



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE ESPECIES DE
Colletotrichum CAUSANTES DE LA PODREDUMBRE AMARGA DEL
MANZANO EN URUGUAY**

LAURA ISABEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

TUTORA: Dra. Ing. Agr. SANDRA ALANIZ FERRO

Departamento de Protección Vegetal, Fitopatología
Facultad de Agronomía

MONTEVIDEO
URUGUAY

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia en primer lugar, que me ha dado el sostén para llegar hasta aquí. Especialmente a mis padres, a mi compañero de vida, Marcelo y a nuestras hijas Lucía y Sofía que hicieron conmigo la carrera.

A mis compañeros de trabajo por su colaboración y aliento a seguir adelante para concluir esta etapa.

A mi tutora, Sandra por transmitirme sus conocimientos y por su dedicación en el seguimiento del trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	v
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA PODREDUMBRE AMARGA DEL MANZANO	1
1.1.1 Agentes causales	3
1.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Colletotrichum</i> .	4
1.2.1 Identificación fenotípica	4
1.2.2 Identificación molecular	9
1.3 OBJETIVO	14
2. MATERIALES Y METODOS	15
2.1 Aislados utilizados	15
2.2 Identificación molecular	18
2.3 Caracterización fenotípica	22
3. RESULTADOS	25
3.1 Identificación molecular	25
3.2 Identificación fenotípica	30
4. DISCUSION	39
5. CONCLUSIONES	45
6. BIBLIOGRAFÍA	46
7. ANEXO	58

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura N°		Página
1.	Síntomas y signo causados por <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos de manzana (A) variedad Crisp Pink, (B) variedad Granny Smith y (C) variedad Red Delicious.....	3
2.	Alineamiento de <i>CaInt2</i> con regiones similares en secuencia del ITS1 de otras especies de <i>Colletotrichum</i>	11
3.	Productos de PCR amplificados con cebadores específicos A) para <i>C. gloeosporioides</i> CgInt/ITS4 y B) para <i>C. acutatum</i> CaInt2/ITS4.....	26
4.	Uno de los 7 árboles con mayor parsimonia obtenido del análisis de la región ITS de todos los aislados de la colección, aislado de citrus y secuencias de aislados de referencia de especies identificadas.....	29
5.	Aspecto de los conidios provenientes de colonias luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA.....	33
6.	Crecimiento diario de las colonias ($\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$) en medio PDA a las temperaturas de 15, 20, 25 y 30°C de 9 aislados seleccionados (C1, C2, C4, C10, C11, C15, C18, C19 y C37).....	34
7.	Aspecto de las colonias luego de 5 días de crecimiento en medio PDA enmendado con 0 (testigo), 0,5 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de benomil....	36
8.	Representación gráfica de los aislados de <i>Colletotrichum</i> según los componentes 1 y 2 extraídos del análisis de Componentes Principales.....	37
9.	Aporte de cada variable en los componente 1 y 2.....	38

Tabla N°		Página
1.	Colección de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. de manzana uruguayos utilizados en este estudio.....	16
2.	Resultado de la identificación molecular de los aislados de <i>Colletotrichum</i> utilizando cebadores especie-específicos para <i>C. gloeosporioides</i> (CgInt/ITS4) y <i>C. acutatum</i> (CaInt2/ITS4) y análisis filogenético de la región ITS del ADNr.....	27
3.	Agrupación de los aislados en función de la coloración de las colonias, aspecto del micelio y presencia de zonación.....	32

RESUMEN

La manzana es la fruta de clima templado de mayor importancia comercial como fruta fresca, en Uruguay y el mundo. La podredumbre amarga del manzano es una enfermedad causada por especies del género *Colletotrichum* que ve favorecida por la ocurrencia de abundantes precipitaciones, sobre todo en los períodos cercanos a la cosecha. En los años favorables para su desarrollo, veranos lluviosos, las pérdidas de fruta pueden superar el 50%. El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de *Colletotrichum* causantes de la podredumbre amarga del manzano en Uruguay mediante estudios moleculares y fenotípicos. Se trabajó con una colección de 41 aislados monospóricos de *Colletotrichum* provenientes de frutos de manzana con síntomas típicos de podredumbre amarga. Se amplificó el ADN con cebadores especie-específicos para *Colletotrichum gloeosporioides* (CgInt/ITS4) y *Colletotrichum acutatum* (CaInt2/ITS4) y se secuenció y analizó filogenéticamente la región ITS del ADNr. Se registraron características de las colonias como color, forma, borde, zonación; se observó la forma y se midió el tamaño de los conidios. Se realizaron ensayos de crecimiento a diferentes temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C) y se determinó su sensibilidad al benomil. Como resultado se determinó la presencia de por lo menos tres especies de *Colletotrichum* causando la podredumbre amarga en Uruguay: *Colletotrichum fructicola* (33 aislados), *Colletotrichum theobromicola* (6 aislados), ambas pertenecientes al complejo de especies de *C. gloeosporioides*. Los restantes dos aislamientos se definieron como pertenecientes al complejo de especies

de *C. acutatum* pero no pudieron ser identificados a nivel de especies. *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, las especies tradicionalmente asociadas a la podredumbre amarga, no fueron identificadas en este estudio. Estos hallazgos son una contribución importante a la etiología de la podredumbre amarga en el cultivo de manzana en Uruguay y debe servir de base para futuros diagnósticos, estudios epidemiológicos y manejo integrado de esta enfermedad. Las características fenotípicas y los pares de cebadores CgInt/ITS4, específico para *C. gloeosporioides* y CaInt2/ITS4, específico para *C. acutatum*, permiten identificar de forma confiable los complejos de especies de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, pero no las especies dentro de estos. El análisis de la región ITS permite identificar las especies *C. gloeosporioides* y *C. theobromicola* pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*. Sin embargo, no resulta útil para identificar especies dentro del complejo de especies *C. acutatum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA PODREDUMBRE AMARGA DEL MANZANO

La podredumbre amarga del manzano, también llamada antracnosis de los frutales de pepita, afecta los manzanos causando podredumbre en la fruta. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en la mayoría de los países donde existen plantaciones comerciales de este cultivo. Cuando ocurren veranos lluviosos pueden ocasionar pérdidas que van del 50% a destruir cosechas completas de manzana en pocas semanas (Sutton, 1990; Agrios, 2005).

Las variedades de manzana de cosecha tardía (abril) suelen ser las más afectadas por la podredumbre amarga, como es el caso de Granny Smith, Cripps Pink o Fuji. En años muy favorables al desarrollo de la enfermedad las variedades de cosecha de estación (marzo) como Early Red One, Oregon Spur y Red Delicious también pueden ser afectadas. (Yoder & Biggs, 1996?; Moggia & Yuri 2004)

El síntoma principal, es una podredumbre blanda que externamente aparece como una mancha redondeada, de color café claro, generando una depresión en el centro con un diámetro medio entre 0,5 y 6 cm (Figura 1). En la sección transversal la podredumbre avanza hacia el corazón de la fruta formando una “V” característica. Esta forma de avance típica de la podredumbre amarga, la diferencia de otras

podredumbres que se caracterizan por lesiones que avanzan de forma cilíndrica hacia el interior del fruto (Jones y Aldwinckle, 2002; Agrios, 2005).

Sobre la mancha aparecen numerosas estructuras, comenzando por el centro de las mismas, que se corresponden con acérvulos de *Colletotrichum* spp., los que con frecuencia se disponen en círculos concéntricos. En condiciones de alta humedad, los acérvulos producen masas cremosas de conidios de color rosado-salmón a marrón oscuro. A medida que la podredumbre avanza, en las zonas más viejas, el tejido se oscurece, arruga y hunde (Figura 1) (Jones y Aldwinckle, 2002).

Cuando se desarrollan varias manchas sobre un fruto, estas coalescen pudriendo gran parte del fruto, el cual puede momificarse manteniéndose suspendido en la rama o caer al suelo (Agrios, 2005).

Colletotrichum sp. puede infectar fruta poco antes de la cosecha, permanecer latente durante el periodo de conservación a bajas temperaturas (0 °C). Posteriormente cuando estos frutos son sacados del almacenamiento y puestos a temperatura ambiente para ser comercializados, la enfermedad se desarrolla rápidamente apareciendo los síntomas (Agrios, 2005).



Figura 1: Síntomas y signo causados por *Colletotrichum* spp. en frutos de manzana (A) variedad Cripps Pink, (B) variedad Granny Smith y (C) variedad Red Delicious.

1.1.1 Agentes causales

La podredumbre amarga es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum*. Las dos especies que tradicionalmente han sido reportadas como causantes de esta enfermedad en manzano son *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y *C. acutatum* J.H. Simmonds ex J.H. Simmonds (Sutton, 1992; Berstein et al., 1995; Jones et al., 1996; Jones y Aldwinckle, 2002; González, et al., 2006). La forma perfecta o teleomorfo de *C. gloeosporioides* corresponde a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk, mientras que la forma perfecta o teleomorfo de *C. acutatum* es *G. acutata* (Guerber & Correll, 2001). Estos hongos pertenecen a la clase Ascomycetos.

1.2 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Colletotrichum*

Dado que el género *Colletotrichum* cuenta con un alto número de especies (más de 100) se definieron complejos de especies que agrupan aquellas más relacionadas (Cannon et al.; Cai et al., 2009; Crouch et al., 2009a).

Tradicionalmente la identificación de las especies de *Colletotrichum* se ha basado en el estudio de características fenotípicas tales como color de la colonia, forma y tamaño de los conidios y apresorios, temperatura óptima de crecimiento, tasa de crecimiento de las colonias, presencia/ausencia de setas, sensibilidad al fungicida benomil y capacidad de hidrolizar caseína (Berstein et al., 1995; Freeman et al., 1998; Photita et al., 2005; Moral et al., 2007). Estas características han sido muy utilizadas para diferenciar dos de las especies más frecuentes dentro del género *Colletotrichum*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Peres et al., 2004).

A partir de 1990 se comenzó a utilizar herramientas moleculares para la identificación de las especies de *Colletotrichum* como diseño de cebadores especie-específicos, estudio del polimorfismo de longitud de fragmentos de ADN (RFLP) generados con enzimas de restricción y análisis de diferentes regiones génicas (Mills, et al., 1992; Sreenivasaprasad et al., 1996; Freeman et al., 1998; Álvarez et al., 2004; Nguyen et al., 2010).

1.2.1 Identificación fenotípica

Aspecto de la colonia

La descripción de las colonias suele ser muy variada y con diferente nivel de detalle, lo que dificulta comparar la observación de distintos investigadores. Algunos, solo las definen como naranja o rosa para *C. acutatum* y grises para *C. gloeosporioides* (Sonoda & Pelosi, 1988; Martín & García-Figueres, 1999; Sutton, 1992). Otros, aportan más detalles utilizando los colores oliva, gris, gris oscuro, marrón, blanco, beige, rosa y naranja para la descripción de las colonias (Smith & Black, 1990).

En medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) la colonia de *C. gloeosporioides* es de color blanco a gris claro o gris oscuro y el micelio es de tipo algodonoso (Jones y Aldwinckle, 2002) con masas de esporas de color anaranjado (Adaskaveg, 2009). Cuando se observan peritecios, éstos se presentan inmersos en el medio de cultivo, son esféricos y de color café oscuro. Los peritecios en su interior contienen ascas con ascosporas hialinas, unicelulares, arqueadas o fusiformes (Villanueva-Arce et al., 2008).

La colonia de *C. acutatum* en PDA presenta micelio de color blanco, masas anaranjadas de conidios y un desarrollo más lento y aspecto más compacto que *C. gloeosporioides* (Jones y Aldwinckle, 2002; Than et al., 2008; Adaskaveg & Föster, 2009).

Forma y tamaño de los conidios

Según Sutton (1992), los conidios de *C. gloeosporioides* son hialinos, oblongos, con terminaciones obtusas y su tamaño se encuentra entre 9-24 x 3-6 μm , mientras que *C. acutatum* produce conidios hialinos, generalmente fusiformes, con terminaciones agudas (a veces una es redondeada) y su tamaño se encuentra entre 8-16 x 2,5-4 μm . Por otra parte, Sonoda & Pelosi (1988) y Berstein (1995), mencionan que el tamaño promedio de los conidios de *C. gloeosporioides* es de 14.8 x 4.8 μm y de *C. acutatum* de 13.3 x 4.7 μm , mientras que para Harp (2008) el tamaño es de 17.96 x 6.37 μm y 16.79 x 4.49 μm respectivamente.

Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento

Varios investigadores sugieren que los aislados de *C. acutatum* poseen una tasa de crecimiento significativamente menor que los de *C. gloeosporioides* (Berstein et al., 1995; Shi et al., 1996; Smith & Black, 1990).

Smith y Black (1990) evaluaron el efecto de la temperatura en el crecimiento radial de tres especies de *Colletotrichum* a 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 °C y encontraron que la mayor diferencia en la tasa de crecimiento se observa a 32 °C. En dicho trabajo el diámetro promedio a los 5 días de incubación fue de 13 mm en *C. acutatum*, 69 mm en *C. gloeosporioides* y 63 mm para *C. fragariae*. El crecimiento óptimo para las tres especies se ubicó en 28 °C.

Olivera et al., (2005) determinaron las curvas de crecimiento a diferentes temperaturas de aislados de *Colletotrichum* obtenidos de olivos producidos en España. En este caso las colonias se desarrollaron solo entre 10 y 30°C. La temperatura óptima calculada para los aislados de olivo españoles fue de 21,8 °C.

Harp (2008) determinó la tasa de crecimiento diario para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en dos experimentos. Como resultado obtuvo una tasa de crecimiento de 5,91 y 5,93 mm.d⁻¹ para *C. gloeosporioides* mientras que para *C. acutatum* fue de 2.96 y 3.54 mm.d⁻¹ en dos ensayos realizados.

Sensibilidad al fungicida benomil

Los fungicidas del grupo de los benzimidazoles como el benomil inhiben el ensamblado de los microtúbulos uniéndose al heterodímero de la molécula de tubulina, lo que constituye un modo de acción muy específico. Estos fungicidas se han utilizado por más de 30 años y numerosos casos de resistencia han sido reportados, incluyendo aislados de *Colletotrichum* spp. provenientes de varios cultivos y así como también en otros patógenos (Peres et al., 2002 y 2004).

Yarden & Katan (1993) encontraron que mutaciones que conducen a sustituciones en los aminoácidos 198 y 200 de la beta tubulina, son responsables de la resistencia a benomil en cepas de *Botrytis cinerea*. Mutaciones similares se encontraron en fenotipos resistentes al benomil de otros hongos patógenos.

Según Sonoda y Pelosi (1988), en el caso del género *Colletotrichum* el fungicida benomil es más tóxico para las especies que presentan colonias grises y rápido crecimiento, que para las naranjas y de crecimiento más lento.

El efecto inhibitorio *in vitro* de benomil en el crecimiento de la colonia de aislados de *Colletotrichum*, fue evaluado a concentraciones entre 0 y 1000 mg.L⁻¹ adicionado a medio de cultivo PDA. Los aislamientos de *C. acutatum* fueron poco sensibles a benomil, el área de la colonia se vio reducida entre 30 y 40 % respecto al control a 0.1 mg.L⁻¹ de principio activo y 75 % a 1.0 mg.L⁻¹. Asimismo, el aumento de la concentración de benomil no se reflejó en una mayor reducción del crecimiento. En contraste el área de la colonia de *C. gloeosporioides* se vio inhibida de 68 a 88 % respecto al control a 0.1 mg.L⁻¹ y a concentraciones mayores no hubo crecimiento (Peres et al., 2002 y 2004).

Capacidad de hidrolizar caseína

La capacidad para hidrolizar distintas proteínas también se ha utilizado para la diferenciación de especies fúngicas. En el caso de *Colletotrichum* spp. se ha empleado la capacidad de hidrolizar caseína para diferenciar *C. acutatum* de *C. gloeosporioides*. Los aislados de *C. acutatum* poseen esta capacidad mientras los de *C. gloeosporioides* no (Martín & García-Figueroa, 1999; Martín et al., 2002).

Moral et al. (2007) evaluaron la capacidad de hidrolizar caseína en medio de hidrólisis de caseína (CHM), la base de este medio fue Agar Agua (AA) al 2% y como fuente de caseína utilizaron leche en polvo descremada. Evaluaron varias concentraciones de leche en polvo y la más adecuada fue la de 15%. A esta concentración de caseína se forman halos de hidrólisis de varios mm que contrastan bien con el color del medio.

1.2.2 Identificación Molecular

Para la identificación molecular de especies de *Colletotrichum* se han desarrollado diferentes técnicas. Inicialmente, varios investigadores diseñaron cebadores especie-específicos para identificar a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, dos de las especies más importantes dentro del género *Colletotrichum* (Mills et al., 1992; Sreenivasaprasad et al., 1996; Martínez-Culebras et al., 2003; Hang et al., 2010). Otros investigadores utilizaron el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) dentro de poblaciones de *Colletotrichum* para identificar especies de este género (Brown et al., 1996; Martín & García-Figueres, 1999; Álvarez et al., 2004). Más recientemente comenzó a utilizarse el análisis de secuencias. La región génica más analizada ha sido la región ITS que codifica para el ADN ribosomal (ADNr) y en general es complementada con otros genes como β -tubulina o Histona 3 (Talhinhas et al., 2002; Photita et al., 2005; