



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



Caracterización morfológica y molecular de *Guignardia citricarpa*, agente causal de la Mancha Negra de los cítricos.

Mariana Menoni Ceriotti

Tutora: Ing. Agr. Mercedes Peyrou, MSc.

Departamento de Biología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable



Licenciatura en Bioquímica
Setiembre-2011

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora Mercedes por permitirme realizar mi pasantía de grado y por brindarme siempre su apoyo y cariño. Junto a ella aprendí mucho en el ámbito profesional, así como también en lo personal.

A Luis por estar siempre dispuesto a dar una mano, por compartir toda su experiencia y por proporcionarme, al igual que Elena y Guillermo, aislamientos y mucha colaboración para el desarrollo de este trabajo.

A Andresa por proporcionarme aislamientos ya caracterizados, utilizados como cepas de referencia en el presente trabajo.

A mi amiga y compañera Lu (Lucila) que gracias a ella conocí el Departamento de Biología Molecular y con la que compartí muy lindos momentos, desde el inicio de la carrera.

A todos mis compañeros de laboratorio por su buena onda y buena disposición para ayudar siempre o dar un buen consejo. En especial a Lu (Lucina), Pao, Marianne y Raquel por alentarme siempre y por esas largas charlas hasta tarde con algún mate de por medio.

A mis amigos y a mis compañeras de estudio con las que compartí largas jornadas preparando parciales y exámenes.

A toda mi familia que me apoyó siempre a lo largo de la carrera, mis padres a la distancia y mi hermano en el día a día y por supuesto a Claudio que me bancó siempre durante todos estos años, brindándome mucho apoyo y cariño. A mis abuelos que ya no están, Baba y Tato, que aunque nunca entendieron mucho lo que estudiaba, siempre me alentaron y les hubiese encantado compartir este momento conmigo.

Agradezco también el apoyo financiero brindado por la ANII, mediante la beca de iniciación a la investigación.

ABREVIATURAS

AA	Agar Avena
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Pares de bases
BrEt	Bromuro de Etidio
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Gc	<i>Guignardia citricarpa</i>
Gm	<i>Guignardia mangiferae</i>
h	Horas
ISSR-PCR	<i>Inter single sequence repeat anchored-polymerase chain reaction</i>
ITS	Secuencias espaciadoras internas al transcripto
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MNC	Mancha Negra de los Cítricos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramo
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa

rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
U	Unidades
µg	Microgramo
µL	Microlitro

RESUMEN

Guignardia citricarpa Kiely es un hongo ascomicete de suma importancia para el área citrícola, ya que es el responsable de la enfermedad denominada Mancha Negra de los Cítricos (MNC). También se lo ha reportado presente en forma endófito en varias especies vegetales, incluyendo los cítricos. La enfermedad MNC se caracteriza por el manchado de la fruta, con la consecuente depreciación de la misma, aunque la característica más importante es la restricción fitosanitaria impuesta por el mercado internacional. Debido a que el patógeno es considerado reglamentado A1 para la Comunidad Europea, donde no ha sido reportado, no está permitido el ingreso de fruta infectada a dicha región, causando importantes pérdidas económicas a los países exportadores de fruta fresca como Uruguay.

En el presente trabajo se planteó realizar una caracterización morfológica y molecular de aislamientos identificados como *G.citricarpa* provenientes de muestras cítricas con sintomatología típica de mancha negra y similitud de morfología de colonia. Para la caracterización morfológica se evaluó la velocidad de crecimiento de las colonias en PDA (Agar Papa Dextrosa), el color y grado de lobulación de las mismas, la presencia de halo amarillo en medio Agar Avena y la morfología y tamaño de los conidios. Para la caracterización molecular se ensayó la reacción de ISSR–PCR con dos cebadores distintos y la secuenciación de la región ITS1–5.8S –ITS2.

La información de la secuencia de la región ITS identificó a 25 de los 31 aislamientos analizados, como *G. citricarpa* presentando los 6 restantes similitud con *Phyllosticta citribraziliensis*. Las diferencias encontradas en las demás características estudiadas ratificaron esta separación de especies. El grupo de aislamientos pertenecientes a *G.citricarpa* mostró poca diversidad en las características estudiadas, a excepción de la velocidad de crecimiento que dividió a los aislamientos en tres grupos significativamente diferentes. Por lo tanto, se evidencia la importancia de contar con un método de identificación molecular, ya que *G. citricarpa* es fácilmente confundible con otras especies endófitas y se trata de un patógeno con restricciones fitosanitarias al comercio.

ÍNDICE

Agradecimientos	1
Abreviaturas	2
Resumen	4
Índice	5
1 Introducción	7
1.1 Hongos endófitos de plantas y hongos fitopatógenos.....	7
1.2 El género <i>Guignardia</i> y su anamorfo <i>Phyllosticta</i>	8
1.3 Identificación de <i>G. citricarpa</i>	10
1.3.1 Identificación morfológica.....	10
1.3.2 Identificación molecular.....	11
1.4 Caracterización de <i>G. citricarpa</i>	12
1.4.1 Caracterización morfológica.....	12
1.4.2 Caracterización molecular.....	13
1.5 Conservación de aislamientos.....	14
1.6 Mancha Negra de los Cítricos.....	15
1.6.1 Origen y distribución.....	15
1.6.2 Sintomatología.....	16
1.6.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad.....	18
1.6.4 Importancia económica y restricciones fitosanitarias.....	20
1.6.5 Control de la MNC.....	21
2 Objetivos	23
3 Materiales y métodos	24
3.1 Aislamiento de <i>Phyllosticta</i> sp.....	24
3.2 Obtención de cultivos monospóricos.....	26
3.3 Patogenicidad.....	26
3.4 Tasa de crecimiento y morfología de colonia.....	27
3.5 Resistencia al fungicida Benomil.....	27
3.6 Medida de los conidios y su envoltura.....	27
3.7 Extracción de ADN genómico.....	28
3.7.1 Extracción con kit comercial.....	28
3.7.2 Extracción rápida de ADN genómico.....	29
3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
3.8.1 PCR específica para <i>G. citricarpa</i>	29
3.8.2 PCR diferencial para <i>G. citricarpa</i> y <i>G. mangiferae</i>	30

3.8.3	ISSR – PCR.....	30
3.8.4	PCR con oligonucleótidos universales.....	30
3.9	Oligonucleótidos cebadores.....	31
3.10	Corridas electroforéticas.....	31
3.11	Análisis de secuencias nucleotídicas.....	32
3.12	Conservación de aislamientos.....	33
3.12.1	Método del aceite.....	33
3.12.2	Método del papel.....	34
4	Resultados	35
4.1	Aislamiento de <i>Phyllosticta</i> spp.....	35
4.2	Caracterización fenotípica.....	36
4.2.1	Patogenicidad.....	36
4.2.2	Velocidad de crecimiento.....	37
4.2.3	Tamaño de los conidios.....	38
4.2.4	Resistencia a Benomil.....	39
4.3	Extracción de ADN.....	39
4.4	Confirmación por PCR.....	41
4.5	Caracterización molecular.....	42
4.5.1	ISSR – PCR.....	42
4.5.2	Secuenciación de la región ITS1–5.8S–ITS2.....	44
4.6	Conservación de aislamientos.....	47
5	Discusión	48
6	Conclusiones	53
7	Perspectivas	54
8	Bibliografía	55
	Anexos	61

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Hongos endófitos de plantas y hongos fitopatógenos

Muchos trabajos de investigación sugieren que, en ecosistemas naturales, todas o la mayoría de las plantas se encuentran colonizadas en forma simbiótica por hongos endófitos (Rodríguez *et al.*, 2009). Estos hongos pueden tener efectos importantes en el “fitness” y evolución de la planta, afectando la estructura y diversidad de comunidades de organismos, por ejemplo, de bacterias, nematodos e insectos (Omacini *et al.*, 2001)

Se denomina hongos endófitos a aquellos que se encuentran en el interior de las plantas durante todo su ciclo de vida o parte de él y que no causan daños aparentes en el hospedador. Se considera que entre estos hongos y sus hospedadores existe una relación mutualista neutra, a diferencia de los hongos fitopatógenos que causan diversas enfermedades en plantas (Carroll, 1988). Generalmente, los hongos endófitos se encuentran en los espacios intercelulares y pueden ser identificados por examen microscópico del tejido vegetal o por aislamiento en medios de cultivo.

Es discutida la distinción exacta entre microorganismos epífitos, endófitos y patógenos. Un microorganismo epífito puede, eventualmente, ser encontrado dentro de una planta; un endófito, en ciertas condiciones, puede tornarse patogénico y un patógeno, en determinadas condiciones, no afecta a su hospedero, pudiendo ser considerado como endófito (Azevedo *et al.*, 1998). La comunidad endofítica, cuya composición varía en función del hospedero y de las condiciones ambientales, se interrelaciona dentro de la planta en un equilibrio armónico. La pérdida de ese equilibrio afecta el comportamiento de los integrantes de la comunidad, dando

condiciones para que hongos oportunistas manifiesten su potencial patogénico para el hospedero (Maki, 2006).

Los hongos endófitos son capaces de producir metabolitos secundarios de gran importancia biotecnológica. Por ejemplo, se han reportado aislamientos del género *Gliocladium* sp. que producen compuestos orgánicos volátiles capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos *in vitro*, presentando gran potencial para la agricultura (Stinson *et al.*, 2003). También se han aislado hongos endófitos capaces de producir compuestos con aplicaciones en el área de la medicina. Éste es el caso de *Taxomyces andreanae*, que es capaz de producir Taxol, una importante droga utilizada para tratar pacientes con cáncer (Stierle *et al.*, 1993; Kumaran *et al.*, 2008).

Dentro de los hongos endófitos de aislamiento frecuente, se destaca el género *Phyllosticta*, que corresponde a la forma anamórfica del ascomicete *Guignardia* (Santamaría *et al.*, 2005). La diferenciación de especies dentro del género *Phyllosticta* está basada principalmente en el hospedero del cual fue aislada y en características morfológicas del micelio y de estructuras reproductivas tales como picnidios y conidios. Los hongos del género *Guignardia* han sido asociados con diversas enfermedades de las plantas, inclusive la Mancha Negra de los Cítricos (MNC). Sin embargo, cepas de este género son aisladas del interior de tejidos de varias especies cítricas sin síntomas de MNC, es decir, en plantas asintomáticas, siendo entonces denominadas endófitas. Con los avances en biología molecular, ha sido posible elaborar un perfil más preciso en la caracterización de estas especies y muchas clasificaciones están en proceso de revisión (Glienke *et al.*, 2011).

Se ha reportado que el extracto crudo producido por una cepa del género *Guignardia*, aislada como endófito de una planta perteneciente a la familia *Anacardiaceae*, exhibe una potente actividad antimicrobiana, identificándose al compuesto antimicrobiano como Ácido Guignárdico (Rodrigues *et al.*, 2000).

1.2 El género *Guignardia* y su anamorfo *Phyllosticta*

El género *Guignardia* fue descrito en el año 1982 y comprende las formas teleomórficas de especies del género *Phyllosticta* (Silva, 2008). Diversos autores han aislado especies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente sanas, describiéndolas como endófitas (Baayen *et al.*, 2002). Sin embargo, existe un gran número de reportes

que citan este género como fitopatógeno de diversos cultivos con gran importancia económica como arroz, caña de azúcar, eucalipto y principalmente cítricos (Baayen *et al.*, 2002; Silva, 2008).

Guignardia citricarpa Kiely (Gc) se comporta como patógeno frente a especies cítricas, causando la enfermedad denominada Mancha Negra de los cítricos (MNC). Existen diversos reportes de este patógeno afectando distintas especies cítricas, en varios países (Meyer *et al.*, 2001, 2006; Bonants *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2005; Everett *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2007; Baldassari *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2008). Sin embargo, también se la ha reportado como endófito de plantas cítricas, tal vez debido al largo período de latencia que posee antes de manifestar los síntomas de la enfermedad (Glienke-Blanco *et al.*, 2002).

Existe un trabajo en el cuál se reporta a Gc como productora de grandes cantidades de Taxol *in vitro*, presentando un importante potencial biotecnológico para la industria farmacéutica (Kumaran *et al.*, 2008).

Guignardia citricarpa Kiely pertenece al Filo Ascomycota, Clase Dothideomycetes, Orden Botryosphaeriales y Familia Botryosphaeriaceae (Crous *et al.*, 2004). El estado asexual, *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa, se encuentra en frutas y hojas de la planta, mientras que la fase sexual, Gc, sólo se genera en hojas desprendidas en proceso de descomposición en el suelo.

Existe otra especie perteneciente al género *Guignardia*, denominada *G. mangiferae* A.J.Roy (Gm) (anamorfo *Phyllosticta capitalensis* (P.Hennings) Van Der Aa relacionada morfológica y filogenéticamente con la especie patogénica. Gm es endófito de muchas especies vegetales tropicales y subtropicales, incluidas las especies cítricas (Holliday, 1980; Baayen *et al.*, 2002). Esta endófito se encuentra ampliamente distribuida y está presente en las principales regiones citrícolas del mundo, por lo que no posee restricción fitosanitaria. Es considerada no patogénica, aunque existe un reporte en Argentina, citado por Peres *et al.*, 2007, de esta especie asociada a síntomas de moteado en frutos de limón. Además, se ha reportado a las dos especies (Gc y Gm) coexistiendo en el mismo hospedero cítrico, incluso en el mismo síntoma (Baldassari *et al.*, 2008).

Gm y Gc poseen diferentes habilidades para producir enzimas hidrolíticas, especialmente pectinasas, sugiriendo que estas enzimas pueden tener distintos roles durante la interacción del patógeno y del endófito con la planta (Romão *et al.*, 2011).

El cultivo *in vitro* de Gc sobre Agar Papa Dextrosa (PDA), produce colonias que se describen como oscuras, estromáticas, de crecimiento lento, con margen lobado y

con picnidios formados a los 10-14 días de edad. Éstos desarrollan conidios elípticos, hialinos, multigutulados, flagelados y rodeados de una cubierta incolora y gelatinosa característicos. (EPPO, 2003).

1.3 Identificación de *G. citricarpa*

La identificación precisa de los microorganismos patógenos es fundamental tanto para la aplicación de correctas y eficaces medidas de control así como para el cumplimiento de los acuerdos fitosanitarios internacionales existentes sobre distintos productos vegetales y sus patógenos.

1.3.1 Identificación morfológica

Uno de los métodos para identificar la enfermedad en frutas y hojas con síntomas típicos es el método morfológico o clásico. Para ello se cultivan las lesiones *in vitro* sobre medio de cultivo sólido apropiado, hasta obtener colonias típicas del patógeno. Una vez obtenidas las colonias, se evalúan las características identificatorias como la tasa de crecimiento, la producción de pigmento amarillo, el tamaño y forma de los conidios y el grosor de su envoltura muscilaginosa. (EPPO, 2003).

Las colonias de Gc presentan un crecimiento lento, producen un pigmento amarillo en el medio de cultivo Agar Avena (AA) que difunde alrededor de la colonia, los conidios son elípticos de 9.4-12.7 x 5.0-8.5 μm de tamaño, y están rodeados de una capa incolora y gelatinosa cuyo grosor es menor a 1.5 μm . Estas características permiten diferenciar la especie patogénica de la no patogénica, ya que ésta última presenta una mayor tasa de crecimiento, no produce pigmento amarillo en AA (Hidalgo y Pérez, 2010) y la envoltura gelatinosa de los conidios es mayor a 1.5 μm . (Baayen *et al*, 2002; EPPO, 2003).

Para que la colonia tenga un tamaño adecuado para su identificación por las características mencionadas en medio PDA, se requiere una incubación a 22 °C durante 14 días. Por otra parte, el método de aislamiento descrito posee una eficacia menor al 10% (EPPO, 2003). A pesar de estas limitantes, este método aún se practica en Uruguay y otros países.

1.3.2 Identificación molecular

El desarrollo de métodos moleculares ha permitido diferenciar al patógeno causante de la mancha negra de los cítricos, Gc, de endófitos como Gm (Bonants et al., 2003; Van Gent-Pelzer et al., 2007), aunque no se conocen aún las características fisiológicas asociadas a la patogenicidad (Romão *et al.*, 2011).

Los métodos moleculares se basan en la amplificación de una secuencia específica del ADN, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En el caso de Gc se han desarrollado varios oligonucleótidos cebadores para amplificar las secuencias espaciadoras internas al transcripto (ITS) del gen del ARN ribosomal (ARNr) (EPPO, 2003; Hidalgo y Pérez, 2010). Los genes del ARNr se encuentran altamente conservados en hongos, mientras que en las regiones ITS se encuentran áreas con distinto grado de conservación, lo que permite la generación de cebadores específicos para especies o géneros (Trtkova y Vladislav, 2006).

Esta misma región permite la diferenciación entre las especies Gc y Gm por PCR. Es el caso del par de cebadores GCF3/GCR7 para Gc y GCF2/GCR4 para Gm (Bonants *et al.*, 2003), ambos juegos diseñados para amplificar las regiones del ITS1 y el ITS2 (Figura N° 1). Everett y Rees-George (2006) describieron el par de cebadores JRGGm y el par JRGGc, para la identificación específica de Gm y Gc, respectivamente. Otro sistema que combina el par de cebadores CITIRC1/CAMEL2 con el cebador universal ITS4, permite identificar ambas especies en una misma reacción, ya que amplifican distintos segmentos (de distintos tamaños) según sea la especie (Meyer *et al.*, 2006).

