complejos de

proteínas mono-funcionales, y las tipo III que son proteínas pequeñas con una sola cadena polipeptídica involucrada en la síntesis de precursores (Lee *et al.* 2001).

En un estudio realizado por Kroken *et al.* (2003) en la búsqueda de sintetasas policétidas tipo I en los genomas de representantes de Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina, se encontró solo en especies de Pezizomycotina desde 15 hasta 25 posibles genes de sintetasas y es posible que existan un gran número de policétidos producidos por otras especies de este grupo de hongos. Estos policétidos desconocidos pueden ser toxinas o pigmentos y estar involucrados en procesos de desarrollo que requieran el señalamiento de moléculas pequeñas, como crecimiento y fusión de hifas, formación aérea de hifas y reproducción sexual; sin embargo, falta mucha investigación que realizar para conocer su función.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Hawksworth (2001) menciona que menos del 5% de especies de hongos han sido descritas y caracterizadas de un posible total de 1.5×10^6 . En el trópico existe la urgente necesidad de realizar un mayor esfuerzo en la descripción y caracterización de grupos.

En Costa Rica se conocen alrededor de 2 000 especies, pero se considera que pueden existir entre 40 000 y 70 000 (Mata 2003). *Rhytidhysterium rufulum* es la única especie para este género, que se ha comunicado para Costa Rica (Umaña, com. pers.); sin embargo, estudios más detallados podrían ayudar a descubrir nuevas especies o variantes ecológicas de interés y su variación genética y química. Samuels & Müller (1979) mencionan que dentro de la especie de *R. rufulum* existe una distribución bimodal en el tamaño de las ascosporas, y una variación en el color del pseudoepitecio, sin embargo, con las técnicas disponibles en ese momento, no se podía definir más de una especie. El uso de marcadores moleculares y bioquímicos podría aportar mayor información sobre la sistemática de este grupo. Hasta el momento, no se han realizado estudios morfológicos, moleculares ni químicos de este género en zonas tropicales, a pesar de tener una amplia distribución.

En investigaciones previas llevadas a cabo en el área de química de la Unidad Estratégica de Bioprospección del Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), como parte del proyecto de Chagas, se logró aislar y dilucidar cuatro compuestos policétidos (Fig. 1), uno de ellos nunca antes comunicado en la literatura para hongos (Wipf *et al.*

2004). Estos compuestos tipo 1,8 dihidroxinaftol espirocetales, se encontraron en los fermentos de las dos muestras de *Rhytidhysterion* analizadas y se han reportado como potenciales inhibidores del sistema celular redox, Thioredoxin-thioredoxin, con actividad potencial antichagas y además se ha encontrado que poseen características antimicrobianas y antifúngicas.

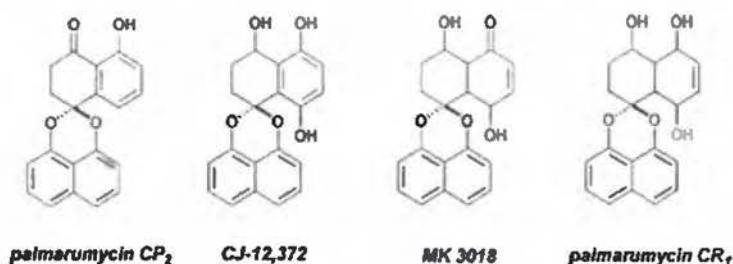


Fig. 1: Compuestos presentes en muestras de *Rhytidhysterion* spp.

Si se considera que algunos de los medicamentos más comúnmente prescritos como los antibióticos penicilina y cefalosporina y el inmunosupresor ciclosporina B son de origen fúngico y que solo el 5% de los hongos han sido descritos, parece existir un gran potencial para el descubrimiento de nuevos productos (Schulz *et al.* 2002). Este potencial puede ser aprovechado si se estudian los hongos desde varias ópticas con la finalidad de obtener información integral que pueda desarrollarse a través del tiempo.

Esta fue una oportunidad para caracterizar muestras de un género de hongos en Costa Rica con caracteres moleculares de diferentes tipos, tanto genéticos como bioquímicos y aprovechar el equipo y experiencia que se ha desarrollado en el país y en las diferentes áreas del Instituto Nacional de Biodiversidad, lo cual fue clave para el éxito del proyecto.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar molecular y químicamente muestras del género *Rhytidhysterion*, que previamente han presentado producción de metabolitos de interés.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recolectar muestras de *Rhytidhysterion* spp. en diferentes zonas del país y compararlas morfológicamente con muestras de referencia descritas dentro de este género.
- Caracterizar las muestras recolectadas con marcadores moleculares mediante secuenciación del ADN, específicamente la región intergénica ITS de los genes nucleares ribosomales.
- Monitorear los tipos de compuestos obtenidos mediante cromatografía, HPLC-PDA (cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos) en conjunto con espectroscopía RMN (Resonancia Magnética Nuclear).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material de trabajo: Las muestras fueron recolectadas con el permiso R-006-2005-OT-CONAGEBIO del Ministerio de Ambiente y Energía. Los hongos utilizados en esta investigación fueron recolectados de junio a octubre del 2005, en los parques nacionales Barra Honda, Palo Verde en el pacífico de Costa Rica y en el parque nacional Cahuita y la Reserva Biológica Hitoy Cerere en la región atlántica del país (Cuadro 2). El aislamiento 3352 Bioprospección fue accesado bajo el permiso número R-CM-INBIO-05-2006-OT del Ministerio de Ambiente y Energía y fue utilizado como control positivo en la taxonomía y presencia de palmarumicinas en la investigación.

Método de muestreo: El grupo de hongos bajo estudio presenta una distribución gregaria, es un saprófito que generalmente se encuentra en troncos por lo que se realizó un muestreo oportunista, se localizaron los troncos y se recolectaron los cuerpos fructíferos en ramas secas o vivas de diferentes especies de plantas. El material se recolectó en los sitios donde se había comunicado la presencia de especímenes del género *Rhytidhysteron*. Se visitó cada sitio al inicio de la época lluviosa para recolectar cuerpos fructíferos con esporas viables. Para cada una de las muestras se registró:

- Fecha de recolecta
- Provincia, Cantón y Distrito del sitio de recolecta
- Coordenadas geográficas
- Altitud
- Área de conservación

- Ecosistema
- Descripción del sitio (del entorno)
- Sustrato donde se recolecta la muestra
- Descripción general de la muestra
- Fotografía del sitio de recolecta
- Fotografía de la muestra.
- Recolectores
- Distribución en el sitio de recolecta.

Se le asignó un número de recolecta y se mantuvieron en bolsas de papel en un lugar fresco durante el transporte al INBio. Una vez las muestras en INBio, se procedió a revisarlas en el estereoscopio. Se observaron diferencias en los cuerpos fructíferos recolectados, por lo que se decidió dividir la muestra en submuestras (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución geográfica de las muestras recolectadas de *Rhytidhysteron* spp.

Área de conservación	Provincia	Descripción del sitio	Altura máxima (m)	Fecha de recolecta	Número de muestras	Número de submuestras
Tempisque	Guanacaste	P.N. Palo Verde	76	22-23/junio/2005	16	34
Tempisque	Guanacaste	P.N. Barra Honda	379	24/junio/2005	8	10
La Amistad Caribe	Limón	R.B. Hitoy Cerere	169	5/julio/2005 24-25/octubre/2005	10	13
La Amistad Caribe	Limón	P.N. Cahuita	0	6/julio/2005 26/octubre/2005	9	12

Solicitud de especímenes a herbarios: Algunas de las muestras de referencia de las especies del género *Rhytidhysteron* se obtuvieron del New York Botanical Garden (NYBG). Las muestras recolectadas se compararon con especímenes de *Rhytidhysteron rufulum* del citado herbario (VENEZUELA, Parque Nacional Guatopo, sendero entre

Agua Blanca y La Cruceta, 10° 03"N, 66° 26"W. Nov. 1990, colectores: G J. Samuels, B. Hein, S.M. Huhndorf # 7620), *R. hysterinum* (VENEZUELA, Bolívar: Dist. Cedeño, cerca de la Villa Panare de Corozal, 6 km de Maniapure hacia Caicara 6°55"N, 66°30"W, Abril. 1986, colectores: Brian Boom y Margot Grillo #6538) y *R. opuntiae* (USA, Monumento Nacional Saguaro, Unidad Oeste, Arizona, Julio 1980, colector R.L. Gilbertson, Det. M.E.B.B #6774) para su identificación morfológica

Caracterización morfológica

La muestra se subdividió en tres partes:

Muestra de herbario: Se secó a temperatura ambiente por 2 días, luego se mantuvo por una semana a 4 °C (cuarentena). Los especímenes de referencia se encuentran preservados en la colección del Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) y los datos se ingresaron al sistema de información Atta (Cuadro 2).

Muestra para caracterización morfológica: Para un total de 48 submuestras se documentó la información de los siguientes caracteres: posición en el sustrato; forma, color, posición y textura del ascocarpo; forma, color del pseudoepitecio; tamaño de las ascas (20 mediciones); tamaño de las ascosporas (50 mediciones). Los colores fueron determinados con la guía de colores de Frank Smithe (1975). Las mediciones de caracteres continuos (ascas, ascosporas) se realizaron en material que previamente había sido tratado con 5% KOH y luego montado en agua. Las mediciones se hicieron en un microscopio Olympus Bx50 con una cámara Song CCD-IRIS (Image-Pro plus Version 4.0). Los estadísticos descriptivos, incluidos promedios, desviación estándar, valores

máximos y mínimos de los caracteres continuos y el ANOVA de una vía con la prueba de Tukey se obtuvieron con el programa Infostat versión 1.1. (InfoStat 2002)

Muestra para aislamiento de fase anamórfica. Se obtuvieron cultivos monospóricos en medio PDA (Agar Papa Dextrosa, Difco™) y se incubaron a 25 °C por 10 días para el posterior análisis molecular y químico. Se llevó a cabo un cuidadoso seguimiento de la germinación de las esporas con la finalidad de asegurarse de la identidad y la no contaminación del cultivo.

Preservación de muestras en cultivo. Los anamorfos se describieron de acuerdo a las características del micelio (textura y pigmentación) en medio PDA y CMA (Corn Meal Agar, Difco™). Se almacenó la muestra a 20 °C en tubos con PDA inclinado y aceite mineral; para preservar los aislamientos a corto plazo se mantuvieron en viales con agua estéril. El material se incorporó a la colección de cultivos (cepoteca) de la Unidad Estratégica de Bioprospección (Cuadro 2)

Cuadro 2 Aislamientos de *Rhytidhysterium rufulum* estudiados

Número de Accesoión/ INBio y número de aislamiento	Localidad/Área protegida	Latitud	Longitud	Hospedero
INB0003985581 502A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985583 504A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985584 505A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985586 507A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985587 508A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985588 509A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985589 510A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985590 511A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.

