

**Tesina de Grado**  
**Licenciatura en Bioquímica**  
**Facultad de Ciencias, UdelaR**  
**Montevideo, Uruguay, 2012**



Autora: Bach. Lucía Sessa Jusid

Orientadora: Dra. Sandra Lupo

Co-orientador: Dr. Eduardo Abreo

Sección Micología

Facultad de Ciencias, UdelaR

## AGRADECIMIENTOS.

A Sandra y Eduardo por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por ponerle toda la buena onda y paciencia tanto al trabajo de laboratorio como a la redacción de esta tesis. Gracias por enseñarme todo lo que sé, confiar en mí y retarme cuando es necesario.

A todo el Laboratorio de Micología y en especial a Lina por darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente en un lugar tan lindo y por sus aportes en la escritura de esta tesis.

A Fernando por sus consejos y apoyo así como a todos mis compañeros del laboratorio, Belén, Anita, Silvina, Naty, Agustina, Rafa, Mariela, Welker, Carlos, Luis, Dinorah, Raquel, Susana, Sebastian M, Umberto y sebastian S. por estar siempre para cualquier consulta, charla, mate, salida, etc.

A mis amigos de la facu y de la vida por estar siempre apoyándome, agradecida de tenerlos en mi vida y hacer de estos años los mejores!.

A mi familia por estar siempre conmigo y bancarme todo este tiempo...especialmente a mamá Anita y a mi brother.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Cultivo de manzano.....	2
Enfermedades del manzano.....	5
Organismos endófitos vs. Patógenos.....	18
Estructura de la pared celular vegetal.....	21
Enzimas lignino-celulósicas.....	25
HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Aislamiento.....	31
Identificación de especies.....	33
Estudio de patogenicidad.....	36
Actividad enzimática.....	40
Análisis de datos.....	42
RESULTADOS .....	43
Aislamientos.....	43
Características de los aislamientos.....	44
Patogenicidad.....	49
Actividad enzimática.....	53
DISCUSIÓN.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXO.....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### INTRODUCCIÓN

Figura 1 – <i>Phomopsis</i> spp.....	7
Figura 2 – <i>Phomopsis cinerascens</i> .....	11
Figura 3 – <i>Phomopsis cotoneastri</i> .....	12
Figura 4 – <i>Phomopsis mali</i> .....	13
Figura 5 – Síntomas causados por <i>P. mali</i> en manzano.....	14
Figura 6 – <i>Phomopsis vaccinii</i> .....	15
Figura 7 – Síntomas causados por <i>P. vaccinii</i> en arándano.....	16
Figura 8 – Síntomas causados por <i>Phomopsis viticola</i> en vid.....	17
Figura 9 – Estructura esquemática de la celulosa.....	21
Figura 10 – Estructura esquemática del dominio homogalacturonano de la pectina.....	22
Figura 11 – Estructura esquemática del dominio ramnogalacturonano de la pectina.....	22
Figura 12 – Estructura esquemática del xilano.....	23
Figura 13 – Estructura esquemática de la lignina.....	24
Figura 14 – Esquema de la biodegradación de la lignina.....	26
Figura 15 – Esquema de la degradación de la celulosa.....	28
Figura 16 – Esquema de la degradación del xilano.....	28
Figura 17 – Esquema de la degradación de la pectina.....	29

### MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 18 – Síntoma de enfermedad.....	31
Figura 19 – Síntoma en rama de manzano cv. Cripps Pink.....	31
Tabla 1 – Secuencias de los primers generales ITS4 e ITS5.....	34
Tabla 2 – Reactivos y volúmenes utilizados en la mezcla de reacción.....	34
Tabla 3 – Aislamientos utilizados en el análisis filogenético.....	35
Figura 20 – Procedimiento de inoculación.....	36
Figura 21 – Diagrama de obtención de fragmentos y plaqueado.....	37
Tabla 4 – Aislamientos seleccionados para el análisis molecular y enzimático.....	38

## RESULTADOS

Figura 22 – Frecuencia relativa de aislamiento de <i>Phomopsis</i> spp.....	43
Figura 23 – Morfotipo 1: Aislamiento $Z_{12}$ .....	44
Figura 24 – Morfotipo 1: Aislamiento $Z_2$ .....	45
Figura 25 – Morfotipo 2: Aislamiento $Z_7$ .....	46
Figura 26 – Morfotipo 2: Aislamiento $Z_{13}$ .....	46
Figura 27 – Árbol filogenético consenso.....	48
Figura 28 – Necrosis observada a los 30 días de inoculación.....	49
Tabla 5 – Áreas promedio de herida según el aislamiento y su desvío estándar.....	49
Figura 29 – Frecuencia de re aislamiento de <i>Phomopsis</i> sp.....	50
Figura 30 – Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	51
Figura 31 – Arbol filogenético más parsimoniosos.....	52
Figura 32 – Actividad endocelulasa de aislamientos $Z_{12}$ , $Z_7$ y $Z_{13}$ .....	53
Tabla 6 – Áreas de crecimiento en $\text{cm}^2$ .....	54
Figura 33 – Actividad $\beta$ -glucosidasa de aislamientos $Z_{12}$ y $Z_7$ .....	54
Figura 34 – Actividad xilanasa de aislamientos $Z_{12}$ y $Z_{13}$ .....	55
Figura 35 – Actividad lacasa del aislamiento $Z_{12}$ .....	55
Figura 36 – Actividad ligninasa de aislamientos $Z_{12}$ y $Z_7$ .....	56
Figura 37 – Actividad pectinasa de aislamientos $Z_{12}$ , $Z_{12}^*$ y $Z_7$ .....	57

## RESUMEN

En Uruguay el cultivo del manzano representa el 50% de la producción frutícola total, habiendo sido reconvertido con la introducción de cultivares bicolors como Cripps Pink. Los patógenos más comunes que producen lesiones en el tronco de manzanos son *Botryosphaeria dothidea*, *B. lutea*, *B. obtusa* y *Phytophthora* spp. En otras regiones, especies pertenecientes al género *Phomopsis* se han reportado como causantes de quemado de brotes y canchros en árboles frutales de distintas especies, incluyendo manzano. En el verano de 2010 se registró la muerte del 30 % de los árboles de una plantación de manzanos cv. Cripps Pink en el sur de Uruguay. Los árboles presentaban canchros rojizos hundidos, que eventualmente rodeaban todo el tronco causando la muerte de la planta. El objetivo del presente estudio fue identificar los organismos causales de dicho síntoma, evaluar su patogenicidad y la capacidad de producir enzimas extracelulares. Los hongos aislados fueron identificados por sus características morfológicas y mediante análisis de secuencias de la región ITS. Para evaluar la patogenicidad se inoculó un aislamiento representativo de cada morfotipo, en varas de árboles de un año durante el período de dormancia invernal en campo. Se evaluó la formación de canchros y el porcentaje de recuperación de los hongos. La capacidad de producir enzimas (celulasas,  $\beta$ -glucosidasas, pectinasas, xilanasas y ligninasas) se evaluó en placa mediante ensayos semi-cuantitativos. Se encontraron dos morfotipos correspondientes a dos especies: *Phomopsis cotoneastri* y *Phomopsis* sp.. Todos los aislamientos presentaron actividad celulolítica y pectinolítica. Sin embargo, no presentaron la capacidad de degradar xilanos o lignina. Ambas especies resultaron patógenas con diferente grado de virulencia. Los dos aislamientos de *P. cotoneastri* resultaron ser los más virulentos. Los aislamientos de *Phomopsis* sp. presentaron distinta virulencia entre sí. Esta es la primera vez que se identifica *P. cotoneastri* como patógena en manzano.

## INTRODUCCIÓN

### *Cultivo de Manzano*

La manzana, fruto proveniente del árbol de manzano (*Malus spp.*) es una de las frutas dulces de mayor difusión a escala mundial, constituyendo el 50% de la producción mundial de árboles frutales de hoja caduca en la mayoría de los países con climas templados (Schneider & Scarbrough, 1980). Esto se debe fundamentalmente a su fácil adaptación a diferentes condiciones climáticas y a una gran diversidad de suelos y sistemas de cultivo. Además su gran valor alimenticio y terapéutico, así como la calidad y diversidad de productos y subproductos generados en la industria la hace muy atractiva para los consumidores.

El género *Malus* incluye más de 7500 variedades pertenecientes a la familia Rosaceae y a la clase Dicotiledoneas. Presentan flores grandes de color blanco, casi sésiles o cortamente pedunculadas, las cuales se abren unos días antes que las hojas. Éstas son de forma oval, blandas, cortamente acuminadas, aserradas y de color verde oscuro. Los frutos globosos (pomo) presentan pedúnculos cortos y numerosas semillas de color pardo brillante en su interior. Su origen se encuentra situado entre Europa, Asia y América del Norte, sin embargo actualmente su cultivo se distribuye ampliamente a nivel mundial; Uruguay se encuentra en la posición número 58 a nivel mundial en cuanto a la producción de manzanas (FAO, 2008) y ésta ha recaudado en 2008 un valor bruto de producción de 22.552 miles de dólares.

Actualmente en nuestro país las plantaciones de frutales de hoja caduca se concentran en el Sur del país, siendo la superficie de plantación frutícola estimada en el año 2010 de 7.3 mil hectáreas. De éstas 3.508 ha se utilizan para el cultivo de manzanas; cuya producción anual es de 52.226 toneladas correspondientes al 50% de la producción frutícola total, que se corresponde con un valor bruto de 26.117 miles de dólares (MGAP – DIEA, 2010).

La producción total de manzanas estimada en nuestro país para el año 2011 fue de 69.350 toneladas. Esta predicción es 1.33 veces mayor a la del año 2010, correspondiéndose con un aumento total del orden de las 17 mil toneladas. Los incrementos esperados en la producción se registran en las variedades bicolors, Cripps Pink, Fuji y Granny Smith. El mayor aumento esperado corresponde a la variedad Cripps Pink con una relación del 1.89 con respecto a la producción en el año 2010 (Anuario Estadístico Agropecuario 2011).

El cultivar Cripps Pink lleva el nombre de su creador-productor Jhon Cripps y fue seleccionada del programa original de producción de manzanas (*Malus domestica*, Borkh) en la Horticultural Research Station of Stoneville de Australia Occidental, en 1979. A nivel mundial se produce y comercializa bajo un sistema de Club, donde la fruta que llega a cierto standard de calidad, se comercializa con una marca registrada, que en este caso es Pink Lady<sup>TM</sup>. Toda fruta que no llegue a este standard de calidad no puede comercializarse como Pink Lady<sup>TM</sup> y se debe hacer como Cripps Pink, con precios hasta 50% más bajos. Este cultivar proviene del cruzamiento entre Lady Williams y Golden Delicious con el que se busco combinar la firmeza, el potencial de almacenaje y baja susceptibilidad a la mancha amarga "bitter pit" de la primera, con la buena calidad organoléptica y la baja incidencia de escaldado de la segunda (Cripps *et al.*, 1993). No es susceptible al asoleado y además presenta poca susceptibilidad al oidio causado por *Podosphaera leucotricha*. Sin embargo, sí es susceptible a la sarna causada por *Venturia inaequalis*.

El fruto presenta un color rosado brillante (del 40-70% de la superficie) característico sobre un fondo verde que se torna amarillo, del 30-60% de la superficie, en la madurez (Royal Horticultural Society, 1966). El cambio de color de rosado a rojo luminoso es tardío y es tan importante la necesidad de luz para favorecerlo, que cuando una hoja hace sombra esa zona del fruto permanece verde (Benitez, 2001). El tamaño de los frutos es de mediano a grande (70-75 mm de diámetro) y presentan forma cónicamente alargada y algo elipsoidal (Cripps *et al.*, 1993). El tamaño es uniforme dentro de un mismo árbol, cuando éste ya ha alcanzado su equilibrio. El pedúnculo es mediano y poco visible (Benitez, 2001). La cavidad calicinal es profunda y angosta (Cripps *et al.*, 1993) y puede



abrirse en frutos grandes (Campbell, 2005). La epidermis del fruto es delgada y lisa y se torna cerosa con el avance de la madurez, puede mostrar un rayado o epidermis desigual en arboles juveniles, pero es lisa en arboles maduros (Cripps *et al.*, 1993). Las lenticelas están poco marcadas (Benitez, 2001). Este cultivar no es susceptible al asoleado, al “russetting”, al agrietamiento de la superficie (pero sí en el cáliz), ni a “bitter pit” (Campbell, 2005). La pulpa es de color blanco, densa, firme, jugosa y con buen sabor. Tiene una tasa alta de azúcar/acido. Su sabor dulce-acido es similar al del cultivar Granny Smith, pero generalmente presenta mayor preferencia entre los consumidores. La media de sólidos solubles es de 13%, comparada con 14% para el cultivar Golden Delicious y 12,3% para el cultivar Lady Williams. La acidez titulable media es de 0,73%, comparada con 0,32% para Golden Delicious y 0,83% de Lady Williams. Se percibe como una manzana crocante y crujiente; su firmeza en cosecha es de 18,65 lb comparada con 17,98 lb del cultivar Golden Delicious (Cripps *et al.*, 1993).

En nuestro país el Programa Nacional de Producción Frutícola de INIA con el apoyo de la Asociación de Productores de PINK LADY del Uruguay, desde 1999 viene acompañando la producción de esta variedad realizando ensayos de investigación sobre la misma. Desde el año 2005 el aporte porcentual, zafra que ha tenido esta variedad sobre el total de las variedades de manzano cultivadas ha ido creciendo exponencialmente (Anuario Estadístico Agropecuario, 2010); la superficie plantada en el Uruguay en el 2010 correspondió a 108 ha (Anuario Estadístico Agropecuario 2010). Esta variedad se cultiva utilizando el portainjerto Malling 9 (M.9). El porta injerto M.9 pertenece a la serie Malling, la cual incluye a los portainjertos de manzanos más conocidos a nivel mundial que fueron seleccionados a principios del siglo XX en la Estación experimental de East Malling en Inglaterra. El portainjerto M.9 es muy popular debido a que induce un vigor moderado, producciones precoces y regulares debido a una alta fertilidad por unidad de crecimiento de brotes. Estas características se reflejan en una alta productividad específica ( $\text{kg}/\text{cm}^2$  de área de tronco o rama) en toda la serie Malling. Además, induce un buen tamaño de fruto y muy buenas características de calidad (color, madurez y contenido de minerales) (Silbereisen, 1992). En diversos ensayos el portainjerto M.9 ha demostrado inducir un elevado contenido de sólidos solubles (Ogata *et al.*, 1986; Sansavini *et al.*, 1986). Sin embargo, la regularidad de producción queda sujeta a la

conservación del equilibrio fructificación-crecimiento de brotes, mediante poda y raleo, necesarios para evitar cargas excesivas (Masseron & Roche, 1993). Otro aspecto que favorece al portainjerto M.9 es su aceptable resistencia a la pudrición del cuello y raíces provocada por *Phytophthora* spp. (Sewell & Wilson, 1959; Utkhede & Quamme, 1988; Carisse & Khanizadeh, 2006). Entre sus características desventajosas, se encuentra el bajo rendimiento en la propagación por estacas, el débil anclaje que obliga al uso de soporte (Masseron & Roche, 1993) y la disminución de la vida productiva de los árboles.

Algunos aspectos sanitarios negativos que presenta este portainjerto son la susceptibilidad a la llamada “fire blight” causada por el patógeno bacteriano *Erwinia amylovora* Burrill 1882 (Travis *et al.*, 1999) y a enfermedades asociadas al “pulgón lanígero” causadas por el áfido *Eriosoma lanigerum* Hausmn. (Bus *et al.*, 2000). Otros son su sensibilidad a la “enfermedad específica del replante” (SARD) y a las altas temperaturas del suelo, debido a sus raíces superficiales.

### **Enfermedades del cultivo de manzano**

Los árboles frutales de hoja caduca como el manzano son afectados por enfermedades como canchros, marchitamiento y pudrición de frutos entre otras que son ocasionadas por bacterias y hongos. Muchos de estos microorganismos producen marchitamiento y pérdida de plantas en varios cultivares comerciales de *Pyrus comunis*, *Prunus salicina* y *Malus domestica* en distintas partes del mundo.

La podredumbre del cuello es una enfermedad causada por distintas especies de *Phytophthora* que ha sido reportada en muchas áreas productoras de manzano en el mundo (Bumbieris *et al.*, 1982; Jeffers *et al.*, 1982; Jeffers & Aldwinckle, 1988; Matheron *et al.*, 1988). Además distintas especies de *Phytophthora* son el agente causal de la llamada podredumbre de la raíz (McIntosh, 1975). Diversos factores favorecen el desarrollo de estas enfermedades incluyendo una excesiva humedad del suelo asociada a un pobre drenaje, ya que el suelo anegado favorece la germinación de las oosporas y la producción de zoosporas, a la vez que produce estrés y predispone a la planta. Otros

factores son temperaturas moderadas, presencia de heridas y la susceptibilidad del porta injerto utilizado (MacDonald & Duniway, 1978a, b; Harris & Tobutt, 1986; Jeffers & Aldwinckle, 1986; Browne & Mircetich, 1996).

Los patógenos más comunes que producen lesiones en el tronco de manzanos son *Botryosphaeria dothidea*, *B. lutea* y *B. obtusa* (Slippers *et al.*, 2007). Las especies de *Botryosphaeria* son responsables del cancro de tronco o ramas y además son el agente causal de la pobredumbre blanca del fruto. La enfermedad es más severa sobre árboles que se encuentran debilitados por sequia, árboles que presentan lesiones por fríos o calores extremos, lesiones por poda, una pobre o desbalanceada nutrición y por la presencia de otras enfermedades fúngicas.

En nuestro país ha sido reportada la presencia de *Phomopsis* spp. asociada a canchros en ramas y troncos de manzanos, sin embargo no se ha demostrado su patogenicidad en estos cultivos (<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/SSD/Index.html>)

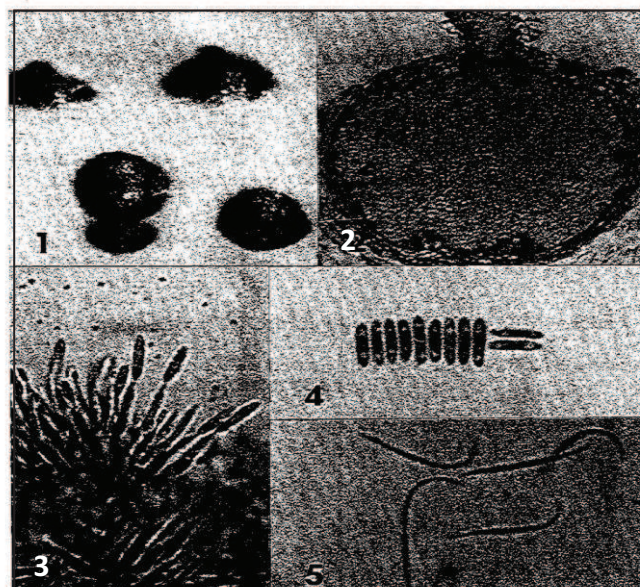
*Phomopsis* (Sacc.) Bubák es el único anamorfo conocido del Ascomycete *Diaporthe* Nitschke, sin embargo la mayoría de los aislamientos de *Phomopsis* no se encuentran asociados al estado teleomorfo *Diaporthe*, ya sea en el huésped original como en cultivo y solo se ha descrito el teleomorfo *Diaporthe* para aproximadamente el 20% de las especies de *Phomopsis* (Uecker, 1988).

El género *Phomopsis* (Sacc.) Bubák incluye alrededor de 1000 especies; muchas de las cuales son fitopatógenas, otras son endófitas, saprofitas y también agentes causales de problemas de salud en humanos y otros mamíferos (Van Warmelo *et al.*, 1970; Kulik, 1984; Uecker, 1988; Rehner & Uecker, 1994; Sutton *et al.*, 1997; Garcia-Reyne *et al.*, 2011).

Las especies de *Phomopsis* frecuentemente se encuentran como endófitas de una variedad de huéspedes tanto en climas templados como tropicales y son muy comunes en la albura de las angiospermas (Bussaban *et al.*, 2001; Tomita, 2003; Rossman *et al.*, 2007; Murali *et al.*, 2006; Suryanarayanan *et al.*, 2002; Botella & Diez, 2011; Gonzáles & Tello, 2011). Además existen muchos estudios en donde se reporta a *Phomopsis* spp. como saprofito de restos vegetales en descomposición, así como también especies endófitas

latentes y patógenas que se convierten en colonizadores primarios de una amplia gama de materiales vegetales en descomposición (Promputtha *et al.*, 2007; Kodsueb *et al.*, 2008a, b; Kumaresan & Suryanarayanan, 2002; Osono & Takeda, 2002; Yanna & Hyde 2002; Hyde *et al.*, 2007; Promputtha *et al.*, 2010).

Morfológicamente *Phomopsis* se caracteriza por presentar picnidios de color oscuro y ostiolados, que contienen fiálides cilíndricas que producen dos tipos de conidios; alfa conidios y beta conidios. Los  $\alpha$ -conidios son hialinos y no septados, con forma elíptica, fusiforme-elíptica u oblonga-elíptica y en la gran mayoría de las especies (93%) miden entre 4-12  $\mu\text{m}$  de largo y 1-7  $\mu\text{m}$  de ancho (aunque el 76% miden de 2-3  $\mu\text{m}$ ). Los  $\beta$ -conidios también son hialinos y no septados, filiformes y curvados en los extremos. Su longitud varía entre los 5 y 53  $\mu\text{m}$ , aunque el 87% presenta dimensiones entre los 12 y 30  $\mu\text{m}$  y su ancho varía entre 0,35 a 3,5  $\mu\text{m}$ , aunque el 95% miden entre 0,5 y 2  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1).



**Figura 1 – *Phomopsis* spp.** 1: Picnidios crecidos en tallo de alfalfa, X45. 2: Sección de un picnidio, X350. 3: Células conidiógenas, X1000. 4: Alfa conidios, X1000. 5: Beta conidios, X1000. Imagen tomada de Uecker, 1998.

La presencia de  $\beta$ -conidios es desconocida en la mayoría de las especies y su producción en muchas de ellas es errática; sin embargo en otras especies predomina la producción de estos conidios y los  $\alpha$ -conidios se encuentran en menores cantidades.

En las especies en donde se encuentran presentes ambos tipos de conidio, se observa que éstos se forman en un mismo picnidio (Uecker, 1988).

Las diversas especies inicialmente fueron nombradas de acuerdo al hospedero en las que se las encontraba (Sutton, 1980; Uecker, 1988; Wechtl, 1990; Van der Aa *et al.*, 1990), sin embargo mientras que algunas especies de *Phomopsis* están asociadas específicamente a determinados hospederos otras tienen una mayor distribución (Horn *et al.*, 1996; Murali *et al.*, 2006). Rehner y Uecker en 1994 reportaron que diversas especies de *Phomopsis* no están restringidas a un único hospedero y son capaces de infectar plantas de géneros taxonómicamente no relacionados. En el mismo sentido Satoko Kanematsu en 2002, reportó que diferentes cepas de *Phomopsis* obtenidas de árboles de durazno, pera y manzano en Japón al ser inoculadas de forma cruzada en ramas primarias y secundarias de dichas plantas, resultaron ser patogénicas, tanto para los huéspedes probados como para el huésped original.

La identificación de las distintas especies de *Phomopsis* presenta la dificultad de que las características en cultivo micro y macro-morfológicas de los aislamientos varían luego de cierto tiempo de conservados; de hecho la variación dentro de un mismo aislamiento puede llegar a ser de igual magnitud que la variación que existe entre dos aislamientos distintos (Wehmeyer, 1933; Nitimargi, 1935; Parmeter, 1958) por lo que la identificación basada únicamente en características morfológicas y de cultivo son insuficientes para una identificación correcta a nivel de especie (van der Aa *et al.*, 1990).

Actualmente en la identificación de las distintas especies de *Phomopsis* se emplean, además de las características macro y micro-morfológicas características moleculares que permiten establecer relaciones taxonómicas entre las especies y relacionarlas con sus características morfológicas. Las regiones de ADN utilizadas actualmente para realizar los análisis filogenéticos son las secuencias ITS de ADN ribosomal (van Niekerk *et al.*, 2005; van Rensburg *et al.*, 2006), los genes del locus mating-type llamado locus MAT y el gen del factor de elongación de la transducción 1 alfa, llamado EF1- $\alpha$  (Santos *et al.*, 2010).

Las especies fitopatógenas causan canchros, die-back, pudrición de ramas, pudrición de frutos, moteado de hojas, marchitamiento, deterioro y quemado en un amplio rango de huéspedes vegetales, incluyendo cultivos económicamente importantes en todo el mundo (Uecker, 1988; Santos & Phillips, 2009); muchas causan el marchitamiento y canchros en manzanos en diferentes regiones del mundo (Roberts, 1913; Fujita *et al.*, 1998) y en árboles frutales de distintas especies, incluyendo perales y ciruelos (Kobayashi & Sakuma, 1982; Nakatani *et al.*, 1984; Ogawa *et al.*, 1995; Kanematsu *et al.*, 1999).