Los métodos moleculares son más robustos que los clásicos, ya que el resultado del diagnóstico se obtiene en poco tiempo y posee una eficacia del 99% (EPPO, 2003).

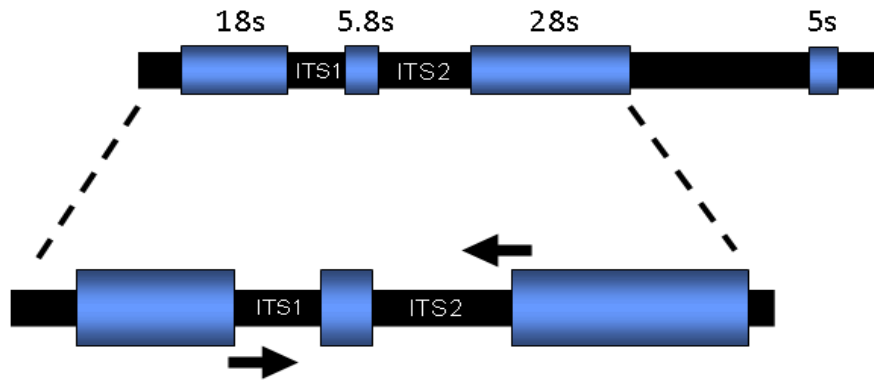


Figura N° 1: Esquema del cluster del ARNr eucariota. Las flechas indican las zonas donde se aparean los cebadores que permiten amplificar las regiones del ITS1 y del ITS2. (Imagen tomada y modificada de <http://phytophthora-id.org/Protocol.htm>)

1.4 Caracterización de *G. citricarpa*

Conocer la composición de la población de patógenos existentes en una región y evaluar su diversidad resulta imprescindible tanto para su manejo en el laboratorio (aspectos morfológicos, tiempos de crecimiento, etc) como a la hora de plantearse medidas de control o poner a punto métodos de identificación.

Es posible realizar la caracterización por técnicas de micología clásicas y/o por técnicas moleculares.

1.4.1 Caracterización morfológica

Los métodos de caracterización morfológica se basan en la variabilidad fenotípica existente en las especies. Para ello se evalúa la variabilidad de las características morfológicas típicas, como la formación de picnidios y conidios, las dimensiones de los conidios, el ancho de la capa gelatinosa que los envuelve, el color que desarrollan las colonias, la tasa de crecimiento en distintos medios de cultivo, (Baayen *et al.*, 2002; Caixeta *et al.*, 2008; Wickert *et al.*, 2009).

La evaluación de la patogenicidad requiere contar con métodos de inoculación artificial de material vegetal que permita comparar tipo de síntoma, virulencia, latencia,

etc. de los distintos aislamientos en estudio. Hasta el momento no se ha logrado obtener material cítrico infectado con Gc y sintomático por inoculación artificial de plantines. Recientemente se reportó la obtención de síntomas en frutas inoculadas artificialmente en el período de susceptibilidad, que permite evaluar la patogenicidad de los aislamientos por los distintos síntomas desarrollados con la maduración de la fruta (Baldassari *et al.*, 2009). En Uruguay, tratándose de una enfermedad que restringe el comercio de fruta cítrica, es imposible realizar inoculaciones a nivel de campo y resulta dificultoso obtener plantas con fruta en invernaderos controlados. Por esta razón, la patogenicidad de los aislamientos se evalúa por la correlación que presenta esta característica con la capacidad, de los aislamientos patogénicos, de desarrollar pigmentación amarilla sobre medio AA (Baayen *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2008, 2009; Wickert *et al.*, 2009).

1.4.2 Caracterización molecular

Dentro de los métodos de caracterización molecular, se encuentran las técnicas basadas en la reacción de PCR, las más utilizadas para hongos son: Inter Single Sequence Repeat anchored-PCR (ISSR-PCR) (Hantula *et al.*, 1996; Grünig *et al.*, 2001, 2002; Rodrigues *et al.*, 2004) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Glienke-Blanco *et al.*, 2002) y Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Baldassari *et al.*, 2008).

Los ISSRs, también llamados microsatélites, son regiones que consisten en repeticiones en tándem de motivos simples, que pueden ser penta-, tetra-, tri- o dinucleótidos. La longitud de las secuencias en microsatélites tienden a ser altamente variable entre individuos, debido a las altas tasas de mutaciones que experimentan, ya que durante la replicación del ADN es probable que se cometan errores en estas regiones, eliminando o agregando unidades repetidas. Los ISSRs son amplificados por PCR, utilizando un oligonucleótido cebador con un motivo repetido de di- o trinucleótido, complementario a la secuencia del microsatélite. (Tóth *et al.*, 2000).

Otro de los métodos utilizados para caracterizar, que también depende de la reacción de PCR, es la secuenciación directa de una región específica del genoma, que presente variación intra-especie. Para ello se utiliza, en hongos, la región espaciadora ITS1 y la región ITS2 (que son transcriptas pero no traducidas) las cuales son más variables que los genes del ARNr. Se han diseñado los cebadores

universales ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), que hibridan con una región conservada de la subunidad 18S y 28S del gen del ARNr, respectivamente, permitiendo amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2.

Además de evaluar la variabilidad genética, estos marcadores moleculares permiten determinar relaciones filogenéticas y colaborar en la identificación de aislamientos que no se diferencian por otras características (Everett y Rees-George, 2006).

1.5 Conservación de aislamientos

La conservación de microorganismos patógenos es una herramienta de fundamental importancia para la investigación, en la medida que permite realizar estudios de caracterización, variabilidad, control y variaciones en el tiempo en las poblaciones que circulan en el país. Consiste en mantenerlos viables, minimizando la necesidad de repiques frecuentes, lo que disminuye la probabilidad de contaminación y acumulación de mutaciones en general, siendo una de sus consecuencias, la pérdida de virulencia (Cañedo *et al.*, 2004). La posibilidad de establecer estas colecciones de microorganismos depende, entre otras cosas, de la puesta a punto del método de conservación, que permita mantener por el mayor tiempo posible la viabilidad de dichos aislamientos, conservando sus características fenotípicas y estabilidad genética, de la forma más económica posible y adaptable a los medios que posea cada laboratorio.

En la actualidad existen varios métodos para conservar hongos por períodos prolongados e implican el uso de material variado. Existen dos principios de conservación: 1) donde se reduce el metabolismo y 2) donde se induce la dormancia de los conidios o esporas. La reducción del metabolismo, incluye la conservación mediante bajas temperaturas, uso de aceite mineral, agua estéril, suelo estéril, etc. En la inducción de la dormancia, se incluye el secado sobre sílica gel, la liofilización y el uso de nitrógeno líquido (la criogenia, o sea el mantenimiento a temperaturas por debajo del punto de congelación). Estos últimos métodos requieren de aparatos especiales y de insumos más costosos (Cañedo *et al.*, 2004).

1.6 Mancha Negra de los Cítricos

La enfermedad denominada “Mancha negra de los cítricos” es causada por el hongo *Guignardia citricarpa* (anamorfo *Phyllosticta citricarpa*) y afecta principalmente los frutos de todas las especies de cítricos comerciales (Kotzé, 2000), aunque las hojas y los tallos también pueden ser infectados (NAPFFAST, 2009). Esta enfermedad perjudica sólo la corteza de los frutos y no causa podredumbre (Kotzé, 2000). Se manifiesta con lesiones necróticas en la superficie de hojas y frutos y en ataques muy severos, o cuando se producen manchas cerca del cáliz se puede producir la caída prematura de éstos últimos (Aguilar – Vildoso *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2008). Las lesiones, generalmente, sólo producen daño cosmético, ya que no afectan la calidad interna de los frutos, pero recobran importancia en el mercado de fruta fresca (Kotzé, 1981).

Dicho patógeno ataca exclusivamente plantas del género *Citrus* (Baayen *et al.*, 2002) y todas las especies comerciales de *Citrus spp.* son susceptibles, con la excepción de la naranja amarga (*C. aurantium*) y sus híbridos. Los limones (*C. limon*) son particularmente susceptibles a la enfermedad, así como también la naranja Valencia (*C. sinensis*) (Kotzé, 1981).

Esta enfermedad se manifiesta en regiones subtropicales con precipitaciones en verano (Kotzé, 2000), donde se observan relativamente altas temperaturas y humedad. En Uruguay puede llegar a alcanzar mayor importancia en primavera y parte del verano, con la ocurrencia de precipitaciones en las estaciones mencionadas (Díaz *et al.*, 2007; Pérez y Alves, 2011)

1.6.1 Origen y distribución

El primer reporte de MNC en plantaciones cítricas se realizó en Australia, en el año 1895. Posteriormente fue reportada en África, Asia y América del Sur (Kotzé, 1981, 2000), incluyendo Uruguay (Paul, 2006), (Figura N° 2).

En la actualidad no se encuentra presente en los países de la Unión Europea (Baayen *et al.*, 2002, Bonants *et al.*, 2003) así como tampoco en Estados Unidos (Baayen *et al.*, 2002), a excepción del estado de Florida, donde fue reportada en Abril de 2010 (USDA, 2010).

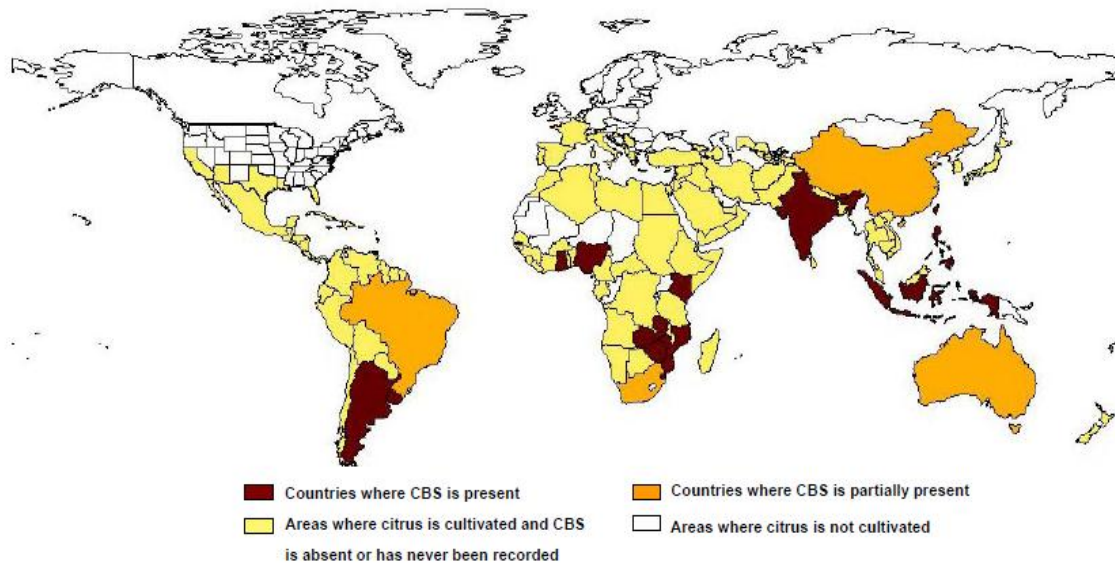


Figura N° 2: Distribución global de la Mancha Negra de los Cítricos según reportes oficiales (Paul, 2006).

1.6.2 Sintomatología

En las hojas y frutas cítricas se observan manchas que constituyen el daño principal que produce ésta enfermedad al depreciar la fruta afectada. Estas manchas en fruta presentan gran variabilidad y se clasifican principalmente en cuatro 4 tipos:

Mancha dura: aparece comúnmente desde inicios de la maduración, cuando la fruta comienza a cambiar de color. Las lesiones son aproximadamente circulares, de 2.5 a 3 mm de diámetro, presentan una zona central deprimida de color marrón claro, delimitada por un borde marrón oscuro sobresaliente. A menudo se observan en la zona clara pequeñas puntuaciones negras, que constituyen los picnidios (cuerpos fructíferos asexuales) del hongo causal (Kotzé, 1981, 2000), (Figura N° 3A).

Mancha en forma de peca: generalmente se observa en frutas maduras, luego del cambio de color de verde a amarillo o anaranjado y en poscosecha. Son pequeñas, de borde irregular o uniforme, levemente deprimidas, de color rosadas o rojizas. En el centro pueden aparecer los picnidios del hongo como puntos negros (Kotzé, 1981, 2000), (Figura N° 3B).

Mancha virulenta: aparece cuando los frutos están maduros, al final de la zafra. Puede manifestarse también después de la cosecha, durante el transporte y el almacenamiento. Son lesiones deprimidas, necróticas, marrones rojizas, de forma irregular y en el centro pueden presentar picnidios. Se forman por la coalescencia de manchas duras o manchas en forma de peca, dando origen a grandes lesiones (Kotzé, 1981,2000), (Figura N° 3C).

Falsa melanosis: se expresa al comienzo de la temporada y puede convertirse en mancha dura con el progreso de la misma. Son lesiones pequeñas, numerosas y negras, semejantes a las provocadas por *Phomopsis citri*, agente causal de la melanosis (Kotzé, 1981,2000), (Figura N° 3D).

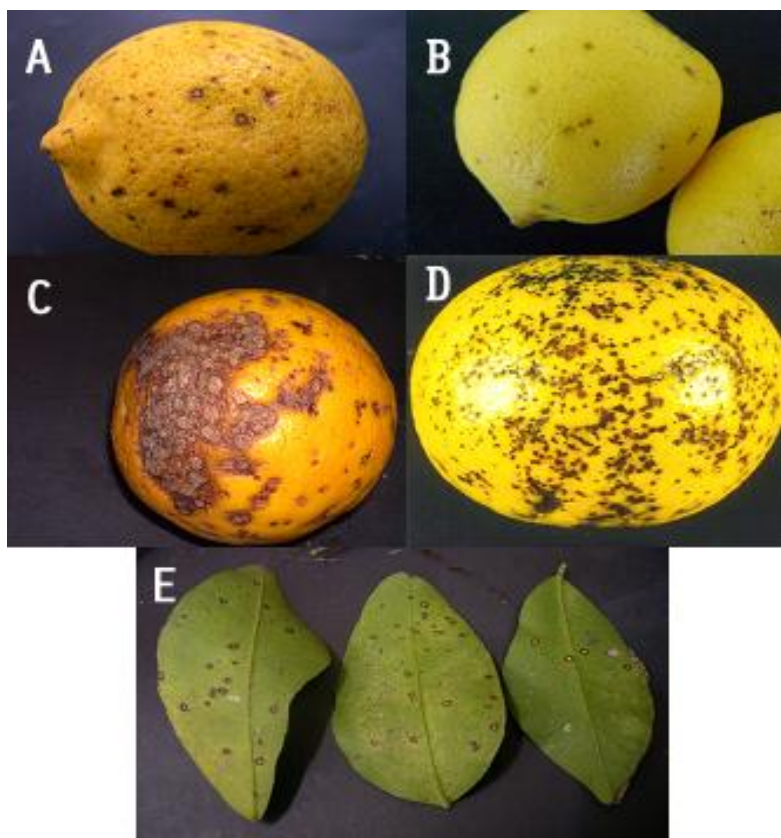


Figura N° 3: Principales síntomas producidos por la Mancha Negra de los Cítricos, encontrados en Uruguay en frutas y hojas. A, mancha dura; B, mancha en forma de peca; C, mancha virulenta; D, falsa melanosis y E mancha típica en hojas.

Los síntomas producidos en hojas son menos comunes y no poseen la variabilidad existente en fruta. Cuando se desarrollan, son semejantes a la mancha dura descrita para fruta (Figura N° 3E).

El desarrollo de los síntomas en frutos maduros se acelera con el aumento de la temperatura, la alta intensidad luminosa, la sequía y por el escaso vigor del árbol. Por lo general los árboles viejos se ven más afectados que los jóvenes (Kotzé, 2000).

1.6.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad

El éxito de una infección depende de la existencia de inóculo durante la primavera y el verano, de las condiciones cálidas y húmedas favorables para la infección y de la edad del fruto en relación con su susceptibilidad (Díaz, *et al*, 2007; Pérez y Alves, 2011). El período crítico de la infección comienza con la caída de los pétalos de los azahares. El fruto sigue siendo susceptible durante 4 a 5 meses, después de los cuales ya no se produce infección, independientemente de las condiciones climáticas o de la presencia de inóculo. (NAPPFAS, 2009; Kotzé, 2000).

Se requieren temporadas húmedas para la infección, luego de la cual existe un largo período de latencia de 3 años para las hojas y de hasta 15 meses para las frutas, razón por la cual las hojas raramente muestran síntomas antes de caer (Holliday, 1995). En esta etapa el hongo se encuentra latente, por lo que muchas veces es reportado como endófito de especies cítricas (Durán *et al.*, 2005). Al recolectar fruta infectada asintomática, la misma puede desarrollar los síntomas luego, durante el transporte o si se almacena a más de 21 °C (Holliday, 1995).

El patógeno produce el estado sexual (peritecios dando lugar a ascosporas) y el estado asexual (picnidios dando lugar a conidios) y los dos tipos de estructuras de fructificación se desarrollan abundantemente en hojas cítricas caídas. Durante períodos húmedos, las ascosporas eyectadas son dispersadas por corrientes de aire y causan infecciones directas en hojas y frutas jóvenes. Además, los conidios son dispersados por el agua y pueden salpicar frutas susceptibles. (Snowdon, 1990). (Figura N° 4).