INB0003985591	512A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985592	513A	Parque Nacional Palo Verde	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003985706	514A	Parque Nacional Palo Verde	10:19:59.9757	-85:15:09.9381	Desconocido
INB0003985707	515A	Parque Nacional Palo Verde	10:19:59.9757	-85:15:09.9381	Desconocido
INB0003986150	517A	Parque Nacional Palo Verde	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Guazuma</i>
INB0003986152	519A	Parque Nacional Palo Verde	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003986153	520A	Parque Nacional Palo Verde	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003986154	521A	Parque Nacional Palo Verde	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003986156	522A	Parque Nacional Palo Verde	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.
INB0003986158	523A	Parque Nacional Palo Verde	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	Desconocido
INB0003986161	524A	Parque Nacional Palo Verde	10:23:09.7000	-85:21:16.4000	Desconocido
INB0003986162	525A	Parque Nacional Barra Honda	10:10:13.2000	-85:21:24.8000	Desconocido
INB0003986166	526A	Parque Nacional Barra Honda	10:09:59.0000	-85:21:26.5000	Bejuco
INB0003986170	527A	Parque Nacional Barra Honda	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Desconocido
INB0003986171	528A	Parque Nacional Barra Honda	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Desconocido
INB0003986172	529A	Parque Nacional Barra Honda	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Bejuco
INB0003986177	530A	Parque Nacional Barra Honda	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Desconocido
INB0003986185	531A	Reserva Biológica Hitoy	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	<i>Nectandra</i> spp.
INB0003986187	532A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Desconocido
INB0003986188	533A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:23.0000	-83:01:27.0000	<i>Inga</i> spp.
INB0003986189	534A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	Desconocido
INB0003986190	535A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Terminalia</i> spp.
INB0003986191	536A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.
INB0003986192	537A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.
INB0003986193	538A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.
INB0003986194	539A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.
INB0003986086	540A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	<i>Nectandra</i> spp.
INB0003986087	541A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	9:40:19.9768	-83:01:44.5992	<i>Nectandra</i> spp.
INB0003986092	542A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:23.0000	-83:01:27.0000	<i>Citrus</i> spp.
INB0003986101	543A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Desconocido
INB0003986106	544A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Desconocido

INB0003986108	545A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Desconocido
INB0003986111	546A	Reserva Biológica Hitoy Cerere	09:40:23.0000	-83:01:27.0000	Desconocido
INB0003986114	547A	Parque Nacional Cahuita	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	Desconocido
INB0003986128	548A	Parque Nacional Cahuita	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	Desconocido
INB0003986131	549A	Parque Nacional Cahuita	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	Desconocido
INB0003986132	550A	Parque Nacional Cahuita	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	Desconocido
INB0003986134	551A	Parque Nacional Cahuita	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	<i>Terminalia</i> spp..
INB0003986136	552A	Parque Nacional Cahuita	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	<i>Terminalia</i> spp..
INB0003986141	553A	Parque Nacional Cahuita	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	<i>Terminalia</i> spp..

Caracterización molecular

Extracción de ADN: Los aislamientos monospóricos se cultivaron en Caldo Papa Dextrosa (PDB) de 3-5 días a 25 °C. Un máximo de 0.1g de micelio se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para realizar inmediatamente la extracción de ADN. La extracción del material genético se realizó con el DNeasy mini plant kit (Qiagen, California, USA) con las modificaciones recomendadas por el fabricante según el tipo de material a procesar.

Amplificación y secuenciación de la región ITS: La región ITS se amplificó mediante la técnica de PCR con los imprimadores ITS1F e ITS4R (Gardes & Bruns 1993). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µL con 50 ng de ADN, 5 µL de Buffer 10X de Promega, 3.0 µL de MgCl₂, 1 µL de 10 µM dNTPs, 1.25 µL de 20 µM de cada imprimador, 0.5 µL de Taq Polimerasa (Promega, Wisconsin, USA) y agua estéril para completar el volumen total de 50 µL por reacción. Las reacciones de PCR se

hicieron en un termociclador 9700 (Perkin Elmer) con el programa descrito por Fernández *et al* (1999).

Los productos de PCR se limpiaron con el GeneElute PCR Clean-up kit (Sigma, Missouri, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante y se determinó la concentración del producto de PCR con el MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Maryland, USA).

La secuenciación se realizó con los mismos imprimadores que para el PCR en el Instituto Dana Farber de la Universidad de Harvard, Boston, Massachusetts.

Análisis de las secuencias: Las secuencias de ADN fueron editadas con el programa Bioedit (Hall 1999). El alineamiento se realizó con Clustal W (Thompson *et al.* 1994) El análisis bayesiano se realizó con el programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Las probabilidades posteriores se aproximaron al muestrear árboles con el método de “Markov chain Monte Carlo” (MCMC). Las probabilidades posteriores de cada rama fueron calculadas por conteo de su ocurrencia en los árboles que fueron visitados durante el curso del análisis MCMC.

El modelo de sustitución nucleotídica transversional con sitios invariables (TVM+I) fue seleccionado por el programa MrModeltest (Nylander 2004) con el criterio de información “Akaike”. MrBayes se corrió por 2 000 000 de generaciones con cuatro cadenas. Los árboles fueron muestreados cada 100 generaciones para un total de 20 000 árboles. Las primeras 100 000 generaciones (los primeros 1 000 árboles) fueron eliminados en el “burn in” de la cadena. Los valores de “log-likelihood” de los puntos de muestreo se graficaron vs el tiempo de generación con TRACER 1.0 (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html?id=tracer>) para asegurar que se había alcanzado un valor de equilibrio estable luego de las primeras 100 000 generaciones. De

los 19 000 árboles restantes se calculó el árbol consenso con el largo de ramas promedio con la opción “sumt” en Mr. Bayes. Las probabilidades posteriores se obtuvieron para cada clado. Los árboles filogenéticos se visualizaron con el programa Treeview (Page 1996). La secuencia de *Plectrophomella* spp.p (GenBank AM286786) fue utilizada como “out-group”. La diversidad nucleotídica o el número promedio de diferencias por sitio entre dos secuencias homólogas fue calculado con el programa DnaSP (Rozas & Rozas 1997). El F_{ST} de Wright fue utilizado para describir que proporción de la varianza genética total se debe a diferencias entre clados. El F_{ST} varía desde 1.0, en donde toda la variación es entre poblaciones a 0.0, cuando las poblaciones son homogéneas. El F_{ST} fue calculado vía el análisis de AMOVA con el software ARLEQUIN (Schneider *et al.* 1992).

Caracterización química

Fermentación: El primer paso para llevar a cabo una caracterización química es la producción de metabolitos por medio de la fermentación. Una de las grandes ventajas de los hongos como fuentes de metabolitos secundarios, es su habilidad de producir algunos compuestos y expulsarlos al medio. Los aislamientos monospóricos se cultivaron en un medio optimizado para la producción de metabolitos secundarios en la unidad de bioprospección de INBio. La primer etapa es el crecimiento del hongo en un medio líquido denominado semilla, compuesto de peptona, extracto de malta, levadura y glucosa, los aislamientos fueron incubados en un shaker a 150 rpm por 7 días a 25 °C en erlenmeyers de 150 ml; la semilla luego fue transferida a erlenmeyers de 250 ml con

medio líquido de malta y resina Diaion HP-20, se mantuvo en el shaker por 16 días a 25 °C a 150 rpm y luego se incubó en fase estacionaria por 5 días adicionales a 25 °C. Los fermentos fueron filtrados y el micelio producido más la resina fueron extraídos dos veces con etanol (EtOH) en un baño ultrasónico por 20 minutos. Los solventes fueron eliminados con rotavapores. Todos los extractos crudos fueron resuspendidos en 50 ml de agua y se limpiaron tres veces con 25 ml de hexano para eliminar el material graso producido durante la fermentación y tres veces con 25 ml de acetato de etilo para eliminar azúcares (Tamayo *et al.*, protocolos no publicados).

Monitoreo de los metabolitos secundarios: Los análisis cromatográficos de capa fina (TLC) se realizaron para todas las muestras. Cada extracto crudo fue disuelto en metanol (CH₃OH) y la cromatografía se realizó en placas de aluminio de 10X20cm, de sílica gel 60 Merck 5553/F254 con diclorometano (CH₂Cl₂)/acetato de etilo (C₄H₈O₂) (8:2) como sistema de elusión. Las placas fueron rociadas con permanganato (KMnO₄) y se calentaron en un horno para revelar la reacción. La presencia o la ausencia de las palmarumicinas MK-3018, CJ-12372 y CR₁ fue determinada por comparación con los estándares respectivos. Los análisis de cromatografía líquida del alto rendimiento (HPLC) fueron realizados en un HPLC Waters 2487, equipado con una bomba 600E. Las separaciones fueron hechas con una columna X-Terra RP18 de 5µm, 3.9 x 150 mm. Aproximadamente 50 µg de cada extracto de material soluble en metanol fue analizado a 22 °C con un flujo de 1 ml/min en el siguiente gradiente: Sistema A: metanol-agua 1:1 y sistema B: metanol. Se inicia con 95% del sistema A y se alcanza 100% en 3 minutos, luego en 10 minutos se alcanza el 100% del sistema B y se mantiene con esa proporción por 10 minutos, se alcanza el 100% del sistema a los 24 minutos y se finaliza a los 25

minutos. El volumen de la inyección por muestra fue de 20 μ l. La longitud de onda fue fijada en 220nm.

Los análisis de la resonancia magnética nuclear (RMN) fueron realizados en la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Aproximadamente a 10 mg de cada una de las muestras se agregó tetracloruro del carbono (CCl_4) y se secó en el rotavapor. Cada muestra fue disuelta en 0.6 ml de metanol deuterado (CD_3OD) para los análisis protónicos de NMR. Las secuencias de pulso y los tiempos de adquisición fueron los valores típicos para este análisis: pw = 45 °C, taq = 35; sin pulso retardado. Cuando el pico del solvente era demasiado alto, fue suprimido con una secuencia de programación de HOHAHA.