Diversas plantas, como la del higo (*Ficus carica* L.)(Grove, 1935), arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. y *V. macrocarpon* Aiton) (Stevens, 1924), durazno (*Prunus pérsica* (L.) Batsch) (Hendrix, 1989) y vid (*Vitis vinífera* L.) (Pearson & Goheen, 1994) entre otros, también han sido reportadas como hospederos susceptibles a sufrir enfermedades causadas por distintas especies de *Phomopsis* (*P. cinerascens*, *P. vaccinii*, *P. amygdali* y *P. vitícola*, respectivamente). Por otra parte se encuentran casos en donde un hospedero puede albergar más de una especie y casos en donde una misma especie de *Phomopsis* es patógena de dos huéspedes taxonómicamente no relacionados; como por ejemplo *P. amygdali*, agente causal de canchros y quemado de ramas de árboles de almendras (Adaskaveg *et al.*, 1999) y quemado de brotes en durazneros (Farr *et al.*, 1999). Esta carencia de especificidad de hospedero junto con los mecanismos de transmisión no-sistémicos que presentan diversas especies de *Phomopsis* endófitas, constituye un peligro potencial para los pequeños y medianos productores en nuestro país, debido a que éstos generalmente mantienen huertos con más de una especie frutal, y por lo tanto una especie vegetal asociada con *Phomopsis* spp. tanto sintomática como asintomática podría servir de inóculo en otros cultivos.

***P. amygdali*** (Del.) Tuset & Portilla, 1989 se ha reportado como agente causal del quemado de ramas (twig blight) en cultivos de durazno (*Prunus pérsica* (L.) Batsch). Este hongo inicialmente fue identificado como *Fusicoccum amygdali* Del. (Guba, 1953) y posteriormente se le asignó el nombre *Phomopsis amygdali*.

Ese hongo presenta picnidios generalmente solitarios de forma globosa o aplanada, a veces elipsoidales y de color oscuro, casi negro cuyas medidas son 180-550 µm. Presentan

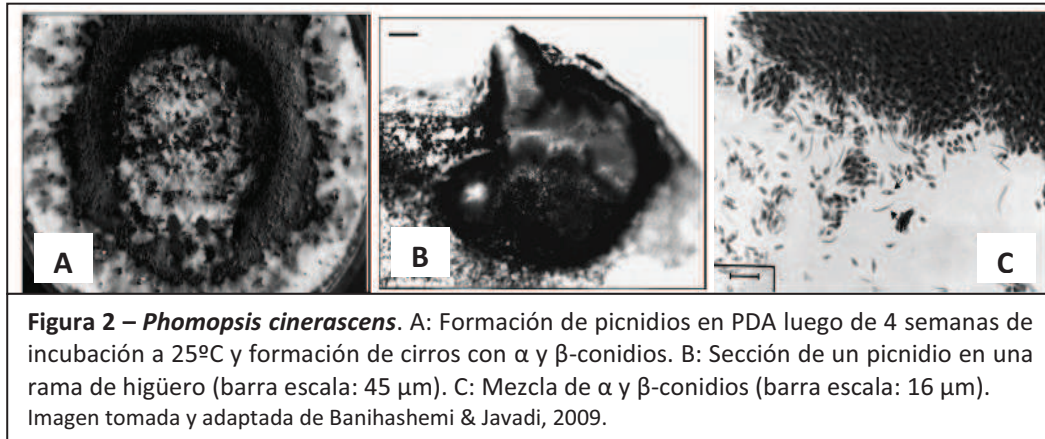


un ostiolo papilado, poco definido o claramente visible. Los conidióforos son hialinos, cilíndricos, escasamente ramificados y septados en la base. Los  $\alpha$ -conidios son hialinos y fusiformes con extremos ligeramente acuminados, son unicelulares y miden 4,9-9,9 x 2,3-3,8  $\mu\text{m}$ . Los  $\beta$ -conidios raramente se observan y cuando están presentes son hialinos, filiformes y alargados. Se observan algunos rectos pero mayoritariamente son ligeramente curvados, unicelulares y miden 14,3-23,1 x 1,1-1,9  $\mu\text{m}$ .

El síntoma de la enfermedad producida por esta especie incluye el marchitamiento y muerte de las hojas de los brotes nuevos. También se produce el marchitamiento y la muerte de flores y frutos jóvenes. Sobre la madera infectada en la base de los brotes enfermos, se puede encontrar un cancro difuso, generalmente de apariencia concéntrica y con exudado de goma.

***P. cinerascens*** Trav. fue identificado por Grove en 1935 como el agente causal de la presencia de canchros en las ramas de higueras (*Ficus carica* L.). Este hongo invade a su huésped a través de heridas, principalmente realizadas durante la poda, pero también por heridas causadas por heladas o sequías.

Morfológicamente se caracteriza por presentar picnidios agregados de color negro, inmersos en la corteza, de forma globosa-deprimida con unos 100-250  $\mu\text{m}$  de diámetro y en longitud cuyos ostiolos emergen de la superficie del huésped. Los conidióforos tienen una forma filiforme y miden 15-20 x 1,5-2  $\mu\text{m}$ , son casi rectos y presentan una leve coloración en su base. Los  $\alpha$ -conidios generalmente son no septados, presentan una forma elíptica-fusoide y una dimensión de 6 x 2-2,5  $\mu\text{m}$  con una terminación algo obtusa en uno o ambos extremos (Figura 2). Los  $\beta$ -conidios son filiformes, presentan terminaciones curvadas y miden de 20-25 x 1  $\mu\text{m}$  (Grove, 1935). En cultivo este patógeno presenta un crecimiento óptimo a 25  $^{\circ}\text{C}$ , y éste se enlentece a temperaturas de 30  $^{\circ}\text{C}$  o mayores y a 4,4  $^{\circ}\text{C}$ .



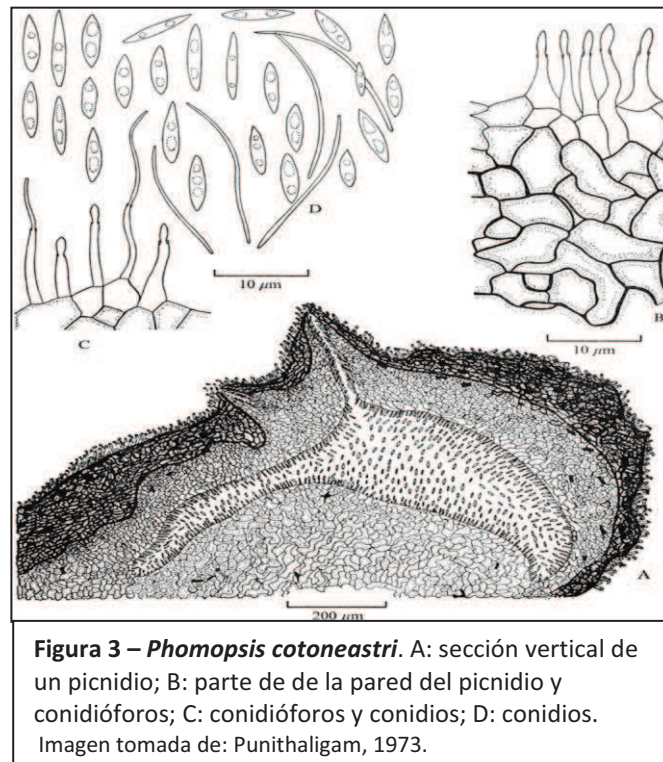
Este microorganismo sobrevive de un año a otro sobre los canchros en los árboles o en ramas infectadas que han sido podadas y permanecen en los huertos (Hansen, 1949). Luego de la infección, los conidios se producen en los canchros durante los períodos húmedos (English, 1951). Las lluvias y las herramientas de podar son los principales medios de dispersión del patógeno (Hansen, 1949) aunque los insectos y pájaros también colaboran en su dispersión.

*P. cotoneastri* fue reportada en 1973 por Punithalingam como una nueva especie de *Phomopsis*, debido a que la determinación a nivel de especie estaba basada en la identidad de la planta hospedera y por lo tanto al aislamiento de *Phomopsis* obtenido de *Cotoneaster* se lo denominó *P. cotoneastri*.

Las colonias de *P. cotoneastri* cultivadas en medio agarosa harina de avena a 24-26 °C son flocosas de color gris blanquecino con abundante micelio aéreo y presentan numerosos picnidios de color marrón casi negro. Estos se encuentran distribuidos en el micelio aéreo en círculos concéntricos de forma solitaria o agregada y presentan un ancho de hasta 1,5 mm. Las paredes de los picnidios son estromáticas; compuestas por múltiples capas de células de color café, muy pigmentadas en su exterior y con una gruesa pared celular. Los conidióforos (fialides) son hialinos, simples y a veces ramificados de forma cilíndrica, y con dimensiones de 10-15 x 2  $\mu$ m. Los  $\alpha$ -conidios son unicelulares y fusiformes de 6-9 x 2-3  $\mu$ m y los  $\beta$ -conidios son hialinos, filiformes y en su mayoría de forma curvada, midiendo de 18-25 x 1  $\mu$ m (Figura 3).



El síntoma de enfermedad producida por esta especie en *Cotoneaster salicifolius* incluye el marchitamiento de los brotes y hojas, que en verano se manifiestan como manchas pequeñas de color claro que luego aumentan su tamaño y se tornan de color oscuro (Fruzynska-Jozwiak & Jerzak, 2006).

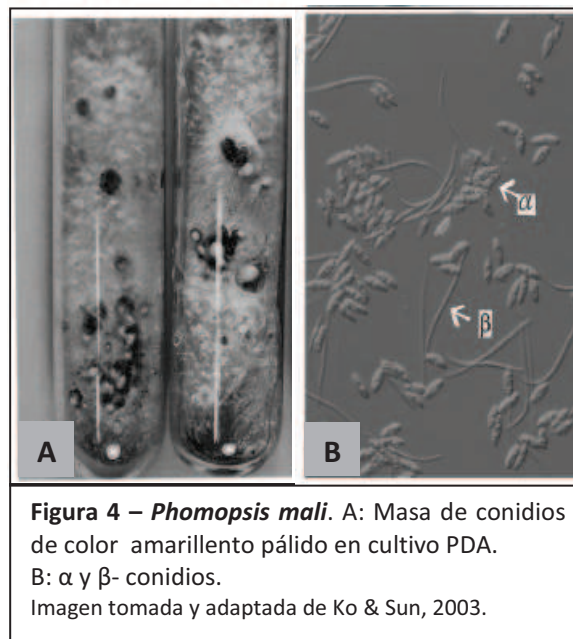


*P. mali* Roberts, cuyo estado sexual se corresponde con *Diaphorte pernicioso* Em. Marchal (Dunegan, 1932) ha sido identificado como el organismo causal del cancro en manzanos (*Malus domestica* Borkh.), enfermedad de gran importancia reportada en Norte América, Europa y Japón. También es conocido como el organismo responsable del moteado de la fruta en manzano (Ko *et al.*, 1994) y de la pobredumbre del cáliz y parte del fruto “stem-end rot” en peras en Taiwan (Ko *et al.*, 1995).

*P. mali* también causa stem-end rot en manzanas durante su almacenamiento (Figura 5) (Colhoun, 1983; Combrink *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1990; Nawawi & Swinburne, 1979; Rosenberger & Burr, 1982) y descomposición de la fruta en manzanas, peras y duraznos (Daines & Peterson, 1976; Ko *et al.*, 1995; Smith & Ramsey, 1957; Terui & Harada, 1968), sin embargo el moteado de hojas (Dunegan, 1932), canchros en árboles (Chupp & Clapp, 1923; Dunegan, 1932; Kidd & Beaumont, 1924; Smith & Ramsey, 1957) y die-back en

árboles frutales con drupa han sido las enfermedades más comunes (Cayley, 1923; Kidd & Beaumont, 1924).

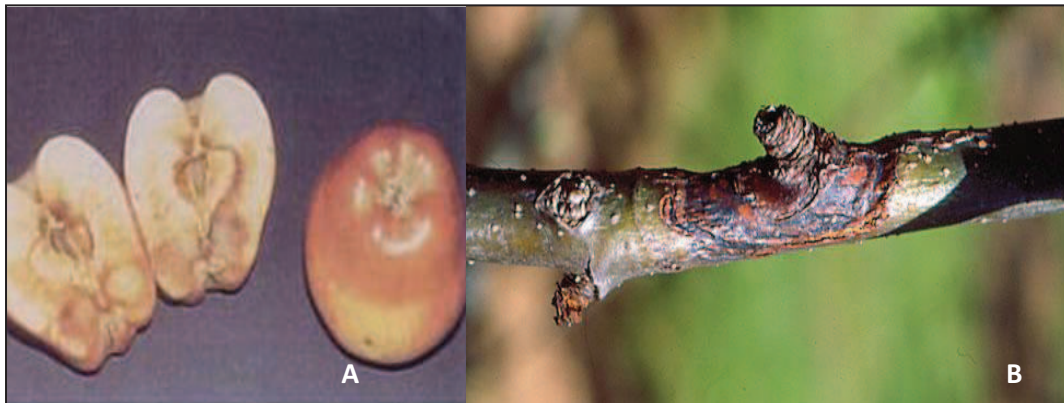
Este hongo es fácilmente cultivable en medio PDA, en donde se observa un micelio aéreo poco espeso de color blanco-tiza que gradualmente se torna gris, con aspecto algodonoso y que se oscurece con la edad. El medio de cultivo se torna de color púrpura-azulado. El desarrollo de picnidios se ve estimulado por la exposición a luz cercana al UV produciéndose a las 4-5 semanas, miden 0,14-0,22 x 0,12-0,16 mm y se observa que los conidios rezuman en un líquido cremoso o en cirros amarillos desde los ostiolos picnidiales. Los conidios son producidos por conidióforos lineales, hialinos que miden aproximadamente 20 x 2  $\mu$ m. Los  $\alpha$ -conidios son hialinos, tienen una forma ahusada con dimensiones de 7-10 x 3-4  $\mu$ m y no son septados. Los  $\beta$ -conidios son filiformes, tienen forma de S o de gancho y miden de 20-36 x 1,5  $\mu$ m (Figura 4).



Este hongo presenta una temperatura óptima de crecimiento de 20 °C, cubriendo una placa de petri de 90 mm a los 6 días de incubación. No presenta crecimiento a 0 °C (Combrink *et al.*, 1976; Roberts, 1912).

Los síntomas de enfermedad causados por esta especie se describen en sus inicios como un cancro liso, oscuro y superficial, el cual finalmente se alarga y rodea las ramas primarias y secundarias causando la muerte progresiva de los brotes desde la punta hacia la base. Estas heridas luego se agrandan, oscurecen y se rajan en sus márgenes

generando el aspecto de un cancro áspero (Roberts, 1913) (Figura 5B). Los cancos se presentan principalmente en las ramas debilitadas o secas; el patógeno produce picnidios parcialmente incrustados en la madera muerta y filamentos negros retorcidos en las células de los huéspedes colonizados; los conidios y las ascosporas que se producen en la madera muerta o seca pueden permanecer luego de la poda auspiciar como fuente de inóculo para la siguiente infección.



**Figura 5 – Síntomas causados por *Phomopsis mali* en manzano**

A: Síntomas externos e internos de pobredumbre en el cáliz (stem end rot). B: Síntoma de cancro.

Imágenes tomadas de [http://www4.gipuzkoa.net/corporac/agricultura/manzanos/esp/04\\_d.asp?id=8](http://www4.gipuzkoa.net/corporac/agricultura/manzanos/esp/04_d.asp?id=8)

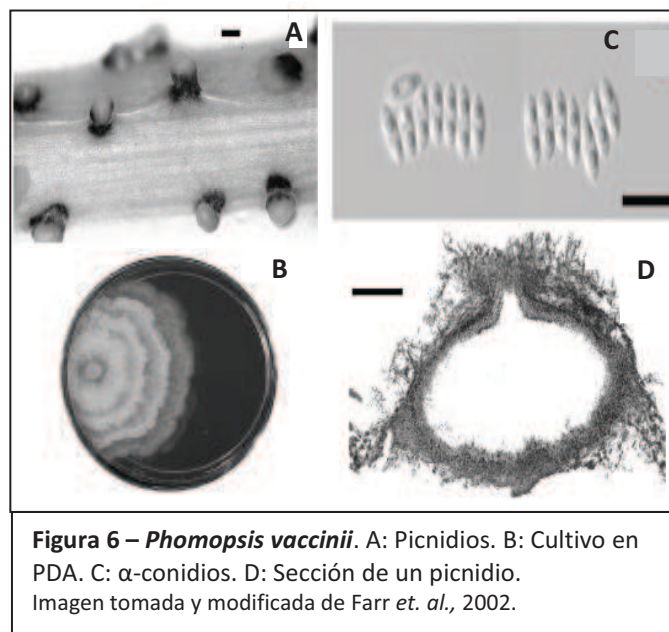
Los frutos infectados con este hongo se vuelven blandos y acuosos y como consecuencia se pudren durante su almacenamiento (Figura 5A). En las manzanas, la germinación de las esporas se ve estimulada por varios lixiviados que éstas liberan; los conidios en germinación forman apresorios y pueden penetrar el fruto directamente por su epidermis y a través de las lenticelas (The American Phytopathological Society, 1999).

Este patógeno entra a la planta a través de heridas e infecta a los frutos a través de extremo del cáliz.

*P. vaccinii* Shear ha sido reportada en 1924 por Stevens como el agente causante de quemado del brote en plantas de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) y arándano rojo (*V. macrocarpon* Aiton) y posteriormente fue descrita su patogenicidad por Wilcox en 1939 y 1940. Hoy en día han sido descritas numerosas enfermedades causadas por *P.*

*vaccini* en dichos cultivos, incluyendo la pobredumbre del fruto, canchros y dieback (Caruso & Ramsdell, 1995).

Los aislamientos de este hongo cultivados en PDA a 25 °C presentan, a los 8 días, un micelio de color blanco con una coloración de blanquecina-grisácea a castaño-grisácea alrededor del inóculo, en donde claramente se observa un crecimiento escalonado con 3 a 5 zonas bien definidas de 0,3 a 2,0 cm de ancho (Figura 6B). La superficie del micelio presenta desde una textura similar al fieltro hasta una textura algodonosa; siendo más densa hacia el margen más externo de cada zona de crecimiento



Morfológicamente se caracteriza por presentar picnidios con un ancho entre 1-2 mm de color negro, correosos, locales y de paredes gruesas, con rupturas irregulares y exudado de conidios (Figura 6A y D). Los conidióforos presentan forma ahusada y miden entre 15 y 25  $\mu\text{m}$  en picnidios jóvenes, pero aumenta en picnidios más maduros. Los  $\alpha$ -conidios son hialinos, aceptados y tienen forma fusiforme, miden 6-11 x 2-5  $\mu\text{m}$ . Los  $\beta$ -conidios miden 14-20 x 0,35  $\mu\text{m}$  y presentan forma filiforme curvada en sus extremos (Figura 6C) (Shear *et al.*, 1931).

Los canchros en los tallos infectados, independientemente de la edad, se presentan como alargados y angostos, cubiertos por la corteza o epidermis (Figura 7A) (Weingartner & Klos, 1975). En tallos de 2 años de edad, *P. vaccinii* provoca una coloración parda en el

xilema del tallo por debajo de los síntomas de marchitamiento (Weingartner & Klos, 1975). Los frutos infectados presentan un color rojizo castaño, son blandos, pulposos y generalmente se rajan o agrietan y pierden su jugo (Figura 7B) (Milholland & Daykin, 1983).



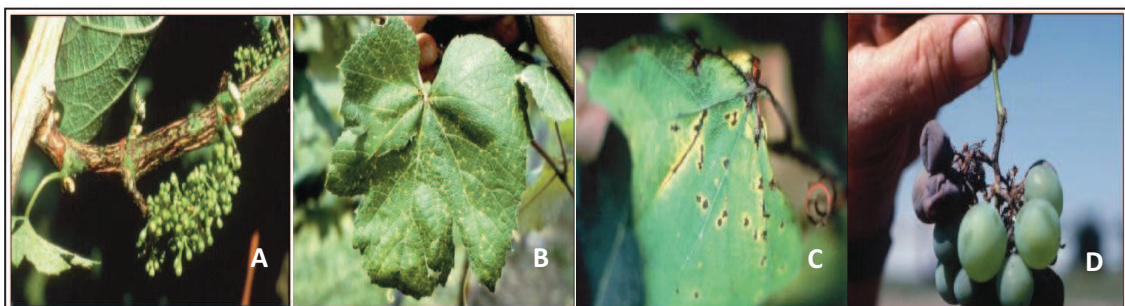
Se cree que el hongo entra a su huésped mayoritariamente a través de los brotes y las flores, en donde alcanza el tejido vascular (Milholland, 1982) sin embargo, también puede ingresar a través de heridas. El micelio progresa de forma descendente hasta la base, anillando las ramas viejas en su unión y matando parte de la planta por encima del anillo (Wilcox, 1939) produciendo así la pérdida del fruto. Este patógeno sobrevive el invierno sobre plantas muertas e infectadas durante el año anterior (Shear *et al.*, 1931; Wilcox, 1939). Las ascosporas y los conidios se diseminan cuando las condiciones de humedad y lluvias son favorables, que coincide con la época de floración, por lo que la mayoría de los conidios liberados quedan atrapados en las yemas abiertas, en donde germinan y luego alcanzan el tejido vascular. Luego de que la rama muere, los picnidios producidos por debajo de la superficie de la corteza exudan conidios, los cuales serán los causantes de infecciones posteriores.

***P. viticola*** Sacc. fue reconocido durante muchos años como el organismo responsable de la enfermedad denominada “dead-arm” de la vid. Sin embargo en 1976, se demostró que esta enfermedad era en realidad la consecuencia de dos enfermedades diferentes que ocurrían en simultáneo; por lo que se las denominó *Phomopsis* de la vara y macha foliar (Pearson & Goheen, 1994).



Este patógeno se caracteriza por presentar picnidios negros y solitarios, inmersos y uniloculados. Las paredes de los picnidios son estromáticas compuestas por varias capas de células pseudo parenquimatosas. Las células conidiogénicas son hialinas, simples, sin collaretes visibles y dimensiones de 5-10 x 5-8  $\mu\text{m}$ . Los  $\alpha$ -conidios son de forma elipsoidal y se ensanchan hacia el medio o ligeramente arriba del medio, presentan un ápice redondeado o ligeramente agudo y una base plana. Miden 6-10 x 2,5-4  $\mu\text{m}$  y pueden ser uni o bi-gutulados (Saccardo, 1915).

*Phomopsis* de la vara y mancha foliar son enfermedades que pueden afectar la mayoría de las partes de la vid, incluyendo varas, hojas, flores y bayas, y se observan en todos los viñedos (Pearson & Goheen, 1994). Cuando a comienzos de la temporada se dan climas húmedos es que ocurren las mayores pérdidas en el cultivo debido al debilitamiento de las varas, lo cual las hace más susceptibles a sufrir daño en las hojas y heridas en el invierno. Esto reduce la tasa fotosintética resultando en el deterioro del fruto, una brotación tardía, etc. (Punithalingam, 1979; Chairman *et al.*, 1982; Nicholas *et al.*, 1994; Pearson & Goheen, 1994). Entre los síntomas que se observan, los más comunes son el moteado o lesiones de las hojas y ramas y la aparición de manchas pequeñas y negras entre los internodos en la base de la rama en desarrollo. Estas manchas generalmente aparecen en los primeros tres a cuatro internodos basales (Figura 8A) y se pueden desarrollar hacia lesiones elípticas que por unión de su crecimiento se pueden asociar y generar áreas rugosas, negras e irregulares.



**Figura 8 – Síntomas causados por *Phomopsis viticola* en vid.** A: Manchado y rasgado de la caña de vid. B: Síntoma de manchado foliar temprano. C: Síntoma de manchado foliar avanzado. D: Síntoma de pobredumbre del fruto.

Imágenes tomadas de [www.dirtdoctor.com/Phomopsis-Fungal-disease\\_vq1833.htm](http://www.dirtdoctor.com/Phomopsis-Fungal-disease_vq1833.htm)

La infección foliar se manifiesta al comienzo como manchas pequeñas, de color verde claro, con márgenes irregulares que a veces tienen forma de estrella (Figura 8B) y

generalmente solo se ven afectadas las últimas cuatro hojas de una rama. Luego, con el tiempo, las manchas se agrandan, se tornan de color más oscuro y presentan un margen de color amarillo (Figura 8C). Como resultado de esto las hojas enfermas mueren y pueden desprenderse si la infección alcanza el pecíolo.