Cuando la ascospora germina produce un tubo germinativo, a partir del cual penetra en la cutícula una pequeña hifa infecciosa (hifa de penetración) y se expande formando una masa de micelio entre la cutícula y la epidermis. El hongo permanece latente en este estado 4 – 6 meses, hasta que el fruto está completamente maduro y puede entonces crecer más hacia el interior de la corteza, produciendo los síntomas muchos meses después de que haya tenido lugar la infección. (Kotzé, 2000). Luego del período de latencia, se inducen lesiones principalmente en los frutos, órganos ricos

en pectina, sugiriendo que las enzimas pectinolíticas no están involucradas en las primeras etapas de infección (invasión y nutrición), sino que están relacionadas con el desarrollo de síntomas (Romão *et al*, 2011).

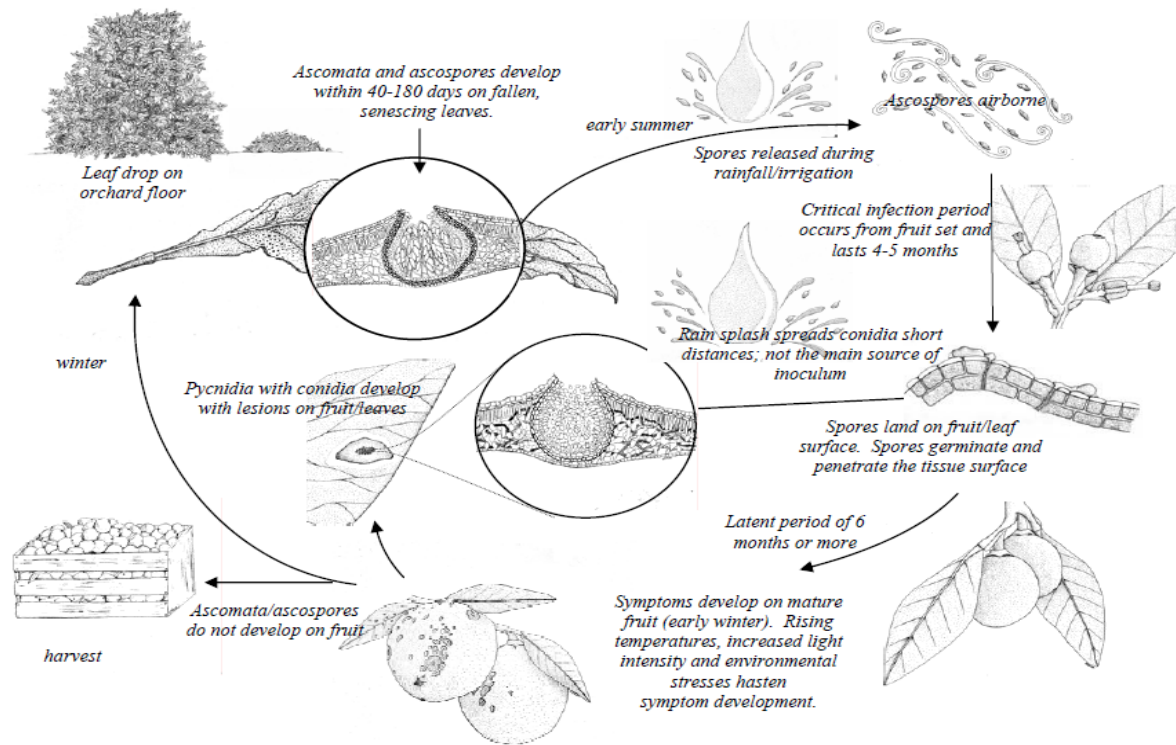


Figura N° 4: Ciclo de vida del patógeno *Guignardia citricarpa* (USDA-APHIS-PPQ, 2007).

Las ascosporas de la fase sexual son la principal fuente de inóculo (Kotzé, 2000) y son las responsables de la introducción del patógeno a nuevas áreas, mientras que el ciclo secundario de la enfermedad o fase asexual sería responsable por el incremento de la enfermedad en la misma planta o en plantas vecinas (Kotzé, 1981, 2000).

Los hongos que intentan colonizar plantas superiores deben enfrentarse a barreras fisiológicas impuestas por estos hospedantes como las ceras de superficie, la cutina y la pared celular. Uno de los efectos más evidentes de los microorganismos en la pared celular vegetal es la degradación enzimática, lo cual facilita el crecimiento del hongo y le provee de nutrientes (Romão *et al.*, 2011).

1.6.4 Importancia económica y restricciones fitosanitarias

Del total de la producción citrícola de Uruguay el 22% se destina a la industria, 30% al comercio interno y 48% a la exportación de fruta fresca. Ese 48% corresponde a 126.000 toneladas de fruta (datos del año 2009) que representan 68 millones de dólares de ingreso al país. Los principales destinos de esas exportaciones son los países de la Unión Europea, habiéndose exportado 105.000 toneladas en el año 2009. (MGAP, anuario 2010).

Debido a que el patógeno no ha sido reportado en los países miembros de la Unión Europea, éstos imponen restricciones fitosanitarias al comercio de fruta fresca. Gc es considerada una plaga reglamentada A1 para dicha región, ya que posee importancia económica y no está presente en esa región (EPPO, 2003, 2010).

Las regulaciones fitosanitarias impuestas por la Unión Europea tienen como objetivo prevenir la entrada y el establecimiento de la enfermedad a nuevas áreas. Si bien la importación de frutas cítricas desde regiones afectadas con MNC no está totalmente prohibida, debe existir un programa de control químico precosecha y no deben observarse síntomas de la enfermedad en la mercadería de exportación, en inspecciones oficiales a plantas de empaque y puertos. Luego, la importación es reinspeccionada por los servicios fitosanitarios, en los puertos de entrada a Europa. En caso de que la mercadería no cumpla con los requisitos impuestos o de constatarse la presencia de fruta con síntomas de MNC, el embarque es totalmente rechazado (Bonants *et al.*, 2003).

En Uruguay, el diagnóstico de la enfermedad lo realiza la DGSSAA en muestras de exportación, utilizando métodos convencionales de identificación. Al ingresar la fruta al mercado europeo, se inspecciona ocularmente y en caso de constatarse un síntoma sospechoso, se procede a la observación de características consideradas diagnósticas para esta enfermedad, como es el caso de los picnidios que se desarrollan en el centro de la lesión. De observarse microscópicamente tales picnidios en los tejidos de la lesión, se confirma la presencia del patógeno y se rechaza la mercadería sin más ensayos. (EPPO, 2003). En caso contrario, se realiza la identificación morfológica y molecular (EPPO, 2003). El principal problema planteado es el tiempo requerido para el transporte de la fruta a Europa y el largo período de latencia del patógeno, con lo cual frutas asintomáticas pueden desarrollar síntomas durante el transporte (Kotzé, 1981).

Las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad pueden ser sustanciales y los costos del control químico pueden ser significantes (EPPO, 2003), elevando el precio de la fruta fresca, con el consiguiente impacto adverso sobre el ambiente.

1.6.5 Control de la MNC

Entre las estrategias de control de esta enfermedad, el control químico es la más utilizada y se realiza principalmente mediante la pulverización de fungicidas en el período crítico de susceptibilidad de la fruta, es decir, desde la caída de los pétalos y hasta 4 ó 5 meses posteriores. Se realizan programas de pulverización de fungicidas de protección, de manera de minimizar la infección en el período de susceptibilidad. (Kotzé, 1981; Schutte *et al.*, 2003).

Algunos fungicidas, como los sistémicos y penetrantes, poseen serias dificultades en el control de enfermedades, ya que son compuestos selectivos y su acción se concentra en uno o unos pocos sitios en el metabolismo celular, aumentando su efectividad pero también el riesgo a desarrollar resistencia (Possiede *et al.*, 2009).

Los fungicidas registrados y de comprobada eficiencia en el control de la MNC se restringen a productos protectores a base de cobre o ditiocarbamatos, productos sistémicos (benzimidazoles) y translaminarios como las estrobirulinas. Los fungicidas protectores presentan un amplio espectro de acción y como intervienen en procesos metabólicos vitales para el hongo, presentan bajo riesgo de generación de resistencia. Los benzimidazoles, en cambio, actúan como fungicidas sistémicos, afectando específicamente la división celular, uniéndose selectivamente a la tubulina del hongo. Esta especificidad conlleva a que estos fungicidas presenten alto riesgo de resistencia adquirida por el patógeno. Los fungicidas de acción translaminar, como las estrobirulinas, también poseen acción específica sobre el patógeno, por lo cual presentan un alto riesgo de generar resistencia. (Rodrigues *et al.*, 2007).

Desde mediados de la década de 1990 se han reportado desde Africa del Sur, cepas del patógeno resistentes a benomil (Schutte, *et al.*, 2003)

Junto con los programas de control químico, se deben tomar otras medidas como evitar introducir el patógeno en áreas donde no ocurre la enfermedad, ya que una vez que se establece no es posible erradicarla completamente (Kotzé, 1981).

Además, la necesidad de programas de pulverización de grandes cantidades de fungicidas ha llevado a un importante aumento del costo de la producción de fruta fresca, así como la aparición de cepas resistentes a los fungicidas (Fialho, *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es obtener información sobre la diversidad genotípica y fenotípica de distintos aislamientos de *Guignardia citricarpa*, provenientes de distintas regiones de Uruguay. Dicha caracterización permitirá conocer la variabilidad existente del patógeno en el país, que pueden ser útiles para trabajos posteriores en el diseño de estrategias para el control de la enfermedad. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Obtener aislamientos de *Guignardia sp.* a partir de frutas y hojas sintomáticas y mantenerlas en cultivo puro.

Objetivo específico 2: Identificar mediante PCR los aislamientos pertenecientes a la especie *G. citricarpa*.

Objetivo específico 3: Caracterizar los aislamientos a través de métodos morfológicos y moleculares, comparándolos con aislamientos extranjeros.

Objetivo específico 4: Obtener una colección de aislamientos de *G. citricarpa* caracterizados para posteriores estudios.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento de *Phyllosticta sp.*

En el presente trabajo, se incluyeron aislamientos obtenidos en el laboratorio a partir de frutas y hojas sintomáticas, provenientes de distintas especies cítricas y de distintas zonas geográficas del país, cuatro aislamientos provenientes de la colección del Laboratorio de Micología de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA–MGAP), tres aislamientos provenientes de Entre Ríos – Argentina, cuatro aislamientos originarios de Brasil y uno cedido por el laboratorio de Micología de la Facultad de Ingeniería. (Tabla N° 1).

Para aislar el patógeno de muestras de campo, se inspeccionó ocularmente el material vegetal, seleccionándose los síntomas típicos de la enfermedad (Fig. N° 2). Se cortaron trozos de cáscara conteniendo las lesiones y se lavaron sumergiéndose en Etanol 70% por 30 s, posteriormente se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio 1% por 2 min y se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril. Luego de secados sobre papel de filtro, se sembraron en placas de Petri conteniendo PDA (sigla en inglés de Agar Papa Dextrosa), a razón de 4 trozos por placa. Las mismas se incubaron a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias típicas de *Phyllosticta spp.*, donde se repicaron hasta obtener cultivos puros.

El medio de cultivo PDA se preparó utilizando 24 g de *Potato Dextrose Broth* (Difco™) y 15 g de agar por litro de agua destilada estéril. Posteriormente se esterilizó en autoclave por 20 min. a 121 °C .

Tabla N° 1: Aislamientos uruguayos y extranjeros utilizados en el trabajo, especificando especie/variedad cítrica, tipo de síntoma y región de la cuál provienen. Sd=sin dato

Nº	Muestra	Hospedero	Origen	Síntoma
100.1	Hoja	Limón	Salto	Mancha dura
100.2	Hoja	Limón	Salto	Mancha dura
102	Fruta	Limón	Montevideo	Mancha en forma de peca
115	Fruta	Valencia	Salto	Mancha dura
116	Fruta	Limón	Montevideo	Mancha dura
119	Fruta	Valencia	Salto	Mancha en forma de peca
121	Aislamiento	Limón	DGSSAA	Sd
165	Fruta	Limón	Paysandú	Mancha en forma de peca
170	Hoja	Limón	Salto	Mancha dura
175	Aislamiento	Valencia	Argentina	sd
181	Aislamiento	Valencia	Argentina	Sd
183	Aislamiento	Valencia	Argentina	Sd
186	Aislamiento	Limón	DGSSAA	Sd
187	Fruta	Valencia	Salto	Mancha en forma de peca
188	Fruta	Valencia	Salto	Mancha dura
189	Fruta	Valencia	Salto	Mancha dura
190	Fruta	Valencia	Salto	Mancha dura
195	Fruta	Valencia	Salto	Mancha dura
197	Fruta	Valencia	Salto	Mancha en forma de peca
198	Fruta	Valencia	Salto	Mancha dura
204	Fruta	Montenegrina	Salto	Mancha dura
205	Fruta	Montenegrina	Salto	Mancha en forma de peca
206	Fruta	Montenegrina	Salto	Mancha virulenta
208	Fruta	Montenegrina	Salto	Mancha virulenta
209	Fruta	Ellendale	Salto	Mancha en forma de peca
210	Fruta	Ellendale	Salto	Mancha en forma de peca
211	Fruta	Ellendale	Salto	Mancha dura
214	Fruta	Ellendale	Salto	Mancha dura
215	Aislamiento	Sd	DGSSAA	Sd
216	Aislamiento	Sd	DGSSAA	Sd
Phy	Aislamiento	Sd	Fac. Ingeniería	Sd
VC8	Aislamiento	Valencia	Brasil	Sd
VC20	Aislamiento	Valencia	Brasil	Sd

P4	Aislamiento	Lima	Brasil	Sd
P7	Aislamiento	Lima	Brasil	Sd

3.2 Obtención de cultivos monospóricos

Para garantizar la homogeneidad genética de cada aislamiento, todos los ensayos se realizaron a partir de cultivos de *Guignardia* crecidos en medio de cultivo sólido, provenientes de cultivos monospóricos.

De colonias de 10 – 15 días de edad, mantenidas en PDA y obtenidas según se indica en 3.1, se generaron cultivos monospóricos. Se realizó una suspensión de esporas provenientes de un picnidio de las colonias desarrolladas, en agua destilada estéril. Una alícuota de la suspensión se sembró sobre placa con PDA. Se hicieron 4 placas por aislamiento, incubándose las mismas a temperatura ambiente. Apenas evidenciadas las colonias se repicaron a placas nuevas de PDA, obteniendo así colonias monospóricas.

3.3 Patogenicidad

Se evaluó la formación de halo amarillo sobre medio Agar Avena (AA), que permite diferenciar los aislamientos patogénicos de los endofíticos (Baayen *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2008; Wickert *et al.*, 2009), a partir de colonias con 20 días de edad, mantenidas en PDA. Para ello se tomó un disco de 6 mm de diámetro de la zona de activo crecimiento micelial y se sembró en placas conteniendo AA, a razón de un disco por placa. Se realizaron 3 repeticiones para cada aislamiento y se incubaron por 15 días a temperatura controlada, oscilando entre 22 y 24 °C, en oscuridad. Pasado ese tiempo, se determinó la presencia o ausencia del halo amarillo esperado, considerando como resultado positivo la presencia del halo en las 3 repeticiones.

El medio de cultivo AA se preparó en el laboratorio, hirviendo por 20 min. 30 g de avena laminada en 1 L de agua destilada, luego se filtró a través de 4 gasas y se completó el volumen con agua destilada. Se incorporaron 15 g de agar por litro y posteriormente se esterilizó en autoclave por 20 min. a 121 °C.

3.4 Velocidad de crecimiento y morfología de colonia

Para determinar la velocidad de crecimiento, se tomaron colonias de 20 días de edad aproximadamente, crecidas en PDA a temperatura ambiente. Con sacabocado, se tomó un disco de micelio de 6 mm de diámetro de la zona de activo crecimiento de la colonia y se sembró en el centro de placas con PDA. Las placas se incubaron por 7 días en oscuridad a 28 °C y se realizaron tres repeticiones por aislamiento. Al séptimo día, se evaluó el crecimiento midiendo dos diámetros ortogonales de cada colonia.

Para el experimento se consideró un diseño en parcelas al azar con tres repeticiones de cada colonia. El análisis estadístico de los datos se realizó con el procedimiento GLM de SAS (Método de mínimos cuadrados) y la comparación de medias por el test de Tukey al 5%.

Por otra parte, se determinaron el color y el grado de lobulación de las colonias, luego del período de incubación. Para ello se definieron tres categorías: colonias muy lobuladas, poco lobuladas o sin lobulación.

3.5 Resistencia al fungicida benomil

Se evaluó la resistencia a benomil, ya que es un fungicida ampliamente utilizado y existen reportes de cepas de *G. citricarpa* que han desarrollado resistencia al mismo (Schutte *et al.*, 2003; Possiede *et al.*, 2009). Para evaluar la resistencia se incorporó benomil al medio PDA fundido, previo a volcarlo en placas de Petri. Luego se inocularon las placas con discos de micelio de 6 mm de diámetro y se incubaron a 28 °C y oscuridad por 15 días hasta su evaluación.

Las concentraciones de producto activo ensayadas fueron 0.1, 0.5 y 1 µg/mL (Possiede *et al.*, 2009) y se incluyeron como control placas de PDA sin el agregado de fungicida, realizándose tres repeticiones por cada tratamiento. Se consideraron resistentes aquellos aislamientos que mostraron crecimiento al cabo de la incubación.

3.6 Medida de los conidios y su cubierta gelatinosa

Para la medida de los conidios y su envoltura, se realizó una suspensión de conidios en agua destilada estéril, tocando un cirro de colonias crecidas en placas de

PDA. Luego se colocó una gota de esa suspensión sobre un porta objeto y se selló, para su visualización en microscopio invertido Olympus IX81. Se observó con una magnitud de 100 X, con inmersión en aceite y se midieron los conidios y la capa gelatinosa que los rodea, con el programa informático Cellf. Se midieron 10 conidios por cada aislamiento.

3.7 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de colonias de *Guignardia citricarpa*, utilizando 2 protocolos diferentes. Se utilizó un kit comercial de Qiagen y una extracción rápida mediante el hervido del micelio. Las muestras de ADN extraídas por ambos métodos se sometieron a las reacciones de PCR convencional y de ISSR – PCR.

3.7.1 Extracción con kit comercial

El ADN genómico del hongo se extrajo utilizando el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit de la marca Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se utilizaron 100 mg de tejido fresco, proveniente del micelio aéreo de colonias de aproximadamente 20 días de crecimiento en PDA. Las muestras se trituraron en nitrógeno líquido, hasta obtener un fino polvo. El volumen final de elusión fue de 100 µL.

El ADN extraído mediante el kit comercial fue visualizado en gel de agarosa 1%, para determinar la concentración comparando con el marcador de peso molecular λ PstI (ADN de λ digerido con PstI). Dicho ADN fue utilizado como molde para las reacciones de PCR.

En algunos casos se obtuvo poca concentración de ADN y fue necesario concentrar las muestras. Para ello se precipitó el ADN con 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M, pH 5 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, toda la noche a -20 °C y se centrifugó 15 min a 13000 rpm y 0 °C. A continuación se lavó el pellet con etanol 70 %, se volvió a centrifugar por 5 min a 13000 rpm y se dejó secar. El ADN se resuspendió en 30 µL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM) pH 8.

3.7.2 Extracción rápida de ADN genómico

Además de la extracción con el kit comercial se puso a punto una técnica de extracción rápida de ADN genómico, mediante el hervido del micelio fresco. Para ello se tomaron 15 mg, aproximadamente, de la parte aérea del micelio en 100 µL de agua ultra pura, posteriormente se agitó en vórtex y se hirvió a baño María por 5 min. Se colocó en hielo y se centrifugó por 5 min. a 13000 rpm. Luego se tomó el sobrenadante y fue utilizado como ADN molde para la reacción de PCR.

3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para confirmar que las colonias obtenidas se trataran de *G. citricarpa*, se analizó la amplificación de un fragmento específico por PCR. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos GCF3/CCR7 específicos para *G. citricarpa* (Bonants *et al.*, 2003) y los oligonucleótidos CITRIC1/CAMEL2 (Meyer *et al.*, 2006) junto con el universal ITS4 (White *et al.*, 1990), para detectar también la presencia de *G. mangiferae*, (Tabla N° 2).

Para la caracterización molecular se utilizaron las técnicas de ISSR – PCR y la secuenciación directa de un producto de PCR. La técnica de ISSR – PCR se basa en la amplificación por PCR de secuencias repetidas en tripletes (muy abundantes en las regiones del ITS1 y el ITS2) y para ello se utilizaron los cebadores CGA y CCA (Tabla N° 2), (Hantula *et al.*, 1996; Grünig *et al.*, 2001, 2002; Rodrigues *et al.*, 2004)

Para la secuenciación directa de productos de PCR, se amplificaron las muestras con los cebadores universales ITS1/ITS4 (Tabla N° 2), (White *et al.*, 1990), se cuantificaron los productos y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen – Korea.

En todos los casos, los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, según se indica en 3.10.

3.8.1 PCR específica para *G. citricarpa*

Las amplificaciones por PCR utilizando los cebadores GCF3/GCR7 (Tabla N° 2) se llevaron a cabo en el equipo Gene Amp® PCR System 2400 de la marca

comercial Perkin Elmer. Se realizaron en un volumen final de 25 μ L, conteniendo cada reacción 1U de Taq DNA Polymerase (Fermentas[®]), 1X Taq Buffer con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas[®]), 200 μ M de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.6 μ M de cada cebador y 1 μ L de ADN molde.

El programa de ciclado utilizado fue de 94 °C por 2 min., 30 ciclos de: 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 1 min., seguido de una extensión final de 72 °C durante 10 min.

3.8.2 PCR diferencial para *G. citricarpa* y *G. mangiferae*

Para el caso de la reacción de PCR con los cebadores CITRIC1/CAMEL2/ITS4, se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos y volumen final que para la PCR específica para *G. citricarpa*, descrito en 3.8.1. Se realizó en el equipo PxE Thermal Cycler (Thermo Electron Co.) y el programa de ciclado utilizado fue de: 95 °C por 2 min., 35 ciclos de: 93 °C por 30 s, 56 °C por 45 s y 72 °C por 90 s, seguido de una extensión final de 72 °C por 7 min.

3.8.3 ISSR – PCR

A partir del ADN genómico extraído con el kit comercial, se ensayó la reacción de ISSR – PCR, utilizando los oligonucleótidos cebadores CCA y CGA (Tabla N° 2), ambos con bases de anclaje en el extremo 5'. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ L, conteniendo cada reacción 0.02U de Taq DNA Polymerase (Fermentas[®]), 1X Taq Buffer con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas[®]), 200 μ M de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.5 μ M de cebador y 4 μ L de ADN molde.

El ciclado utilizado fue de 95 °C por 5 min., seguidos de 35 ciclos de: 95 °C por 1 min., 53.5 °C por 1 min. y 72 °C por 90 s y una extensión final de 72 °C durante 10 min., utilizándose el mismo equipo que en el ítem anterior.

3.8.4 PCR con oligonucleótidos universales

La reacción de PCR se realizó con el par de cebadores universales ITS1/ITS4 (Tabla N° 2) en el equipo mencionado. Dichas amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, conteniendo cada reacción 1U de Taq DNA Polymerase (Fermentas®), 1X Taq Buffer con (NH₄)₂SO₄ (Fermentas®), 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.7 µM de cada cebador y 2 µL de ADN molde.

El programa de ciclado utilizado para la amplificación fue de 2 min. a 94 °C, 39 ciclos de: 1 min. a 94 °C, 1 min. a 60 °C y 90 s a 72 °C, seguido de una extensión final de 10 min. a 72 °C.

Los productos amplificados con los cebadores universales, luego de ser cuantificados, se secuenciaron las dos hebras (con los mismos cebadores) en la empresa Macrogen – Korea.

3.9 Oligonucleótidos cebadores

Tabla N° 2: Secuencia de los oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de PCR (GCF3, GCR7, CITRIC1, CAMEL2, ITS4, ITS1) y de ISSR – PCR (CCA, CGA) y sus respectivas secuencias. El código de bases degeneradas: B = G, T o C; D = G, A o T; H = A, T o C.

Oligonucleótidos	Secuencia (5´ → 3´)
GCF3	AAAAAGCCGCCCGACCTACCT
GCR7	TGTCCGGCGGCCAG
CITRIC1	GAAAGGTGATGGAAGGGAG
CAMEL2	AGTATACAAAACCTCAAGAATTC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
CCA	DD(CCA) ₅
CGA	DHB(CGA) ₅

3.10 Electroforesis de los productos de PCR.

En todos los casos se agregó, previo a la corrida electroforética, 2 uL de Stop Buffer a cada muestra. El Stop Buffer fue preparado en el laboratorio, conteniendo EDTA 0.1 M, Bromophenol Blue 0.1%, Xylene Cyanol 0.2%, glicerol 50% y SDS 1%.

Las corridas electroforéticas de los productos de PCR amplificados con los cebadores GCF3/GCR7 y CITRIC1/CAMEL2/ITS4 fueron realizadas en gel de agarosa 1.5 % en solución tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM pH 8), durante 1 h y 30 min a 70 V y se corrió junto con las muestras 5 µL de marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de la marca comercial Promega. Luego se revelaron con Bromuro de Etidio (1µg/mL) por 5 minutos y se visualizaron y fotografiaron bajo luz Ultravioleta.

Las electroforesis realizadas para visualizar los productos de PCR amplificados con los cebadores ITS1/ITS4 y el ADN genómico del hongo, se realizaron en gel de agarosa 1% en solución tampón TAE 1X, durante 45 minutos a 75 V. Junto con las muestras se corrieron 2.5 µL del marcador λPstI (ADN de λ digerido con la enzima PstI) de manera de poder estimar la concentración de ADN.

Los productos de amplificación de las reacciones de ISSR – PCR fueron separados en geles de agarosa 1.5% en solución tampón TAE 1X, durante 20 min. a 35 V, seguido de 2 h a 65 V. Posteriormente se tiñeron con BrEt (1µg/mL) por 25 min. y se visualizaron bajo luz Ultravioleta.

3.11 Análisis de secuencias nucleotídicas

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR con los cebadores ITS1/ITS4 (Tabla N° 2), fue realizada en el secuenciador automático de la empresa Macrogen (Korea), con los mismos cebadores. Se realizó a partir de 40 ng/uL de ADN amplificado por PCR. Las secuencias obtenidas fueron editadas y corregidas utilizando la información de las dos hebras secuenciadas. Dichas secuencias fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1997), para comparar la similitud con las secuencias ya depositadas.

Se realizaron alineamientos entre las secuencias nucleotídicas, utilizando el programa informático BioEdit 7.0.0 (Hall, 1999) y a partir de estos alineamientos se construyó un árbol filogenético. Para ello se usó el método de Distancia, con algoritmo de agrupamiento Neighbor Joining y el modelo de sustitución de Kimura-2-parameter, mediante el software MEGA 5. Para asegurar la confiabilidad del agrupamiento, fue realizado el test de bootstrap con 1000 repeticiones (Wickert *et al.*, 2009). Se incluyeron otras secuencias pertenecientes a distintas especies del género *Guignardia*: *G. citricarpa* clon 75 (ID:AF346782.1); *G. citricarpa* (ID: AF346772.1); *G. citricarpa* PC-

11 (ID: FJ769660); *G. citricarpa* PC-19 (ID: FJ769668); *G. citricarpa* LC-11 (ID: FJ769707); *G. mangiferae* voucher ICMP 8336 (ID:AY816311.1); *G. mangiferae* (ID: AM403717.1); *G. laricina* (ID:AB041245.1); *G. philoprina* (ID:AB095507.1); *G. philoprina* (ID:AF312008); *G. philoprina* specimen-voucher CBS 447.68 (ID: AF312014); *G. aesculi* (ID:AB095504.1); *G. vaccinii* (ID:AB041244.1); *G. bidwellii* (ID:AB095511.1); *G. bidwellii* (ID: AB095505); *G. bidwellii* (ID: AB095509); *G. gaultheriae* (ID: AB095506.1); *Phyllosticta pyrolae* (ID: AF312010); *Phyllosticta pyrolae* (ID: AB041242); *Phyllosticta spinarum* (ID: AF312009); *Phyllosticta kerriae* (ID: AB454266.1); *Phyllosticta citribraziliensis* (ID: FJ538352.1) y una secuencia identificada como perteneciente a un hongo endófito aislamiento 9129 (ID: EF420000.1). Secuencias de otros hongos Ascomycetes como *Colletotrichum gloesporioides* (ID: FJ434136.1); *Colletotrichum lagenarium* (ID: EU622278.1); *Glomerella acutata* (ID: AB273195.1); *Fusarium subglutinans* (ID: FSU38556) y *Fusarium oxysporum* (ID: FJ233193.1) fueron incluidos como *outgroup*.

3.12 Conservación

Los aislamientos obtenidos se conservaron mediante repiques sucesivos en placas de Petri en medio PDA (mantenidas a temperatura ambiente), durante la realización de los ensayos. Para el almacenamiento de los aislamientos por tiempos prolongados se evaluó la conservación de los mismos aislamientos, por los métodos del aceite mineral y del papel, que permiten conservarlos por largos períodos de tiempo (Abd-Elsalam *et al.*, 2010).

Éstos últimos métodos se evaluaron repicando los aislamientos, en placas de PDA, a los 3 meses, 6 meses y 1 año de conservados.

3.12.1 Método del aceite

Para el método del aceite se repicaron los aislamientos en frascos pequeños conteniendo 20 mL de PDA estériles, se inocularon con un trocito de colonia, se taparon con algodón estéril y se incubaron a 28 °C hasta que lograron cubrir toda la superficie del medio de cultivo. A continuación se cubrieron con una capa de aceite mineral de un cm de altura, para impedir la entrada de oxígeno y evitar la desecación del medio, y se guardaron sellados a 4 °C.

3.12.2 Método del papel

Para la realización del método del papel, se repicaron los aislamientos en placas de Petri conteniendo PDA y se colocaron trozos de papel de filtro de 1 cm², previamente esterilizados en autoclave, adyacentes al inóculo. Se incubaron a temperatura ambiente por 15 – 20 días, hasta que el micelio cubriera la superficie del papel de filtro. Los trozos de papel fueron retirados de la placa, colocados en sobres de papel estériles, secados al vacío (Savant Speed Vac®) y conservados a -20 °C, hasta la realización de las evaluaciones periódicas.

4 RESULTADOS

4.1 Aislamiento de *Phyllosticta* spp.

Se trabajó con un total de 35 aislamientos, de los cuales 23 fueron obtenidos a partir de síntomas procesados en el laboratorio para este trabajo y 12 aislamientos fueron proporcionados por otros investigadores entre los que se incluyen 4 aislamientos ya caracterizados en Brasil (VC8 y VC20=Gc, P4 y P7=Gm), utilizados como aislamientos de referencia de Gc y Gm . Los 31 aislamientos estudiados se seleccionaron por la morfología típica de la colonia de *Phyllosticta citricarpa*, que según se describe en la literatura, se presenta oscura, estromática, de crecimiento lento, con margen lobado y presencia de picnidios que exudan cirros, conteniendo conidios elípticos característicos (EPPO, 2003), como se puede observar en la Figura N°5.

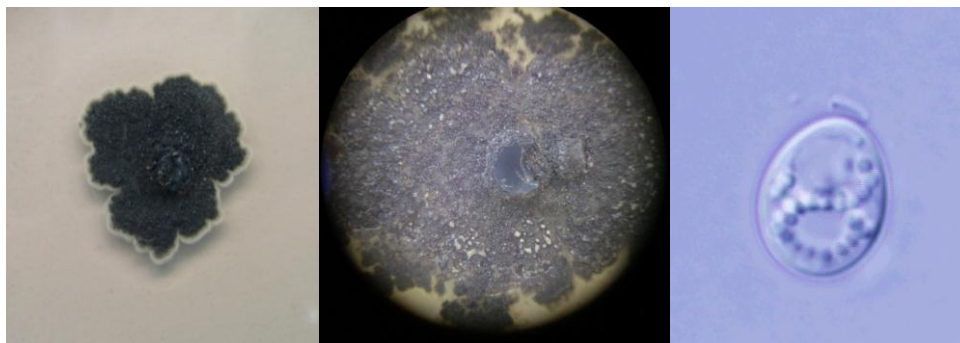


Figura N° 5: Colonia típica de *Phyllosticta citricarpa* cultivada en PDA, a temperatura ambiente (izquierda). Observada bajo lupa (1X) se evidencian los cirros color crema (centro). Al microscopio óptico (100X) se observan los conidios característicos (derecha).

4.2 Caracterización fenotípica

Las características ensayadas para todos los aislamientos fueron: patogenicidad, tasa de crecimiento y resistencia a Benomil. Además, se midió el tamaño de los conidios de algunos aislamientos, eligiendo de manera representativa de la variabilidad encontrada.

4.2.1 Patogenicidad

Luego de 15 días de incubación en el medio AA y oscuridad, se observaron 27 aislamientos con presencia del halo amarillo alrededor de la colonia como se muestra en la Figura N° 6, incluyendo los aislamientos de referencia VC8 y VC20, estando presente en las 3 repeticiones ensayadas. Ocho de los aislamientos (100.1; 121; 186; 215; 216; Phy y las referencias P4 y P7) no presentaron el halo en ninguna de las 3 repeticiones. Por lo tanto, se podría inferir que los aislamientos que no presentaron dicho halo son aislamientos no patogénicos, mientras que los que sí lo presentaron se consideran patogénicos, según se indica en la literatura (Baayen *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2008; Wickert *et al.*, 2009).

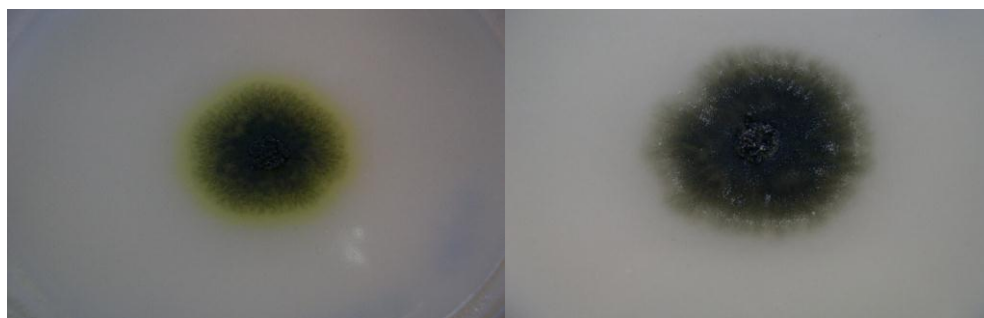
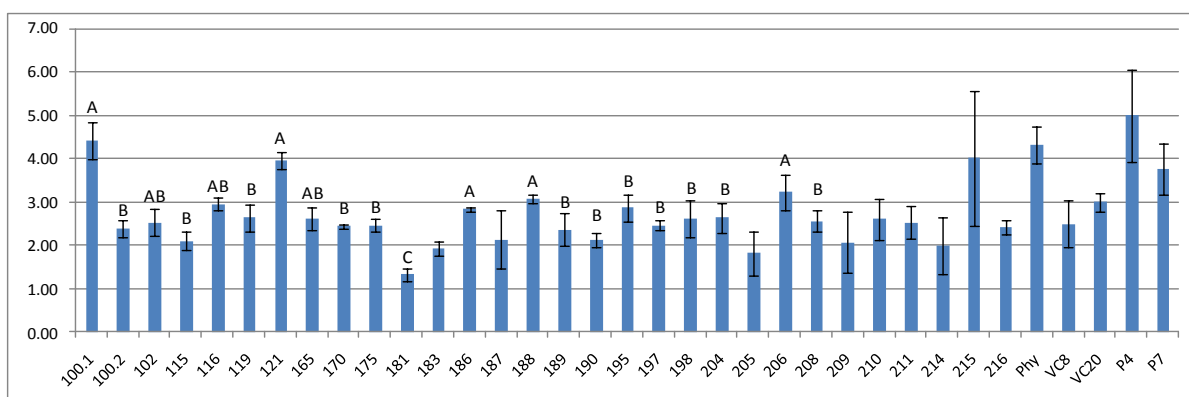


Fig. N° 6: Aislamiento con presencia de halo amarillo (izquierda) y aislamiento sin halo (derecha), ambos cultivados en medio de cultivo Agar Avena, a 25 °C y oscuridad.

4.2.2 Velocidad de crecimiento

Se evaluó la velocidad de crecimiento en PDA, luego de 7 días de incubación. El diámetro de las colonias varió entre 1.33 cm, correspondiente al aislamiento 181, y 5 cm para el aislamiento P4 (Figura N° 7A). El estudio estadístico realizado para algunas medidas separó los aislamientos en tres grupos significativamente diferentes. Cabe destacar que la velocidad de crecimiento reportada para Gc es entre 2.5 y 3 cm (Baayen *et al.*, 2002), encontrándose la mayoría de los aislamientos dentro de dicho rango.

A



B

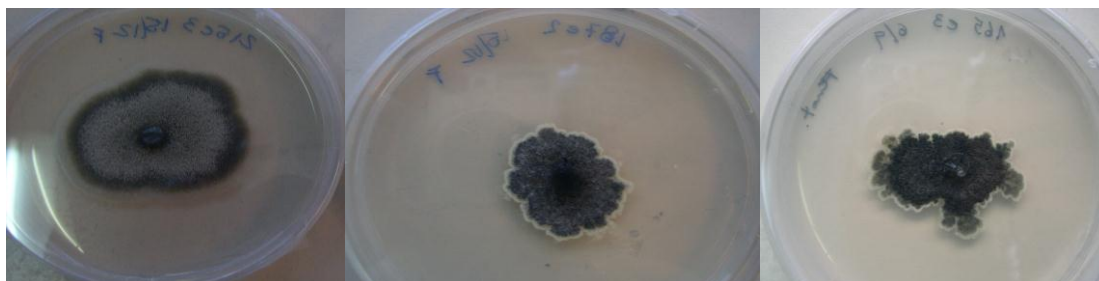


Figura N° 7: Velocidad de crecimiento de aislamientos de *Phyllosticta spp.* cultivados en PDA, por 7 días a 28 °C. En **A** se comparan los diámetros de las colonias (en cm) de cada uno de los aislamientos y **B** muestra la variabilidad fenotípica encontrada entre las colonias.

Además de la tasa de crecimiento, luego de los 7 días de incubación, se observó el color de las colonias y el grado de lobulación de las mismas. Se encontraron colonias negras, grises y verde oliva. El grado de lobulación se evaluó estableciendo como criterio colonias sin lobulación, con lobulación media o muy lobuladas. En la Figura N° 7B se puede observar la variabilidad encontrada en la

velocidad de crecimiento, así como también en el color y grado de lobulación de las colonias.

La mayoría de los aislamientos mostraron cierto grado de lobulación de la colonia, observándose variabilidad entre colonias muy lobuladas y con lobulación media. Sin embargo, los aislamientos 100.1; 121; 186; 215; Phy; P4 y P7 no presentaron lobulación.

4.2.3 Tamaño de los conidios

Al evaluar la suspensión de esporas bajo el microscopio, con una magnificación de 100X, se observaron conidios de forma elíptica y multigutulados, rodeados de una cubierta mucilaginosa, Figura N° 8 y Figura N° 5 (derecha), típico del género *Phyllosticta*, como se describe en la literatura (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009; Glienke *et al.*, 2011).

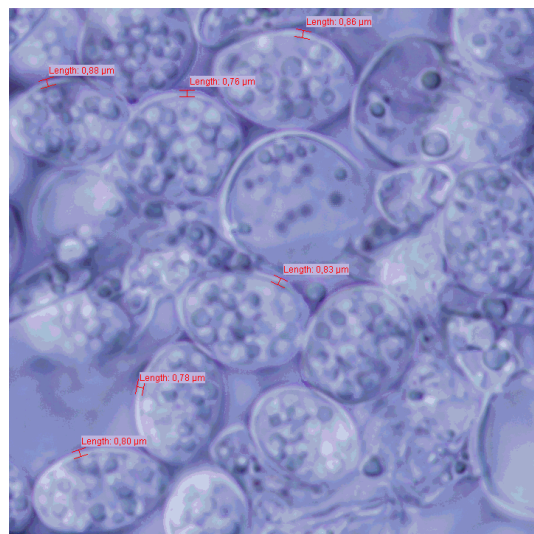


Figura N° 8: Conidios de *Phyllosticta citricarpa*, de forma elíptica, con presencia de envoltura mucilaginosa y presencia de gúttulas dentro de los mismos, visualizados bajo microscopio con un aumento de 100X.

Las medidas se realizaron con el programa informático Cellf, acoplado al microscopio y oscilaron entre 8 – 11 µm de largo y entre 5.5 – 9 µm de ancho para los conidios, mientras que su envoltura se encontró siempre por debajo de 1.5 µm. Estas medidas mostraron cierta variabilidad entre los distintos aislamientos, pero dentro del rango reportado para el género *Guignardia* (Glienke *et al.*, 2011).

En algunos casos se pudo observar conidios con la presencia de un apéndice apical, reportado anteriormente por Baayen *et al*, 2002 y Glienke *et al*, 2011 (Figura N° 5).

4.2.4 Resistencia a benomil

La resistencia a benomil se ensayó incorporando el fungicida al medio de cultivo PDA. No se observó resistencia en ninguna de las tres concentraciones ensayadas (0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de producto activo), ya que ninguno de los aislamientos mostró crecimiento, en ninguna de las 3 réplicas (Fig. N° 9).

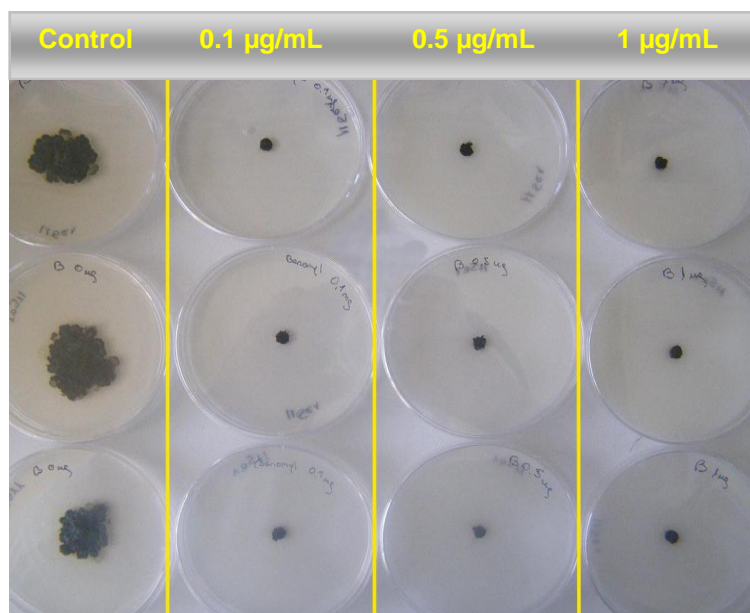


Fig. N° 9: Aislamientos de *G. citricarpa* crecidos en medio PDA con el agregado de distintas concentraciones de benomil (0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubados por 15 días a 28 °C. El control corresponde a medio PDA sin benomil.

4.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico realizada con el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit se visualizó y cuantificó en geles de agarosa 1% (Figura N° 10). La concentración obtenida fue entre 2 y 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$, para cada aislamiento.

En algunos casos se obtuvo poco rendimiento en la extracción y fue necesario concentrar las muestras de ADN para poder visualizarlas en un gel. Para ello se precipitaron con Acetato de Sodio y Etanol absoluto, resuspendiéndolas luego en un volumen menor.

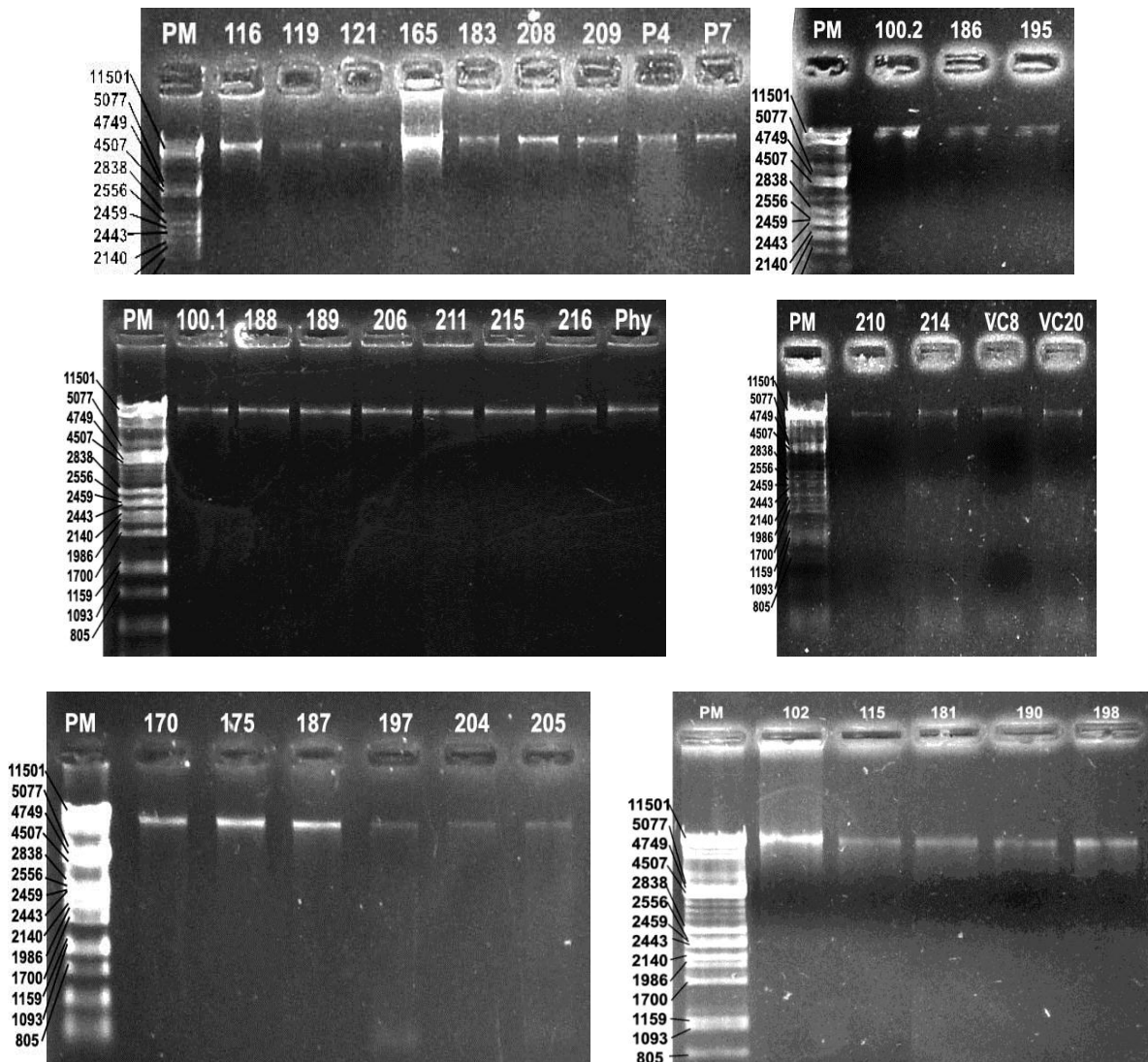


Fig. N° 10: Cuantificación de ADN genómico de todos los aislamientos, visualizados en geles de agarosa 1 %, teñidos con BrEt. PM: marcador de peso molecular λ PstI.

Las extracciones realizadas por el procedimiento rápido, mediante el hervido del micelio, no se cuantificaron en gel de agarosa, sino que se usaron directamente para la amplificación por PCR con los cebadores específicos para Gc (GCF3/GCR7). En todos los casos se obtuvieron iguales resultados que con el ADN extraído con el kit.

4.4 Confirmación por PCR

Treinta y cinco aislamientos se sometieron a la reacción de PCR con los cebadores GCF3 y GCR7 (Tabla N° 2), específicos para *Gc*, para su confirmación. Incluyendo los aislamientos VC20 y VC8, se obtuvieron 27 positivos, amplificando una única banda de 490 bp aproximadamente, coincidiendo con el tamaño de banda esperado para *G. citricarpa* (Bonants *et al.*, 2003), Figura N° 11.

Los 8 aislamientos que resultaron negativos para la PCR específica, se sometieron a la reacción de PCR diferencial con los cebadores CITRIC1/CAMEL2/ITS4, permitiendo detectar la presencia de *G. mangiferae*. Se agregaron en esta reacción 2 aislamientos positivos para la PCR con los cebadores GCF3/GCR7.

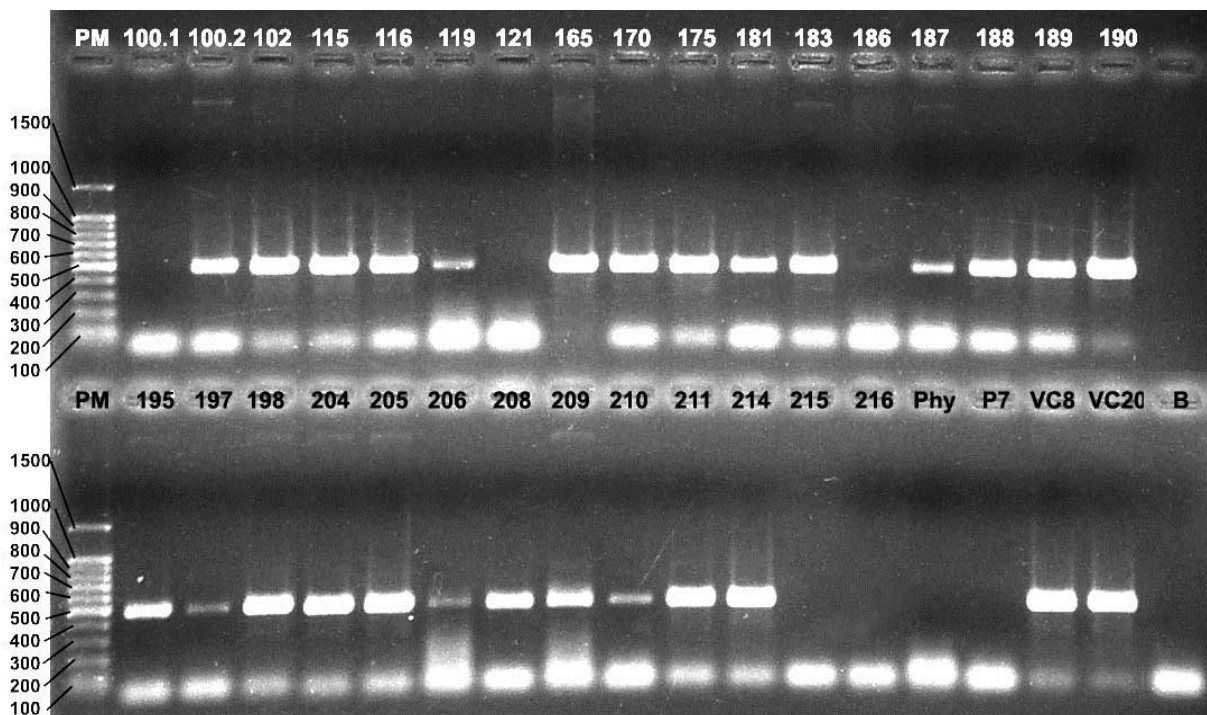


Figura N° 11: Productos de PCR específica para *G. citricarpa* (cebadores GCF3/GCR7) visualizados en gel de agarosa 1.5 %, teñido con BrEt. PM: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega), B: Blanco (sin ADN molde).