BIBLIOGRAFÍA

- Acero, F.J., V. González, J. Sánchez-Ballesteros, V. Rubio, J. Checa, G.F. Bills, O. Salazar, G. Platas & F. Peláez. 2004. Molecular phylogenetic studies on the Diatrypeaceae based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia* 96: 249-259.
- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims & M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- Andersen, B., K.F. Nielsen, U. Thrane, T. Szaro, J.W. Taylor & B.B Jarvis. 2003. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* spp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95: 1227-1238.
- Barr, M.E. 1990. Some Dictyosporous genera and species of pleosporales in North America. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 62: 1-92.
- Barr, M.E. & S.M. Huhndorf. 2001. Loculoascomycetes. Pp 284-288. In: *The Mycota VII. Part A. Systematics and Evolution*. McLaughlin/McLaughlin/Lenke.
- Bezerra, J.L & J.W. Kimbrough. 1982. Culture and cytological development of *Rhytidhysterium rufulum* on citrus. *Can. J. Bot.* 60: 568-579.

- Berbee, M.L. & J.W. Taylor. 1992. Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. *Molec. Biol. Evol.* 9: 278-284.
- Berbee, M.L. 1996. Loculoascomycete origins and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data. *Molec. Biol. Evol.* 13: 462-470.
- Blackwell, M., D.S. Hibbett, J.W. Taylor & J.W. Spatafora. 2006. Research coordination networks: a phylogeny for Kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98: 829-837.
- Collado, J., G. Platas, G.F. Bills, A. Basilio, F. Vicente, J.R. Tormo, P. Hernández, M.T. Díez & F. Peláez. 2006. Studies on *Morinia*: Recognition of *Morinia longiappendiculata* sp. nov. as a new endophytic fungus, and a new circumscription of *Morinia pestalozzioides*. *Mycologia* 98: 616-627.
- Dodd, S.L., E. Lieckfeldt & G.J. Samuels. 2003. *Hypocrea atroviridis*, sp nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.
- Fernandez, F.A., F. Lutzoni & S.M. Huhndorf. 1999. Teleomorph-anamorph connections: the new pyrenomycetous genus *Carpoligna* and its Pleurothecium anamorph. *Mycologia* 91: 251-262.
- Gardes, M. & T. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of micorrhizae and rust. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432.
- Huelsenbeck, J.P. & F. Ronquist. 2001. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Huhndorf, S.M., A.N. Miller & F.A. Fernández. 2004. Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia* 96: 368-387.
- InfoStat. 2002. *InfoStat, versión 1.1*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Kirk, P.M., P.F. Cannon, J.C. David & J.A. Stalpers. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB international, Wallingford, Oxon, UK.

Kroken, S., N.L. Glass, J.W. Taylor, O.C. Yoder & B.G Turgeon. 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 15670-15675.

Kutorga, E. & D.L. Hawksworth. 1997. A reassessment of the genera referred to the family Patellariaceae. *Systema Ascomycetum* 15: 1-110.

Lee, T., S.H. Yun, K.T. Hodge, R.A. Humber, S.B. Krasnoff, G.B. Turgeon, O.C. Yoder & D.M. Gibson. 2001. Polyketide synthase genes in insect- and nematode- associated fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 181-187.

Liew, E.C.Y., A. Aptroot & K.D. Hyde. 2000. Phylogenetic significance of the pseudoparaphyses in loculoascomycete taxonomy. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 392-402.

Lindemuth, R., N. Wirtz & H.T. Lumbsch. 2001. Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial rDNA sequences supports the view that loculoascomycetes (Ascomycota) are not monophyletic. *Mycol. Res.* 105: 1176-1181.

Magnes, M. 1997. *Weltmonographie der Tribliidiaceae*. *Bibliotheca Mycologica* 165: 127-133.

Mata, M. 2003. *Macrohongos de Costa Rica*. Instituto Nacional de Biodiversidad, Heredia, Costa Rica.

Miller, A.N. & S.M. Huhndorf 2004. Using Phylogenetic species recognition to delimit species boundaries within *Lasiosphaeria*. *Mycologia* 96: 1106-1127.

Moore-Landecker, E. 1996. An introduction to the Fungi, Pp 1-14. In: *Fundamentals of the Fungi*. Prentice Hall New Jersey.

Nylander, J.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.

Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.

Prado, R., I. Schmitt, S. Kautz, Z. Palice, R. Luecking & H.T. Lumbsch. 2006 Molecular data place *Trypetheliaceae* in *Dothideomycetes*. *Mycol. Res.* 110: 511-520.

Raven, P.H. & G.B. Johnson. 1989. *Fungi*. Pp. 631-644. In: *Biology*. Times Mirror/Mosby College Publishing.

Rossmann, A.Y., R.E. Tulloss, T.E. O'Dell & R.G. Thorn. 1998. Introduction and Overview. Pp 1-12. In: *Protocols for an all taxa biodiversity inventory of fungi in a Costa Rican Conservation Area*. Parkway Publishers, Inc. Boone, North Carolina.

- Rozas, J & R. Rozas. 1997. DnaSP version 2.0: a novel software package for extensive molecular population genetics analysis. *Comput. Appl. Biosci.* 13: 307-311.
- Samuels, G.J. & E. Müller. 1979 Life-History studies of Brazilian Ascomycetes. *Rhytidhysterium rufulum* and the genus *Eutrybliella*. *Sydowia* 32: 277-292.
- Schneider, S., J.M. Kueffer, D. Roessli & L. Excoffier. 1997 ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis. Ver 1.1. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A.K. Rommert & K. Krohn. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106: 996-1004.
- Seymour, F.A., P.D. Crittenden, N. Wirtz, D.O. Ovstedal, P.S. Dyer & H.T. Lumbsch. 2007. Phylogenetic and morphological analysis of Antarctic lichenforming *Usnea* species in the group *Neuropogon*. *Antarct. Sci.* 19: 71-82.
- Shenoy, B.D., R. Jeewon, W.P. Wu, D.J. Bhat & K.D. Hyde. 2006. Ribosomal and RPB2 DNA sequence analyses that *Sporidesmium* and morphologically genera are polyphyletic. *Mycol. Res.* 110: 916-928.
- Smithe, F.B. 1975 Naturalist's color guide. The American Museum of Natural History, New York.
- Stadler, M., Ju Yu-Ming & J.D. Rogers. 2004. Chemotaxonomy of *Entonaema rhopalostroma* and other Xylariaceae. *Mycol. Res.* 108: 239-256.
- Taylor, J.W., D.J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D.M. Geiser, D.S. Hibbett & M.C. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31: 21-32.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Turner, W.B. 1971. Fungi, their cultivation and their secondary metabolism. Pp. 11-24. In: *Fungal metabolites*. Academic Press London and New York.
- Verkley, G.J.M., M. Starink-Willemsse, A. Van Iperen & E.C.A. Abeln. 2004. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 96: 558-571.

Wipf, P., S. Lynch, A. Birmingham, G. Tamayo, A. Jimenez, N. Campos & G. Powis. 2004. Natural product based inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system. *Org. Biomol. Chem.* 2: 1651-1658.

Yajuan, J.L., S. Whelen & B.D. Hall. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Molec. Biol. Evol.* 16: 1799-1808.

Yajuan, J.L. & B.D. Hall. 2004. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 4507-4512.

APÉNDICE I

Preliminary study of the morphology, chemistry and molecular data of *Rhytidhysterium rufulum* (Ascomycota, Patellariales) in Costa Rica

Catalina Murillo Cruz ^{1,2}, Federico J. Albertazzi ^{2,3}, Julieta Carranza², H. Thorsten Lumbsch⁴, Giselle Tamayo^{1,5}.

¹ Unidad Estratégica de Bioprospección, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), San José, Costa Rica

² Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

³ Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

⁴ Department of Botany, The Field Museum, Chicago, USA

⁵ Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Address for correspondence: Catalina Murillo Cruz M. Sc.

Unidad Estratégica de Bioprospección, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), San José, Costa Rica, América Central

Email: cmurillo@inbio.ac.cr

Abstract: *Rhytidhysterium rufulum* is a poorly known common pantropical species, generalist, capable of utilizing different substrata and occupying diverse habitats and is the only species of its genus in Costa Rica. We have employed morphological, molecular and chemical data to assess the variability and differentiation of *Rhytidhysterium rufulum* in Costa Rica, including sites from the Pacific and Atlantic coast. Phylogenetic analyses of nuclear ITS sequences revealed the presence of four distinct lineages in the *R. rufulum* complex. Re-examination of the morphology and anatomy showed differences between these lineages in ascoma, ascus and ascospore size that have previously been regarded as intraspecific variation. Further, chemistry of clades was distinct with two lineages producing the palmarumycins MK-3018, CJ-12372 and CR₁, while clade III produced dehydrocurvularin and clade IV unidentified compounds. Given together, these data strongly suggest that four species are involved and reject previous interpretations of one morphologically variable species.

Key words: tropical fungi, palmarumycins, dehydrocurvularin, pseudoepithecium color, cryptic species.

Recent estimates of the number of fungal species worldwide predict a minimal number of over 700 000 species (Mueller & Schmit 2007), while the most commonly cited number is about 1.5 million taxa (Hawksworth 2001). Given the approximately 70 000 described species; this means that only a small percentage of taxa is currently known. This situation is even more complicated by uncertainties in the species concept in fungi.

There is a growing body of evidence from recent molecular studies that morphology-based concepts severely underestimate the number of species. Morphological differences have been misinterpreted as intraspecific variation and geographically or ecologically isolated populations have been shown to belong to distinct phylogenetic species (Crous *et al.* 2004, Dettman *et al.* 2006, Molina *et al.* 2004, Pringle *et al.* 2005, Rehner & Buckley 2005, Taylor *et al.* 2006, Wirtz *et al.* in press). In tropical regions there is even less information available for most groups of ascomycetes. In Costa Rica only 2 000 species of fungi have been reported, but it is considered that the real number lies between 40 000 and 70 000 species of fungi (Mata 2003). At present, there is an increasing interest in documenting diversity for a number of reasons, among them their role in ecosystems, their potential as sources of secondary metabolites for use as antibiotics or biocontrol agents. A better understanding of the diversity and natural history of the fungi will contribute to the generation of knowledge and thereby with the implementation of initiatives for the protection and sustainable use of these natural resources (Rossman *et al.* 1998).

The genus *Rhytidhysterion* is classified in Patellariaceae (Patellariales). It is characterized by hysteriform ascomata that become discoidal at maturity and paraphyses covered by a gelatinous layer (pseudoepthecium). Samuels and Müller (1979) revised the genus and accepted two species: *Rhytidhysterion rufulum*, a saprophyte or weak parasite found on a great variety of plants and *R. hysterinum* a wood inhabitant distributed mainly in warm climates of the Northern Hemisphere but also there are reports from South America (Venezuela). The anamorphs for these species have been described as "*Diplodia*-like" or "*Aposphaeria*-like", however, no studies have been carried out to relate these structures

to the biology and evolutionary history of these groups. Recently, other species for the genus *Rhytidhysterion* have been described, for example *Rhytidhysterion opuntiae* (J.G. Brown.) M.E. Barr (1990) has (1-3 (4-5) septate ascospores, with one longitudinal septum in mid cells (Barr 1990) and *Rhytidhysterion dissimile* (P. Karst.) Magnes (1997) have 5-septate ascospores (Magnes 1997).

Rhytidhysterion rufulum is the only species at present known from Costa Rica (Umaña, pers. comm.) This species is currently accepted in a wide circumscription as suggested by Samuels and Müller (1979) who synonymized two species and suggested that six further species are synonyms of *R. rufulum* as well.

Previous research at the Bioprospecting Strategic Unit of the National Institute of Biodiversity (INBio) on a *Rhytidhysterion* spp. isolate resulted on the isolation of palmarumycins, secondary metabolites that have been reported as potential inhibitors of the Thioredoxin-thioredoxin reductase cellular redox systems and which also have antimicrobial and antifungal properties (Wipf *et al.* 2004). This finding stimulated additional research on this genus in Costa Rica. The aim of the current investigation was to characterize morphologically and molecularly samples of *Rhytidhysterion* spp. collected in different areas of Costa Rica that were found to include different secondary metabolites. To address this, we conducted morphological comparisons within the collection and with known species, a re-examination of micromorphological characters, chromatographic examination of the samples and a molecular analysis using sequences of the ITS DNA region.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection: Samples were collected from June to October 2005 in Barra Honda and Palo Verde National Parks (Guanacaste, Costa Rica), Cahuita National Park and Hitoy Cerere Biological Reserve. (Limón, Costa Rica). The isolate 3352 previously obtained by INBio from *Rhytidhysterion* spp. was used as positive control for the presence of the palmarumycins studied. Voucher specimens are deposited in INBio (Table 1)

The specimens were compared morphologically with specimens of *R. hysterinum* (VENEZUELA, Bolívar: Dist. Cedeño, vicinity of Panare village of Corozal, 6 km from Maniapure toward Caicara 6°55"N, 66°30"W, Apr. 1986, collectors: Brian Boom and Margot Grillo #6538), *R. rufulum* (Type: Puerto Rico, Vicinity of Coamo Springs, on dead wood, 21 February 1922, collectors: N.L. & E.G. Britton & M.S. Brown. Explorations of Porto Rico, No. 6149, NY-neotypus hic designatus and a specimen from VENEZUELA, Parque Nacional Guatopo, trail between Agua Blanca and La Cruceta, 10° 03"N, 66° 26"W. Nov 1990, collectors: G J. Samuels, B. Hein, S.M. Huhndorf # 7620) and *R. opuntiae* (USA, Saguadro National Monument, West Unit, Arizona, July 1980, collector R.L. Gilbertson, Det. M.E.B.B #6774) from the New York Botanical Garden

Morphological studies: Samples were divided for morphological analysis according to ascoma form, pseudoepithecium and receptacle colour and margin appearance. The colours were determined using the Naturalist's Color Guide (Smithe 1975).

Measurements of asci and ascospores were done from material that was first treated with 5% KOH and then mounted in water. Twenty asci and fifty ascospores were measured using an Olympus Bx50 microscope fitted with a Song CCD-IRIS (Image-Pro plus Version 4.0) camera. Descriptive statistics, including means, standard deviation, maximum and minimum values of continuous characters and the significance of differences in sample means by one-way ANOVA using Tukey's test were obtained using InfoStat version 1.1. (InfoStat 2002). Monospore cultures from all samples of Table 1 were cultivated on PDA (Potato Dextrose Agar, Difco™) medium and incubated at 25 °C for 10 days, the isolate was then transferred to PDA and CMA (Corn Meal Agar, Difco™) and incubated at 25 °C for ca. 15 days, at which time cultures were described. Cultures are maintained at INBio collection.

Molecular studies: Monosporic isolates were grown in potato-dextrose broth for 3-5 days at 25 °C. A maximum of 0.1 g of the dried mycelial mat was placed in a 1.5 ml Eppendorf tube for immediate DNA extraction with DNeasy mini plant kit (Qiagen, California, USA). The ITS region was amplified and sequenced. The primers used for PCR and sequencing were: ITS1F and ITS4R (Gardes and Bruns 1993). PCR reactions were set up for 50 µl reactions using 50 ng of DNA, 5 µl of Promega 10X Buffer, 3.0 µl of MgCl₂, 1 µl of 10 µM dNTPs, 1.25 µl of 20 µM of each primer, 0.5 µl of Taq Polymerase (Promega, Wisconsin, USA) and sterile water to complete a total of 50 µl per reaction. The PCR reactions were done on a Perkin Elmer 9700 thermocycler using the program described by Fernández *et al.* (1999). PCR products were purified using GeneElute PCR Clean-up kit (Sigma, Missouri, USA) and their concentration was

determined using the MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Maryland, USA). Sequencing was performed at the sequencing facility of the Dana Farber Cancer Institute at the University of Harvard, Boston, Massachusetts, using the same primers as for PCR. Sequences were edited and assembled using Bioedit (Hall 1999). The alignment was done using Clustal W (Thompson *et al.* 1994).

Bayesian analyses were conducted using the MrBayes 3.1 program (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Posterior probabilities were approximated by sampling trees using a Markov chain Monte Carlo (MCMC) method and the posterior probabilities of each branch were calculated by counting its occurrence in trees that were visited during the course of the MCMC analysis.

The Transversional model of nucleotide substitution assuming invariable sites (TVM+I) was selected by MrModeltest (Nylander 2004) using the Akaike information criterion. MrBayes was run for 2 000 000 generations with four chains. Trees were sampled every 100 generations for a total of 20 000 trees. The first 100 000 generations (the first 1 000 trees) were deleted as the "burn in" of the chain. The log-likelihood scores of sample points against generation time were plotted using TRACER 1.0 (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html?id=tracer>) to ensure that stationarity was achieved after the first 100 000 generations by checking if the log-likelihood values of the sample points reached a stable equilibrium value. Of the remaining 19 000 trees a majority rule consensus tree with average branch lengths was calculated using the sumt option of MrBayes. Posterior probabilities were obtained for each clade. Phylogenetic trees were visualized using the program Treeview (Page 1996)

The sequence of *Plectophomella* spp. (GenBank AM286786) was used as an out-group.

Nucleotide diversity or the average number of differences per site between two homologous sequences was calculated using the program DnaSP (Rozas and Rozas 1997). Wright's F_{ST} was used to describe what proportion of the total genetic variance is due to differences among Clades. F_{ST} can range from 1.0, in which all of the variation is among populations, to 0.0, in which all populations appear homogeneous. F_{ST} was calculated via an AMOVA analysis using the software package ARLEQUIN (Schneider *et al.* 1997).

Chemical studies: The *Rhytidhysterion* cultures were grown on a medium optimized in the bioprospecting unit of INBio for production of secondary metabolites: A rich seed consisted of peptone, malt extract, yeast and glucose, the cultures were incubated for 7 days at 25 °C in 150 ml erlenmeyers on a rotary shaker at 150 rpm; the seed plus the growing mycelium was transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing Malt broth and kept for 16 days on a rotary shaker at 25 °C at 150 rpm and then incubated for an additional 5 days at 25 °C in a stationary phase. The cultures were harvested and filtered. The mycelium plus the resin were extracted twice with ethanol (EtOH) in an ultrasonic bath for 20 minutes. Solvents were removed by rotary evaporation. All crude extracts were resuspended in 50 ml of water and cleaned three times using 25 ml of hexane to eliminate the fatty material (lipophyllic) produced during fermentation and were cleaned three times with 25 mL of ethyl acetate to eliminate sugars (Tamayo *et al.*, unpublished protocols).

Thin layer chromatography (TLC) analyses were performed for all of the samples. Each crude extract was dissolved in methanol (CH₃OH) and chromatographed on aluminium

sheets 10X20 cm, silica gel 60 Merck 5553/F₂₅₄ using dichloromethane (CH₂Cl₂)-Ethyl acetate (C₄H₈O₂) (8:2) as the eluent system. The aluminium sheets were subsequently sprayed with permanganate (KMnO₄) and heated in an oven. The presence or absence of the secondary metabolites palmarumycins MK-3018, CJ-12372 and CR₁ was revealed by comparison with the respective standards.

High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on a Waters HPLC 2487, equipped with a 600E pump. Separations were done using an X-Terra column RP18 of 5 µm, 3.9 x 150 mm. Approximately 50 µg of each crude extract of methanol soluble materials, were analyzed at 22 °C with a flow rate of 1 ml/min in the following gradient: System A: methanol: water 1:1 and system B: methanol, the elution lasts for 23 minutes and begins with 95% A, reaching 100 % A in 3 minutes; then in 10 minutes it reaches 100% B and it is kept with that proportion for 10 minutes. The injection volume per sample was 20 µl. The UV length was set on 220nm.

The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses were performed at the Escuela de Química of the University of Costa Rica, San José, Costa Rica. Samples were freed of water using rotary evaporation. Each sample consisted of approximately 10 mg and was dissolved in 0.6 ml of deuterated methanol (CD₃OD) for proton NMR analyses. Pulse sequences and acquisition times were set for typical analysis: pw =45 °, taq = 35 s, with no pulse delay. When the solvent peak was too high, it was deleted using a HOHAHA programming sequence.

RESULTS

Morphological classification: Forty eight collections of *R. rufulum* were studied morphologically. The following description is based on those specimens.

Ascomata erumpent, discoidal, lenticular to circular, solitary to gregarious; when dry the ascomata remaining discoidal or the edges of the disc reclosing by folding along 1-3 lines, becoming hysteriform, triangular or triradiate. Margin smooth to striate, black, carbonaceous, receptacle concolorous. Pseudoepithecium typically orange (cinnamon rufous 40), but varying from salmon (salmon 6) to red (chestnut 32 or amber 36) or green (grayish-olive 43) to black (jet black 89). Asci bitunicate, narrowly clavate, 6-8 spored, (144-) 216-246(-284) x (10.8-) 12.8-15.8 (-17.3) μm . Ascospores ellipsoidal to fusiform, brown, (23.0-) 29.8-33.1(-37.0) x (7.7-) 9.8-12.2(-14.4) μm , 3-cross septate. Paraphyses exceeding the asci, branching dichotomously immediately below the tip, the part above the ascial apices becoming blue-green in Meltzer's reagent. The asci measured were longer and broader and ascospores were broader than reported by Samuels and Muller (1979), (asci (77-100(-112) x 9-12(-17), ascospores (19-)26-36(-43) x 3.5-4.5(-6.5) μm) but agree with the data of Kutorga and Hawksworth (1997), (asci (180-)200-260(-275) x 15-17(-22) μm and ascospores (22-)25-35(-39) x (7.5-)9-12(-14) μm).

Comparative studies with similar species revealed that the 48 Costa Rican collections belong to *R. rufulum* as circumscribed by Samuels and Müller (1979). *R. hysterinum* differs in having one-septate ascospores (Samuels and Müller 1979), while the ascospores in *R. dissimile* are 5-septate (Magnes 1997). *R. opuntiae* has (1-3 (4-5) septate ascospores, with one longitudinal septum in mid cells (Barr 1990) (Fig. 1).

Molecular phylogenetic analysis: DNA sequences obtained included partial ITS1, the 5.8S gene and the ITS2 region. The first 110 bp of the ITS1 region were excluded due to ambiguous alignment. The sequence alignment included 501 unambiguously aligned positions. Of these, 145 were variable and 57 parsimony informative. Base frequencies were 0.22 for A, 0.22 for T, 0.27 for G, and 0.29 for C. Nucleotide diversity was 0.03325 ± 0.0022 . In the majority rule consensus tree of the Bayesian tree sampling (Fig. 2) *R. rufulum* falls into four distinct clades. All these clades are strongly supported, but the relationships among the clades lack strong support. The clades do not correspond with geographical origin, except Clade IV, which was only collected in Palo Verde and Clade III which was only collected in the pacific side of Costa Rica. Most of the variation observed was between clades (Table 2). Since the molecular analysis suggested that four different isolated lineages are involved in the *R. rufulum* complex in Costa Rica, we re-examined the morphology and anatomy of the samples. We found clade-related differences in ascomata morphology that previously have been regarded as intraspecific variation. The ascomata in clade I have a smooth margin and cinnamon-rufous (40) pseudoepithecium while clade II includes samples with striate margin, black (jet black 89), grayish olive (43) or raw umber (123) pseudoepithecium. Clade III includes specimens with striate margins and a chestnut (32), amber (36) or sepia (219A) coloured disc. Clade IV consist of only three isolates from Palo Verde with striate margin and salmon (6) pseudoepithecium. Asci and ascospores in collections from Clades III and IV were shown by variance analysis to be significantly shorter and narrower (Fig 3, Fig 4) than Clades I and II: ascus length, F: 29.71, p: 0.0001; ascus width, F: 73.93, p: 0.0001; ascospore length F: 35.7, p: 0.0001 and ascospore width, F:

16.23, p : 0.0001 Clades I and II only differ in ascus width and ascospore length (Table 3).

The collections from Clade IV were exclusively collected from *Acacia* spp. in the Pacific coast; the remaining clades could not be correlated with hosts because of the large number of unidentified hosts (33.3% Clade I, 29.4% Clade II and 61.5% Clade III). No single host dominated in Clade I (26.7 % from *Acacia* spp., 13.3% from *Inga* spp. 13.3% from *Nectandra* spp. and 6.7% from *Citrus*, 6.7% from *Terminalia* spp.), Clade II (29.4 % from *Acacia* spp., 17.7% from *Inga* spp., 17.7 from *Terminalia* spp. and 5.9% from *Nectandra* spp.) and Clade III (15.4% from vine-like climbing plant, 15.4% from *Acacia* spp. and 7.7% from *Guazuma ulmifolia*).

Secondary metabolites: The three palmarumycins, MK-3018, Palmarumycin CR₁ and CJ 12,372 were monitored in the extracts of the samples examined. Standards of these compounds were facilitated by the Chemical Laboratory of the Bioprospecting unit of INBio. Three groups were recognized based on this monitoring profile from TLC. These chemical groups agree with the clades found in the ITS analysis. Members of Clade I and Clade II comprising 69.8% of the samples produced MK3018 (R_f = 0.32), CJ 12,372 (R_f = 0.43) and palmarumycin CR₁ (R_f = 0.01), 23.2% all belonging to Clade III, produced only dehydrocurvularin (R_f = 0.40) (Tamayo and Torres, pers. comm.); 7.0%, members of Clade IV, did not produce either palmarumycins or dehydrocurvularin. From these set of samples, 16 extracts were chosen from the main group based on the duplicate pattern observed from the TLC analyses and the presence or absence of the monitor compounds were confirm using HPLC (Fig 5) and NMR techniques (Fig. 6)

DISCUSSION

This study assessed the variability and differentiation of the genus *Rhytidhysterion* present in Costa Rica, including sites from the Pacific and Atlantic coast to understand the diversity of these microfungi. Based on morphological characteristics, all samples from Costa Rica belong to *Rhytidhysterion rufulum* as currently circumscribed (Samuels and Müller 1979, Barr 1987, Kutorga and Hawsworth 1997).

Initially, the ITS region was analyzed to infer relationships within *Rhytidhysterion rufulum* in Costa Rica. The nucleotide diversity in the ITS rDNA region was low; and most of the variation was among the resulting clades; this could be the result of effective dispersal patterns of *Rhytidhysterion rufulum* coupled with the fact that *R. rufulum* is homothallic (Bezerra and Kimbrough 1982). Low genetic variation has been reported in other common fungi by Rydholm *et al.* (2006) who explained the lack of population structure on a global scale in *Aspergillus fumigatus* by continual gene flow across continents that resulted from wind dispersal of the UV resistant conidia. Future analyses of additional genes are necessary to understand genetic structure within *Rhytidhysterion rufulum* clades.

In contrast to previous studies (Samuels and Müller 1979), we have found morphology of ascomata, ascus and ascospore size, informative for the characterization of distinct clades in *R. rufulum*. Morphological characters, such as shape and color of ascomata have been useful in some cases as taxonomic information. In Xylariaceae with

Nodulisporium-like anamorphs, numerous species are characterized by conspicuous colors of their ascomata (Stadler *et al.* 2004), and in Helotiales they are usually characteristic at family level, but some species also show extraordinary variation and classifications based only on morphology alone is not always consistent with cellular, ultra structural and molecular characters (Wang *et al.* 2006). The color of the pseudoepithecium is variable within *Rhytidhysterion rufulum*. Samuels and Müller (1979) did not find any correlation between the pseudoepithecium color and the ascospore size. However, we demonstrated correlation with the four clades found in the molecular analyses and further showed correlation with ascus and/or ascospore size in several clades.

Rhytidhysterion is a genus of saprobes or weak parasites on woody plants and is uncommon in temperate regions. *Rhytidhysterion rufulum* is a common pantropical species, generalist, capable of utilizing different substrata and occupying diverse habitats. Clade I and II include isolates that easily colonize different substrates and environments for example in the Pacific sites it was found in *Acacia* spp. (Fabaceae), *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae) or *Samanea saman* (Fabaceae) and in the Atlantic sites in *Inga* spp. (Fabaceae), *Terminalia* spp. (Combretaceae), *Nectandra* spp. (Lauraceae) and *Citrus* spp. (Rutaceae). *Rhytidhysterion rufulum* is a self-fertile, homothallic species (Bezerra and Kimbrough 1981) and hence able to maintain sexual reproduction in the absence of compatible mycelia (Kendrick 1992). Dispersal by wind could be another factor that contributes to their widespread distribution.

In our study we observed a higher genetic diversity in the Pacific region, especially in the dry forest of Palo Verde, which hosted samples of all four clades. This agrees with studies showing higher diversity of wood-inhabiting organisms in logs decomposing in dry than in wet forest (Torres and Gonzalez 2005), mainly those groups for example Xylariales, that initially colonized the dry fallen logs (Mata and Umaña, pers. comm.)

Rhytidhysterion rufulum isolates from clade I and II, collected in different sites of Costa Rica produced the palmarumycins MK-3018, CJ-12372 and CR₁. The palmarumycin MK-3018 which was first isolated in 1989 from *Tetraploa aristata* (Dothideomycetes, Pleosporales) showed antimicrobial activity. It was the first representative of a new family of bioactive, natural products; it is based on a 1,8-dihydroxynaphthalene derived spiroketal unit linked to a second, oxidized naphthalene moiety. CJ-12372 was isolated from the endophytic fungus *Coniothyrium palmarum* (Pleosporales) and related *Coniothyrium* species and was shown to be a DNA gyrase inhibitor that possesses antifungal, antibacterial and herbicidal activity (Ragot *et al.* 1999). Palmarumycin CR₁ was isolated from *Rhytidhysterion* sp. (Patellariales) (Wipf *et al.* 2004). Palmarumycins also can produce potent inhibitors of the Thioredoxin-thioredoxin reductase cellular redox systems, CJ-12372 and CR₁ showed no cytotoxicity and only insignificant inhibition of the Trx-1/TrxR redox system, MK-3018 did manifest more activity in this system but also more cytotoxicity, demonstrating that the presences of an enone function is necessary for biological activity in this class of fungal metabolites (Wipf *et al.* 2004). Paralell to the determination of Trx-1/TrxR inhibition, these compounds were also tested

for their anti-chagasic potential, where MK-3018 again was the only active compound (Tamayo *et al.*, unpublished results)

Samples from clade III only collected in the Pacific side produced a secondary metabolite identified as dehydrocurvularin. This compound has been reported in different Pleosporales taxa, such as *Cochliobolus spicifer*, *Curvularia* spp., *Alternaria* spp. and in *Penicillium* spp. (Eurotiales). (Almassi *et al.* 1994) Dehydrocurvularin inhibits cell division in sea urchin embryonic development and its phytotoxicity and antimicrobial activity has been demonstrated. (Ghisalberti and Rowland 1993) This compound isolated from *Alternaria* spp. affects a broad spectrum of plant species inhibiting cell division through its disturbance of the microtubule assembly (Thomma 2003) and from *Penicillium* spp. showed nematocidal activity (Kusano *et al.* 2003) Clade IV produces compounds apparently different than the palmarumycins and dehydrocurvularin, which will be further studied.

The compounds found in extracts of *Rhytidhysterion rufulum* were previously isolated mainly from fungi in Pleosporales. Samuels and Müller (1979) noted that taxonomic relationships of *Rhytidhysterion* are uncertain. Blackwell *et al.* (2006) included Patellariales in an uncertain position in the Dothideomycetes and remarked that Pleosporales and Patellariales are phylogenetically related orders classified in the Dothideomycetes group that includes the majority of bitunicate ascostromatic species. The presence of these secondary metabolites supports a close relationship of Pleosporales and Patellariales.

The compounds produced from the bioprospecting point of view could have relevant activities as for example anticancer and antimicrobial ones. Because it is known that secondary metabolites often are produced as families of related compounds (Keller *et al.* 2005) more morphological, molecular and chemical characters must be studied in the future to deeply understand the diversity of the four lineages discover of *Rhytidhysteron rufulum*. This information is of biological interest but also could guide the search of new bioactive molecules.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Ministry of the Environment and Energy for the access to Costa Rica natural resources, under the permits R-006-2005-OT and R-CM-INBIO-05-2006-OT; the Escuela de Química of the University of Costa Rica for the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) measurements, Dr Gary J. Samuels (USDA-ARS, Baltimore, MD) for critical reading and suggestions on this work, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), the staff of the Bioprospecting and Fungi unit for all the support given, especially Allan Jimenez and Loengrin Umaña. Sequencing was carried out at Dana Farber/Harvard Cancer Center DNA Resource Core. This study was supported by Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT) 157-2005 and funds from the Neatherland government (NIDA program) through the Bioprospecting unit (INBio).

REFERENCES

- Almassi, F., E.L. Ghisalberti, B.W. Skelton & A.H. White. 1994. Structural study of dehydrocurvularin, an inhibitor of microtubule assembly. *Aust. J. Chem.* 47: 1193-1197.
- Barr, M.E. 1990 *Rhytidhysterium opuntiae*. *Memoires of the New York Botanical Garden* 62: 72.
- Barr, M.E. 1987. *Prodromus to Class Loculoascomycetes*. Department of Botany, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts.
- Bezerra, J.L. & J.W. Kimbrough. 1982. Culture and cytological development of *Rhytidhysterium rufulum* on citrus. *Can. J. Botany*. 60: 568-579.
- Blackwell, M., F. Hibbett, D.S. Taylor & J.W. Spatafora. 2006. Research coordination networks: a phylogeny for Kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98: 829-837.
- Crous, P.W., J.Z. Groenewald, K. Pongpanich, W. Himaman, M. Arzanlou & M.J. Wingfield. 2004. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* sp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. *Stud. Mycol.* 50: 457-469.
- Dettman, J.R., D.J. Jacobson & J.W. Taylor. 2006. Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia* 98: 436-446.
- Fernández, F.A., F. Lutzoni & S.M. Huhndorf. 1999. Teleomorph-anamorph connections: the new pyrenomycetous genus *Carpoligna* and its *Pleurothecium* anamorph. *Mycologia* 91: 251-262.
- Gardes, M. & T. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of micorrhizae and rust. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Ghisalberti, E.L. & C.Y. Rowland. 1993. 6 Chlorodehydrocurvularin. A new metabolite from *Cochliobolus spicifer*. *J. Nat. Prod* 6: 2175-2177.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432.

- Huelsenbeck, J.P. & F. Ronquist. 2001. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- InfoStat. 2002. *InfoStat, versión 1.1*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Keller, N.P., G. Turner & J.W. Bennett. 2005. Fungal Secondary Metabolism- From Biochemistry to Genomics. *Nat. Rev.* 3: 937-947.
- Kendrick, B. 1992. *The Fifth Kingdom*. Second edition. Focus Information Group, Inc. Newburyport, MA. ISBN 0-941051-28-5.
- Kusano, M., K. Nakagami, S. Fujioka, T. Kawano, A. Shimada & Y. Kimura. 2003. $\beta\gamma$ -Dehydrocurvularin and related compounds as nematicides of *Pratylenchus penetrans* from the fungus *Aspergillus* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1413-1416.
- Kutorga, E & D.L. Hawksworth. 1997. A reassessment of the genera referred to the family Patellariaceae. *Systema Ascomycetum* 15: 1-110.
- Magnes, M. 1997 *Weltmonographie der Tribliidiaceae*. *Bibliotheca Mycologica* . 165: 127-130.
- Mata, M. 2003. *Macrohongos de Costa Rica*. Instituto Nacional de Biodiversidad, Heredia, Costa Rica.
- Molina, M.C., A. Crespo, O. Blanco, H.T. Lumbsch & D.L. Hawksworth. 2004. Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia* s.str. (Parmeliaceae) inferred from nuclear ITS rDNA and beta-tubulin sequences. *Lichenologist* 36: 37-54.
- Müller, G.M. & J.P. Schmit. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers. Conserv.* 16: 1-5.
- Nylander, J.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Sweden.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Pringle, A., D.M. Baker, J.L. Platt, J.P. Wares, J.P. Latge & J.W. Taylor. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59: 1886-1899.
- Ragot, J.P., C. Steeneck, M.L. Alcaraz , & R.J.K. Taylor. 1999. The synthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene-derived natural products: palmarumycin CP1, palmarumycin

- CP2, palmarumycin C11, CJ-12,371, deoxypreussomerin A and novel analogues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 1073–1082.
- Rehner S.A. & E. Buckley. 2005. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-98.
- Rossman, A.Y., R.E. Tulloss, T.E. O'Dell & R.G. Thorn. 1998. Introduction and Overview. Pp 1-12. In: *Protocols for an all taxa biodiversity inventory of fungi in a Costa Rican Conservation Area*. Parkway Publishers, Inc. Boone, North Carolina.
- Rozas, J. & R. Rozas. 1997. DnaSP version 2.0: a novel software package for extensive molecular population genetics analysis. *Comput. Appl. Biosci.* 13: 307-311.
- Rydholm, C., G. Szakacs & F. Lutzoni. 2006. Low genetic variation and no detectable populations structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosastorya* species. *Eukaryot. Cell* 5: 650-657.
- Samuels, G.J. & E. Müller. 1979. Life-History studies of Brazilian Ascomycetes. *Rhytidhysterium rufulum* and the genus *Eutrybliella* *Sydowia* 32: 277-292.
- Schneider, S., J.M. Kueffer, D. Roessli & L. Excoffier, 1997. ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis. Ver 1.1. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Smithe, F.B. 1975 *Naturalist's color guide*. The American Museum of Natural History, New York.
- Stadler, M., Ju Yu-Ming & J.D. Rogers. 2004. Chemotaxonomy of *Entonaema rhopalostroma* and other Xylariaceae. *Mycol. Res.* 108: 239-256.
- Taylor, J.W., E. Turner, J.P. Townsend, J.R. Dettman & D. Jacobson. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361: 1947-1963.
- Thomma, B.P.H.J. 2003 *Alternaria* sp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4: 225-236.
- Thompson, J.D., D.G Higgins & T.J. Gibson. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Torres, J.A. & G. Gonzalez. 2005. Wood Decomposition of *Cyrtia racemiflora* (Cyrtiaceae) in Puerto Rican Dry and Wet Forests: A 13-year case study. *Biotropica* 37: 452-456.

Wang, Z., M. Binder, C.L. Schoch, P.R. Johnston, J.W. Spatafora & D.S. Hibbett. 2006. Evolution of helotialean fungi (Leotiomyces, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Mol. Phylogenet.Evol.* 41: 295–312.

Wipf, P., S. Lynch, A. Birmingham, G. Tamayo, A. Jimenez, N. Campos & G. Powis. 2004. Natural product based inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system. *Org. Biomol. Chem.* 2: 1651-1658.

Wirtz, N., C. Printzen & H.T. Lumbsch. The delimitation of Antarctic and bipolar species of *Usnea*, *Neuropogon* (Ascomycota, Lecanorales): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex. *Mycol. Research*, in press.

TABLE 1
Rhytidhysteron rufulum isolates studied

<i>INBio Accession number and isolate number</i>	<i>Location</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>	<i>Host</i>	<i>GenBank No.</i>
INB0003985581	502A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020017
INB0003985583	504A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020048
INB0003985584	505A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020029
INB0003985586	507A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020037
INB0003985587	508A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020049
INB0003985588	509A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020065
INB0003985589	510A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020063
INB0003985590	511A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020018
INB0003985591	512A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020050
INB0003985592	513A Palo Verde National Park	10:21:21.4000	-85:19:11.3000	<i>Acacia</i> spp.	EU020064
INB0003985706	514A Palo Verde National Park	10:19:59.9757	-85:15:09.9381	Unknown	EU020032
INB0003985707	515A Palo Verde National Park	10:19:59.9757	-85:15:09.9381	Unknown	EU020034
INB0003986150	517A Palo Verde National Park	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Guazuma ulmifolia</i>	EU020042
INB0003986152	519A Palo Verde National Park	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.	EU020051
INB0003986153	520A Palo Verde National Park	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.	EU020036
INB0003986154	521A Palo Verde National Park	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.	EU020028
INB0003986156	522A Palo Verde National Park	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	<i>Acacia</i> spp.	EU020052
INB0003986158	523A Palo Verde National Park	10:20:30.4000	-85:21:58.0000	Unknown	EU020043
INB0003986161	524A Palo Verde National Park	10:23:09.7000	-85:21:16.4000	Unknown	EU020041
INB0003986162	525A Barra Honda National Park	10:10:13.2000	-85:21:24.8000	Unknown	EU020035
INB0003986166	526A Barra Honda National Park	10:09:59.0000	-85:21:26.5000	Vine-like plant	EU020038
INB0003986170	527A Barra Honda National Park	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Unknown	EU020044
INB0003986171	528A Barra Honda National Park	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Unknown	EU020033
INB0003986172	529A Barra Honda National Park	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Vine-like plant	EU020040
INB0003986177	530A Barra Honda Biological Reserve	10:10:29.8000	-85:22:19.4000	Unknown	EU020039
INB0003986185	531A Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	<i>Nectandra</i> spp.	EU020053
INB0003986187	532A Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Unknown	EU020026

INB0003986188	533A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:23.0000	-83:01:27.0000	<i>Inga</i> spp.	EU020019
INB0003986189	534A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	Unknown	EU020046
INB0003986190	535A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Terminalia</i> spp.	EU020047
INB0003986191	536A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.	EU020054
INB0003986192	537A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.	EU020055
INB0003986193	538A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.	EU020030
INB0003986194	539A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	<i>Inga</i> spp.	EU020056
INB0003986086	540A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	<i>Nectandra</i> spp.	EU020021
INB0003986087	541A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	<i>Nectandra</i> spp.	EU020027
INB0003986092	542A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:23.0000	-83:01:27.0000	<i>Citrus</i> spp.	EU020024
INB0003986101	543A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Unknown	EU020031
INB0003986106	544A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Unknown	EU020045
INB0003986108	545A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:19.9768	-83:01:44.5992	Unknown	EU020057
INB0003986111	546A	Hitoy Cerere Biological Reserve	09:40:23.0000	-83:01:27.0000	Unknown	EU020025
INB0003986114	547A	Cahuita National Park	09:43:06.4000	-82:48:55.0000	Unknown	EU020058
INB0003986128	548A	Cahuita National Park	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	Unknown	EU020023
INB0003986131	549A	Cahuita National Park	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	Unknown	EU020020
INB0003986132	550A	Cahuita National Park	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	Unknown	EU020059
INB0003986134	551A	Cahuita National Park	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	<i>Terminalia</i> spp.	EU020022
INB0003986136	552A	Cahuita National Park	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	<i>Terminalia</i> spp.	EU020060
INB0003986141	553A	Cahuita National Park	09:44:07.0000	-82:50:11.7000	<i>Terminalia</i> spp.	EU020061

TABLE 2.