Los frutos pueden ser infectados (Gregory, 1913; Savocchia *et al.*, 2007) en todos sus estados de desarrollo (Erincik *et al.*, 2001), aquellos con una infección avanzada se muestran de color marrón claro (Figura 8D), con la piel arrugada y con un tamaño disminuido; esto es debido al crecimiento de picnidios sobre su superficie que rompen la pared del fruto y así el fruto marchita. Las infecciones en los frutos inmaduros pueden permanecer latentes y manifestar los síntomas cuando maduran (Erincik *et al.*, 2002).

Este patógeno sobrevive el invierno en las lesiones o manchas en varas del año anterior, y requiere climas frescos y húmedos para que se liberen los conidios y se desencadene una nueva infección. La dispersión de los conidios contenidos en los picnidios en el material enfermo viejo ocurre a través de lluvias, pudiendo alcanzar así a ramas, hojas y clusters en desarrollo. El microorganismo penetra en su huésped mediante los estomas, heridas o directamente en los brotes jóvenes (Pine, 1958; Punithalingam, 1979; Nalli, 1999).

### ***Organismos endófitos vs. patógenos***

Desde que en 1879 Anton De Bary define en su trabajo “El fenómeno de la simbiosis” a los simbioses como organismos diferentes que conviven juntos, se han definido una enormidad de estilos de vida simbióticos de acuerdo a los beneficios o impactos en la adaptabilidad de huéspedes macroscópicos y simbioses microscópicos (Lewis, 1985).

Más de 100 años de investigación sugieren que la mayoría, sino todas las plantas en un ecosistema natural son simbioses con hongos micorrizicos y/o hongos endófitos (Petrini, 1986). A diferencia de los hongos micorrizicos colonizadores de raíces vegetales en la rizófera, los endófitos residen únicamente dentro del tejido vegetal, creciendo dentro de las raíces así como hojas y tallos y emergiendo para esporular una vez que el tejido

vegetal se encuentra en senescencia (Sherwood, 1974; Carroll, 1988; Stone *et al.*, 2004). El programa de senescencia en células vegetales individuales se activa mediante muerte celular programada y una de sus funciones en plantas es la protección frente a organismos patógenos. Las células que mueren de esta forma generan una pequeña zona circular de células muertas llamada lesión necrótica. Esta lesión aísla y evita que la infección se extienda a los tejidos sanos circundantes, creando un ambiente tóxico y agotado nutricionalmente alrededor del patógeno (Taiz & Zeiger, 2006).

Los hongos endófitos son aquellos hongos que habitan órganos vegetales, capaces de colonizar los tejidos internos sanos de plantas, persistiendo durante un cierto período de su ciclo vital de forma asintomática; es decir sin causar sintomatología de enfermedad (Petrini, 1991; Wilson, 1995). La relación ecológica entre un hongo endófito y su respectivo hospedero es muy compleja; un endófito puede sobrevivir en una planta como simbiote brindando sustancias anti fúngicas o antibacterianas de protección que inhiben o destruyen microorganismos patógenos invasores de tejido (Strobel *et al.*, 1997), también puede brindar protección contra insectos herbívoros (Breen, 1994; Clement *et al.*, 1994) y contra nemátodos parasíticos (West *et al.*, 1988; Elmi *et al.*, 2000). En general se han reconocido dos grandes grupos de hongos endófitos; de acuerdo a sus diferencias evolutivas, taxonomía, huésped vegetal y función ecológica; los Clavicipetaceos y los No Clavicipetaceos (Carroll, 1988; Petrini, 1991; Schulz & Boyle, 2005; Stone & Petrini, 1997; Stone *et al.*, 2004).

Los organismos endófitos más estudiados son los simbioses intracelulares pertenecientes a la familia Clavicipitaceae (Ascomycota) los cuales habitan dentro de los tejidos sobre la superficie terrestre (órganos aéreos) de muchas gramíneas en zonas templadas. Estos se transmiten de forma vertical, de la planta madre a las semillas germinantes y crecen de forma sistémica a través de la hojas y tallo (Clay & Schardl, 2002). En el caso de los hongos clavicipitaceos se da un crecimiento fúngico activo dentro del tejido del hospedero en una relación aparentemente mutualista, frecuentemente incrementando la biomasa de la planta huésped, confiriendo tolerancia a la sequía y produciendo sustancias tóxicas para animales (Clay, 1988).



En contraste, los hongos endófitos no clavicipitaceos, presentan una colonización no sistémica y restringida a unas pocas células (Stone, 1987). Pueden, clasificarse en por lo menos tres clases funcionales, basadas en las interacciones ecológicas, ciclos de vida y otras características (Rodríguez *et al.*, 2008). De forma general estos hongos tienen una baja especificidad de hospedero, comprenden un amplio espectro de especies de varias familias de ascomicetes y se encuentran en todas las especies vegetales de las zonas templadas, incluyendo las gramíneas (Sieber *et al.*, 1988). Se transmiten de forma horizontal a través del ambiente y el inóculo proveniente de colonias saprofitas circundantes se propaga mediante vía aérea o por la lluvia.

Habitualmente se considera que los endófitos mutualistas han evolucionado de hongos parásitos o patógenos de plantas. Los endófitos en determinado hospedero generalmente están más relacionados con patógenos del mismo género en el mismo hospedero que con especies endófitas del mismo género en otro hospedero diferente. Los hongos endófitos y patógenos estrechamente relacionados poseen un ancestro en común, aunque el estilo de vida de dicho ancestro sea desconocido (Carroll, 1988; Saikkonen *et al.*, 1998).

Las enfermedades en plantas son caracterizadas por los tejidos en donde ocurren, por ejemplo la colonización del tejido vascular genera marchitamiento debido a la alteración en el flujo de transpiración, mientras que la proliferación en el tejido foliar genera manchas foliares debido a una disminución en la tasa fotosintética (Agrios, 1997). Aquellos hongos que generan enfermedades en las especies vegetales se consideran hongos fitopatógenos. La mayoría de las especies fitopatógenas pertenecen a géneros de Ascomycetes y Basidiomycetes.

La comunidad endofítica en algunas especies de árboles se encuentra dominada por endófitos considerados patógenos, por ejemplo especies de *Phomopsis* en *Acer macrophyllum* (Sieber & Dorworth, 1994). Sin embargo, estos patógenos han co-evolucionado con sus huéspedes, y por lo tanto no suelen ser altamente virulentos, observándose una sintomatología severa muy ocasionalmente y en dicho caso de forma localizada. El desarrollo de síntoma suele estar acompañado por cambios en los factores externos, o, en raras ocasiones por genotipos virulentos del endófito "patógeno". En contraste, cuando un hongo es introducido desde otros continentes se encuentra con

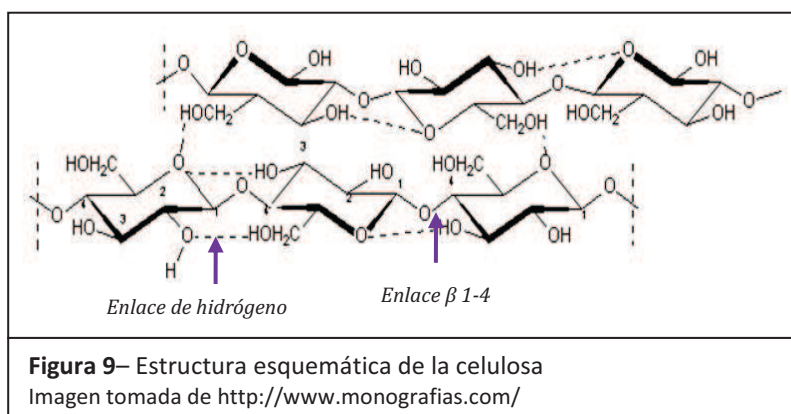
plantas con las cuales no ha co-evolucionado, y por lo tanto éstas no presentan resistencia, siendo altamente susceptibles.

Algunos hongos endófitos de árboles son potenciales patógenos y pueden cambiar su estado de quiescencia a patogénico cuando las condiciones son favorables para el patógeno y/o desfavorables para el hospedero. Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales un hongo endófito puede transformarse de mutualista a patógeno y viceversa, entre los cuales se encuentran la aparición de mutaciones puntuales (Freeman & Rodriguez, 1993); la transferencia de genes de virulencia de una especie a otra (Friesen *et al.*, 2006); la infección viral a un hongo le confiere a la planta tolerancia al calor (Marquez *et al.*, 2007) entre otros.

### **Estructura de la pared celular vegetal**

La pared de la célula vegetal recubre el exterior de la membrana plasmática de la célula vegetal, conecta células entre sí y ayuda a definir la forma celular, entre otras funciones. Su composición es variable en términos de los diferentes grupos taxonómicos y tipos celulares. En general se compone de una red de carbohidratos y proteínas estructurales embebidas en una matriz compuesta por carbohidratos y proteínas.

Su principal componente es el polisacárido fibrilar llamado celulosa, formado por aproximadamente 8000 a 12000 unidades de D-glucosas unidas entre sí mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos (Alexander, 1967) como se muestra en la figura 9.

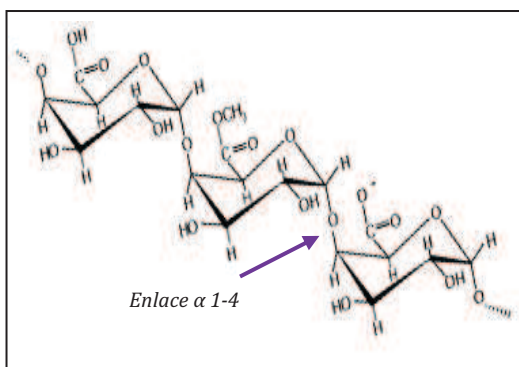


Estas microfibrillas son polímeros largos y lineales que debido al tipo de enlace cada molécula de glucosa se encuentra rotada unos 180° con respecto a la anterior, lo que le da al polímero una estructura concéntrica que le permite formar una gran cantidad de enlaces de hidrógeno intramoleculares y entre cadenas yuxtapuestas.

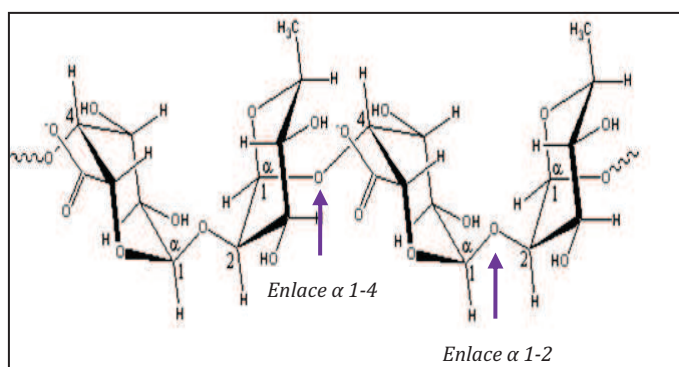
En la pared vegetal las microfibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que se encuentran incrustadas en una matriz de pectina y de hemicelulosa unidas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002).

Las pectinas son una familia de polisacáridos complejos no fibrilares, heterogéneamente ramificados y compuestos por unidades de ácido D-galacturónico (un derivado ácido de la galactosa) unidas por enlaces  $\alpha$ -1-4. De acuerdo a su apariencia en las microfotografías electrónicas las pectinas contienen dos regiones o dominios diferentes; una región "lisa" denominada homogalacturonano y otra "ramificada" denominada ramnogalacturonano.

La región "lisa" forma la mayoría de su estructura y consiste en un homopolímero compuesto por residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -1-4 parcialmente metilados en la posición 6 y acetilados en posiciones 2 y/o 3 (Figura 10). Esta estructura lisa se encuentra levemente interrumpida por la región "ramificada" la cual está formada por áreas en donde los residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1-4 se ven interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1-2 (Figura 11).



**Figura 10** - Estructura esquemática del dominio Homogalacturonano de la Pectina  
Imagen tomada de <http://www.mdidea.com/>

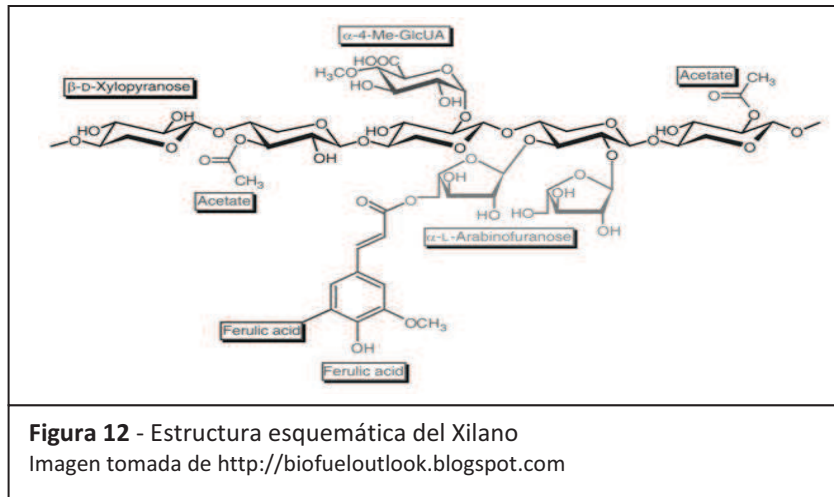


**Figura 11** - Estructura esquemática del dominio Ramnogalacturonano de la Pectina  
Imagen tomada de <http://www.mdidea.com/>

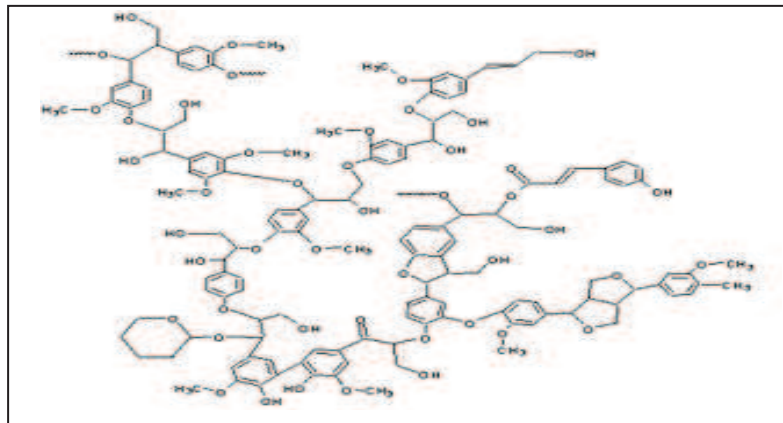
Estos residuos de L-ramnosa generan secciones de ramificación en donde se anclan cadenas laterales; mayoritariamente L-arabinosa y D-galactosa. También se encuentran presentes en algunos casos, bloques de xilogalacturonano, formados por unidades de ácido D-galacturónico unidas mediante enlace  $\alpha$ -1-4 parcialmente sustituidas en la posición O-3 con un único residuo no reductor de D-xilosa y/o con una cadena más larga de D-xilosa (Aro *et al.*, 2005).

La hemicelulosa, es un polímero con una estructura corta y ramificada de composición muy heterogénea compuesta de varios tipos de unidades unidas mediante enlaces  $\beta$ -1-4 de azúcares pentosas (mayoritariamente xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) y/o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico) (Wilder & Albersheim, 1973).

El xilano es el segundo polisacárido más abundante luego de la celulosa (Biely, 1985), es un heteropolímero compuesto por un esqueleto formado por unidades repetitivas de xilosa, unidas mediante enlace  $\beta$ -1-4 y ramificado con grupos acetilo, arabinosa y grupos 4-O-metil- $\beta$ -D-glucuronatos (Figura 12).



Otro componente importante de las paredes celulares es la lignina. La lignina es un polímero complejo, tridimensional, globular, insoluble, y de alto peso molecular formado por la unión de varios ácidos fenilprenoides y alcoholes aromáticos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) (Figura 13).



**Figura 13** - Estructura esquemática de la lignina  
 Imagen tomada de <http://academic.scranton.edu>

En las plantas la lignina se encuentra en la laminilla media, pero también se encuentra presente en las capas de la pared celular; especialmente en la pared celular secundaria, en donde establece uniones con la hemicelulosa a la vez que forma una matriz que envuelve las fibras de celulosa, protegiéndola contra la biodegradación (Fengel & Wegener, 1984), por lo que su degradación es un pre requisito para la posterior hidrólisis de los demás componentes de la biomasa vegetal los cuales son la principal fuente de carbono y energía para los microorganismos.

Las propiedades de los componentes principales de la pared celular vegetal, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos. Los materiales celulósicos son una excelente fuente de carbono utilizada por muchos microorganismos, sin embargo, debido a su carácter recalcitrante solamente ciertos organismos (como bacterias y hongos) producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Béguin & Aubrt, 1993).

Para una mayor efectividad en la utilización de estos nutrientes es que los microorganismos han evolucionado mecanismos que les permiten superar su recalcitrancia (Henrissat *et al.*, 1985), observándose actividades máximas de degradación de la celulosa cuando hay una mezclas de tres o más enzimas actuando de forma sinérgica (Nidetzky *et al.*, 1994).

### **Enzimas lignino-celulósicas**

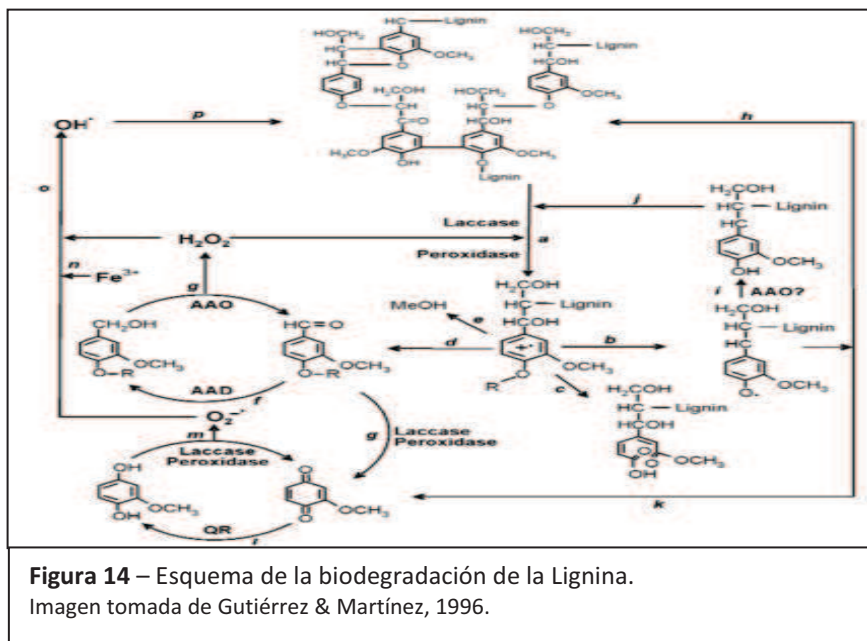
A fin de determinar el rol funcional que cumplen los hongos, resulta muy útil el lograr establecer sus patrones en cuanto a la utilización de diferentes sustratos y en cuanto a cuál o cuáles enzimas están produciendo (Carroll & Petrini, 1983). Las enzimas lignino-celulósicas son consideradas factores de virulencia en microorganismos fitopatógenos, los cuales se activan por señales ambientales y de quórum sensing (Dong *et al.*, 2001) a la vez que determinan la capacidad de ataque de los hongos permitiéndoles hidrolizar la pared celular de su hospedero vegetal (Inglis & Kawachuk, 2002). Por esto es que el estudio de estas enzimas permite determinar patrones de virulencia.

La descomposición de materiales lignino-celulósicos se produce por la acción de hongos y bacterias cuyo rol es clave en el reciclaje del carbono en los ecosistemas; la degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que implica la acción conjunta de muchas enzimas/ sistemas enzimáticos extracelulares (Aro *et al.*, 2005). Los hongos implicados en este proceso pertenecen casi en su totalidad a los Basidiomycetes y a los hongos imperfectos, aunque existen especies pertenecientes a Ascomycetes. Estos últimos utilizan la madera como fuente nutricional, moviéndose a través de ella como una red microscópica que a medida que crece va penetrando la pared celular del sustrato. Sus hifas producen un conjunto de enzimas, que le permiten colonizar la célula vegetal al degradar la celulosa, hemicelulosa, o lignina. Estos hongos descomponedores de celulosa segregan enzimas denominadas celulasas y xilanasas degradadoras de xilano (Vilches *et al.*, 2002).

La gran hidrofobicidad, complejidad y aleatoriedad estructural de la lignina, la hace resistente a la degradación por parte de la mayoría de microorganismos degradadores de celulosa; los hongos capaces de degradarla no la pueden utilizar directamente como fuente de carbono y energía, sino que utilizan a los monómeros precursores de fenilpropano. Por lo tanto su función en la ligninólisis es exponer éstos monómeros para su posterior utilización y solo ocurre durante el metabolismo secundario, es decir bajo condiciones de estrés nutricional, en donde, la expresión de los genes ligninolíticos se ve activada por la escasez de nutrientes, como el carbono o nitrógeno.

La lignólisis ocurre bajo condiciones aeróbicas y se debe a enzimas oxidativas e inespecíficas, principalmente a las lignino peroxidadas (LiP), manganeso peroxidadas (MnP), las laccasas (LAC) y también por el sistema enzimático citocromo P450 (Vázquez *et al.*, 2004) (Figura 14). Adicionalmente participan enzimas generadoras de peróxido de hidrógeno extracelular que generan el peróxido esencial para el funcionamiento de las peroxidadas.

La enzima Lignino peroxidada (LiP) es una hemo-proteína que contiene al grupo hemo férrico y funciona bajo la presencia de peróxido de hidrógeno. Es degradadora de unidades de lignina no- fenólicas, que representan hasta un 90% del polímero. En caso de que se genere un exceso de peróxido de hidrógeno en el medio, la enzima LiP puede sufrir una inactivación irreversible (Fernández & Henao, 2007).



**Figura 14** – Esquema de la biodegradación de la Lignina. Imagen tomada de Gutiérrez & Martínez, 1996.

La enzima manganeso peroxidada (MnP) es una hemo-proteína que cataliza la oxidación de Mn<sup>+2</sup> a Mn<sup>+3</sup> en presencia de peróxido de hidrogeno, este Mn<sup>+3</sup> generado puede ser quelado por diferentes ácidos orgánicos y así puede actuar como un oxidador difusible de unidades fenólica o no-fenólicas de lignina vía reacciones de peroxidación lipídica (Jensen *et al.*, 1996). La enzima se ve inhibida bajo altas concentraciones de manganeso, debido a la generación de grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que alteran el ciclo



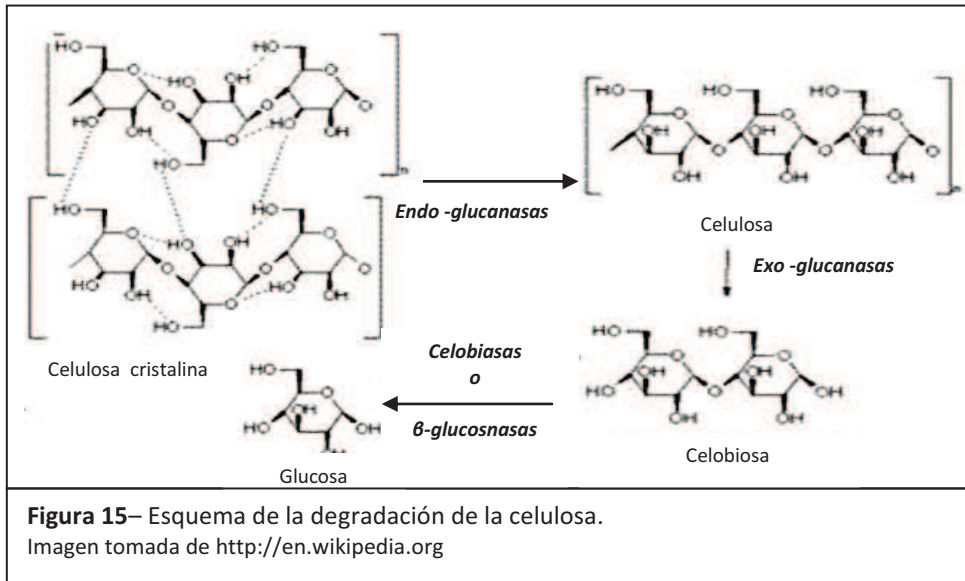
catalítico de la enzima y afecta la biomasa y el crecimiento micelial fúngico (Gómez *et al.*, 2005)

Las lacasas (LAC) son fenol oxidasas con cobre que presentan un bajo potencial red-ox que les permite oxidar directamente los anillos de las unidades fenólicas de la lignina en ausencia de la enzima LiP. Para cumplir su función requieren la presencia de peróxido de hidrógeno, el cual oxida al ion cobre para aumentar el estado de oxidación hasta un nivel en el cual la enzima es capaz de despolimerizar la lignina y sus derivados, además reduce el oxígeno a agua y simultáneamente realiza la oxidación de un electrón y muchos sustratos aromáticos. La lacasa también es capaz de oxidar compuestos como aminas aromáticas y compuestos no fenólicos con radicales libres (Zille *et al.*, 2003). La expresión de los genes codificantes para lacasas no es dependiente de la limitación nutricional. Las lacasas son expresadas de forma constitutiva en los hongos Basidiomycetes (Eggert *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; Scheel *et al.*, 2000).

En la figura 14 se muestra como las enzimas LiP, MnP y LAC oxidan el polímero de lignina generando radicales aromáticos (Eriksson *et al.*, 1990). Luego se llevan a cabo diferentes reacciones no-enzimáticas que incluyen ruptura de anillos aromáticos y demetoxilación entre otras. En las etapas finales los productos simples de la degradación entran a las hifas fúngicas y son incorporadas en las rutas catabólicas intracelulares.

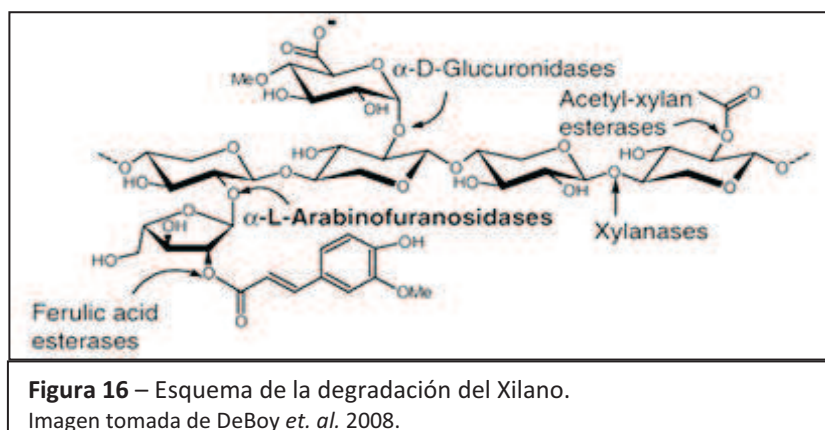
La celulólisis o rotura de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos es catalizada por un sistema constituido por tres enzimas: las enzimas endo- $\beta$ -1,4-glucanasas son las responsables de romper de forma aleatoria los enlaces internos de una molécula de celulosa, generando largos fragmentos de longitud variable de oligosacáridos solubles, los cuales mantienen su configuración  $\beta$  y generando nuevos sitios de ataque que se complementan por la acción de las enzimas denominadas exo- $\beta$ -1,4-glucanasas (Ryu & Mandels, 1980; Chou *et al.*, 1981; Philippidis & Smith, 1995; Lee, 1997), las cuales actúan sobre los extremos terminales no reductores de las moléculas de celulosa, liberando subunidades de celobiosa (Figura 15).





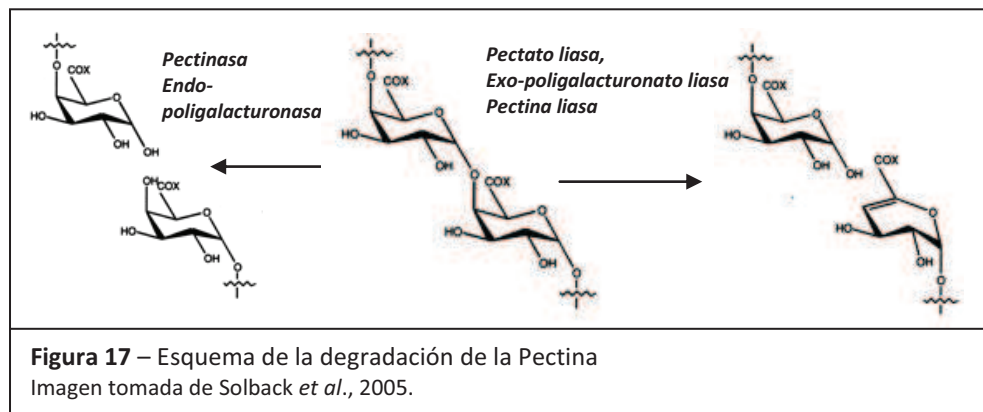
La subunidades de celobiosa pueden ser hidrolizadas por enzimas llamadas  $\beta$ -glucanasas o celobiasas que generan en último término moléculas de glucosa libres. La hidrólisis de la celulosa se realiza de forma más efectiva cuando estas tres enzimas actúan en conjunto y es la etapa limitante en la degradación de la celulosa, ya que las  $\beta$ -glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Ladisich *et al.*, 1983; Ljungdahl & Eriksson 1985; Philippidis & Smith 1995; Lee, 1997).

El xilano, componente principal de la hemicelulosa, es degradado más rápidamente que la celulosa; una amplia variedad de bacterias y hongos producen enzimas capaces de degradarlo, las cuales secretan a su entorno para romper dicho polímero y poder utilizar los oligosacaridos más cortos como fuente de energía. La compleja estructura del xilano requiere de diferentes enzimas que en conjunto completan su hidrólisis (Figura 16). Estas enzimas hidrolíticas son las  $\beta$ -1,4- endoxilanasas,  $\beta$ -1,4-xilosidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -D-glucuronidasas, galactosidasas y acetilxilanoesterasas.



Las  $\beta$ -1,4- endoxilanasas hidrolizan de manera aleatoria la cadena principal de xilano y las  $\beta$ -1,4-xilosidasas separan los pequeños oligosacáridos generando xilosa, xilobiosa y oligómeros de 2 a 6 unidades. El resto de las enzimas nombradas se encargan de liberar los grupos laterales presentes en el xilano.

La degradación de la pectina se lleva a cabo por un grupo de enzimas, que en conjunto se denominan Pectinasas, éstas son depolimerasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 de las moléculas de ácido galacturónico que forma las cadenas de pectina. Dentro de este grupo enzimático, las enzimas que prefieren el sustrato pectato sódico se denominan poligalacturonasas y las que degradan el sustrato altamente esterificado se llaman polimetilgalacturonasas. El prefijo endo se refiere a las enzimas que rompen la cadena polisacárida de forma aleatoria e indiscriminada y exo a aquellas enzimas que actúan sobre el extremo reductor libre (Figura 17). Las pectinasas que rompen los enlaces glucosídicos mediante  $\alpha$  -eliminación, se denominan pectato y pectín liasa según si degradan al pectato sódico o a la pectina. Este grupo de enzimas degradadores de la pectina incluyen también la pectín estearasa que cataliza la de-esterificación de este polisacárido (Solbkack *et al.*, 2005).



## **Hipótesis**

A comienzos del año 2010 en una plantación de 1 año de edad de manzanos cv. Cripps Pink localizada en el sur de Uruguay se registró la muerte del 30 % de los árboles. Los árboles presentaban canchros rojizos hundidos que eventualmente rodeaban todo el contorno causando la muerte de la planta y asociado a dicho síntoma se obtuvieron distintos aislamientos de *Phomopsis* spp.

La hipótesis que surgió a partir de tal observación fue que *Phomopsis* spp. fue el microorganismo causal de dicho síntoma de enfermedad en esta variedad de manzanos.

## **Objetivo General**

El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar los hongos asociados a canchros de plantas de manzano de la variedad Cripps Pink.

## **Objetivos Específicos:**

- 1.** Aislar e identificar las especies de hongos asociados a tejidos sintomáticos provenientes del porta injerto e injerto de árboles de manzano de la variedad Cripps Pink.
- 2.** Evaluar la patogenicidad de las especies asociadas al síntoma en ramas de manzano de la variedad Cripps Pink sanas.
- 3.** Evaluar la capacidad de producción de los aislamientos de enzimas relevantes en la patogenicidad: celulasas,  $\beta$ -glucosidasas, ligninasas, pectinasas, xilanasas y lacasas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 - Aislamiento

Se aislaron los hongos de un total de 10 ramas de manzano de la variedad Cripps Pink de un año de edad que mostraban síntoma de enfermedad (Figuras 18 y 19), provenientes de dos viveros ubicados en Libertad, en el departamento de San José. Se escogieron 5 ramas de cada uno (llamados vivero 1 y vivero 2) y se obtuvieron un total de 390 fragmentos de tejido para ser analizados; por cada rama se obtuvieron fragmentos de la corteza y del xilema tanto a partir del injerto como del porta injerto.

La totalidad de los fragmentos se trataron según el mismo protocolo de desinfección superficial seguido de su sembrado en placa con medio de papa dextrosa agar (PDA) (MacFadding, 1985) y su posterior incubación a 25°C.



**Figura 18** – Síntoma de enfermedad. Rama proveniente del vivero 2.



**Figura 19** – Síntoma en ramas de manzano cv. Cripps Pink asociado a *Phomopsis* spp.

Para el aislamiento de tejido cortical se obtuvieron fragmentos de dicho tejido de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm, los cuales se sumergieron en alcohol 70% durante 1 minuto, luego en hipoclorito al 4% durante 1 minuto y luego un enjuague en agua destilada estéril durante 2 minutos. Se secaron en papel filtro estéril y sembraron en placas de petri de 90 x 15 mm con medio PDA con cloranfenicol (100 mg/L) (PDA-Cl) (10 fragmentos por cada placa). Para el aislamiento a partir del xilema se trabajó con segmentos de rama a los cuales se les sacó la corteza, exponiendo el tejido xilemático y se

les realizó la desinfección superficial antes descrita. El segmento de rama estéril se cortó longitudinalmente y se obtuvieron a partir de sus caras internas los fragmentos, aproximadamente de 0,5 cm x 0,5 cm, de tejido que finalmente fueron sembrados en placas con PDA-Cl; se sembraron 10 fragmentos por placa.

Todas las placas sembradas fueron incubadas a 25 °C en alternancia de 12 hs de luz- 12 hs de oscuridad hasta que se observó crecimiento micelial. Dado que el crecimiento micelial proveniente de algunos fragmentos resultó ser más rápido que el de otros, una vez que se observó crecimiento se retiraron los fragmentos que no mostraban desarrollo de micelio a nuevas placas de PDA para permitir el desarrollo de hongos de crecimiento más lento. Todos los hongos de los fragmentos sembrados se repicaron en placas de PDA hasta la obtención de cultivos puros; se realizó la identificación morfológica de cada colonia a nivel macro y microscópico y se obtuvo la frecuencia relativa de aislamiento de *Phomopsis* sp. según:

$Fr = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fragmentos con } Phomopsis \text{ spp.}}{\text{n}^\circ \text{ de fragmentos totales}}$ .

## 2 - Identificación de especies

Los aislamientos se cultivaron en medio PDA-Cl durante 17 días a 25 °C en alternancia de 12 hs de luz- 12 hs de oscuridad hasta que se observó fructificación.

La identificación a nivel de género se realizó mediante la observación de las características macro y microscópicas de las colonias. Se observaron las características micro-morfológicas de forma y tamaño de picnidios, fiálides y  $\alpha$  y  $\beta$ -conidios. De estos últimos se midieron al menos 10 de cada aislamiento.

La identificación a nivel de especie se realizó mediante el análisis filogenético de secuencias de ADN. La extracción de ADN se realizó a partir del micelio vegetativo de los cultivos en PDA según la metodología propuesta por Lee & Taylor (1990).

Se raspó (utilizando la hoja estéril de bisturí) el micelio y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, luego se le agregó 400  $\mu$ l de buffer de lisis [Tris HCl pH8 (50 mM), EDTANa<sub>2</sub> (50 mM), SDS 0,3%] y 5  $\mu$ l de proteinasa K 2% (m/v). A la mezcla se la lisó mecánicamente utilizando un machacador de plástico estéril hasta que se obtuvo una mezcla homogénea y luego se la incubó durante 30 minutos a 60°C. Posteriormente se le agregaron 112  $\mu$ l de NaCl 5 M y 52  $\mu$ l de CTAB 10X [CTAB 10% (m/v), Tris HCl pH8 (100 mM), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% (v/v)] y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Se le agregaron 570  $\mu$ l de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v) se agitó enérgicamente y se incubó durante 30 minutos a -20°C.

Luego se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm y aproximadamente 400 a 500  $\mu$ l del sobrenadante se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se le agregó 20  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M y se incubó durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó nuevamente la mezcla durante 10 minutos a 10.000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se le agregaron suavemente 0,55 volúmenes de isopropanol. Se agitó suavemente y se incubó durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu$ l de etanol 70% (v/v). Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm, se descartó el etanol y se dejó secar el pellet a 37°C aproximadamente 1 hora. Una vez seco se resuspendió el

pellet en 50-100  $\mu$ l de agua destilada estéril a 60°C. Finalmente se agregó 1  $\mu$ l de ARNasa (5  $\mu$ g/ml), se incubó durante 60 minutos a 37°C y se almacenó a -20°C.

Se amplificó el ADN de la región ITS mediante PCR utilizando los primers generales ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990). Los primers se obtuvieron de INVITROGEN ARGENTINA S.A y sus secuencias se muestran a continuación:

<b>Tabla 1</b> – Secuencias de los primers generales ITS4 e ITS 5. White <i>et al.</i> , 1990.	
Primer	Secuencia
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Se utilizó un termociclador Corbett Research CG1--96 para llevar a cabo la amplificación y el programa de amplificación fue de 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C, y un ciclo final de 4 minutos a 74 °C. Se realizó este programa para las 5 muestras (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>) y para un control negativo que constó de la mezcla de reacción sin ADN.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l y en la tabla 2 se detallan las concentraciones.

<b>Tabla 2</b> – Reactivos y volúmenes utilizados en la mezcla de reacción	
Reactivo	Volumen en $\mu$ l
Buffer 10X	2,5
dNTPs	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75
Primer 1 (10 $\mu$ M)	0,5
Primer 2 (10 $\mu$ M)	0,5
Taq Polimerasa	0,25
Agua mQ	16
ADN	2

Las secuencias obtenidas (Anexo, Apartado 4) fueron corregidas manualmente y alineadas mediante Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) utilizando el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007) con secuencias ex-tipo alojadas en la base de datos del GenBank (Tabla 3).

El árbol filogenético más parsimonioso fue obtenido mediante el método de Máxima Parsimonia (Eck & Dayhoff, 1966) utilizando el Close-Neighbor-Interchange como algoritmo. Se utilizaron como grupos externos *Leucostoma personii* (DQ996042) y *Valsa ceratosperma* (DQ241769).

El método de máxima parsimonia utiliza un algoritmo en donde todas las posiciones que contienen lagunas y los datos que faltan fueron eliminados del conjunto de datos.

Tabla 3 – Aislamientos utilizados en el análisis filogenético				
Aislamiento	nº Identidad	Huésped	Origen	Nº de acceso al GenBank, ITS
CBS 495.72	<i>Diaporthe alleghaniensis</i>	<i>Betula alleghaniensis</i>	Canadá	FJ889444
CBS 114015	<i>Diaporthe ambigua</i>	<i>Pyrus communis</i>	Sud Africa	AF230767
AR3776	<i>Diaporthe angelicae</i>	<i>Heracleum sphondylium</i>	Austria	AY196779
CBS 117169	<i>Diaporthe aspalathi</i>	<i>Aspalathus linearis</i>	Sud Africa	DQ286275
CBS 592.81	<i>Diaporthe helianthi</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Serbia	AY705842
CBS 507.78	<i>Diaporthe melonis</i>	<i>Cucumis melo</i>	USA	FJ889447
CBS 123208	<i>Diaporthe neotheicola</i>	<i>F. vulgare</i>	Portugal	EU814480
CBS 109745	<i>Diaporthe perijuncta</i>	<i>Ulmus glabra</i>	Austria	AY485785
CBS 160.32	<i>Diaporthe vaccinii</i>	<i>Oxycoccus macrocarpus</i>	USA	AY952141
CBS 113201	<i>Diaporthe viticola</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY485750
CBS 439.82	<i>Phomopsis cotoneastri</i>	<i>Cotoneaster sp.</i>	Escocia	FJ889450
CBS 117499	<i>Phomopsis cuppatea</i>	<i>A. linearis</i>	Sud Africa	AY339322
IFO 31031	<i>Phomopsis mali</i>	ND	ND	AB665315
CBS 161.64	<i>Phomopsis phoenicicola</i>	<i>Areca catechu</i>	India	FJ889452
CBS 296.67	<i>Phomopsis sclerotioide</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Países bajos	AF439626
CBS 114016	<i>Phomopsis viticola</i>	<i>V. vinifera</i>	France	AF230751
GLB 06	<i>Phomopsis sp.</i>	ND	ND	U864606

ND: dato no disponible



### 3 - Estudio de patogenicidad

Se seleccionaron un total de cuatro aislamientos: Z<sub>2</sub>, Z<sub>7</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> que presentaron diferencias en su morfología, agrupándose en dos morfotipos. En base a la secuencia de la región ITS se utilizaron dos aislamientos de cada morfotipo; Z<sub>2</sub>, Z<sub>7</sub> (morfotipo 1) y Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> (morfotipo 2). Las colonias Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> fueron aisladas a partir del xilema y Z<sub>7</sub> a partir de la corteza de ramas de manzano con síntoma, todas pertenecientes al vivero 2. La colonia Z<sub>2</sub> fue aislada de la corteza de ramas de manzano con síntoma pertenecientes al vivero 1. Las colonias se obtuvieron en cultivos puros por duplicado, en placas de Petri de 90 x 15 mm conteniendo medio PDA y se incubaron a 25°C bajo luz blanca para su posterior inoculación en árboles de manzano en el campo.

La inoculación fue realizada en el mes de junio en una plantación de dos años de manzanos del cultivar Cripps Pink, ubicado en el departamento de San José. Para ello fueron seleccionados al azar 5 árboles de manzano de dicha variedad por cada uno de los cuatro aislamientos a ser evaluados, y de éstos se inocularon dos ramas (A y B); por lo tanto se trataron un total de 25 árboles y 50 ramas, ya que se inocularon los aislamientos Z<sub>2</sub>, Z<sub>12</sub>, Z<sub>7</sub>, Z<sub>13</sub> y un control negativo.

A cada rama se le realizó una herida en forma de V invertida utilizando un bisturí estéril para exponer los tejidos internos y se inoculó un disco de 5 mm de crecimiento micelial tomado del margen de un crecimiento vigoroso de una colonia de aproximadamente 7 días de edad en PDA (Figura 20).

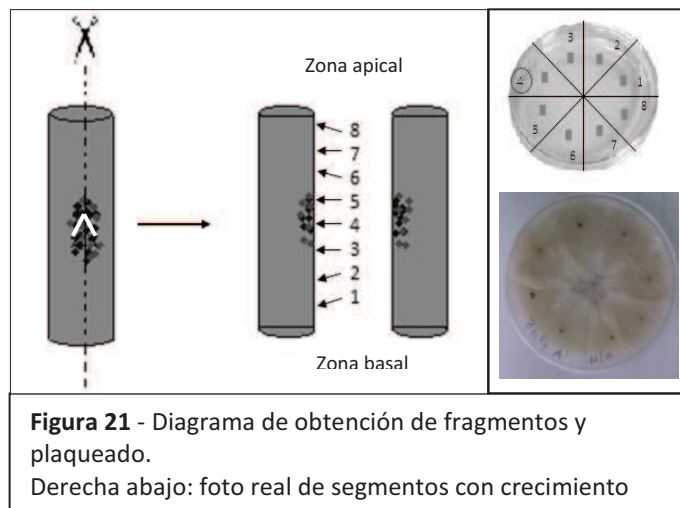


**Figura 20** – Procedimiento de inoculación.

Los controles se inocularon con un disco de medio PDA sin crecimiento micelial. Finalmente se selló cada herida con parafilm para evitar la entrada de microorganismos externos y se esperó a que se desarrollara el síntoma.

A los 30 días el total de ramas inoculadas se cortaron, ya que se observó el desarrollo de peritecios en las lesiones, se evaluó el tamaño de las lesiones (ver el apartado 1 del Anexo) y se procesaron en el laboratorio para el aislamiento de los hongos. El desarrollo de necrosis se calculó como el área de un rectángulo (largo por ancho de la herida) para la rama A y B de cada árbol, luego se promedió el valor de las ramas A y B, obteniendo para cada cepa un total de cinco valores y por último se promediaron estos valores, obteniendo un único valor para cada cepa inoculada.

Para el re-aislamiento fúngico primero se expuso el xilema de las ramas tratadas. El segmento tratado comprendió tanto la zona con síntoma (incluyendo la herida en forma de V invertida) como porciones asintomáticas. A estos segmentos se les realizó desinfección superficial de la misma manera descrita anteriormente. El segmento estéril se secó en papel filtro estéril y se lo cortó transversalmente en el vértice de la herida, obteniéndose dos segmentos con su xilema expuesto. A partir de cada uno de estos se obtuvieron una serie de fragmentos de tejido de aproximadamente 0,3 x 0,3 cm, pertenecientes a toda la superficie transversal, incluyendo la zona de inoculación, zona basal y apical, se inocularon en placas de petri de 90 x 15 mm con medio PDA-Cl (Figura 21). Cada placa fue inoculada con 6 a 8 fragmentos de tejido e incubada a 25 °C durante varios días hasta observar crecimiento fúngico. Se inocularon un total de 552 fragmentos.



Dado que el crecimiento micelial proveniente de algunos fragmentos resultó ser más rápido que el de otros, una vez que se observó crecimiento se retiraron los fragmentos que no mostraban desarrollo de micelio a nuevas placas de PDA para permitir su crecimiento sin ser contaminados. Todas las colonias se repicaron en placas de PDA hasta la obtención de cultivos puros.

Para cada aislamiento inoculado se obtuvo la frecuencia de re-aislamiento según:

Fr re-aislamiento = nº de fragmentos con *Phomopsis* spp./ nº de fragmentos totales.

Los aislamientos se cultivaron en medio PDA-CI durante 17 días a 25 °C en alternancia de 12 hs de luz- 12 hs de oscuridad hasta que se observó fructificación y se observó su estructura macro y micro morfología; en base a ésta y a su origen se escogió un total de cinco aislamientos llamados: M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> para su identificación a nivel de especie. En la tabla 4 se describe su origen.

M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> corresponden a aislamientos macroscópicamente diferentes que se obtuvieron ambos del mismo segmento de rama analizado (rama B de árbol 3, inoculado con cepa Z<sub>12</sub>) pero de diferente fragmento; M<sub>1</sub> se obtuvo del fragmento apical más distante a la zona de inoculación y M<sub>2</sub> se obtuvo de la zona de la herida (zona inóculo). M<sub>3</sub> corresponde a un hongo aislado de la rama B del árbol 4 a partir del segmento de la herida que fue inoculada con la cepa Z<sub>7</sub>. M<sub>4</sub> se aisló del fragmento más apical a la zona de inoculación de la rama B del árbol de manzano 5, inoculado con la cepa Z<sub>13</sub> y M<sub>5</sub> también se aisló de a la zona más apical a la zona de inoculación de la rama A del árbol 2 inoculado con a cepa Z<sub>2</sub>.

<b>Tabla 4</b> – Aislamientos seleccionados para el análisis molecular y su posterior análisis enzimático. (* Aislamientos obtenidos de fragmentos de la zona de herida.					
Nombre	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
Origen	Z <sub>12</sub> P <sub>3</sub> B <sub>6</sub>	Z <sub>12</sub> P <sub>3</sub> B <sub>3</sub> *	Z <sub>7</sub> P <sub>4</sub> B <sub>3</sub> *	Z <sub>13</sub> P <sub>5</sub> B <sub>6</sub>	Z <sub>2</sub> P <sub>2</sub> A <sub>6</sub>

A los aislamientos escogidos se les realizó la extracción de ADN del micelio vegetativo según la metodología propuesta por Lee & Taylor (1990) detallada anteriormente, se realizó la amplificación de la región ITS mediante PCR utilizando los primers generales ITS4 e ITS5 bajo las mismas condiciones que las descritas antes y luego los productos de PCR fueron separados como fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, revelados con bromuro de etidio (10µg/µl) y visualizados mediante luz UV utilizando un transiluminador. Como marcador molecular se utilizó ADN mass ruler 1000pb (Fermentas). Los productos de PCR se enviaron a un laboratorio externo (Macrogen Inc.) para su secuenciación.

Las secuencias de la región ITS se corrigieron manualmente y se alinearon con las secuencias ITS de las especies inoculadas. El análisis filogenético fue realizado usando el programa MEGA versión 4 (Eck & Dayhoff, 1966) utilizando el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987).

#### 4 - Actividad enzimática

La producción de enzimas extracelulares se evaluó mediante métodos semi cuantitativos. Se incorporó el sustrato de la enzima al medio de cultivo y se reveló mediante un colorante que evidencia la degradación de dicho sustrato.