De los 10 aislamientos ensayados en la PCR diferencial, 2 (los positivos para la PCR específica) amplificaron una única banda de 580 bp, como era esperado y sólo

los aislamientos P4 y P7 amplificaron una banda de 430 bp, correspondiente a *G. mangiferae* (Meyer *et al.*, 2006). Los restantes 6 aislamientos, al igual que con los cebadores GCF3/GCR7, no mostraron amplificación, Figura N° 12.

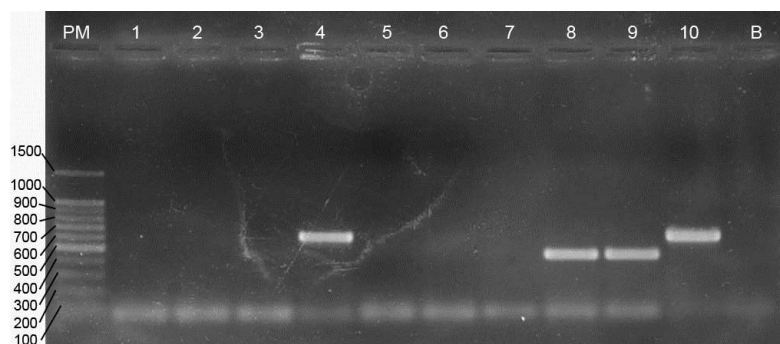


Fig. N° 12: Productos de PCR diferencial para *G. citricarpa* y *G. mangiferae* con los cebadores CITRIC1/CAMEL2/ITS4. Visualizados en gel de agarosa 1.5 %, teñido con BrEt. PM: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega), carril 1: 100.1; 2: 121; 3: 186; 4: 198; 5: 215; 6: 216; 7: Phyl; 8: P4; 9: P7; 10: VC8 y B: Blanco (sin ADN molde).

4.5 Caracterización molecular

4.5.1 ISSR – PCR

Para el ensayo de ISSR – PCR fue necesario poner a punto la concentración de ADN molde a utilizar, ya que se observaron diferencias en la amplificación variando la cantidad de ADN. Se probaron dos concentraciones de ADN (dato no mostrado), previamente cuantificado en geles de agarosa (Figura N° 10).

Se observaron variaciones en la presencia de algunas bandas con las distintas concentraciones de ADN molde, como fue reportado por Grünig *et al.*, 2001. En la mayoría de los casos se obtuvo un perfil reproducible, más nítido y con mayor número de bandas en el carril correspondiente al ADN diluido. Por esta razón se consideró que el óptimo se encontraba entre 0.2 y 1 ng/μL de ADN molde de cada aislamiento. De esta manera se obtuvieron perfiles comparables, disminuyendo las diferencias obtenidas con las distintas concentraciones de ADN y así poder evaluar las verdaderas diferencias existentes entre los distintos genotipos.

Se hicieron dos reacciones de ISSR – PCR por aislamiento, con el cebador CCA y CGA (Tabla N° 2), respectivamente, Figura N° 13.

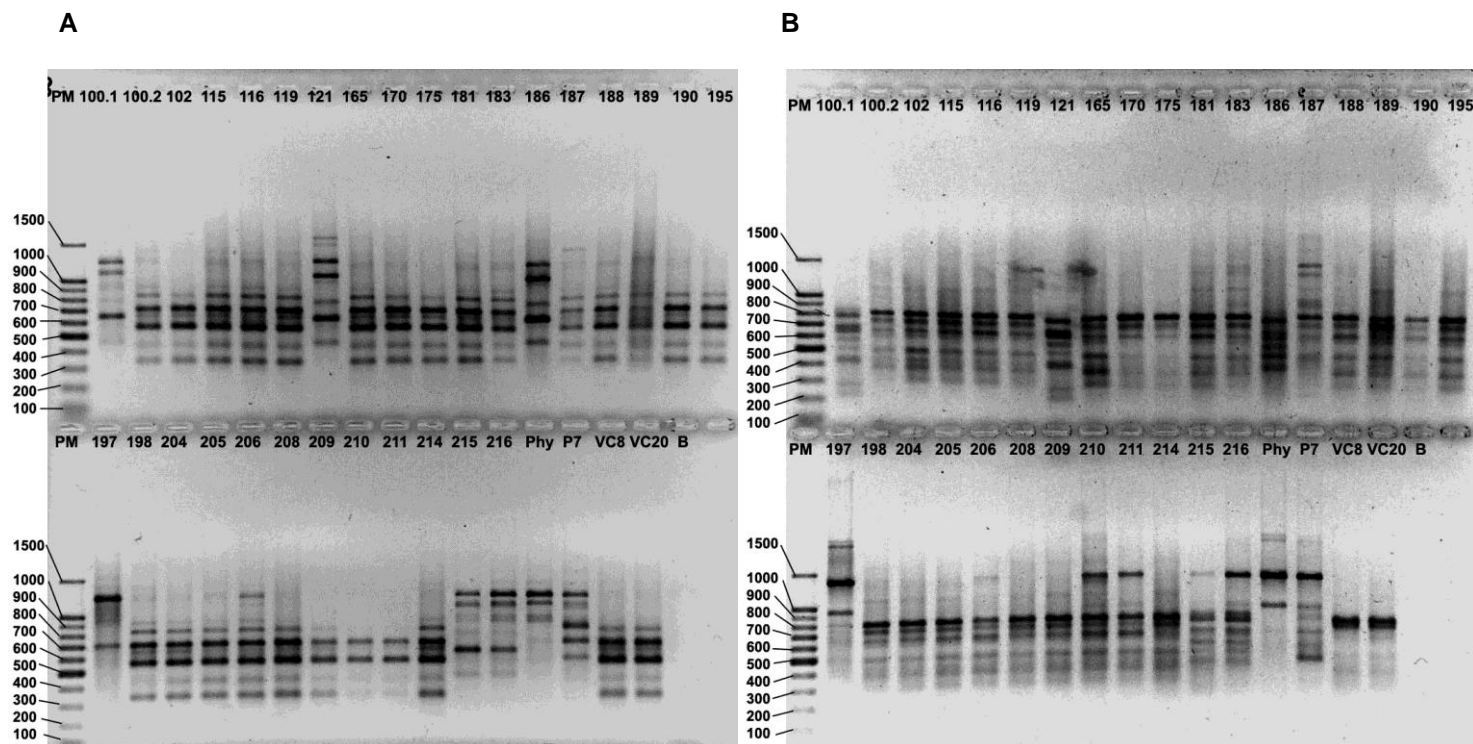


Figura N° 13: Perfiles de ISSR-PCR, visualizados en geles de agarosa 1.5%, teñidos con BrEt. **A** Con el cebador CCA y **B** con el cebador CGA. PM: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega), B: blanco (sin ADN molde).

Con el cebador CCA (Figura N° 13A) se obtuvo el mismo perfil para todos los aislamientos que fueron identificados por PCR convencional como *G. citricarpa*. El perfil mayoritario presentado por estos aislamientos fue de 5 bandas evidentes, comprendidas entre 300 y 900 bp. El aislamiento 197, si bien fue positivo para Gc por PCR, mostró un perfil diferente al resto de los aislamientos, formado por 2 bandas mayoritarias, una de 700 y otra de 1300 bp aprox. Los aislamientos que no fueron identificados como Gc por PCR, mostraron un perfil claramente distinto, formado por 4 a 6 bandas comprendidas conspicuas, entre 400 y 1500 bp aprox.

Con el cebador CGA (Figura N° 13B) no se obtuvieron perfiles tan nítidos como con el cebador CCA, pero se observaron resultados similares. Se obtuvo un perfil para los aislamientos positivos para Gc, formado por 5 bandas visibles, ubicadas entre 400 y 800 bp. El aislamiento 197, al igual que con el cebador CCA, mostró un perfil distinto al resto de los aislamientos identificados como Gc. Los aislamientos VC8

y VC20 (Gc extranjeros) mostraron un perfil de sólo 2 bandas mayoritarias, coincidentes con 2 bandas del resto de los aislamientos y las bandas por debajo de éstas se observan muy tenues. Los negativos para Gc, presentaron un perfil diferente, formado por 6 a 7 bandas comprendidas entre 200 y 1500 bp.

4.5.2 Secuenciación de la región ITS1 – 5.8S – ITS2

Veintidós aislamientos, incluyendo positivos y negativos de la PCR específica para Gc, se amplificaron por PCR con los cebadores universales ITS1/ITS4 (Tabla N° 2) y se cuantificó el producto en geles de agarosa 1% (Figura N° 14). Se obtuvo una concentración de 45 ng/μL aprox. de producto amplificado, que se envió a secuenciar (con los mismos cebadores) a Macrogen – Korea.

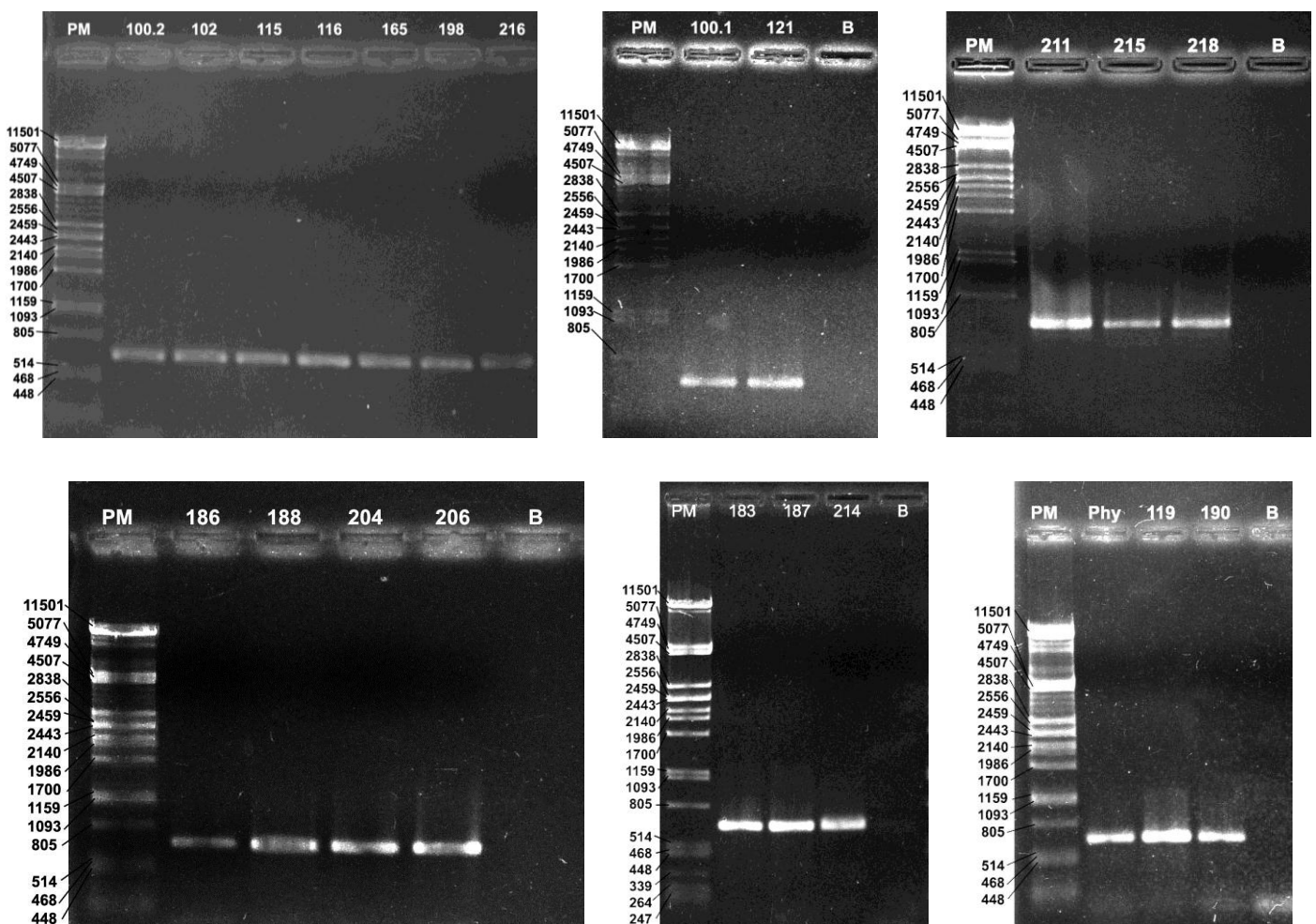


Figura N° 14: Productos de PCR con cebadores universales ITS1/ITS4, visualizados en geles de agarosa 1%, teñidos con BrEt. En todos los casos PM corresponde al marcador de peso molecular λ PstI y B al blanco (sin ADN molde).

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa informático BioEdit 7.0.0 y posteriormente se realizó un alineamiento entre ellas utilizando la herramienta Clustal-W, del mismo programa. Dicho alineamiento mostró que las secuencias presentaban diferencias, dividiéndolas en dos grupos. Un grupo lo integraban los aislamientos que fueron identificados como Gc por PCR (100.2; 102; 115; 116; 119; 165; 183; 187; 188; 190; 198; 204; 206; 211; 214; 218) y el otro grupo por los aislamientos negativos para Gc (100.1, 121, 186, 215, 216, Phy). Estos dos grupos fueron homogéneos, ya que las secuencias resultaron ser idénticas entre sí, para cada uno de los grupos.

Dos de las secuencias obtenidas de Gc, se depositaron en la base de datos GenBank del NCBI, los números de acceso son JF742785, para el aislamiento 102 y JF742786 para el aislamiento 188.

Las secuencias nucleotídicas se compararon con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), mediante la herramienta BLASTN. La mayoría de los aislamientos (100.2; 102; 115; 116; 119; 165; 183; 187; 188; 190; 198; 204; 206; 211; 214; 218) mostraron 100 % de homología con otros aislamientos de *G. citricarpa* ya depositados en la misma. Seis aislamientos (100.1, 121, 186, 215, 216, Phy) no mostraron homología de secuencia con *G. citricarpa*, sino que presentaron un porcentaje de homología entre 98 y 99 % con las secuencias de *G. Philoprina* (ID: AF312008.1), *Phyllosticta kerriae* (ID: AB454266.1), fungal endophyte isolate 9129 (ID: EF420000.1), *P. spinarum* (ID: AF312009.1) y *P. citribraziliensis* (ID: FJ538352.1).

Con los aislamientos secuenciados en este trabajo y otras especies de *Guignardia sp.* (incluyendo las secuencias con mayor porcentaje de homología) se realizó un alineamiento con el programa BioEdit 7.0.0 (Anexo I). Este alineamiento mostró que las secuencias presentan mayor variabilidad en la región del ITS1 y del ITS2, siendo la secuencia de la subunidad 5.8S del ARNr altamente conservada.

A partir de los alineamientos realizados con todas las secuencias, se confeccionó un árbol filogenético utilizando el programa informático MEGA 5 (Figura N° 15). Dicho árbol mostró que los aislamientos que fueron previamente identificados como Gc por PCR, agruparon todos juntos con las secuencias de Gc obtenidas del NCBI. El resto de los aislamientos (100.1, 121, 186, 215, 216, Phy), que no fueron identificados por PCR, agruparon juntos y en la misma rama que *P. citribraziliensis*.

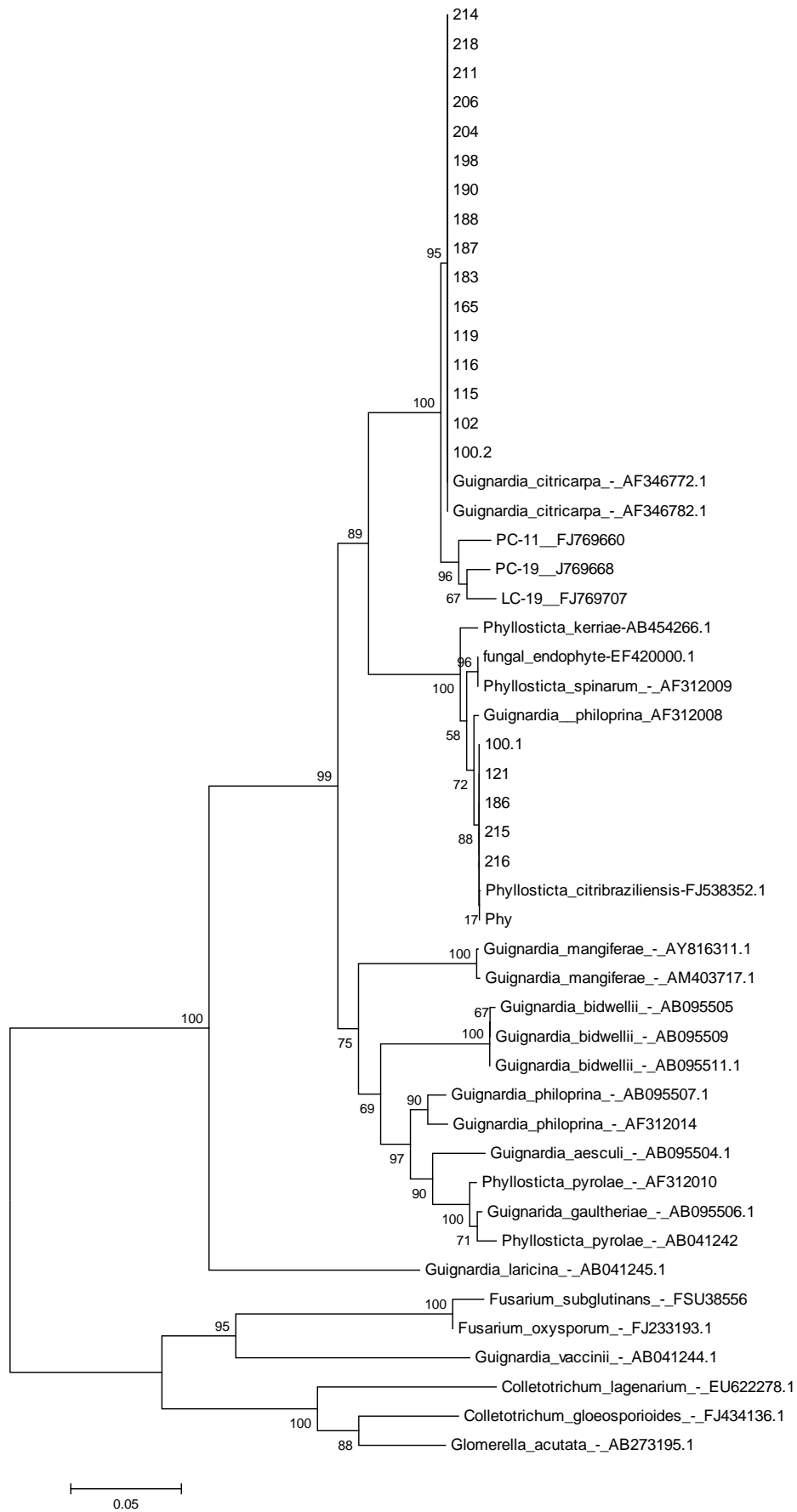


Figura N° 15: Dendrograma construido con el algoritmo de agrupamiento Neighbor Joining y el modelo de sustitución de Kimura-2-parameter, se realizó el test de bootstrap con 1000 repeticiones.

4.6 Conservación de aislamientos

Los aislamientos fueron conservados por el método del papel a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por el método del aceite a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se evaluaron los dos métodos de conservación, observando la capacidad de los aislamientos de crecer en PDA al cabo de 3, 6 y 12 meses de almacenados.

Los dos métodos mostraron resultados positivos, permitiendo el desarrollo del 100% de las colonias evaluadas en PDA al cabo del tiempo indicado. Sin embargo, el método del papel presentó la ventaja de ser más sencillo y no requerir demasiada manipulación, disminuyendo la posibilidad de contaminaciones y requerir menor espacio de almacenamiento.

5 DISCUSIÓN

Este trabajo representa la primera caracterización de aislamientos de *Guignardia citricarpa* realizado en Uruguay. Los aislamientos de *Guignardia* obtenidos de diversos síntomas y de distintas especies cítricas, fueron comparados por técnicas morfológicas y moleculares. Las técnicas de caracterización molecular utilizadas incluyen el ISSR-PCR, una variante del RAPD-PCR (Grüning et al. 2001), para evaluar la diversidad genética entre los aislamientos y la secuenciación de la región ITS de los ADNr. La información proporcionada por este segmento de secuencia se considera adecuada para estudios de relación filogenético a nivel de especie y subespecie (White et al. 1990). Las cepas incluidas en este estudio fueron identificadas en primer término por morfología de colonia.

De los 31 aislamientos estudiados, 25 pudieron ser clasificados como pertenecientes a la especie Gc por homología de secuencia de la región ITS1–5.8S–ITS2 con otras secuencias depositadas en el NCBI. Las demás características estudiadas en este trabajo, coinciden con las descriptas para dicha especie.

Las características fenotípicas de estos 25 aislamientos mostraron poca variabilidad. Todos presentaron el halo amarillo en el medio AA, por lo que se consideraron patogénicos, ya que en estudios a campo se ha visto una correlación de esta característica con la patogenicidad (Baldassari *et al.*, 2008), aunque no permite evaluar el grado de virulencia de las cepas. Ninguno de los aislamientos evaluados presentó resistencia al fungicida benomil, característica reportada por Possiede *et al.*, 2009, que observó cepas resistentes a 0.5 µg/mL de producto activo. La velocidad de crecimiento en PDA fue la característica que presentó más variaciones, separando los aislamientos en tres grupos significativamente diferentes. La correlación de esta característica con la patogenicidad podría determinar un aspecto importante para la identificación de cepas más o menos virulentas. Sin embargo, la carencia de un método de evaluación de la patogenicidad *in vitro*, no permite correlacionar alguna de estas características con este aspecto de importancia fitopatológica.

Otro aspecto morfológico evaluado fue el tamaño y morfología de los conidios que es comúnmente usado en taxonomía clásica. Estos resultados mostraron cierta variabilidad en el tamaño de los mismos entre los distintos aislamientos evaluados, pero dentro del rango reportado para las especies de *Guignardia* (Glienke *et al.*, 2011). Este método no es muy sencillo de aplicar para caracterizar cepas de *Guignardia*, ya que existen muchas especies de éste género con sutiles diferencias en el tamaño de los conidios y la capa mucilaginosa que los envuelve (Glienke *et al.*, 2011).

Al amplificar las muestras por PCR con los cebadores específicos GCF3/GCR7, se identificaron aquellos aislamientos que pertenecían a la especie Gc. Los aislamientos que resultaron negativos para esta PCR (100.1; 121; 186; 215; 216; Phy; P4; P7), se sometieron a otra reacción con los cebadores CAMEL/CITRIC/ITS4, para identificar aquellos que pudieran pertenecer a Gm. Esta especie se ha reportado como endófito de distintas especies cítricas y ha sido frecuentemente confundida con Gc, debido a la similitud que comparten en las características morfológicas (Baayen *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2008). Sólo los aislamientos P4 y P7 resultaron positivos para Gm, los cuales habían sido previamente identificados como tal por investigadores brasileños. Por lo cual, a pesar de ser un endófito aislado frecuentemente de plantas cítricas, no fue posible obtener aislamientos de Gm a partir de las muestras uruguayas procesadas para este trabajo,

La aplicación de la técnica de PCR con cebadores específicos para Gc, permitió discriminar los aislamientos que pertenecían a esta especie de los que no. Estos resultados muestran la importancia de la identificación con métodos moleculares de los aislamientos realizados a partir de síntomas presentes de MNC en fruta, ya que la existencia de variadas especies endófitas, puede llevar a atribuir la inducción del síntoma observado a este patógeno. En la medida que Gc es considerado plaga reglamentada A1 en algunos países, la identificación errónea de su presencia puede causar severos daños económicos a través del rechazo de partidas de fruta de exportación.

La metodología empleada en esta caracterización demostró que es posible realizar la detección e identificación de este patógeno, en forma rápida a través de la amplificación de secuencias específicas por PCR. La aplicación de esta técnica y su puesta a punto permitirá contar con una técnica de diagnóstico que servirá como apoyo a los servicios fitosanitarios de nuestro país, responsables de certificar la ausencia de Gc en las partidas de fruta exportada. También permitirá identificar la presencia de este hongo en cuadros de cítricos de los productores previo a la cosecha y de esta forma no considerar esa fruta para la exportación.

Además, se probó la amplificación por PCR, a partir de la extracción rápida de ADN, mediante el hervido de micelio. Este método permite obtener en pocas horas, ADN para ser utilizado como molde para la reacción de PCR. A pesar de que, debido a la presencia de contaminantes, el ADN obtenido por este método resulta inestable, esta técnica es muy útil para ser utilizada como herramienta de diagnóstico, ya que se obtienen resultados en pocas horas, es muy económica y fácil de aplicar.

Seis aislamientos (100.1; 121; 186; 215; 216; Phy) del total analizado, resultaron negativos para ambas PCRs ensayadas y no resultaron pertenecer a la especie *G. citricarpa*, presentando alta homología de secuencia de la región ITS1–5.8S–ITS2, con otras especies del mismo género. Al evaluar las características morfológicas de estos 6 aislamientos, se observaron diferencias en comparación con el grupo de Gc: no presentaron producción del pigmento amarillo alrededor de la colonia en el medio AA, mayores velocidades de crecimiento en PDA y no mostraron lobulación en el borde de sus colonias. La falta del mencionado halo (relacionado con la patogenicidad), concuerda con los resultados de secuencia obtenidos, ya que al comparar la región ITS1–5.8S–ITS2 con las secuencias depositadas en el NCBI, mediante la herramienta BLAST, se obtuvo el mayor porcentaje de homología con *Phyllosticta citribraziliensis*, una especie recientemente reportada como endófito de *Citrus sp.* en Brasil (Glienke *et al.*, 2011). Esta especie comparte semejanzas morfológicas con Gc, lo que explica la inclusión de estos aislamientos en este trabajo.

Los perfiles electroforéticos obtenidos de la amplificación por ISSR–PCR con los cebadores CCA y CGA, que evidencian la presencia de repetidos de estos tripletes dispersos en el genoma de Gc, no presentaron variación. El aislamiento 197, que arrojó resultados positivos en la amplificación con cebadores específicos para Gc, pero cuya identidad no fue confirmada por secuenciación de la región intergénica del ADNr, presentó un perfil de bandas diferente a los demás. En caso de confirmarse como perteneciente a la especie estudiada, representaría la única variación registrada en este trabajo, en el perfil de repetidos en el genoma de Gc, respecto al mayoritario. En cuanto a la aplicación de esta técnica se observó que la cantidad y nitidez de las bandas obtenidas es muy dependiente de la cantidad de ADN utilizado como molde para la reacción. Por lo cual, la etapa de puesta a punto de las concentraciones utilizadas es fundamental para obtener resultados reproducibles con dicha técnica. Esta dificultad ha sido reportada en la literatura, así como también la necesidad de estandarizar las concentraciones de cebadores y $MgCl_2$, para cada reacción, ya que en función de estas variables se obtienen distintos números de bandas (Wujun *et al.*, 2007).

La técnica de ISSR-PCR no resultó útil para discriminar los aislamientos a nivel de individuos, sino que discriminó a nivel de especie, mostrando distintos perfiles de bandeo para Gc, Gm y la especie endófito sin determinar.

La comparación de secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr con las secuencias depositadas en el NCBI, mostró que los aislamientos identificados como Gc por PCR presentaban 100% de homología con otras secuencias de Gc, mientras que los aislamientos que fueron negativos (100.1, 121, 186, 215, 216, Phy), presentaban mayor similitud con otras especies de *Guignardia* u hongos endófitos no identificados. Con la confección del árbol filogenético, se pudo observar que dichos aislamientos agruparon juntos y en la misma rama que *Phyllosticta citribraziliensis*. Estos aislamientos endófitos agruparon filogenéticamente más cercanos a Gc que Gm, a pesar que este último ha sido reportado frecuentemente en forma errónea como Gc, debido a su gran similitud. También se observó que algunos aislamientos (PC-11; PC-19; LC-19) realizados en Brasil e identificados como Gc (Wickert *et al.*, 2009) presentan cierta variabilidad genética en comparación con los aislamientos uruguayos, ya que agrupan en distintas ramas, cercanas a la anterior.

El alineamiento realizado con todas las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2, mostró que las mismas presentan mayor variabilidad en la región del ITS1 y del ITS2, siendo la secuencia de la subunidad 5.8S del ADNr altamente conservada. Esto era de esperar, ya que las regiones ITS1 e ITS2 son transcritas pero no traducidas, por lo cual los cambios son más probables, ya que son silenciosos.

Cabe destacar que la variación encontrada entre los aislamientos no tiene correlación con el origen geográfico de los aislamientos, el huésped cítrico ni el tipo de síntomas de donde fueron aislados (ver Anexo II)

La conservación de aislamientos de microorganismos en general y de fitopatógenos en particular es de especial importancia, tanto para el trabajo de los fitopatólogos como para los organismos de regulación sanitaria. La formación de colecciones de organismos patógenos es una herramienta fundamental para la identificación de especímenes, estudios de variabilidad en el espacio y en el tiempo, fuente de diversidad genética, etc., así como la evaluación de resistencias a plaguicidas y resistencia del huésped a las enfermedades, entre otras. Los organismos internacionales de regulación sanitaria exigen a los países miembros contar con especímenes viables de los patógenos presentes en su territorio, así como de la información básica para su ubicación e identificación. Un aspecto fundamental para

mantener una colección es conocer las condiciones de conservación de estos patógenos y el tiempo que se mantienen viables en dichas condiciones.

En este trabajo se ensayaron distintos métodos de conservación como forma de contribuir a esta necesidad. Debido a la duración del trabajo fue posible evaluar la eficiencia de los métodos luego de un año de almacenamiento, lográndose el crecimiento normal del 100% de los aislamientos evaluados. Los métodos del aceite y del papel resultaron ser efectivos en mantener la viabilidad de los aislamientos y presentar la ventaja de un menor riesgo de contaminación o pérdida de características genéticas, como es el caso del mantenimiento por repiques continuos en medio de cultivo.

6 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se desprende que de 25 aislamientos de *G. citricarpa* analizados, y así clasificados debido a la alta similitud de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2, no fue posible identificar una variabilidad importante a través de los parámetros evaluados. Se puede destacar la diferencia en la velocidad de crecimiento de las colonias de Gc en medio PDA, como una variación evidente.

El par de cebadores específicos GCF3/GCR7, diseñados por Bonants *et al.*, 2003, fue efectivo para identificar todos los aislamientos pertenecientes a *G. citricarpa*, por lo cual constituye una herramienta importante para la detección molecular del patógeno.

Las características morfológicas, en cambio, no son una herramienta confiable para la identificación de Gc, ya que es fácilmente confundible con otras especies de hongos endófitos, pertenecientes al mismo género y puede arrojar falsos positivos, causando importantes pérdidas económicas.

No fue posible aislar *G. mangiferae* de las muestras uruguayas procesadas, a pesar de ser un hongo endófito aislado frecuentemente de plantas cítricas.

Como producto de este trabajo, se generó una colección de aislamientos de Gc, aislados de muestras uruguayas.

7 PERSPECTIVAS

Una de las perspectivas futuras es poner a punto la detección del patógeno *Guignardia citricarpa* por técnicas moleculares, a partir de tejido vegetal sintomático y asintomático. Esto presentaría importantes ventajas para los productores citrícolas, ya que podrían diagnosticar de forma temprana la presencia de la enfermedad en sus plantaciones y poder tomar las medidas de control necesarias.

Lograr un método de inoculación artificial en plantines, permitiría realizar estudios de patogenicidad y así poder evaluar las cepas circulantes en nuestro país, para poder tomar medidas de control más efectivas. Además, permitiría estudiar los mecanismos de respuesta de defensa vegetal frente a Gc, así como los mecanismos o factores involucrados en la patogenicidad.

Se podrían hacer además, pruebas in vitro de control biológico, enfrentando al patógeno con otros microorganismos, de manera de obtener algún agente de biocontrol y poder así disminuir o eliminar la necesidad de utilizar fungicidas, que afectan al medio ambiente y encarecen notablemente la producción citrícola.

Otro aspecto que sería interesante investigar, es la producción de metabolitos secundarios de interés biotecnológico, ya que existen reportes de compuestos con propiedades antimicrobianas y anticancerígenas, producidos por algunas especies del género *Guignardia*.

Finalmente, continuar con la evaluación de los métodos de conservación de aislamientos ensayados, para poder evaluar el tiempo máximo de conservación.

8 BIBLIOGRAFÍA

Abd-Elsalam, K. A., Yassin, M. A., Moslem, M. A., Bahkali, A. H., de Wit, P. J. G. M., McKenzie, E. H. C., et al. (2010). Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens, *Fungal Diversity*, 45 (1): 21–32.

Aguilar – Vildoso, C., Baldini, J., Feichtenberger, E., de Goes, A., Bellato, M. (2002). Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros. Projeto CE – MERCOSUL ALA 93/143 AGRÍCOLA. Brasil.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402.

APHIS, (2010). Legislative and public affairs. <http://www.aphis.usda.gov>.

Azevedo, J. L. Microrganismos Endofíticos. En: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna : Embrapa, 1998. p. 117-137.

Baayen, R. P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van Der Aa, H. A., DeWeerd, M., et al. (2002). Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92: 464–477.

Baldassari, R. B., Reis, R. F. (2009). A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 1–4.

Baldassari, R. B., Wickert, E., de Goes, A. (2008). Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 103–110.

Bonants, P. J. M., Carroll, G. C., De Weerd, M., Van Brouwershaven, I. R., & Baayen, R. P. (2003). Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 503–513.

Caixeta, M. P., Corazza, M. J., de Oliveira, R. R., Zanutto, C. A., et al. (2008). Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolado de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros. *Acta Scientiarum Agronomy*, 30: 625–630.

Cañedo, V., Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Carrol, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, Brooklym, v.69, p.2-9, 1988.

Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V., Stegehuis, G. (2004). Mycobank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50: 19–22.

Díaz, L.; Fischer, G.; Brennan, M; Texeira, W. 2007. Estudio de la biología y la epidemiología de la mancha negra de los Citrus. Proyecto N° 20 INIA – DGSSAA – FA (informe de actividades).

Durán, E. L., Ploper, L. D., Ramallo, J. C., Piccolo Grandi, R. A., Hupper Giancoli, A. C., Azevedo, J. L. (2005). The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Standards. (2010). EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2003). Diagnostic protocols for regulated pests. *Guignardia citricarpa* Bulletin, 33: 271–280.

Everett, K. R., Rees-George, J. (2006). Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. *Plant Pathology*, 55: 194–199.