Analyses of molecular variance (AMOVA) results and fixation index (Fst) inferred from the ITS region sequences from isolates of Rhytidhysterium rufulum, Costa Rica

<i>Source of variation</i>	<i>df</i>	<i>Sum of squares</i>	<i>Variance components</i>	<i>Percentage variation</i>
Among clades	3	366.155	10.85097 Va	94.92
Within clades	44	25.572	0.58119 Vb	5.08
Total	47	391.727	11.43215	
Fixation index		F _{ST} : 0.94916		

TABLE 3

Values of the continuous characters measured by the clades found in the molecular analyses. Different upper case letter by columns indicate significant differences between clades ($p \leq 0.05$) by the Tukey test.

Clade	Ascus length (μm)	Ascus width (μm)	Ascospore length (μm)	Ascospore width (μm)
I	(215-)234-256(-269) A	(12.6-)13.9-15.2(-16.0) A	(27.9-)30.9-32.2(-36.9) A	(9.2-)10.6-12.3(-14.3) A
II	(218-)224-257(-284) A	(15.0-)15.7-16.7(-17.3) B	(31.3-)32.6-36.4(-37.0) B	(10.4-)11.7-13.0(-14.4) A
III	(183-)200-221(-237) B	(11.6-)12.2-13.0(-13.5) C	(25.8-)29.1-30.3(-31.7) C	(8.2-)9.1-10.5(-11.6) B
IV	144-168 C	10.7-11.9 D	23.0-23.8 D	7.7-9.4 C

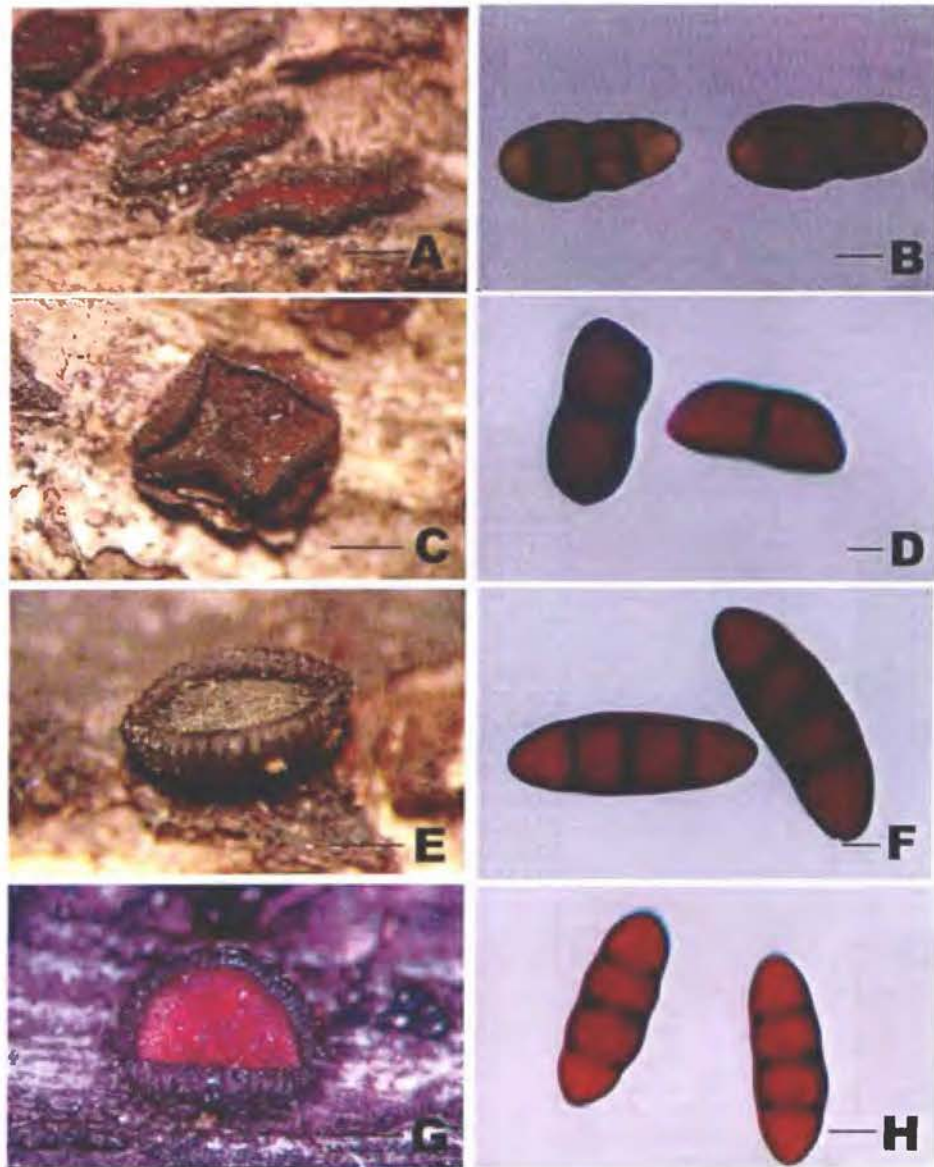


Fig 1. Morphology of *Rhytidhysteron* species. A&B. *R. opuntiae* A. Ascoma. B. Ascospore. C&D *R. hysterinum* C. Ascoma D. Ascospore E&F. *R. rufulum* E. Ascoma F. Ascospores. G&H *R. rufulum* Neotype G. Ascoma H. Ascospore. Bars: A,C,E,G, 0.5 mm; B,D,F,H, 5 μ m.

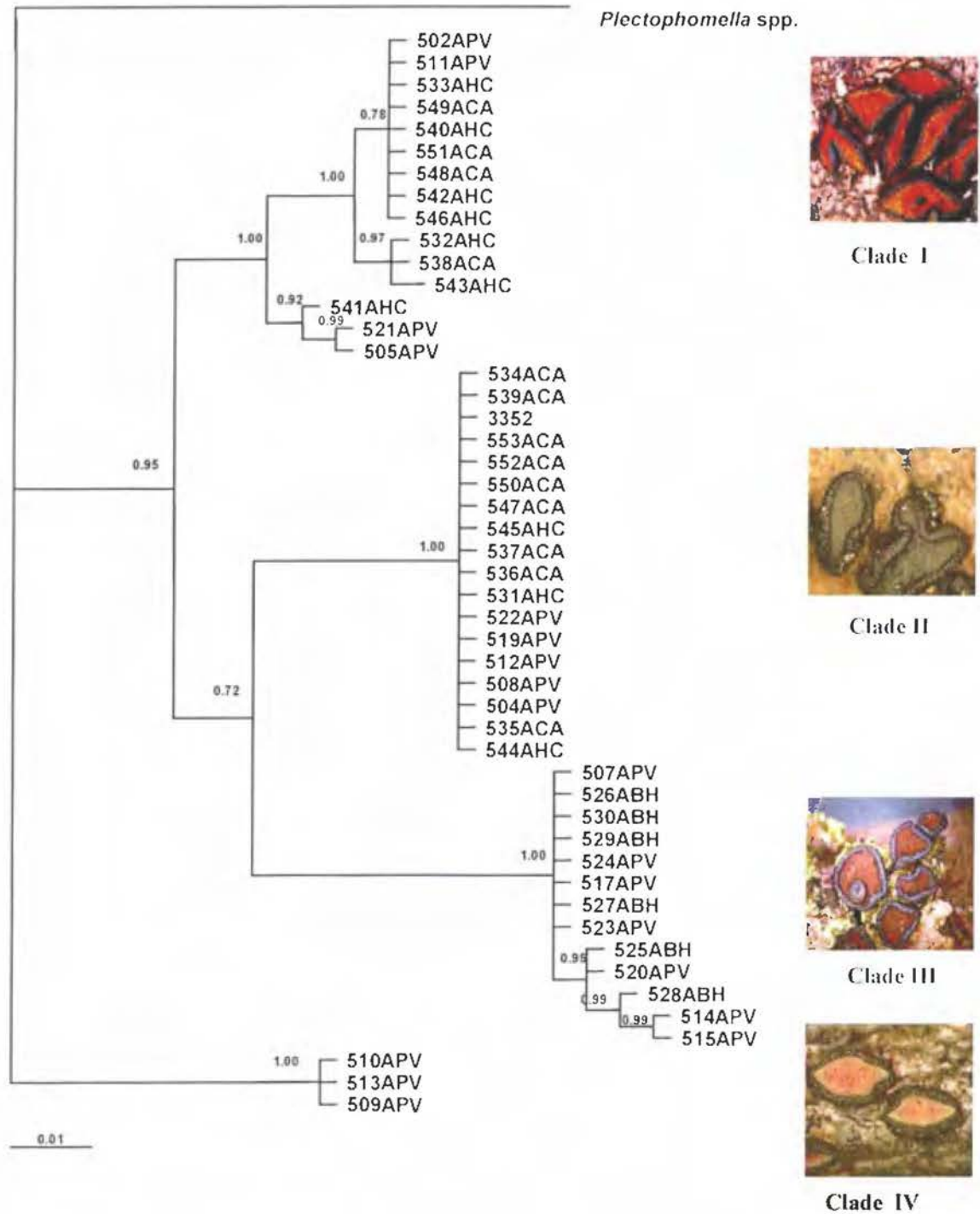


Fig 2. Phylogeny of *Rhytidhysteron* isolates from Costa Rica as inferred from an ITS sequence analysis. This is a 50% majority-rule consensus tree based on 19 000 trees from a B/MCMC tree sampling procedure based on 501 bp. Collecting sites are given immediately after the id number: Palo Verde (PV), Barra Honda (BH), Cahuita (CA) and Hitoy Cerere (HC). *Plectophomella* spp. was used as out group.