Para evaluar la actividad de enzimas celulasas, se utilizó el método en placa propuesto por Magnelli *et al.*, 1997, utilizando la carboximetil-celulosa (CMC) como sustrato y única fuente de carbono. CMC es sustrato de endoglucanasas, y por lo tanto puede ser utilizado para evaluar la actividad de endoglucanasas. Este ensayo es un buen indicador de la habilidad celulolítica, ya que los hongos producen generalmente mayor cantidad de endoglucanasas que celobiohidrolasas (Cai *et al.*, 1994, Pointing *et al.*, 1999). Para esto se preparó medio de cultivo CMC como se detalla en el apartado 2 del anexo, se autoclavó y se llenaron placas de petri de 90 x 15 mm.

Las placas se inocularon con discos de micelio obtenidos del borde de crecimiento de los hongos en medio PDA de 4 días de crecimiento. Las placas inoculadas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 3 días con períodos de 12 horas de luz 12 horas oscuridad. Luego fueron reveladas mediante su exposición al colorante rojo Congo (0,05 % en Tris-HCl 0,1 M pH 8) durante 30 minutos seguida de su posterior lavado con NaCl durante 5 minutos. Al finalizar el revelado, la actividad enzimática se evidenció como un halo de degradación de CMC con coloración amarillenta alrededor de las colonias en contraste con el CMC no degradado de color naranja oscuro.

La hidrólisis de celobiosa a glucosa, es llevada a cabo por las enzimas  $\beta$ -glucosidasas, las cuales fueron evaluadas en este estudio utilizando como sustrato y única fuente de carbono a la esculina (6-  $\beta$  glucósido-7- hidroxycumarina). Se preparó el medio de cultivo, detallado en el apartado 2, se esterilizó y se llenaron placas de petri de 90 x 15 mm. Luego se inocularon los discos de PDA de 4 días de crecimiento de los hongos a ser testeados y se incubaron las placas inoculadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 4 días con períodos de 12 horas de luz 12 horas oscuridad. La actividad enzimática se evidenció según la aparición de halos de color oscuro del medio de cultivo, esto es debido a que la hidrólisis

del sustrato produce glucosa y esculetina, y ésta última reacciona con una sal de hierro (III) formando un complejo fenólico de color castaño oscuro o negro (Mac Faddin, 1990).

La actividad xilanasa se evaluó a través de una modificación del método en placa descrito para las celulasas, reemplazando el CMC por el xilano (Teater & Wood, 1982) (la composición detallada se muestra en el apartado 2 del anexo). Las placas fueron inoculadas con discos de PDA con crecimiento de micelio de 4 días y fueron incubadas a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 3 días. Luego fueron reveladas mediante su exposición al colorante rojo Congo (0,05 % en Tris-HCl 0,1 M pH 8) durante 30 minutos seguida de su posterior lavado con NaCl durante 5 minutos. La actividad enzimática se evidenció como un halo de degradación del medio de cultivo con coloración amarillenta alrededor de las colonias en contraste con el medio de cultivo no degradado de color naranja oscuro.

La evaluación de ligninasas totales se siguió mediante la metodología propuesta por Machado *et al.*, 2005. Se preparó el medio de cultivo conteniendo agar-malta al 2% y 0,05% de Remazol Brilliant Blue R, se esterilizó y se llenaron placas de petri de 90 x 15 mm. Luego se inocularon discos de micelio de los correspondientes aislamientos crecidos durante 4 días en medio de cultivo Malta extracto agar (MEA) (Pridham *et al.*, 1956, 1957) y se las dejó incubando durante 3 días a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó a un hongo Basidiomicete como control. La actividad enzimática fue evidenciada mediante la decoloración del medio de cultivo, resultando en casos positivos la presencia de un halo de color hialino, en contraste con el medio de cultivo de color azul oscuro.

La actividad lacasa se evaluó utilizando los inductores guayacol y  $\alpha$ -naftol sobre los cultivos. Sobre los diferentes cultivos en PDA de 6 días de crecimiento se dejó caer una gota del inductor guayacol y se observó el cambio de coloración durante las siguientes dos horas. Las enzimas lacasas catalizan la polimerización oxidativa del guayacol para formar zonas de coloración rojizo/castaña sobre el medio (Coll *et al.*, 1993). El mismo procedimiento se siguió utilizando el inductor  $\alpha$ -naftol.

La actividad pectinasa se evaluó mediante la utilización de pectina de citrus como sustrato en el medio de cultivo. Las placas conteniendo este medio fueron inoculadas con discos de agar con crecimiento de micelio de 4 días y fueron incubadas durante 3 días a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Luego de este período de incubación las placas fueron reveladas al ser

inundadas con rojo de Rutenio 0,1 % (m/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente lavadas con agua destilada (Diorio *et al.*, 2003) La degradación de la pectina fue indicada por un halo de decoloración contrastante con una coloración rojiza en el resto de la placa.

De todos los ensayos se realizan cuatro réplicas; sembrando cuatro discos con crecimiento micelial de 4 a 6 días de incubación a 25° C y se utilizaron como control negativo discos de PDA que no poseen crecimiento fúngico, a excepción del ensayo de actividad ligninolítica en el que se utilizó además un control positivo.

En todos los casos se tomaron las medidas de crecimiento de las colonias y de sus halos de decoloración/coloración inmediatamente después de su revelado. Los ensayos que no requieren revelado igualmente fueron medidos a los 3 a 5 días de inoculación. Finalmente se construyeron Índices de actividad, según: diámetro halo / diámetro crecimiento.

## **5 - Análisis de datos**

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el método de análisis de varianza ANOVA y el test de Student (Kirkman, 1996). El test de Student fue utilizado para el tratamiento de datos de las heridas de necrosis producidas en el ensayo de patogenicidad utilizando un intervalo de confianza del 95%. El método de análisis de varianza ANOVA fue empleado durante el análisis de los grupos de datos en los ensayos de actividad enzimática para evidenciar diferencias en los crecimientos de micelio de los diferentes aislamientos, al igual que el test de Student de datos pareados.

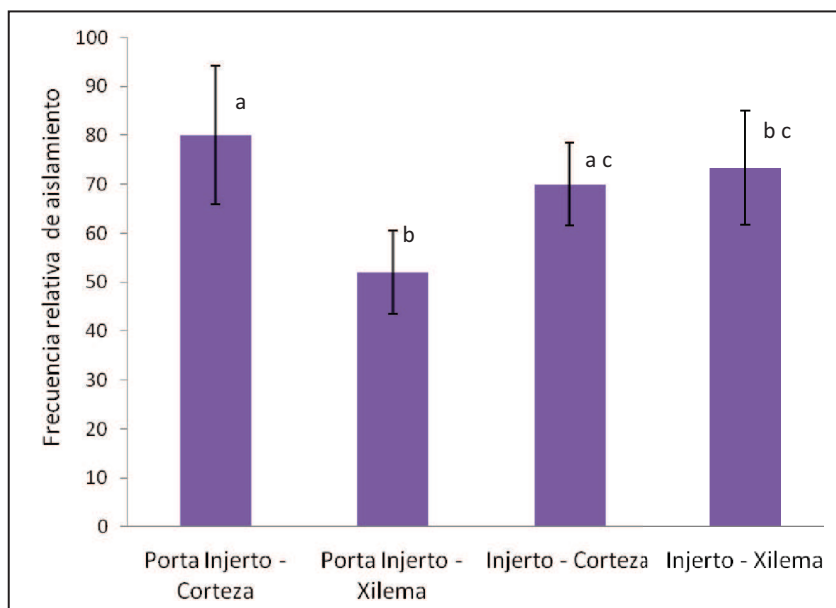


## RESULTADOS

### Aislamientos

De los 390 fragmentos inoculados se aislaron especies de *Phomopsis* a partir de 268 fragmentos (69%) y la frecuencia relativa de aislamiento de *Phomopsis* spp. resultó superior al 50% independientemente del tejido y del vivero.

No se observó una diferencia significativa en la frecuencia relativa de aislamientos de *Phomopsis* spp. entre injerto y porta injerto independientemente del tejido vegetal analizado (Figura 22). Sin embargo sí se observó diferencia en la frecuencia de aislamiento entre corteza y xilema del porta injerto.



**Figura 22 – Frecuencia relativa de aislamiento de *Phomopsis* spp.**

Porcentajes de recuperación promedio de ambos viveros según los diferentes tejidos.

Las letras sobre las barras indican las diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencias significativas a un valor de  $p \leq 0.05$

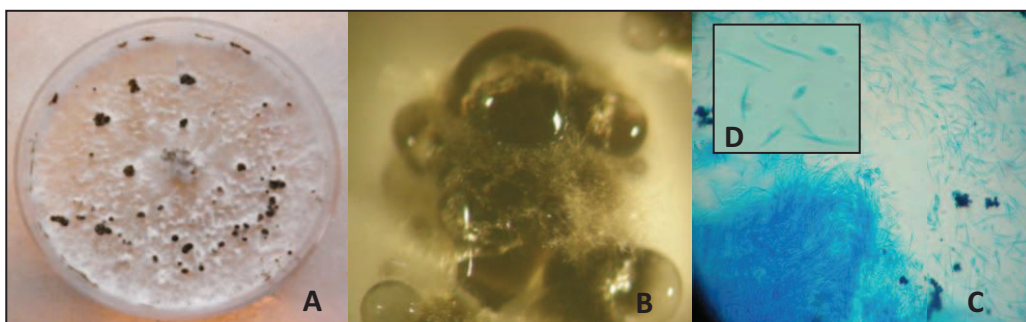
*Botryosphaeria* sp. fue aislada en menos del 10% de los segmentos por lo cual no fue considerada como el agente causante del síntoma.

### Características de los aislamientos

Los aislamientos obtenidos fueron identificados en base a sus características tanto macro como microscópicas como *Phomopsis* spp. y éstos fueron agrupados en dos morfotipos.

Ambos morfotipos presentaron diferencias tanto en sus características macro y micro-morfológicas como en su velocidad de crecimiento. Aquellos aislamientos pertenecientes al morfotipo 1 presentaron un crecimiento más rápido bajo las condiciones de laboratorio que los aislamientos pertenecientes al morfotipo 2. Además presentaron un abundante micelio aéreo de color blanquecino o blanco-crema en contraste con los del morfotipo 2 que presentaron un micelio apelmazado de color crema y en algunas zonas de color marrón. Los primeros presentaron una gran cantidad de picnidios dispersos en el micelio, en contraste con los segundos que presentaron escasos picnidios y de menor tamaño. Además la dimensión de los  $\alpha$ - conidios de aquellos aislamientos pertenecientes al morfotipo 1 fue mayor que para los del morfotipo 2.

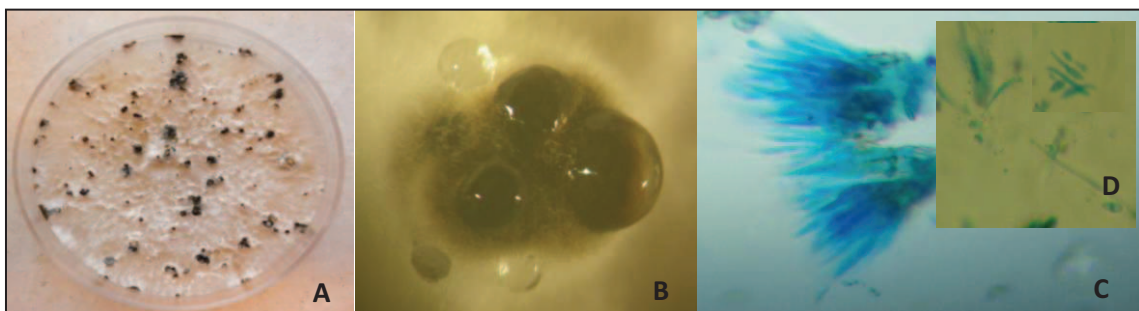
El aislamiento  $Z_{12}$ , correspondiente al morfotipo 1, en medio PDA a los 17 días presentó un micelio abundante, flocoso, de color blanco o blanco-crema. Se observaron numerosos picnidios de color marrón oscuro, que se distribuyeron sobre el micelio de forma concéntrica, alrededor del disco de inóculo. Los picnidios se observaron distribuidos tanto de forma solitaria, como de forma agregada y presentaron un ancho de 1-2 mm (Figura 23).



**Figura 23 –Morfotipo 1: Aislamiento  $Z_{12}$ .** A: Cultivo crecido en medio PDA durante 17 días. B: Picnidios. C :  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 40X. D:  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 60X.

En el reverso de la placa, se observó que el medio de cultivo mantuvo su coloración cremosa casi en su totalidad; observándose algunas pequeñas zonas de color más grisáceo. Los  $\alpha$  conidios fueron unicelulares, hialinos y presentaron forma fusiforme, algunos presentaron una forma ovoide con sus extremos redondeados y otros forma ovoide con sus extremos afinados. Presentaron una dimensión de 1-2 x 5-7  $\mu\text{m}$ . Los  $\beta$ -conidios presentaron un color hialino, forma filiforme y casi recta con una ligera curvatura en uno de sus extremos. Presentaron una dimensión de 0,5-1,3 x 15,6-20  $\mu\text{m}$ .

El aislamiento  $Z_2$ , correspondiente al morfotipo 1, en medio PDA a los 17 días presentó un micelio abundante, flocoso, de color blanco o blanco-crema (Figura 24). Se observaron numerosos picnidios de color marrón oscuro dispersos de forma concéntrica en el micelio, de forma agrupada o solitaria que midieron de 0,1-3,5 mm.

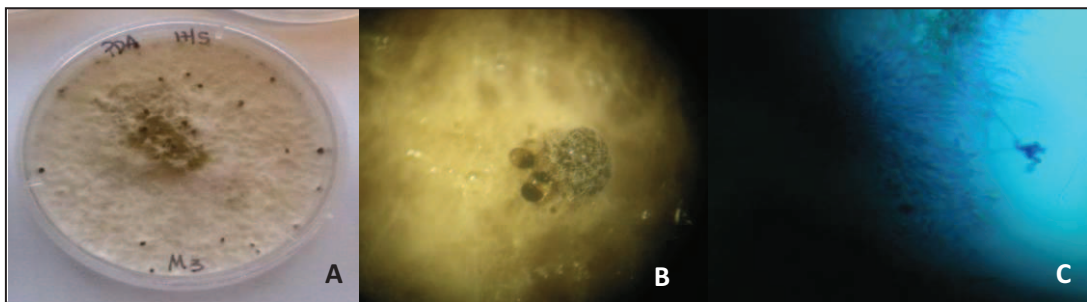


**Figura 24 –Morfotipo 1: Aislamiento  $Z_2$ .** A: Cultivo crecido en medio PDA durante 17 días. B: Picnidios. C :  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 40X. D:  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 60X.

Los  $\alpha$  conidios fueron unicelulares, hialinos y presentaron forma fusiforme, con ambos extremos de forma redondeada o con uno de los extremos de forma afinada. Su dimensión fue de 3,7 x 9,6  $\mu\text{m}$ . Los  $\beta$ -conidios presentaron un color hialino, una forma filiforme, la mayoría rectos con uno de sus extremos curvado. Su dimensión fue de 0,6-1,3 x 15,5-18  $\mu\text{m}$ .

El aislamiento  $Z_7$ , correspondiente al morfotipo 2, en medio PDA a los 17 días presentó un micelio abundante, flocoso y apelmazado, de color crema y en algunas zonas de color crema-amarillento (Figura 25). Se observaron escasos picnidios, de color marrón oscuro

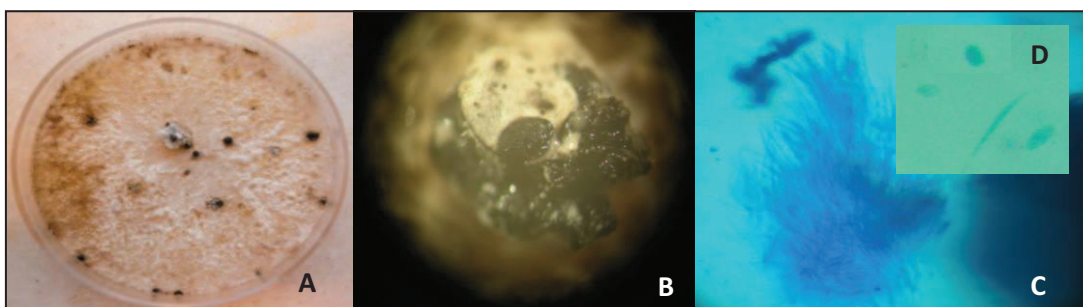
dispersos de forma azarosa y distribuidos sobre todo de forma individual midiendo 0,08-1,5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25 – Morfotipo 2: Aislamiento Z<sub>7</sub>.** A: Cultivo crecido en medio PDA durante 17 días. B: Picnidios. C :  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 40X.

Los  $\alpha$  conidios fueron escasos, unicelulares, hialinos y presentaron forma fusiforme con ambos extremos de forma redondeada y una dimensión de 1,3-1,5 x 4-4,5  $\mu\text{m}$ . Los  $\beta$ -conidios presentaron un color hialino, una forma filiforme y curvada; la gran mayoría presentó una forma lineal con una ligera curvatura en uno de sus extremos y algunos con forma de S. Su dimensión fue de 0,4-0,8 x 18-19  $\mu\text{m}$ .

El aislamiento Z<sub>13</sub>, correspondiente al morfotipo 2, en medio PDA a los 17 días presentó un micelio abundante, flocoso, de color blanco o blanco-crema y en algunas zonas de color crema-marrón claro. Se observaron escasos picnidios de color marrón oscuro dispersos al azar en el micelio de forma predominantemente solitaria, que midieron de 1,3-2 mm (Figura 26).

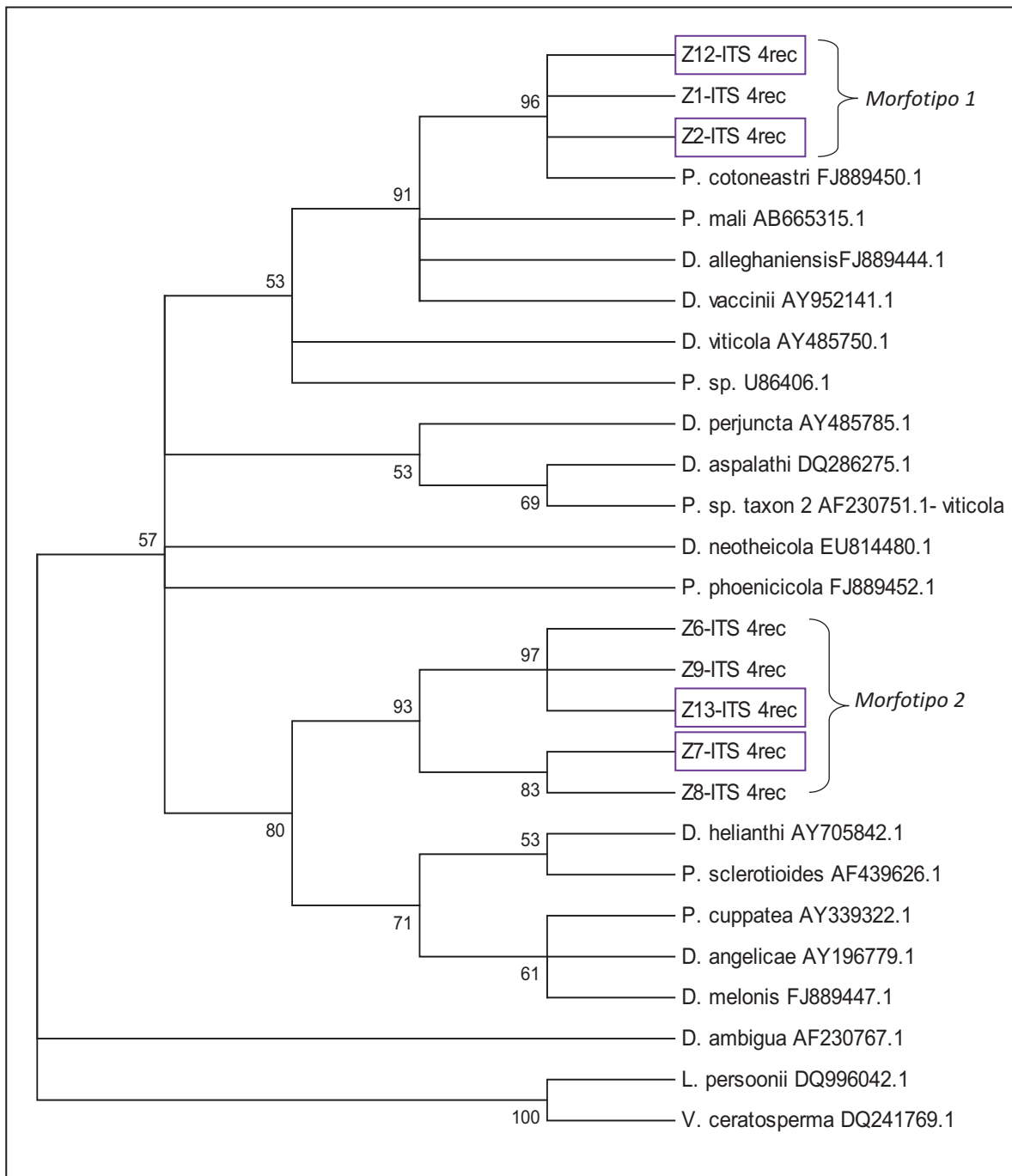


**Figura 26 – Morfotipo 2: Aislamiento Z<sub>13</sub>.** A: Cultivo crecido en medio PDA durante 17 días. B: Picnidios. C :  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 40X. D:  $\alpha$  y  $\beta$  – conidios, 60X.

Los  $\alpha$  conidios fueron unicelulares, hialinos y de forma fusiforme, con ambos extremos con forma redondeada. Su dimensión fue de 1,5-2 x 3-5  $\mu\text{m}$ . Los  $\beta$ -conidios presentaron un color hialino, forma filiforme y curvada; la gran mayoría presentó una forma lineal con una ligera curvatura en uno de sus extremos y algunos con forma de S. Su dimensión fue de 0,6 x 18-19,5  $\mu\text{m}$ .

En el análisis filogenético se consideraron un total de 362 nucleótidos de los cuales 76 fueron parsimoniosamente informativos. El árbol filogenético consenso obtenido usando parte de la secuencia ITS de 27 aislamientos (aquellos obtenidos de las plantas de manzano enfermas y de secuencias ex-tipo depositadas en el GenBank) (Figura 27) permitió identificar a tres de los aislamientos correspondientes al morfotipo 1 como *P. cotoneastri* ( $Z_1$ ,  $Z_2$  y  $Z_{12}$ ) mientras que los otros cinco aislamientos ( $Z_6$ ,  $Z_7$ ,  $Z_8$ ,  $Z_9$  y  $Z_{13}$ ) correspondientes al morfotipo 2 no pudieron ser identificados a nivel de especie.

Se seleccionaron dos aislamientos identificados como *P. cotoneastri* ( $Z_2$  y  $Z_{12}$ ) y dos aislamientos sin identificar ( $Z_7$  y  $Z_{13}$ ) para su posterior inoculación.



**Figura 27 - Árbol filogenético consenso** obtenido usando parte de la secuencia ITS de los aislamientos obtenidos de las plantas de manzano enfermas y de secuencias ex-tipo depositadas en el GenBank. En los nodos se indican los valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas mayores al 50%. En violeta se señalan los cuatro aislamientos seleccionados para el estudio de patogenicidad.

## Patogenicidad

A los 30 días post-inoculación un 87% del total de las ramas inoculadas desarrollaron síntoma de enfermedad, lo cual se evidenció como una zona oscura en la superficie de la corteza y sobre el xilema por debajo de ésta (Figura 28).



**Figura 28 – Necrosis** observada a los 30 días de la inoculación.

Se observó síntoma de enfermedad en todas las ramas inoculadas con los aislamientos  $Z_2$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  (Apartado 1 del anexo). Sin embargo solamente un 50% de las ramas inoculadas con el aislamiento  $Z_7$  presentaron síntoma.

El área necrosada varió entre 0,212 y 2,386 cm<sup>2</sup>. Todas las áreas de necrosis desarrolladas en las ramas inoculadas resultaron ser superiores a aquellas encontradas en las ramas control; las áreas de necrosis producidas por *P. cotoneastri* ( $Z_2$  y  $Z_{12}$ ) fueron similares entre sí y significativamente mayores que las áreas producidas por los otros dos aislamientos ( $Z_{13}$ ,  $Z_7$ ) (Tabla 5). El área de necrosis desarrollada en las ramas testigo fue estadísticamente no significativa.

<b>Tabla 5 – Áreas promedio de herida según el aislamiento inoculado y su desvío estándar asociado.</b>		
Cepa	Área de herida promedio (cm <sup>2</sup> )	Desvío estándar
$Z_2$	2,386 <sup>a</sup>	1,042
$Z_{12}$	2,106 <sup>a</sup>	0,931
$Z_{13}$	0,603 <sup>b</sup>	0,355
$Z_7$	0,212 <sup>c</sup>	0,185
Testigo	0,033 <sup>d</sup>	0,042

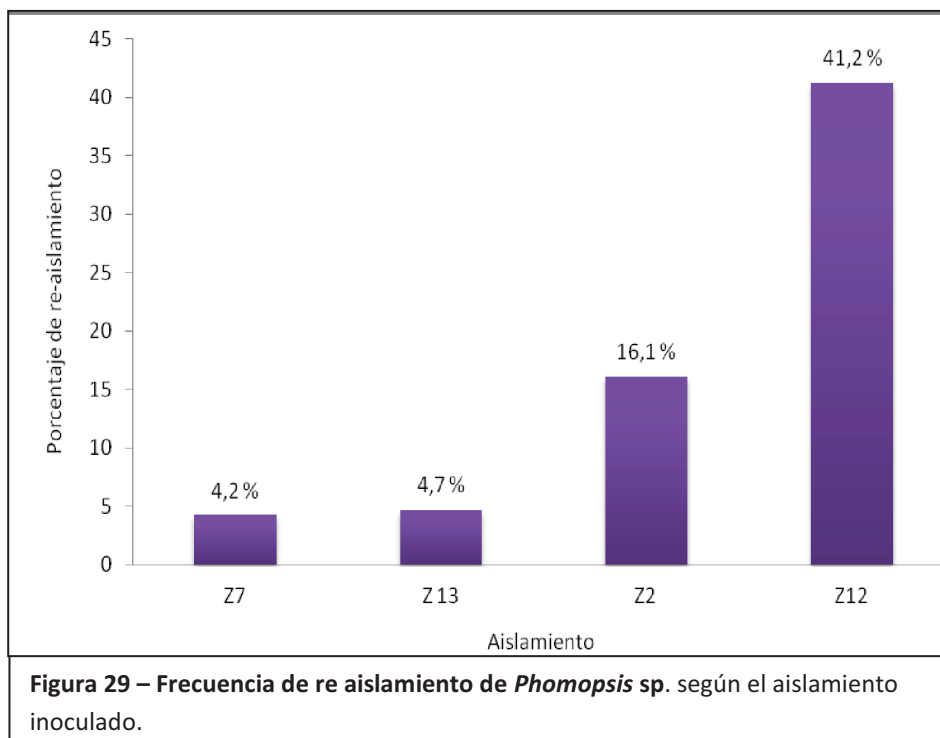
Los superíndices indican las diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencias significativas a un valor de  $p \leq 0.05$



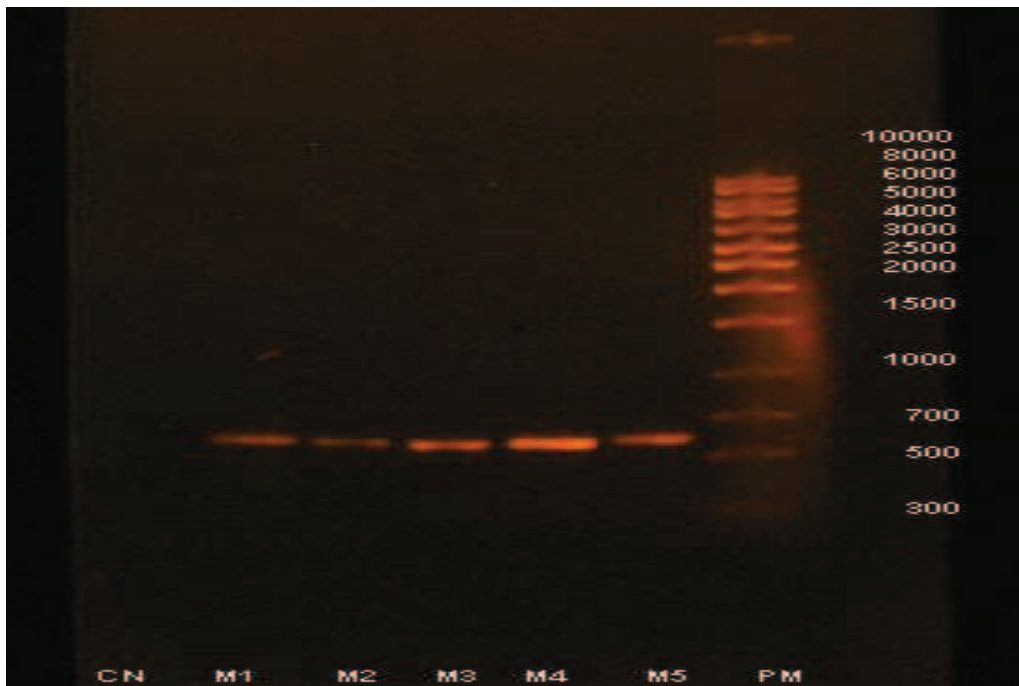
Del total de los fragmentos plaqueados (482 fragmentos, sin considerar ramas testigo) se logró recuperar *Phomopsis* spp. en 89 fragmentos, lo que representa una frecuencia de re-aislamiento del 18,5%. Las características macro y microscópicas de las colonias re-aisladas coincidieron con las características de los aislamientos inoculados.

La mayor frecuencia de re-aislamiento se obtuvo para *Phomopsis cotoneastri* (aislamiento Z<sub>12</sub>) seguido del aislamiento Z<sub>2</sub>, también identificado como *P. cotoneastri* (Figura 29). El menor porcentaje de re-aislamiento se obtuvo con las cepas Z<sub>13</sub> y Z<sub>7</sub> las cuales presentaron valores similares (4.66% y 4.11% respectivamente).

A partir de las ramas que no desarrollaron síntoma de enfermedad y de los testigos no se re-aisló *Phomopsis* spp.



Los productos de amplificación obtenidos por PCR empleando los primers específicos para la región ITS y el ADN extraído de las ramas inoculadas, presentaron el tamaño esperado de aproximadamente de 600pb (Figura 30).

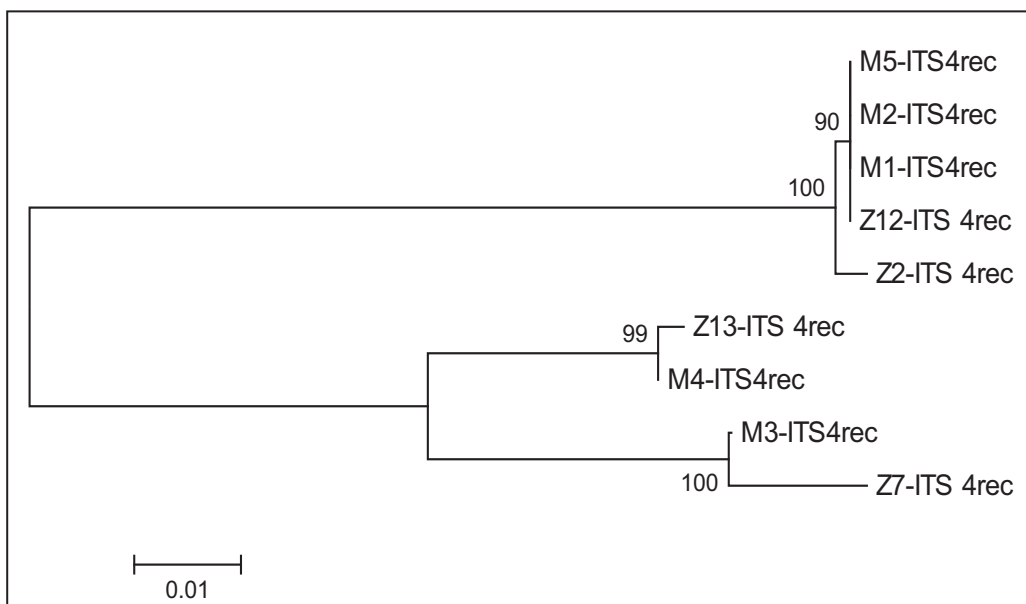


**Figura 30 –Electroforesis en gel de agarosa al 1%** de los productos de PCR de las 5 colonias seleccionadas, el control negativo y el marcador de peso molecular. Carril 1: Control negativo, Carril 2: M<sub>1</sub>, Carril 3: M<sub>2</sub>, Carril 4: M<sub>3</sub>, Carril 5: M<sub>4</sub>, Carril 6: M<sub>5</sub>, Carril 7: Marcador Molecular.

El cladograma nos permitió confirmar que las especies de *Phomopsis* re-aisladas se correspondieron con las inoculadas; observándose dos grupos definidos (Figura 31).

En uno de ellos se agrupó al aislamiento M<sub>4</sub> (aislado de una rama inoculada con Z<sub>13</sub>) con el aislamiento Z<sub>13</sub> y al aislamiento M<sub>3</sub> (aislado de una rama inoculada con Z<sub>7</sub>) con el aislamiento Z<sub>7</sub>.

En el otro se agrupó a los aislamiento M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>5</sub> (obtenidos de ramas inoculadas con Z<sub>12</sub> y Z<sub>2</sub> respectivamente) con los aislamientos Z<sub>12</sub> y Z<sub>2</sub>.

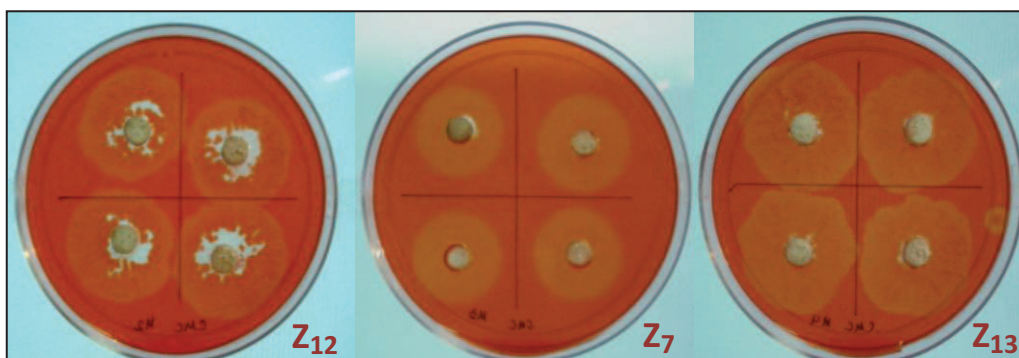


**Figura 31 – Árbol filogenético más parsimonioso** construido mediante el método Neighbor-Joining utilizando las secuencias de ITS de los aislamientos inoculados y los re-aislados previamente alineadas. En los nodos se indican los valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas y las distancias evolutivas fueron construidas utilizando el método compuesto de máxima verosimilitud.

### Actividad enzimática

Todos los aislamientos fueron capaces de crecer en el medio de cultivo con carboximetilcelulosa como única fuente de carbono y además todos presentaron actividad endocelulasa (Figura 32). Como resultado del análisis de la varianza (ANOVA) y del análisis de grupos de datos pareados se obtuvo que dentro de los 5 grupos de datos de crecimiento de micelio (Apartado 3 del anexo) existieron diferencias significativas (Tabla 6).

El crecimiento del micelio de todos los aislamientos bajo estas condiciones de cultivo fue diferente, con un crecimiento mayor para el aislamiento  $Z_{12}$ , seguido del aislamiento  $Z_{13}$ , el  $Z_2$  y por último el  $Z_7$ . Sin embargo, a diferencia de los aislamientos identificados como *P. cotoneastri* y el  $Z_{13}$  que presentaron un índice de actividad enzimática igual a 1, el aislamiento  $Z_7$  resultó ser el único que produjo un halo de decoloración mayor a su halo de crecimiento, con un Índice de 2,01, lo cual es indicativo no solo de la presencia de actividad de la enzima endocelulasa sino de una mayor producción de enzima ya que el halo excede al crecimiento.



**Figura 32 - Actividad endocelulasa de aislamientos  $Z_{12}$ ,  $Z_7$  y  $Z_{13}$ .** Halos de crecimiento-decoloración de los distintos aislamientos crecidos en medio CMC (4%) revelados con Rojo Congo a los 3 días de incubación.

Tabla 6 – Áreas de crecimiento en cm <sup>2</sup>					
Aislamiento	Z <sub>12</sub>	Z <sub>12</sub> *	Z <sub>7</sub>	Z <sub>13</sub>	Z <sub>2</sub>
Medio de cultivo					
CMC	3.48±0.13 <sup>a</sup>	3.10±0.07 <sup>c</sup>	1.32±0.26 <sup>e</sup>	3.27±0.12 <sup>b</sup>	2.86±0.19 <sup>d</sup>
Esculina	4.20±0.08 <sup>a</sup>	4.35±0.19 <sup>a</sup>	ND	ND	4.05±0.17 <sup>a</sup>
RBBR	3.27±0.07 <sup>b</sup>	2.39±0.68 <sup>c</sup>	4.58±0.22 <sup>a</sup>	3.56±0.40 <sup>b</sup>	2.96±0.78 <sup>c</sup>
Xilano	1.79 ±0.87	1.86±0.48	1.52±0.30	2.23±0.43	2.41 ± 0.09
Pectina de citrus	2.99±0.11 <sup>b</sup>	3.25±0.15 <sup>a</sup>	1.72±0.29 <sup>d</sup>	2.85±0.17 <sup>b</sup>	2.72±0.06 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada fila a un valor de p≤0.05  
 ND: Dato no disponible  
 (\*) Aislamiento obtenido de fragmento de la zona de herida.

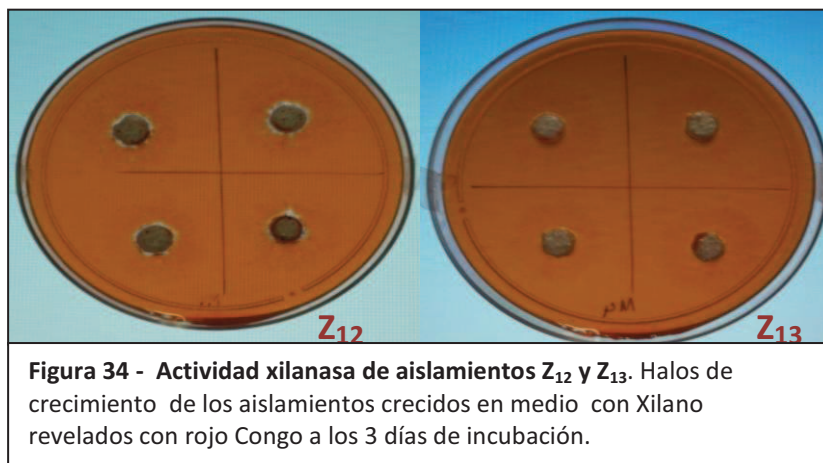
En el medio de cultivo con esculina como única fuente de carbono todos los aislamientos fueron capaces de crecer y además todos presentaron actividad β-glucosidasa (Figura 33).



A los 4 días de incubación los aislamientos de *Phomopsis* Z<sub>7</sub> y Z<sub>13</sub> crecieron excesivamente y no fue posible tomar la medida del diámetro de crecimiento ni la determinación de su índice de actividad enzimática, pero se observó la coloración del medio de cultivo por debajo del micelio; es decir que esta especie de *Phomopsis* presentó una elevada actividad β-glucosidasa conforme avanzó su crecimiento. Como resultado del análisis de la varianza en los casos restantes se obtuvo que no existieron diferencias significativas en

el crecimiento de micelio (Tabla 6) y en ellos se obtuvo un índice de oscurecimiento del medio de cultivo igual a 1.

Todos los aislamientos fueron capaces de crecer en el medio de cultivo con xilano como única fuente de carbono, no existiendo diferencias significativas entre ellos. Sin embargo en ningún caso se observó una decoloración del medio del cultivo indicativa de actividad xilanasa (Figura 34). Tampoco se observó actividad lacasa en ninguna de las especies de *Phomopsis* evaluadas (Figura 35).



**Figura 34 - Actividad xilanasa de aislamientos Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub>.** Halos de crecimiento de los aislamientos crecidos en medio con Xilano revelados con rojo Congo a los 3 días de incubación.



**Figura 35 - Actividad lacasa del aislamiento Z<sub>12</sub>.** Izquierda: Aislamiento tratado con  $\alpha$ -naftol. Derecha: Aislamiento tratado con guayacol.

En medio RBBR todos los aislamientos fueron capaces de crecer y presentaron un crecimiento micelial estadísticamente superior al registrado en el control, excepto la cepa Z<sub>12</sub> (Tabla 6). Como resultado del análisis de la varianza (ANOVA) y del análisis de grupos de datos pareados se obtuvo que dentro de los 5 grupos de datos de crecimiento de micelio (Apartado 3 del anexo) existieron diferencias significativas (Tabla 6).

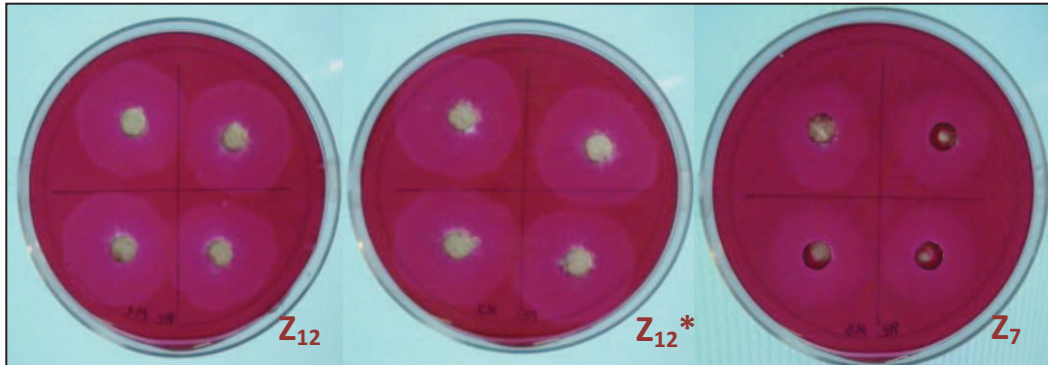
El mayor crecimiento a los tres días de incubación lo presentó el aislamiento de *Phomopsis* Z<sub>7</sub>, y éste fue mayor al crecimiento del control positivo ( $1,58 \pm 0,09 \text{ cm}^2$ ). Los crecimientos de los aislamientos Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> son iguales estadísticamente y los de Z<sub>12</sub> y Z<sub>2</sub> resultaron ser equivalentes entre sí, siendo ambos los menores crecimientos registrados dentro de las especies de *Phomopsis* evaluadas. Sin embargo en ningún caso se observó decoloración del medio de cultivo a los 10 días de crecimiento, como sí se observó en el control (Figura 36); por lo tanto no se evidenció actividad enzimática de ligninasas.



Todos los aislamientos fueron capaces de crecer en el medio de cultivo con pectinasa como única fuente de carbono y además todos presentaron actividad enzimática degradadora de pectina (Figura 37). Como resultado del análisis de la varianza (ANOVA) y del análisis de grupos de datos pareados se obtuvo que dentro de los 5 grupos de datos de crecimiento de micelio (Apartado 3 del anexo) existieron diferencias significativas (Tabla 6).



El aislamiento  $Z_{12}$  fue aquel con la mayor capacidad de crecimiento, seguido del  $M_{13}$ , luego el  $Z_2$  y por último el  $Z_7$ . Éste presentó un índice de actividad enzimática de 1,56, a diferencia del resto de los aislamientos que presentaron un índice igual a 1.



**Figura 37 - Actividad pectinasa de aislamientos  $Z_{12}$ ,  $Z_{12}^*$  y  $Z_7$ .** Halos de crecimiento-decoloración de los distintos aislamientos crecidos en medio pectina de citrus reveladas con rojo de Rutenio a los 3 días de incubación.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo revelaron la presencia de dos morfotipos de *Phomopsis* spp. asociados a las ramas de manzanos con síntoma de enfermedad, habiendo sido aislados con una frecuencia relativa de casi el 70%. Si bien los aislamientos de las distintas especies de *Phomopsis* fueron aislados mayoritariamente en corteza, también fueron obtenidos de los tejidos internos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Daykin & Milholland en 1990 quienes observaron que *P. vaccinii* infectando arándanos se localizaba preferentemente sobre la corteza. Observaron que, a diferencia del crecimiento en *B. dothidea* en donde el movimiento descendente a través del tejido vascular es esencial en la colonización de las hifas en varas de arándano, *P. vaccinii* invade los tejidos vasculares solo una vez que la corteza ha sido colonizada completamente. Un patrón similar se observó por Muntañola-Cvetkovic y colaboradores en 1981 para *Phomopsis* invadiendo girasol.

La identificación de *Phomopsis* spp. mediante técnicas moleculares, utilizando la región ITS del ADN permitió identificar a los aislamientos del morfotipo 1 como *P. cotoneastri*. Los aislamientos pertenecientes al morfotipo 2 se correspondieron a otra especie de *Phomopsis* la cual no pudo ser identificada. Las dos especies de *Phomopsis* encontradas no solo difirieron en su aspecto macro y micro- morfológico, sino que además difirieron en sus requerimientos de temperatura y humedad de crecimiento, ya que en medio PDA y a 25 °C de temperatura se observaron mayores tasas de crecimiento de micelio, y más temprana producción de picnidios con  $\alpha$  y  $\beta$ - conidios para *P. cotoneastri* ( $Z_{12}$  y  $Z_2$ ) que para *Phomopsis* sp. ( $Z_7$  y  $Z_{13}$ ).

Los ensayos de patogenicidad demostraron que las especies de *Phomopsis* evaluadas crecieron y desarrollaron el síntoma de enfermedad con una frecuencia del 87%, evidenciando su patogenicidad en la variedad de manzano Cripps Pink. Las heridas observadas en las ramas inoculadas con *P. cotoneastri* resultaron ser más extensas que las observadas con *Phomopsis* sp., y además *P. cotoneastri* fue re-aislado de las heridas en mayor proporción, por lo tanto se sugiere que ésta fue la especie más virulenta. Dentro de *Phomopsis* sp. el aislamiento  $Z_{13}$  presentó mayor virulencia que el  $Z_7$ ; una diferencia en

la virulencia de distintos aislamientos de otras especies como *P. viticola* ha sido también observada por Schilder y colaboradores en 2005 en vid.

*P. cotoneastri* ha sido reportado como patógeno de *Cotoneaster salicifolius* y los síntomas en estas plantas incluyen el marchitamiento de los brotes y hojas (Fruzynska-Jozwiak & Jerzak, 2006). Sin embargo no había sido hasta ahora reportado como patógeno de manzano en Uruguay. Estos resultados confirman la falta de especificidad de *P. cotoneastri* con respecto a su hospedero original, como ha sido visto también en otras especies de *Phomopsis* (Murali *et al.*, 2006).

A los 30 días de su inoculación *P. cotoneastri* fue re-aislado tanto de fragmentos de la región apical como de la región basal, lejanos a la zona de inoculación de los segmentos, mientras que *Phomopsis* sp. sólo fue re-aislada de fragmentos cercanos a la zona de inoculación. Esta diferencia observada en la colonización de los tejidos refleja otra diferencia entre ambas especies.

De forma contraria a la reportada para *Phomopsis* spp. en *Aspalathus linearis* en Sud África (van Rensburg *et al.*, 2006) el desarrollo de *P. cotoneastri* tendió hacia la región apical de la rama ya que se obtuvo un mayor re-aislamiento a partir de aquellos fragmentos pertenecientes a la zona apical. En ambas especies, se observó el desarrollo de una necrosis superficial del xilema, por debajo de la corteza. Esto se asemeja a la forma de crecimiento de *P. vaccinii* observada en arándanos en donde las hifas crecen en los espacios inter e intracelulares de la corteza y desde la corteza infectada crecen de forma lateral hacia el xilema y floema causando dieback de la vara (Daykin & Milholland, 1990).

Los ensayos semi-cuantitativos de producción enzimática aplicados a aislamientos de ambas especies de *Phomopsis* revelaron que todos fueron capaces de crecer en los diferentes medios de cultivo utilizando como única fuente de carbono compuestos diferentes a la glucosa, por ejemplo celulosa, esculina, carboximetilcelulosa, xilano y pectina de citrus. Sin embargo, se observaron tasas de crecimiento diferentes.

Ninguna especie de *Phomopsis* presentó actividad ligninasa ni xilanasa. Tampoco se observó en ninguno de los casos actividad lacasa. Sin embargo se ha demostrado que la

producción de lacasas depende fuertemente de la composición del medio de cultivo; influyendo la fuente de carbono, contenido de nitrógeno y compuestos fenólicos inductores (Niku-Paavola *et al.*, 1990; Rogalski *et al.*, 1991; Schlosser *et al.*, 1997), por lo tanto resultaría conveniente evaluar diferentes combinaciones de éstos, de modo de poder asegurar la presencia o ausencia de esta ruta enzimática en *Phomopsis* spp.

Los dos morfotipos presentaron patrones de actividad y crecimiento de micelio diferentes en los ensayos de actividad endocelulasa y pectinasa. La actividad de estas enzimas traería como consecuencia el aumento de la tasa de degradación de la celulosa hacia moléculas que el hongo pueda asimilar más fácilmente, lo que se reflejaría en un incremento en la biomasa (Penttila & Saloheimo, 1999). En este estudio se observó una relación inversa a la esperada, ya que *P. cotoneastri* presentó las mayores tasas de crecimiento de micelio pero *Phomopsis* sp., y en particular el aislamiento Z<sub>7</sub> presentaron los mayores índices de actividad celulolítica y pectinolíticas. No obstante, *P. cotoneastri* presentó actividad de estas enzimas.

Estos resultados reflejan dos comportamientos; uno en el cual el consumo de glucosa es mayor a la actividad celulolítica (morfotipo 1 – *P. cotoneastri*) y otro en donde existe una mayor actividad celulolítica con respecto al consumo de glucosa en la etapa de crecimiento (morfotipo 2 – *Phomopsis* sp.). El segundo comportamiento ha sido observado en los hongos del Phylum Ascomycota por Chaparro y colaboradores (2009).

Las actividades celulolíticas y pectinolíticas, junto con los ensayos de patogenicidad reflejan la capacidad de ambos morfotipos de colonizar su hospedero, ya que en estudios anteriores se ha asociado la presencia de estas enzimas con patógenos latentes relacionados de forma mutualista a su hospedero (Brett, 1990; Reddy & Basappa, 1997). Estos pueden eventualmente adquirir una forma de vida saprofita (Pointing, 1999). En diversas especies fúngicas fitopatógenas, como las pertenecientes al género *Fusarium*, las enzimas célula y pectinolíticas son consideradas uno de los principales factores de virulencia (Juge, 2006) sin embargo, en el caso de los aislamientos evaluados en este trabajo no se puede considerar lo mismo, ya que la mayor actividad enzimática fue observada en la especie de *Phomopsis* menos virulenta.

La presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa tampoco estaría reflejando la virulencia de los aislamientos, ya que se observaron mayores tasas de crecimiento y producción de enzima en la especie de *Phomopsis* no identificada (aislamientos Z<sub>13</sub> y Z<sub>7</sub>). Estos resultados, demuestran la ambigüedad que supone el estudio de virulencia dentro de organismos patogénicos, ya que en este caso se estimó la virulencia de los distintos aislamientos según la herida ocasionada en ramas sanas, pero de haber estimado virulencia como la presencia/ausencia de enzimas celulolíticas o pectinolíticas los resultados serían diferentes.

Como la lignina se localiza por fuera de la celulosa, se supone que la producción de enzimas ligninolíticas como ligninasas o la lacasas sería suficiente para la intrusión del endófito, haciendo posible que el micelio invada la planta, lo cual fue reportado en estudios de la cepa B3 de *Phomopsis* sp. por Dai y colaboradores en 2010. Sin embargo, la no detección de actividad degradadora de xilano y lignina en los aislamientos de *Phomopsis* evaluados en este estudio nos permite sugerir que *Phomopsis* spp. ingresaría a su hospedero a través de pequeñas heridas producidas por insectos, a través de los estomas naturales de la planta o de heridas producidas por la poda o por daños producidos por sequías o heladas. De hecho se ha demostrado que *Phomopsis vaccinii* infecta a tallos de arándanos solamente cuando estos presentan heridas mecánicas o producidas por heladas (Baker & Hancock, 1995).

En el boletín Agroclimático elaborado por el INIA-Unidad GRAS se reportó que las condiciones climáticas prevalentes sobre los viveros infectados en el año 2009 en nuestro país, durante los períodos posteriores a la práctica de cosecha en invierno (junio-julio) fueron básicamente de alta humedad y temperaturas frías a cálidas; condiciones bajo las cuales los conidios de *Phomopsis* spp. tienen capacidad de germinar (English, 1951; Pine, 1958; Punithalingam, 1979; Nalli, 1999). Por lo tanto podríamos sugerir que la infección observada en estos viveros fue el resultado de la germinación de los conidios sobrevivientes en el suelo del año anterior (cuya dispersión fue favorecida por lluvias y vientos) y su posterior ingreso a través de heridas.

Como perspectivas, a fin de continuar los estudios de éstos patógenos resulta necesaria la identificación a nivel de especie de los aislamientos del morfotipo 2. Una metodología basada en estudios moleculares utilizando la región del ADN del locus MAT y/o el factor de elongación de la traducción 1-alfa podría resultar adecuada.

Asimismo resultaría interesante estudiar la interacción que podría establecer *P. cotoneastri* con la diversa gama de microorganismos que afectan a los cultivos de manzano, como por ejemplo *Botryosphaeria spp.*, el cual es un patógeno preponderante de manzanos que ingresa a su huésped mediante heridas (Slippers *et al.*, 2007) y fue encontrado en muy bajas tasas en las ramas analizadas en este trabajo.

En este trabajo se demostró la patogenicidad de *Phomopsis spp.* en manzanos, presentando *P. cotoneastri* la mayor virulencia. Este es el primer reporte en Uruguay de *P. cotoneastri* como patógeno de manzano.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg, J. E.; Förster, H. **1999**. First report of fruit rot and associated branch dieback of almond in California caused by a *Phomopsis* species tentatively identified as *P. amygdali*. *Plant Disease*, 83: 1073.
- Agrios, G. N. **1997**. *Plant Pathology*, 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Alexander M. **1967**. *Introduction to soil microbiology*. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, pp 197-215.
- Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. **2005**. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 719-739.
- Baker, J. B.; Hancock, J. F. **1995**. Screening highbush blueberry cultivars for resistance to *Phomopsis* canker. *HortScience*, 30: 586-588.
- Banihashemi, Z.; Javadi, A. R. **2009**. Further Investigations on the biology of *Phomopsis cinerascens*, the cause of fig canker in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 454-460.
- Béguin, P.; Aubert, J. P. **1993**. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Review*, 13: 25-28.
- Biely, P. **1985**. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3: 286.
- Benítez, C. E. **2001**. Cosecha y poscosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la Patagonia. Ediciones INTA, pp. 89-91.
- Botella, L.; Diez, J. J. **2011**. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47:9–18.
- Breen, J. P. **1994**. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology*, 39: 401–423.
- Brett, C. T. **1990**. Cell wall degradation. In: *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls* (eds. C.T. Brett and K. Waldron). Unwin, Hyman, London, pp 169-179.
- Browne, G. T.; Mircetich, S. M. **1996**. Effects of month of inoculation on severity of disease caused by *Phytophthora* spp. In apple root, crowns and excised shoots. *Phytopathology*, 86: 290–294.



- Bumbieris, M.; Wicks, T. J.; Windle, B. E. **1982**. *Phytophthora* species in apple and cherry orchards in South Australia. *Australasian Plant Pathology*, 11: 28–29.
- Bus V., Ranatunga C., Gardiner S., Bassett H. and Rikkerink E. **2000**. Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. *Acta Horticulturae*, 538: 541–547.
- Bussaban, B.; Lumyong, L.; Lumyong, P.; McKenzie, E. H. C.; Hyde, K. D. **2001**. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:943–948.
- Cai, Y. J.; Buswell, J. A.; Chang, S. T. **1994**. Cellulases and hemicellulases of *Volvariella volvacea* and the effect of tween 80 on enzyme production. *Mycological Research*, 98: 1019-1024.
- Campbell, J. **2005**. Apple variety: Cripp’s Pink (Pink Lady™ fresh apple product). State of new South Wales, Department of Primary Industries. <http://www.agric.nsw.gov.au/reader/pome-fruits/11123>
- Carisse, O.; Khanizadeh, S. **2006**. Relative resistance of newly released apple rootstocks to *Phytophthora cactorum*. *Canadian Journal of Plant Science*, 86: 199-204.
- Carroll, G. **1988**. Fungal endophytes in stems and leaves – from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69: 2–9.
- Carroll, G. C.; Petrini, O. **1983**. Patterns of substrate utilization by some endophytes from coniferous foliage. *Mycologia*, 75: 53-63.
- Caruso, F. L.; Ramsdell, D. C. **1995**. Compendium of blueberry and cranberry diseases. St. Paul, Minnesota: American Phytopatological Society Press, pp 87.
- Cayley, D. M. **1923**. Fungi associated with “die-back” in stone fruits trees. *Annals of Applied Biology*, 10: 253-275.
- Chairman, D. L. F.; Jensen F. L.; Kasimatis A. N.; Kido, H. and Moller, W. J. **1982**. Grape Pest Management. Agricultural Sciences Publications, University of California, USA, pp 312.

- Chaparro, D. F.; Rosas, D. C.Ç; Varela, A. **2009**. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26: 238-243.
- Chou, T. Y. C.; Chang, M. M.; Tsao, G. T. **1981**. Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*, 20: 16-42.
- Chupp, D.; Clapp, G. L. **1923**. Fusicoccum canker on apples. *Phytopathology*, 13: 225-230.
- Clay, K. **1988**. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69: 10–16.
- Clay, K. and Schardl, C. **2002**. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160: S99–S127.
- Clement, S. L.; Kaiser, W. J.; Eichenseer, H. **1994**. Acremonium endophytes in germplasms of major grasses and their utilization for insect resistance. In: Bacon, C.W., White, J. (Eds.), *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 185–199.
- Colhoun, J. **1983**. Fungi causing rots of apple fruits in storage in Northern Ireland. *Annals of Applied Biology* 25: 88-99.
- Coll, P. M.; Abalos, J. M. F.; Villanueva, J. R.; Santamaria, R.; Perez, P. **1993**. Purification and characterization Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2607-2613.
- Combrink, J. C.; Commer, N. F.; Tyler, R. H.; Fortlage, R. J. **1976**. Postharvest *Phomopsis* rot of apple fruits. *Plant Disease Reporter*, 60: 1060-1064.
- Cripps, J. E. L.; Richards, L. A.; Mairata, A. M. **1993**. “Pink Lady” apple. *HortScience*, 28:1057.
- Dai, C.; Chen, Y.; Tian, L.; Shi, Y. **2010**. Correlation between invasion by endophytic fungus *Phomopsis* sp. And enzyme production. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 1324-1330.
- Daykin, M. E.; Milholland, R. D. **1990**. Histopathology of Blueberry twig blight caused by *Phomopsis vaccinii*. *Phytopathology*, 80: 736-740.

- Daines, R. H.; Peterson, J. L. **1976**. The occurrence and control of Phomopsis rot of peach. *Plant Disease Reporter*, 60: 141-143.
- De Bary, A. **1879**. Die Erscheinung der Symbiose. In: Trubner KJ, ed. *Vortragauf der Versammlung der Naturforscher und Ärzte zu Cassel*. Strassburg, Germany: Verlag, pp 1–30.
- DeBoy, R. T.; Mongodin, E. F.; Fouts D. E.; Tailford, L. E.; Khouri, H.; Emerson, J. B.; Mohamoud, Y.; Watkins, K.; Henrissat, B.; Gilbert, H. J.; Nelson, K. E. **2008**. Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. *Journal of bacteriology*, 190: 5455-63.
- Diorio, L. A.; Forchiassin, F.; Papinutti, V.L.; Sueldo, D. V. **2003**. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 11-15.
- Dong, Y.; Wang, L.; Xu, J.; Zhang, H.; Zhang, X.; Zhang, L. **2001**. Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 62: 1151-1158.
- Dunegan, J. C. **1932**. The occurrence of the perfect stage of *Phomopsis mali* in the United States. *Phytopathology*, 22: 922-924.
- Eck, R. V.; Dayhoff, M. O. **1996**. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K. **1996**. The ligninolytic system of the White-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1151-1158.
- Elmi, A. A.; West, C. P.; Robbins, R. T.; Kirkpatrick, T. L. **2000**. Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment in tall fescue. *Grass and Forage Science*, 55: 166–172.
- English, H. **1951**. Phomopsis canker: A progress report. *Proceedings of the Fifth Annual Research Conference of the Californian Fig Institute*, 45–48.
- Eriksson, K. E. L.; Blanchette, R. A.; Ander, P. **1990**. *Microbial and enzymatic degradation of wood components*. Springer-Verlag, Berlin.

- Erincik, O.; Madden, L. V.; Ferree, D. C. and Ellis, M. A. **2001**. Effect of growth stage on susceptibility of grape berry and rachis tissues to infection by *Phomopsis viticola*. *Plant Disease*, 85: 517-520.
- Erincik, O.; Madden, L. V.; Ferree, D. C. and Ellis, M. A. **2002**. Infection of grape berry and rachis tissues by *Phomopsis viticola*. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2002-0702-01-RS.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **2008**. FAO-STAT, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Farr, D. F.; Castlebury, L. A.; Pardo-Schultheiss, R. A. **1999**. *Phomopsis amygdali* Causes Peach Shoot Blight of Cultivated Peach Trees in the Southeastern United States. *Mycologia*, 9: 1008-1015.
- Farr, D. F.; Castlebury, L. A.; Rossman, A. Y. **2002**. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia*, 94: 494-504.
- Fengel, D.; Wegener, G. **1984**. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. De Gruyer, Berlin & New York. pp 613.
- Fernández, J.; Henao, L. **2007**. Evaluación de tres hongos basidiomycetos inmovilizados en *Luffa cylindrica* y fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> para la remoción del Negro reactivo 5. *Microbiólogo industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá, pp 154.
- Freeman, S.; Rodriguez, R. J. **1993**. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, 260: 75–78.
- Friesen, T. L.; Stukenbrock, E. H.; Liu, Z. H.; Meinhardt, S.; Ling, H.; Faris, J. D.; Rasmussen, J. B.; Solomon, P. S.; McDonald, B. A.; Oliver, R. P. **2006**. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 38: 953–956.
- Fruzynska-Jozwiak, D.; Jerzak, E. **2006**. Fungi on the collection of *Cotoneaster* plants in the Poznań botanical garden in 2003. *The Polish Phytopathological Society*, 40: 63-68.

- Fujita, K.; Sugiki, T.; Matsunaka, K. **1998**. Apple blight caused by *Diaporthe tanakae* in Aomori Prefecture. Bull. Aomori Field Crop and Horticultural Experimental Station, 6: 17-35.
- Garcia-Reyne, A.; López-Medrano, F. **2011**. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. Transplant Infectious Disease, 13: 204–207.
- Gómez, C.; Martínez, M.; Mosquera, D.; Pedroza, A.; Rodríguez, R.; Rosas, J. **2005**. Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. Universitas Scientiarum, 10: 37-45.
- González, V.; Tello, M. L. **2011**. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. Fungal Diversity, 47: 29–42.
- Gregory, C. T. **1913**. A rot of grapes caused by *Cryptosporella viticola*. Phytopathology, 3: 20–23.
- Grove, W. B. **1935**. In British stem-and-leaf fungi. Cambridge University Press, 1: 186-187.
- Guba, E. F. **1953**. Large leaf spot and canker of peach caused by the fungus *Fusicoccum amygdali* Delarc. Plant Disease Reporter, 37: 560-564.
- Gutiérrez, A., Martínez, A. T. **1996**. Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual. Revista Iberoamericana de Micología, 13:18-23.
- Hansen, H. N. **1949**. *Phomopsis* canker of fig. Californian Agriculture, 3: 13-14.
- Henrissat, B.; Driguez, H.; Viet, C.; Schulein, M. **1985**. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. Bio/Technology, 3: 722-726.
- Harris, D. C.; Tobutt, K. R. **1986**. Factors influencing the mortality of apple seedlings inoculated with zoospores of *Phytophthora cactorum*. Journal of Horticultural Science, 61: 457-464.
- Hendrix, F. F., Jr. **1989**. *Phomopsis* bud; shoot blight of peach. Phytopathology, 79: 1154.

- Horn, W. S.; Simmonds, M. S. J.; Schwartz, R. E.; Blaney, W. M. **1996**. Variation in production of phomodiol and phomopsolide B by *phomopsis* spp. *Mycologia*, 88: 588-595.
- <http://academic.scranton.edu/faculty/cannm1/inorganic/inorganicmodule.html>
- <Http://biofueloutlook.blogspot.com/2010/09/enzymatic-deconstruction-of-xylan-for.htm>
- [http://www.cals.ncsu.edu/plantpath/extension/fact\\_sheets/Blueberry\\_-\\_Twig\\_Blight.htm](http://www.cals.ncsu.edu/plantpath/extension/fact_sheets/Blueberry_-_Twig_Blight.htm)
- [http://www.dirtdoctor.com/Phomopsis-Fungal-Disease\\_vq1833.htm](http://www.dirtdoctor.com/Phomopsis-Fungal-Disease_vq1833.htm)
- <http://www.mdidea.com/products/proper/proper01805.html>
- <http://www.monografias.com/trabajos44/celulosa-madera/celulosa-madera.shtml>
- <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/SSD/Index.html>
- [http://www4.gipuzkoa.net/corporac/agricultura/manzanos/esp/04\\_d.asp?id=8](http://www4.gipuzkoa.net/corporac/agricultura/manzanos/esp/04_d.asp?id=8)
- Hyde, K. D.; Bussaban, B.; Paulus, B.; Crous, P. W.; Lee, S.; McKenzie, E. H. C.; Photita, W.; Lumyong, S. **2007**. Biodiversity of saprobic fungi. *Biodiversity and Conservation*, 16:17–35.
- Inglis, G.; Kawachuk, L. **2002**. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 60-70.
- Jeffers, S. N.; Aldwinckle, H. S.; Burr, T. J.; Arneson P. A. **1982**. *Phytophthora* and *Pythium* species associated with crown rot in New York apple orchards. *Phytopathology*, 72: 533–538.
- Jeffers, S. N.; Aldwinckle, H. S. **1986**. Seasonal variation in extent of colonization of two apple rootstocks by five species of *Phytophthora*. *Plant Disease*, 70: 941–945.
- Jeffers, S. N.; Aldwinckle, H. S. **1988**. *Phytophthora* crown rot of apple trees: sources of *Phytophthora cactorum* and *P. cambivora* as primary inoculum. *Phytopathology*, 78: 328–335.
- Jensen, K. A. Jr.; Bao, W.; Kawai, S.; Srebotnik, E.; Hammel, K. E. **1996**. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3679-3686.

- Jones, A. L.; Aldwinckle, H. S. **1990**. Comendium of Apple and Pear Diseases. APS press, St. Paul, MN., pp 100.
- Juge, N. **2006**. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. Trends in Plant Science, 11: 359-367.
- Kanematsu, S. **2002**. Variation in Japanese Isolates of *Phomopsis* from Fruit Trees and Their Phylogenetic and Taxonomic Studies. Journal of General Plant Pathology, 68:263.
- Kanematsu, S.; Konayashi, T.; Kudo, A.; Ohtsu, Y. **1999**. Conidial morphology, pathogenicity and culture characteristics of *Phomopsis* isolates from peach, Japanese pear and apple in Japan. Annals of Phytopathological Society of Japan, 65: 264-273.
- Kirkman, T. W. **1996**. Statistics to Use. <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>
- Kidd, M. N.; Beaumont, A. **1924**. Apple rot fungi in storage. Transactions of the British Mycological Society, 10: 98-118.
- Ko, Y.; Sun, S. K.; Kuo, M. S. **1994**. *Phomopsis* fruit spot of apple in Taiwan. Plant Protection Bulletin, 36:75-80.
- Ko, Y.; Sun, S. K.; Kuo, M. S. **1995**. Stem-end rot of pear in Taiwan. Plant Protection Bulletin, 37:223-255.
- Kobayashi, T.; Sakuma, T. **1982**. Materials for the fungus flora of Japan. Transactions of the Mycological Society of Japan, 23:37-40.
- Kodsueb, R.; McKenzie, E. H. C.; Lumyong, S.; Hyde, K. D. **2008a**. Diversity of saprobic fungi on Magnoliaceae. Fungal Diversity, 30: 37–53.
- Kodsueb, R.; McKenzie, E. H. C.; Lumyong, S.; Hyde, K. D. **2008b**. Fungal succession on woody litter of *Magnolia liliiflora* (Magnoliaceae). Fungal Diversity, 30: 55-72.
- Kulik, M. M. **1984**. Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis sojae*, and the taxonomic implications. Mycologia, 76: 274-291.
- Kumaresan, V.; Suryanarayanan, T. S. **2002**. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. Fungal Diversity, 9:81–91.



- Ladisch, M. R.; Lin, K. W.; Voloch, M.; Tsao, G. T. **1983**. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 5: 82-102.
- Lee, S. B.; Taylor, J. W. **1990**. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M. A., D.H.Gelfand, J.J.Snindky, T.J. White (ed), Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 282–287.
- Lee, J. **1997**. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56: 1-24.
- Lewis, D. H. **1985**. Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics. In: Boucher DH, ed. *The biology of mutualism*. London, UK: Croom Helm Ltd, pp 29–39.
- Ljungdahl, L. G.; Eriksson, K. E. **1985**. Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbiology and Ecology*, 8: 237-299.
- Lynd, L.; Weimer, P.; van Zyl, W.; Pretorius, I. **2002**. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 3: 506–577.
- MacDonald, J. D.; Duniway, J. M. **1978a**. Influence of the matric and osmotic components of water potential on zoospore discharge in *Phytophthora*. *Phytopathology*, 68: 751–757.
- MacDonald, J. D.; Duniway, J. M. **1978b**. Influence of soil texture and temperature on the motility of *Phytophthora cryptogea* and *P. megasperma* zoospores. *Phytopathology*, 68: 1627–1630.
- Machado, M. G. K.; Matheus, D. R.; Bononi, V. L. R. **2005**. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decoloration by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 246-252.
- MacFaddin, J. F. **1985**. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of bacteria, vol I. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- MacFaddin, J. F.; **1990**. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, Mexico City.
- Magnelli, P.; Martínez, A. E.; Mercuri, O. **1997**. Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. *Revista Argentina de Microbiología*, 29: 210-214.

- Marquez, L. M.; Redman, R. S.; Rodriguez, R. J.; Roossinck, M. J. **2007**. A virus in a fungus in a plant: Three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, 315: 513–515.
- Masseron, A.; Roche, L. **1993**. Pajam® 1 Lancep, Pajam® 2 Cepiland: deux sélections de M.9 sans virus. *Infos-Ctifl*, 94: 17-21.
- Matheron, M. E.; Young, D. J.; Matejka, J. C. **1988**. Phytophthora root and crown rot of apple trees in Arizona. *Plant Disease*, 72: 481–484.
- McIntosh, D. L. **1975**. Proceedings of the 1974 APDW workshop on crown rot of apple trees. *Canadian Plant Disease Survey*, 55: 109–116.
- Milholland, R. D. **1982**. Blueberry twig blight caused by *Phomopsis vaccinii*. *Plant Disease*, 66: 1034-1036.
- Milholland, R. D.; Daykin, M. E. **1983**. Blueberry fruit rot caused by *Phomopsis vaccini*. *Plant Disease*, 67: 325-326.
- MGAP. **2010**. Encuesta frutícola de hoja caduca, zafra 2009/10. Serie de encuestas N° 294.
- MGAP, DIEA. **2010**. Anuario Estadístico Agropecuario 2010.
- MGAP, DIEA. **2011**. Anuario Estadístico Agropecuario 2011.
- Murali, T. S.; Suryanarayanan, T. S.; Geeta, R. **2006**. Endophytic *phomopsis* species: host range and implication for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 673-680.
- Nakatani, F.; Hilaragi, T.; Sekizawa, H. **1984**. Studies on the canker of pear caused by *Diaporthe tanakae* Kobayashi et Sakumalwate. *Horticultural Experimental Station Bulletin* 5. pp 47-70.
- Nalli, R. **1999**. Osservazioni sulla patogenicità di *Phomopsis viticola* su vite. *Petria*, 9: 269-276.
- Nawawi, A.; Swinbure, T. R. **1979**. Observations on the infection and rotting of apple var. Bramley's Seeding by *Diaporthe pernicioso*. *Annals of Applied Biology*, 66: 245-255.
- Nicholas, P.; Margarey, P.; Wachtel, M. **1994**. *Diseases and Pests*. Winetitles, Adelaide, Australia, pp 106.

- Nidetzky, B.; Steiner, W.; Hayn, M.; Claeysens, M. **1994**. Cellulosa hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochemical Journal*, 298: 705-710.
- Niku-Paavola, M. L.; Karhunen, E.; Kantelinen, A.; Viikari, L.; Lundell, T.; Hatakka, A. **1990**. The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology*, 13: 211-221.
- Nitimargi, N. M. **1935**. Studies in the genera *Cytosporina*, *Phomopsis*, and *Diaporthe*. VII. Chemical factors influencing spore characters. *Annals of Botany (London)*, 49: 19-40.
- Ogata, R.; Goto, K.; Kunisawa, T.; Harada, R. **1986**. Productivity and fruit quality of four apple cultivars on three different rootstocks and at different planting densities. *Acta Horticulturae*, 160:97-104.
- Ogawa, J. M.; Zehr, E. I.; Bird, G. W.; Ritchie, D. F.; Uriu, K.; Uyemoto, J. K. **1995**. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul. MN.
- Osono, T.; Takeda, H. **2002**. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia*, 94:421–427.
- Parmeter, J. R. **1958**. An effect of substrate on spore form in *Phomopsis*. *Phytopathology*, 48: 396 -397.
- Pearson, R. C.; Goheen, A. C. **1994**. *Phomopsis* cane and leaf spot. *Compendium of Grape Diseases* (W.B. Hewitt, and R.C. Pearson, ed.), APS Press, St Paul, Minnesota, USA, 17–18.
- Penttila, M.; Saloheimo, M. **1999**. Lignocellulose breakdown and utilization by fungi. En: Oliver R, Schweizer M, editors. *Molecular fungal Biology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Petrini, O. **1986**. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema NJ, van den Huevel J, eds. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp 175–187.
- Petrini, O. **1991**. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J H, Hirano S S, eds. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag, pp 179-197.

- Philippidis, G. P.; Smith, T. K. **1995**. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52: 117-124.
- Pine, T. S. **1958**. Etiology of the dead-arm disease of grapevines. *Phytopathology*, 48: 192–197.
- Pointing, S. P. **1999**. Qualitative methods for the determination of lignocellolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*, 2: 17-33.
- Pointing, S.B.; Buswell, J. A.; Vrijmoed, L. L. P.; Jones, E. B. G. **1999**. Extracellular cellulolytic enzyme profiles of five lignicolous mangrove fungi. *Mycological Research* 103: (In press).
- Pridham, T. G.; Anderson, P.; Foley, C.; Lindenfelser, L. A.; Hesseltine, C. W.; Benedict, R. G. **1956-1957**. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *Antibiotics Annual*, pp 947-953.
- Promputtha, I.; Lumyong, S.; Vijaykrishna, D.; McKenzie, E. H. C.; Hyde, K. D.; Jeewon, R. **2007**. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53: 579–590.
- Promputtha, I.; Hyde, K. D.; McKenzie, E. H. C.; Peberdy, J. F.; Lumyong, S. **2010**. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?. *Fungal Diversity*, 41: 89–99.
- Punithaligam, E. **1973**. Two new species of *Phomopsis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 60: 157-158.
- Punithaligam, E. **1979**. *Phomopsis viticola*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 635: 631-640.
- Reddy, O. V. S.; Basappa, S. C. **1997**. Preparation of sweet potato flour and its fermentation to ethanol. *Journal of Food Science and Technology* 34: 108-112.
- Rehner, S. A.; Uecker, F. A. **1994**. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1666-1674.

- Rodriguez, R. J.; Henson, J.; Van Volkenburgh, E.; Hoy, M.; Wright, L.; Beckwith, F.; Kim, Y.; Redman, R. S. **2008**. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology*, 2: 404–416.
- Roberts, J. W. **1912**. A new fungus on the apple. *Phytopathology*, 2: 263-264.
- Roberts, J. W. **1913**. The “rough bark” disease of Yellow Newtown apple. U. S. Department of Agriculture’s Bureau of Plant Industry Bulletin, 280.pp 18.
- Rogalski, J.; Lundell, T.; Leonowicz, A.; Hatakka, A. **1991**. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiologica Polonica*, 40: 221-234.
- Rosenberger, D. A.; Burr, T. J. **1982**. Fruit decays of peach and apple caused by *Phomopsis mali*. *Plant Disease*, 66:1073-1075.
- Rossman, A. Y.; Farr, D. F.; Castlebury, L. A. **2007**. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*, 48:135–144.
- Royal Horticultural Society. **1996**. Royal Horticultural Society Colour chart. Royal Horticultural Society, London, and Flower Council of Holland, Leiden.
- Ryu, D. D. ; Mandels, M. **1980**. Cellulases: Biosynthesis and Applications. *Enzyme Microbiology and Technology*, 2: 92-102.
- Saccardo, P. A. **1915**. Notae mycologicae. *Annales Mycologici*, 13: 115–138.
- Santos, J. M.; Phillips, A. J. L. **2009**. Resolving the complex of Diaporthe (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*, 34:111–125.
- Santos, J. M.; Correia, V. G.; Phillips, A. J. L. **2010**. Primers for mating-type diagnosis in Diaporthe and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114: 225-270.
- Saikkonen, K.; Faeth, S. H.; Helander, M.; Sullivan, T. J. **1998**. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319–343.
- Saitou, N.; Nei, M. **1987**. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.

- Sansavini, S.; Marangoni, B.; Buscaroli, C.; Corelli-Grappadelli, L.; Tazzari, G. **1986**. The relationship between spacing and rootstock effects in an intensive planting trial of two apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 160: 23-37.
- Savocchia, S.; Greer, L. A.; Steel, C. C. **2007**. First report of *Phomopsis viticola* causing bunch rot of grapes in Australia. *Plant Pathology*, 56: 725.
- Scheel, T.; Hofer, M.; Ludwig, S.; Holker, U. **2000**. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in White-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 686-691.
- Schilder, A. M.C., Erincik, O., Castlebury, L., Rossman, A., Ellis, M. A. **2005**. Characterization of *Phomopsis* spp. infecting grapevines in the Great Lakes region of North America. *Plant Disease*, 89:755–762.
- Schlosser, D.; Grey, R.; Fritsche, W. **1997**. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 412-418.
- Schneider, G. W.; Scarbrough, C. C. **1980**. Cultivo de árboles frutales, Compañía Editorial Continental S.A. México.
- Schulz, B.; Boyle, C. **2005**. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661–686.
- Sewell G. W. F.; Wilson, J. F. **1959**. Resistance trials of some apple rootstocks varieties to *Phytophthora cactorum* (L & C.) Schroet. *Journal of Horticultural Science*, 34: 51–58.
- Shear, C. L.; Stevens, N. E.; Bain, H. F. **1931**. *Fungus diseases of the cultivated cranberry*. Technical Bulletin, United States Department of Agriculture, 258: 7-8.
- Sherwood, M.; Carroll, G. **1974**. Fungal succession on needles and young twigs of old-growth Douglas fir. *Mycologia*, 66: 499–506.
- Sieber, T. N.; Riesen, T. K.; Muller, E.; Fried, P. M. **1988**. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ.  $\frac{1}{4}$  *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of Phytopathology*, 122: 289–306.

- Sieber, T. N.; Dorworth, C. E. **1994**. An ecological study about assemblages of endophytic fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia - in search of candidate mycoherbicides. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1397–1402.
- Silbereisen, R. **1992**. Die wirtschaftlich wichtigen Obstarten. In: Lucas' Anleitung zum Obstbau (Winter *et al.* Ed.). Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart. pp. 58-120.
- Slippers, B.; Smit, W. A.; Crous, P. W.; Coutinho, T. A.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. **2007**. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology*, 56: 128-139.
- Smith, M.; Shnyreva, A.; Wood, D.; Thurston, C. **1998**. Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 144: 1063-1069.
- Smith, M. A.; Ramsey, G. B. **1957**. Fruit decay and twig canker on peach. *Phytopathology*, 47: 445-446.
- Solbak, A. I.; Richardson, T. H.; McCann, R. T.; Kline, K.A.; Bartnek, F.; Tomlinson, G.; Tan, X.; Parra-Gessert, L.; Frey, G. J.; Podar, M.; Luginbuhl, P.; Gray, K. A.; Mathur, E. J.; Robertson, D. E.; Burk, M. J.; Hazlewood, G. P.; Short, J. M.; Kerovuo, J. **2005**. Discovery of Pectin-degrading Enzymes and Directed Evolution of a Novel Pectate Lyase for Processing Cotton Fabric\**Journal of Biological BChemistry*, 280: 9431-9438.
- Stevens, N. E. **1924**. Notes on blueberry and cranberry diseases. *Proceedings Annual Convention of American Cranberry Growers Association*, 55: 7-10.
- Stone, J. K. **1987**. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas fir. *Canadian Journal of Botany*, 65: 2614–2621.
- Stone, J. K.; Petrini, O. **1997**. Endophytes of forest trees: a model for fungus-plant interactions. In: Carroll GC, Tudzynski P (eds), *Plant Relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 129–140.
- Stone, J. K.; Polishook, J. D.; White, J. R. J. **2004**. Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills GF, Foster MS, eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, USA: Elsevier, pp. 241–270.
- Strobel, G. A.; Torczynski, R.; Bollon, A. **1997**. *Acremonium* sp.- a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, 128: 97–108.



- Suryanarayanan, T. S.; Murali, T. S.; Venkatesan, G. **2002**. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*, 80:818–826.
- Sutton, B. C. **1980**. The Coelomycetes, Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Community Mycology Institute, Kew, Surrey, England, pp 696.
- Sutton, D. A.; Fothergill, A. W.; Rinaldi, M. G. **1997**. Guide to clinically significant fungi, pp. 491.
- Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo. **2006**. Fisiología Vegetal, volumen II. Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universidad Jaume I, D.L., pp 699.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. **2007**. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Teater, R. M.; Wood, P. J. **1982**. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Environmental Microbiology*, 43:777–780.
- Terui, M.; Harada, Y. **1968**. On *Phomopsis mali* causing “Jikugusare” disease of apples. *Review of Applied Mycology*, 47: 13151.
- The American Phytopathological Society. **1999**. Compendium of Apple and Pear Diseases. St Paul, MN., 55121-2097, USA. pp 38:39.
- Tomita, F. **2003**. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*, 14:187–204.
- Travis, J.W.; Rytter, J. L; Hickey, K. D. **1999**. The susceptibility of apple rootstocks and cultivars to *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 489: 235-242.
- Tuset, J. J.; Portilla, M. T. **1989**. Taxonomic status of *Fusicoccum amygdali* and *Phomopsis amygdalina*. *Canadian Journal of Botany*, 67:1275-1280.
- Uecker, F. A. **1988**. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir No. 13*. Cramer Publishers, Berlin, pp 1-231.
- Utkhede, R. S.; Quamme, H. A. **1988**. Use of the excised shoot assay to evaluate resistance to *Phytophthora cactorum* of apple rootstock cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 68: 851–857.

- van der Aa, H. A.; Noordeloos, M. E.; de Gruyter, J. **1990**. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*, 32: 3-19.
- van Niekerk, J. M.; Groenewald, J. Z.; Farr, D. F.; Fourie, P. H.; Halleen, F.; Crous, P. W. **2005**. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevine. *Australasian Plant Pathology*, 34: 27–39.
- van Rensburg, J. C. J.; Lamprecht, S. C.; Groenewald, J. Z.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W. **2006**. Characterisation of *Phomopsis* spp. Associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Studies in Mycology*, 55: 65–74.
- Van Warmelo K.T.; Marasas, W. F. O.; Adelaar, T. F.; Kellerman, T. S.; van Rensburg, I. B. J.; Minne, J. A. **1970**. Experimental evidence that lupinosis of sheep is a mycotoxicosis caused by the fungus *Phomopsis leptostromiformis* (Kuhn) Bubak. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 41: 235–247.
- Vázquez, R. **2004**. Detoxificación de contaminantes por actividad peroxidásica. [www.microbiologia.org.mx/CONAMI/Resumenes-Simposios/](http://www.microbiologia.org.mx/CONAMI/Resumenes-Simposios/)
- Vilches, L., **2002**. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Basi.c>
- Wechtl, E. E, **1990**. *Phomopsis* (Coelomycetes) species on Compositae and Umbelliferae: a critical evaluation of characters with keys. *Linzer biologische Beitrage*, 22: 161–173.
- West, C. P.; Izekor, E.; Oosterhuis, D. M.; Robbins, R. T. **1988**. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil*, 112: 3–6.
- Wehmeyer, L. E. **1933**. The Genus *Diaporthe* Nitschke and Its Segregates. Univ. of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Weingartner, D. P.; Klos, E. J. **1975**. Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberries caused by *Godronia (Fusicoccum) cassandrae* and *Diaporthe (Phomopsis) vaccinii*. *Phytopathology*, 65: 105-110.
- 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*. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. New York: Academic Press Inc., pp 315-322.

- Wilcox, M. S. **1939**. *Phomopsis* twig blight of blueberry. *Phytopathology*, 29: 136-142.
- Wilcox, M. S. **1940**. *Diaporthe vaccinii*, the ascigerous stage of *Phomopsis*, causing a twig blight of blueberry. *Phytopathology*, 30: 441-443.
- Wilder, B. M.; Albersheim, P. **1973**. The Structure of Plant Cell Walls: IV. A Structural Comparison of the Wall Hemicellulose of Cell Suspension Cultures of Sycamore (*Acer PseudoPlatanus*) and of Red Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris*). *Plant Physiology*, 5: 889–893.
- Wilson, D. **1995**. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274–276.
- Yanna Ho, W. H.; Hyde, K. D. **2002**. Fungal succession on fronds of *Phoenix hanceana* in Hong Kong. *Fungal Diversity*, 10: 185–211.
- Zille, A.; Tzanov, T.; Gubitz, G.; Cavaco, A. **2003**. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters*, 25: 1473-1477.

## ANEXO

**Apartado 1** – Determinación del área de necrosis obtenida a los 30 días de inoculación en los ensayos de patogenicidad.

Cepa inoculada	Árbol	Superficie de necrosis (cm <sup>2</sup> )		
		rama A	rama B	Promedio
<b>Z<sub>13</sub></b>	1	<b>0,75</b>	<b>0,60</b>	0,68
	2	0,44	0,20	0,32
	3	0,57	0,32	0,45
	4	0,44	0,32	0,38
	5	<b>1,80</b>	<b>0,57</b>	1,19
<b>Z<sub>2</sub></b>	1	<b>2,75</b>	<b>4,90</b>	3,83
	2	<b>1,80</b>	*	1,80
	3	1,60	<b>4,55</b>	3,08
	4	0,90	<b>3,00</b>	1,95
	5	1,50	1,04	1,27
<b>Z<sub>7</sub></b>	1	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,42	0,21
	3	0,00	0,36	0,18
	4	0,00	<b>0,32</b>	0,16
	5	0,36	<b>0,65</b>	0,51
<b>Z<sub>12</sub></b>	1	<b>1,89</b>	<b>2,70</b>	2,30
	2	<b>4,90</b>	<b>1,35</b>	3,13
	3	<b>0,60</b>	0,56	0,58
	4	<b>3,60</b>	<b>0,80</b>	2,20
	5	0,65	3,99	2,32
<b>Testigo</b>	1	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,04	0,02
	3	0,06	0,03	0,05
	4	0,00	0,00	0,00
	5	0,20	0,00	0,10

(\*) Rama que se perdió durante el proceso de poda y recolección. En negrita se señalan las ramas con recuperación de *Phomopsis* spp.

**Apartado 2** - Composición de los medios de cultivo utilizados en los ensayos de actividad enzimática

Producción de Celulasas – Medio CMC		
Compuesto	Fórmula	Cantidad (g/L -mL)
Fosfato de amonio monobásico	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
Cloruro de potasio	KCl	0.2 g
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2$	0.2 g
Carboximetil celulosa (4% m/v) (CMC)		250 mL
Agar		12 g
Agua destilada	$\text{H}_2\text{O}$	750 mL

Producción de Pectinasas – Medio Pectina Citrus		
Compuesto	Fórmula	Cantidad (g/L -mL)
Fosfato de amonio monobásico	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.9 g
Fosfato diamónico	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.2 g
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
Cloruro de potasio	KCl	0.5 g
Pectina de citrus		1 g
Agar		12 g
Agua destilada	$\text{H}_2\text{O}$	c. s. p 1000 mL

Producción de Ligninasas – Medio RBBR	
Compuesto	Cantidad (g/L -mL)
Remazol Brilliant Blue R (RBBR)	0.5 g
Extracto de Malta	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	c. s. p 1000 mL

Producción de Xilanasa – Medio Xilano		
Compuesto	Fórmula	Cantidad (g/L -mL)
Fosfato de amonio monobásico	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
Cloruro de potasio	KCl	0.2 g
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2$	0.2 g
Xilano		10 g
Agar		12 g
Agua destilada	$\text{H}_2\text{O}$	750 mL

Producción de $\beta$ -glucosidasas – Medio Esculina		
Compuesto	Fórmula	Cantidad (g/L -mL)
Esculina	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_9$	1 g
Cloruro Férrico	$\text{FeCl}_3$	0.3 g
Caseína		1 g
Extracto de levadura		25 g
Glicerol		8 g
Agar		20 g
Agua destilada	$\text{H}_2\text{O}$	c. s. p 1000 mL

**Apartado 3** – Evaluación de crecimiento de micelio y decoloración/coloración del medio de cultivo obtenido en los ensayos de actividad enzimática.

Aislamiento	Áreas de crecimiento micelial/decoloración del medio de cultivo (cm <sup>2</sup> )				
	Actividad Celulasa				
M <sub>1</sub> (Z <sub>12</sub> )	3.3	3.45	3.55	3.45	3.65
M <sub>2</sub> (Z <sub>12</sub> *)	3.05	3.1	3.05	3.2	3.1
M <sub>3</sub> ' (Z <sub>7</sub> )	1.7	1.1	1.35	1.05	1.4
M <sub>4</sub> (Z <sub>13</sub> )	3.4	3.35	3.25	3.25	3.1
M <sub>5</sub> (Z <sub>2</sub> )	2.8	2.6	3.0	2.8	3.1

(\*) M<sub>3</sub> fue el único aislamiento en donde se observó un halo de decoloración diferente al área de crecimiento micelial. Los valores de decoloración fueron: 2.65, 2.55, 2.55, 2.45 y 2.7 cm<sup>2</sup>. En el resto de los aislamientos el halo de decoloración fue igual al de crecimiento.

Aislamiento	Áreas de crecimiento micelial/decoloración del medio de cultivo (cm <sup>2</sup> )				
	Actividad Pectinasa				
M <sub>1</sub> (Z <sub>12</sub> )	2.9	3.05	2.95	2.9	3.15
M <sub>2</sub> (Z <sub>12</sub> *)	3.15	3.1	3.4	3.35	3.25
M <sub>3</sub> (Z <sub>7</sub> ) c	1.4	1.6	1.95	1.55	2.1
M <sub>3</sub> (Z <sub>7</sub> ) d	2.6	2.55	2.6	2.7	2.7
M <sub>4</sub> (Z <sub>13</sub> )c	2.95	2.95	2.9	2.9	2.55
M <sub>4</sub> (Z <sub>13</sub> ) d	2.96	2.96	2.91	2.91	2.55
M <sub>5</sub> (Z <sub>2</sub> ) c	2.7	2.8	2.7	2.65	2.75
M <sub>5</sub> (Z <sub>2</sub> ) d	2.71	2.81	2.71	2.66	2.76

M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> presentaron un área de crecimiento igual al halo de decoloración. M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> mostraron áreas de decoloración diferentes. c = crecimiento, d = decoloración



Aislamiento	Áreas de crecimiento micelial/decoloración del medio de cultivo (cm <sup>2</sup> )			
	Actividad β-glucosidasa			
M <sub>1</sub> (Z <sub>12</sub> )	4.3	4.2	4.1	4.2
M <sub>2</sub> (Z <sub>12</sub> *)	4.2	4.4	4.6	4.2
M <sub>5</sub> (Z <sub>2</sub> )	4.1	3.8	4.2	4.1

En todos los casos el área de crecimiento resulto igual al área de coloración del medio de cultivo. No se reportan las áreas de M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> (Z<sub>7</sub> y Z<sub>13</sub> respectivamente) debido a que su abundante crecimiento no permitió la toma de medidas.

Aislamiento	Áreas de crecimiento micelial/decoloración del medio de cultivo (cm <sup>2</sup> )			
	Actividad Ligninasa			
Control +	1.7	1.5	1.55	1.55
M <sub>1</sub> (Z <sub>12</sub> )	3.2	3.4	3.3	3.25
	3.2	3.3	3.2	3.3
M <sub>2</sub> (Z <sub>12</sub> *)	2.5	2.85	1.4	2.8
M <sub>3</sub> (Z <sub>7</sub> )	4.4	4.9	4.5	4.5
M <sub>4</sub> (Z <sub>13</sub> )	3.15	3.25	3.1	3.3
	3.8	3.8	4.1	4.0
M <sub>5</sub> (Z <sub>2</sub> )	2.2	2.2	2.25	2.4
	4.1	3.7	3.4	3.4

En ninguno de los casos se observó decoloración del medio de cultivo, solamente en el control positivo a los 10 días de incubación.

El ensayo de M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> se realizo por duplicado.

Aislamiento	Áreas de crecimiento micelial/decoloración del medio de cultivo (cm <sup>2</sup> )			
	Actividad Xilanasa			
Control -	0	0	0	0
M <sub>1</sub> (Z <sub>12</sub> )	0.9	0.95	0.8	1.3
	2.65	2.6	2.5	2.6
M <sub>2</sub> (Z <sub>12</sub> *)	2.05	1.45	1.25	1.2
	2.05	2.3	2.2	2.35
M <sub>3</sub> (Z <sub>7</sub> )	1.95	1.2	1.2	1.3
	1.7	1.55	1.75	---
M <sub>4</sub> (Z <sub>13</sub> )	2.2	1.45	2.1	1.85
	2.5	2.65	2.7	2.4
M <sub>5</sub> (Z <sub>2</sub> )	2.35	2.4	2.55	2.35

En ninguno de los casos se observó decoloración del medio de cultivo.

El ensayo de todos los aislamientos M se realizó por duplicado; los datos duplicados de M<sub>5</sub> no se reportan debido a que la gran contaminación de la placa no permitió la toma de medidas.

**Apartado 4** – Secuencias de la región ITS amplificadas mediante PCR obtenidas con los primers ITS4

Aislamiento Z2

5'-GCCTTCAAAGCGAGGGTTTAACTACTGCGCTCGGGGTCCTGGCGAGCTCGCCACTGAATTCAGGGCCTGCTTCTT  
GGGTAAGAAGCAGTGCCCCATACCAAGCCAGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTCCGGAAT  
ACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTG  
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATGTTTTGTGCTCAGAGTTTCACT  
GTAAAAACAAGAGTTAGGTTGGCCGCCGACGGGCTGTCTCAACACCCGAGGGTGAGGGGCCCCGAGGGACCAGCTA  
GCGCCGAGGCAACAGTAAGGTATAAGTTGACAAAGGGTTTCTGGGTGCGCCTGGGGCGCGTTCCAGCAATGATCCCT  
CCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTTAC-3'

Aislamiento Z7

5'-TTCAAAGCGAGATATAACTACTACGCTCGGGGTCCTGGAGAGCTCGCCACTGAATTCAGGGCCTACTCCCGTGA  
GGAAGTAGTGCCCCATACCAAGCCAGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAG  
GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCT  
TCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATGTTTTTACTCAAAGATTCACTATAAAA  
ACAAGAGTTTAGTTGGCCGCCGCGGGGCTGCTCCCTGTCTCCAGGGGGCCTCAGTGAAGAGGGCCGCGCTAACGCCAA  
GGCAACAATAGGTATAAGTTCACAAAGGGTTTCTGGGTGCGCCAAAGCGCGTTCCAGCAATGATCCCTCCGCTGGTTC  
ACCAACGGAGACCTTGTACG-3'

Aislamiento Z12

5'-GCACCGCCAGGGCCTTCCAGAGCGAGGGTTTAACTACTGCGCTCGGGGTCCTGGCGAGCTCGCCACTGAATTCAG  
GGCCTGCTTCTTGGGTAAGAAGCAGTGCCCCATACCAAGCCAGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCAT  
GCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTAT  
CGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATGTTTTGTGCT  
CAGAGTTTCACTGTAAAAACAAGAGTTAGGTTGGCCGCCGACGGGCTGTCTCAACACCCGAGGGTGAGGGGCCCCGA  
GGGACCAGCTAGCGCCGAGGCAACAGTAAGGTATAAGTTGACAAAGGGTTTCTGGGTGCGCCTGGGGCGCGTTCCA  
GCAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGG-3'

Aislamiento Z13

5'-CACCGCCAGGGCCTTCCAGAGCGAGATATAACTACTACGCTCGGGGTCCTGGCGAGCTCGCCACTGAATTCAGGG  
CCTGCTCCTCTCGAAGCAGTGCCCCATACCAAGCCAGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCC  
GGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT  
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATGTTTTTACTCAAAGATT  
CACTGTAGAAAACAAGAGTTTAGTTGGCCGCCGCGGGGCTGCTCCCGTTTCCAGGGGGCTTATATTTCAAAGCCAGCT  
TACGCCGAGGCAACAGTAGGTATAAGTTCACAAAGGGTTTCTGGGTGCGCCGAAGCGCGTTCCAGCAATGATCCCTCC  
GCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTA-3'