Everett, K. R., Rees-George, J. (2006). Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. *New Zealand Plant Protection*, 59: 141–145.

Fialho, M. B., Toffano, L., Pedroso, M. P., Augusto, F., Pascholati, S. F. (2010). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 925–932.

Glienke, C., Pereira, O. L., Stringari, D., Fabris, J., Karva-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R. G., Groenewald, F. Z., Crous, P. W. (2011). *Persoonia*, 26: 47–56.

Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C. I., Vieira, M. L. C., Barroso, P. A. V., Azevedo, J. L. (2002). Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 251–255.

Grünig, C. R., Sieber, T. N., Holdenrieder, O. (2001). Characterization of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycological Research*, 105: 24–32.

Grünig, C. R., Sieber, T. N., Rogers, S. O., Holdenrieder, O. (2002). Spatial distribution of dark septate endophytes in a confined forest plot. *Mycological Research*, 106: 832–840.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.

Hantula, J., Dusabenyagasani, M., Hamelin, R. C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS)—a novel method for characterization genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26: 159–166.

Hidalgo, E. I., Pérez, L. (2010). Diferenciación morfológica, cultural y biológica de *Guignardia citricarpa* y *Guignardia mangiferae* en frutos cítricos de Cuba. *Fitosanidad*, 14: 141–152.

Holliday, P. (1980). *Fungus diseases of tropical crops*. Cambridge University Press, pp 234–235.

Kotzé, J. M. (1981). Epidemiology and control of Citrus Black Spot in South Africa. *Plant Disease*, 65: 945–950.

Kotzé, J. M. (2000). Punteado negro. En: *Plagas y enfermedades de los cítricos* (Ed. por Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & Gram., J. H.) 2ª edición, pág. 23–25. American Phytopathological Society, Press St Paul (USA).

Kumaran, R. S., Muthumary, J., Hur, B. (2008). Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1): 103–106.

Maki, C. S. (2006). Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Cacao *Theobroma cacao* L. Tesis de Doctorado – Sector de Agronomía, Genética y Mejoramiento de Plantas. Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidad de São Paulo. Piracicaba.

Meyer L., Sanders G. M., Jacobs R., Kortsen L. (2006). A one-day method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*, 90: 97–101.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) – Estadísticas Agropecuarias (DIEA). (2010). Anuario estadístico agropecuario 2010. www.mgap.gub.uy/diea.

NAPFFAST, USDA-APHIS-PPQ-CPHST-PERAL/NCSU. (2009). Validation study and risk assessment: *Guignardia citricarpa*, (Citrus Black Spot).

Okane, I., Lumyong, S., Nakagiri, A., Ito, T. (2003). Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Pyllosticta capitalensis*). *Mycoscience*, 44: 353–363.

Omacini, M., Chaneton, E. J., Ghersa, C. M., Müller, C. B. (2001). *Nature*, 409: 78–81.

Paul, I. (2006). Modelling the distribution of citrus black spot caused by *Guignardia citricarpa* Kiely. Tesis de doctorado, Universidad de Pretoria.

Paul, I., van Jaarsveld, A.S., Korsten, L., Hattingh, V. (2005). The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. *Crop Protection*, 24: 297–308.

Peres, N. A., Harakava, R., Carroll, G. C., Adaskaveg, J. E., Timmer, L.W. (2007). Comparison of molecular procedure for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. Mangiferae*. *Plant Disease*, 91: 525–531.

Pérez, E. y Alves, P. (2011). Estudios para elaborar una propuesta de manejo integrado para mancha negra de los cítricos. Resultados de Avance. Período 2006 – 2010. INIA Salto Grande.

Possiede, Y. M., Gabardo, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L. V., Azevedo, J. L., Glienke, C. (2009). Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 308–313.

Rodrigues, K. F., Hesse, M., Werner, C. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*, 40: 261–267.

Rodrigues, K. F., Sieber, T. N., Grünig, C., Holdenrider, O. (2004). Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based in morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *Mycological Research, Cambridge*, 108:45–52.

Rodrigues, M. B. C., Andreote, F. D., Spósito, M. B., Aguillar-Vildoso, C. I., Araújo, W. L., Pizzirani-Kleiner, A. A. (2007). Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 323–327.

Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182: 314–330.

Romão, A. S., Spósito, M. B., Andreote, F. D., Azevedo, J. L., Araújo, W. L. (2011). Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. *Genetics and Molecular Research*, 10 (1): 243–252.

Santamaría, J., Bayman, P. (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, 50: 1–8.

Schutte, G. C., Mansfield, R. I., Smith, H., Beeton, K. V. (2003). Application of Azoxystrobin for control of benomil-resistant *Guignardia citricarpa* on Valencia oranges in South Africa. *Plant Disease*, 87: 784–788.

Silva, T. M., RNA dupla-fita em *Guignardia citricarpa* e estimativa do número de cromossomos em *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*. Tesis de Maestría, Curitiba, UFPR, 2008. Orientador: Prof. Dra. Chirlei Glienke. Universidad Federal de Paraná.

Snowdon, A. L. (1990). General introduction & fruits. In: *Colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruit and vegetables*. Manson Publishing, 1: 62–63.

Stierle, A., Strobel, G. A., and Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science*, 260: 214–216.

Stinson, M., Ezra, D., Hess, W. M., Sears, J., Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compound. *Plant Science*, 165: 913–922.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876–4882.

Trtkova, J., Raclavsky, V. (2006). Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 150(1): 51–61.

USDA/APHIS/PPQ. (2007). Risk assessment for the importation of fresh lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) fruit from northwest Argentina into the continental United States.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 315–322.

Wickert, E., de Goes, A., de Macedo Lemos, E. G., de Souza, A., da Silveira, E. L., Dias Pereira, F., Rinaldo, D. (2009). Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31: 360–380

Wujun, G., Shufen, L., Da, H., Chuanliang, D., Longdou, L. (2007). Phylogenetic classification as revealed based on optimize ISSR-PCR system in the *Osmanthus*. *Analele Științifice ale Universității Alexandru Ioan Cuza, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*, 8: 133–140.

ANEXO I: Alineamiento de la región ITS1 e ITS2 de las secuencias obtenidas en este trabajo con secuencias descargadas del NCBI.

	10	20	30	40	50	60	70	80	
G_citricarpa	-T	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
F_kerriae	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
fungal_endophyte	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
P_citribraziliensis	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
G_mangiferae	CT	GAAATGTAATAAACCTT	TATTGAAAGGT	TCAGAGTAGGC	GCT	ACAACGCC	GAAATGAC		
G_laricina	GTAA	GTCGTAAACAAGGTT	TCCGTAGGTGAC	CTGGGAAGGATCATTACC	GAGTTGATTC	GAGCTCCGGCTCGAC			
G_philoprina	CT	GAAC	TAGTAATCT	CTGAAAGG	TGCGC	TAGGGGCCCCCTC	AAACAAGGGGC	CCC	GAAGTCC
G_aesculi	CT	GACC	TATAATCTCT	TTGAAAGG	TGCGCGTACC	CGTCCCCCC	AAAAAGGGGG	CCG	GGGAAGGTCC
G_vaccinii	GTAA	AGTCGTAAACAAGGTC	TCCGTAGGTGAC	CAGCGGAGGATCATT	AAACGAGTTA		TACAC		
G_bidwellii	CT	GAAAT	TAGTAACCT	TCGAAAGGATCG	AGTAGGCCGCCCTC	GAAAGCCGG	CCG	AAAGAGCC	
G_gaultheriae	CT	GAAC	TAGTAATCT	CTGAAAGG	TGCGCGTACC	CGTCCCCCT	AAACAAGGGGG	CCG	GGGAAGGTCC
P_pyrolae	CT	GAAC	TAGTAATCT	CTGAAAGG	TGCGCGTACC	CGTCCCCCT	AAACAAGGGGG	CCG	GGGAAGGTCC
F_spinarum	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
100.2	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
100.1	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
102	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
115	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
116	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
119	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
121	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
165	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
183	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
186	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
187	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
188	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
190	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
198	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
204	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
206	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
211	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
214	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
215	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
216	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		
218	CT	GAAATAC	GTAATCCT	GAAAGTGAT	GGAAGGGAG	GCCTT	AAAAAGCCG	CCC	GACCTAC
Phy	CT	GAAATGTAATAAACCC	TTCAGGTTT	GGAAGGGGAGCCGT	CAAAAGCTTC	CCT	GGTACATG		

	90	100	110	120	130	140	150	160
G_citricarpa	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
F_kerriae	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
fungal_endophyte	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
P_citribraziliensis	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
G_mangiferae	CTTCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG	
G_laricina	TCTCCACCC	ATGT	GTACCT	ACCTC	TGTTGCTTTGGCGGGCCG	CGGT	CCT	CGCAC
G_philoprina	T	TCACACC	TTGT	GTACCTTACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG	
G_aesculi	TCTCACACC	CTTGT	GTACCTTACCA		TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG	
G_vaccinii	TCCCAACCC	TTGT	GTACCTTACCA	CTTGT	GTACCTTACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
G_bidwellii	CTTCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG	
G_gaultheriae	TCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG	
P_pyrolae	TCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG	
F_spinarum	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
100.2	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
100.1	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
102	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
115	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
116	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
119	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
121	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
165	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
183	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
186	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
187	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
188	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
190	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
198	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
204	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
206	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
211	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
214	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
215	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
216	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG
218	CCTCACACC	TTGT	GTATCT	ACCA	TGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGTCGGCG	
Phy	CCTCAC	CCC	TTGT	ATATCT	ACCA	CGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTT	GACCCGGG	CGGCCGGCG



Figura N° 16: Alineamiento de la región ITS1

	10	20	30	40	50	60	70	80
G_citricarpa	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACGTC	CCGC	TGCCGGACGGCCCT		
P_kerriae	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGTCG	TCTGC	TGCCAGACGGCCCT		
fungal_endophyte	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCTGC	TGTCAGACGGCCCT		
P_citribraziliensis	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCTGC	TGTCAGACGGCCCT		
G_mangiferae	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCAACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
G_laricina	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCTCCG	TCTGC	CGCGGACGGCCCT		
G_philoprina	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
G_aesculi	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
G_vaccinii	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	TACGGACGAGAAGCC	GGTATTGGGGCGCGG	CGATCGAGCCTAGC	TCCGGCCGGC	
G_bidwellii	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	CGTCGGACGGCCCT		
G_gaultheriae	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
P_pyrolae	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
P_spinarum	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
100.2	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
100.1	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
102	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
115	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
116	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
119	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
121	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
165	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
183	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
186	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
187	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
188	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
190	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
198	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
204	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
206	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
211	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
214	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
215	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
216	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
218	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		
Phy	-ATTTC AACCCCTCAAG	CTCTGC	TTT	GGTATTGGGGCGACG	TCCGC	TGCCGGACGGCCCT		

	90	100	110	120	130	140	150	160
G_citricarpa	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
P_kerriae	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
fungal_endophyte	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
P_citribraziliensis	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
G_mangiferae	TG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	CGTGGG CGA		
G_laricina	CG AAGACCTCGGCGTGG	CGTCTT GCCTCA	GC	CGTAGTAG AAAACA	CGTCTCGCTTTGGAGCG	CACGG CGT		
G_philoprina	CG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	CTGGG CGT		
G_aesculi	CG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	CGTGGG CGA		
G_vaccinii	TCCGAAATTTAGTGGCGG	CCCGTTCCGGCGACCT	CG	CGTAGTAGTAACTTAACC	TCCG ACTGGGACAGCAGCCGGCGG			
G_bidwellii	CG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAACAT	CTCGCTTTGGAGCG	CTGGG CGA		
G_gaultheriae	CG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAACAT	CTCGCTTTGGAGTG	CTAGG CGT		
P_pyrolae	CG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAACGT	CTCGCTTTGGAGTG	CTAGG CGT		
P_spinarum	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
100.2	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
100.1	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
102	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
115	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
116	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
119	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
121	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
165	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
183	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
186	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
187	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
188	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
190	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
198	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
204	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
206	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
211	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
214	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
215	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
216	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		
218	GG AAGACCTCGGCGACGG	CGTCTCAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	GG	GGGGGGCCG		
Phy	GG AAGACCTCGGCGACGG	CATTC CAGCCTCGA	GC	CGTAGTAGTAAATATCTCGCTTTGGAGGA	TG	GGGGTGGC		

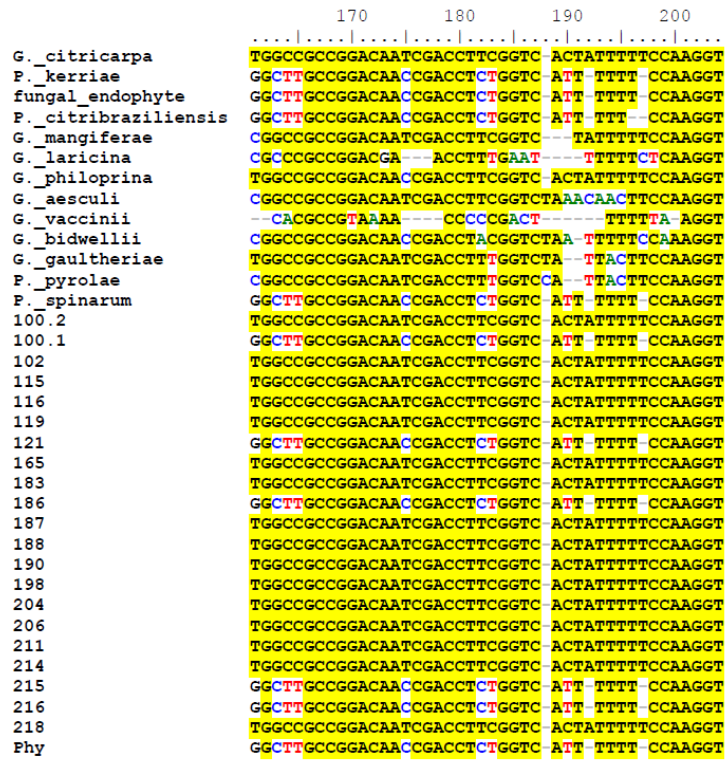


Figura N° 17: Alineamiento de la región ITS2

ANEXO II: Tabla resumen de los resultados obtenidos.

Nº	Muestra	Hospedero	Origen	Síntoma	PCR Gc	PCR Gc/Gm	Halo amarillo	Crec (cm)	Lobulación
100.2	Hoja	Limón	Salto	mancha dura	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.40	medio
102	Fruta	Limón	Montevideo	mancha pecosa	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.53	muy
115	Fruta	Valencia	Salto	mancha dura	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.10	medio
116	Fruta	Limón	Montevideo	mancha dura	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.95	medio
119	Fruta	Valencia	Salto	mancha pecosa	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.63	medio
165	Fruta	Limón	Paysandú	mancha pecosa	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.63	medio
170	Hoja	Limón	Salto	mancha dura	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.45	medio
175	Aislamiento	Valencia	Argentina	Sd	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.47	medio
181	Aislamiento	Valencia	Argentina	Sd	POSITIVO	Sd	POSITIVO	1.33	medio
183	Aislamiento	Valencia	Argentina	Sd	POSITIVO	Sd	POSITIVO	1.93	muy
187	Fruta	Valencia	Salto	mancha pecosa	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.13	medio
188	Fruta	Valencia	Salto	mancha dura	POSITIVO	Sd	POSITIVO	3.08	muy
189	Fruta	Valencia	Salto	mancha dura	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.37	medio
190	Fruta	Valencia	Salto	mancha dura	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.12	muy
195	Fruta	Valencia	Salto	mancha dura	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.87	medio
197	Fruta	Valencia	Salto	mancha pecosa	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.47	medio
198	Fruta	Valencia	Salto	mancha dura	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.61	medio
204	Fruta	Montenegrina	Salto	mancha dura	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.63	muy
205	Fruta	Montenegrina	Salto	mancha pecosa	POSITIVO	Sd	POSITIVO	1.82	medio
206	Fruta	Montenegrina	Salto	mancha virulenta	POSITIVO	Gc	POSITIVO	3.23	medio
208	Fruta	Montenegrina	Salto	mancha virulenta	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.57	medio
209	Fruta	Ellendale	Salto	mancha pecosa	POSITIVO	Sd	POSITIVO	2.07	medio
210	Fruta	Ellendale	Salto	mancha pecosa	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.62	muy
211	Fruta	Ellendale	Salto	mancha dura	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.53	medio
214	Fruta	Ellendale	Salto	mancha dura	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.00	medio

VC8	Aislamiento	Valencia	Brasil	Sd	POSITIVO	Gc	POSITIVO	2.50	medio
VC20	Aislamiento	Valencia	Brasil	Sd	POSITIVO	Gc	POSITIVO	3.00	medio
100.1	Hoja	Limón	Salto	mancha dura	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	4.41	sin
121	Aislamiento	Sd	DGSSAA	Sd	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3.97	sin
186	Aislamiento	Sd	DGSSAA	Sd	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2.83	sin
215	Aislamiento	Sd	DGSSAA	Sd	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	4.02	sin
216	Aislamiento	Sd	DGSSAA	Sd	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2.42	medio
Phy	Aislamiento	Sd	Fac. Ingeniería	Sd	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	4.32	sin
P4	Aislamiento	Lima	Brasil	Sd	NEGATIVO	Gm	NEGATIVO	5.00	sin
P7	Aislamiento	Lima	Brasil	Sd	NEGATIVO	Gm	NEGATIVO	3.77	sin