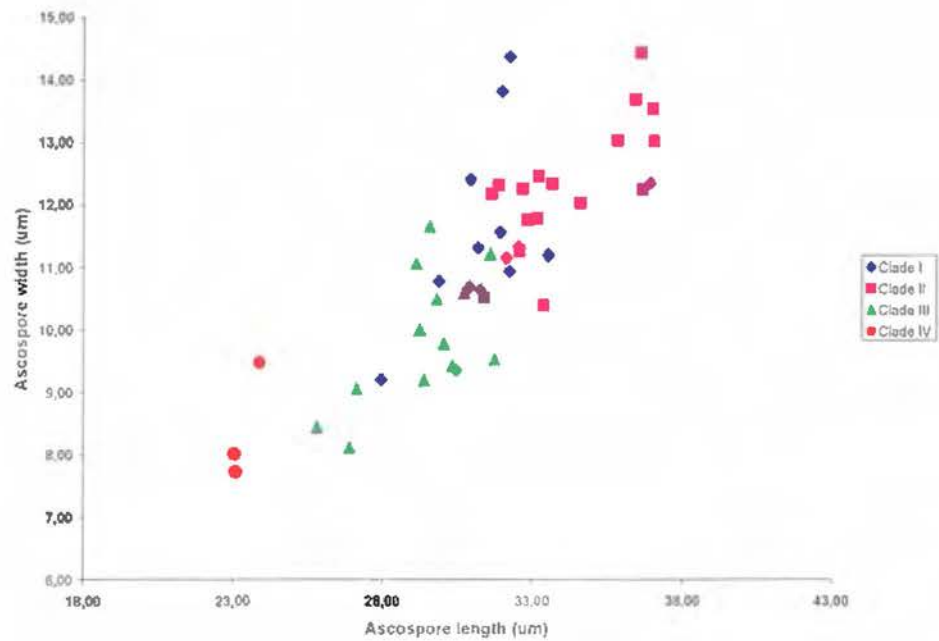


Fig 3. Variation in ascospore length and ascospore width among the samples belonging to the four distinct lineages.

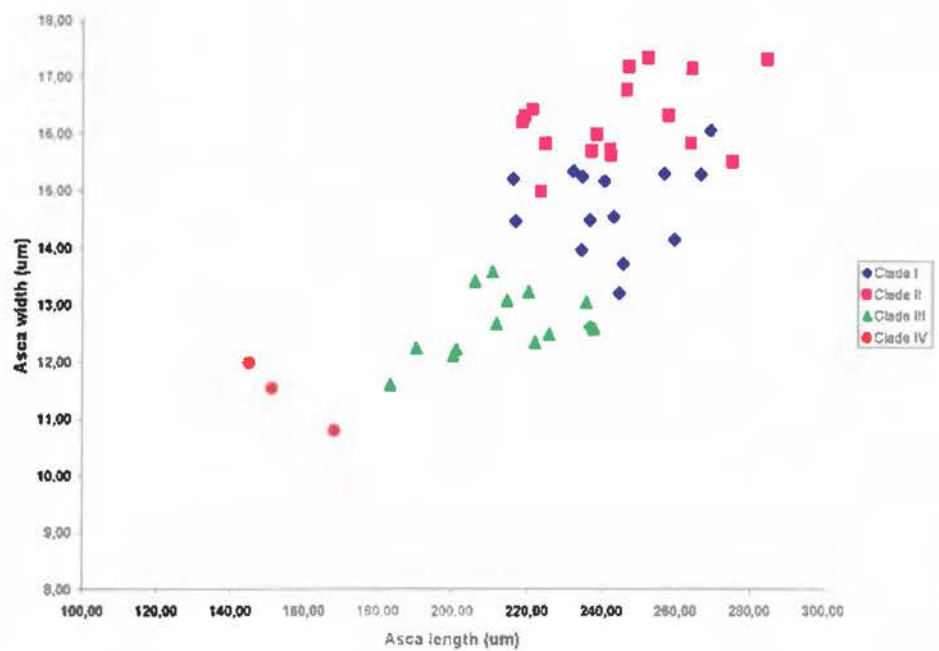


Fig 4. Variation in asca length and width among the samples belonging to the four distinct lineages.

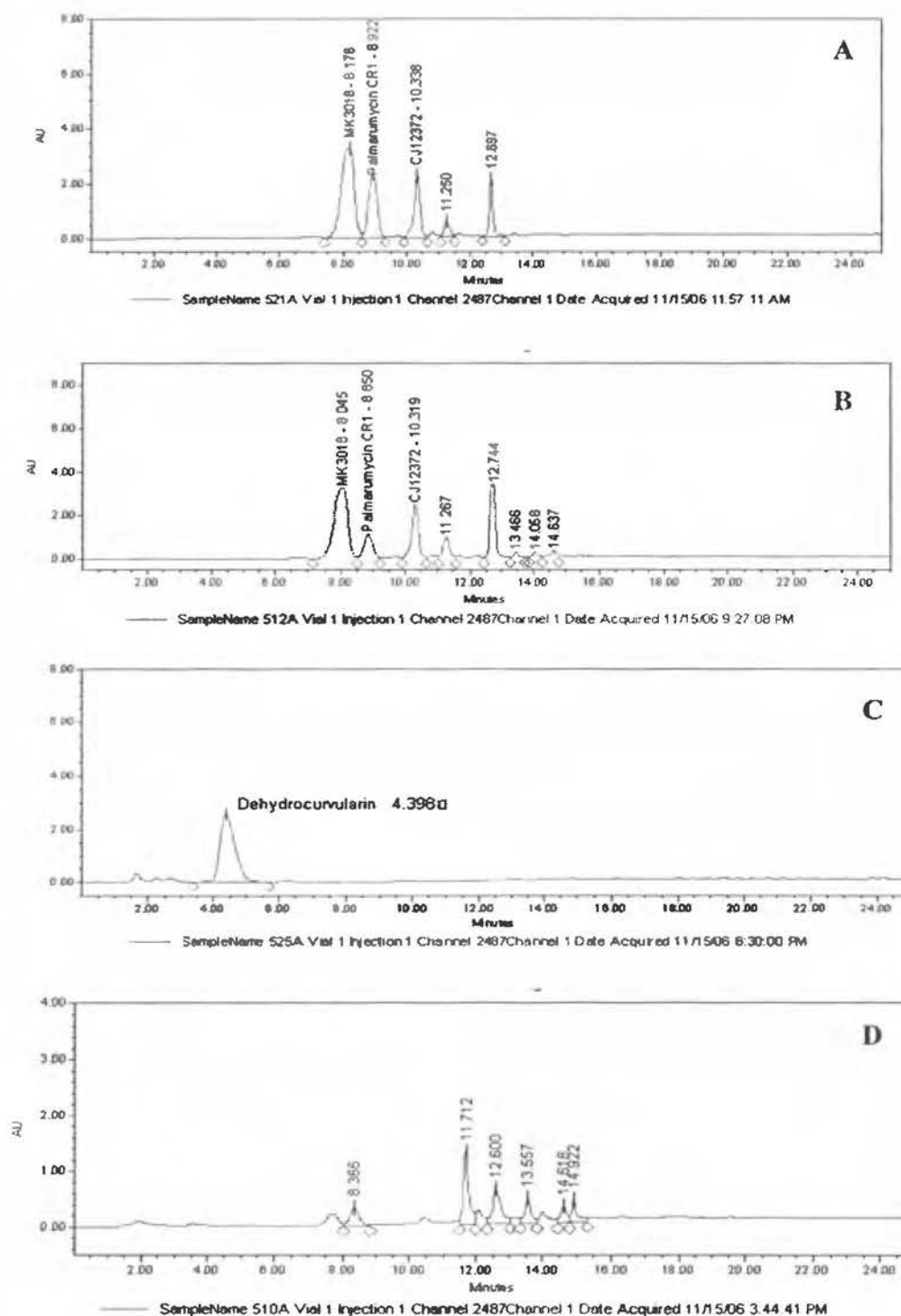


Fig 5. HPLC traces (220 nm) of crude extracts prepared from liquid cultures of *Rhytidhysteron rufulum* from Costa Rica. The occurrence of the peaks is indicated in the corresponding chromatograms A=sample 521A-Clade I, B=sample 512A-Clade II, C= sample 525A-Clade III, D= sample 510A-Clade IV.

ANEXO I

ACTA 2051

Acta de la Sesión 2051 del Tribunal Examinador del Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica, celebrada el 14 de agosto del 2007, con el objeto de proceder al Examen de Grado de **Catalina Murillo Cruz**, carné universitario 902543, quien opta al Grado de *Magister Scientiae en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular*. Presentes los señores: Dr. Ramiro Barrantes Mesén, en Representación del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado, Ph.D. Federico Albertazzi Castro, Ph.D. Julieta Carranza Velásquez, Ph.D. Giselle Tamayo Castillo, M.Sc. Andrés Gatica Arias, en Representación del Director del Programa de Posgrado en Biología.

ARTICULO 1

El Presidente informa que el expediente de la estudiante **Murillo Cruz** contiene todos los documentos que el Reglamento exige. Declara que la postulante ha cumplido con todos los requisitos del Programa de Posgrado en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular.

ARTICULO 2

La estudiante **Murillo Cruz** hizo la exposición de la tesis titulada: **Caracterización molecular y química del género *Rhytidysteron* (Ascomycota, Patellariales) en Costa Rica.**

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogaron a la postulante el tiempo reglamentario. Las respuestas fueron satisfactorias en opinión del Tribunal.

ARTICULO 4

Concluido el interrogatorio, el Tribunal procedió a deliberar.

ARTICULO 5

Efectuada la votación el Tribunal Examinador consideró la tesis satisfactoria y la declaró aprobada.

ARTICULO 6

El Presidente del Tribunal comunicó en público a la postulante el resultado de la deliberación y la declaró acreedora al grado de Magister Scientiarum en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular. Se le indicó la obligación de presentarse al acto público para juramentarse. Luego se dio lectura al acto que firmaron los miembros del Tribunal a las 11:15 horas.

T.Z.L

Representante/
Decano, Sistema Estudios Posgrado

Director (a) de la tesis

Asesor (a)

Asesor (a)

Director(a)/ Representante
Programa de Posgrado

OBSERVACIONES:

1. La postulante se hizo acreedora a la MENCIÓN HONORÍFICA
2. Por razones fuera de nuestro control el MSc. Andrés Caticari, representante del Director del Programa de Posgrado en Biología, no asistió a la reunión.

T.Z.L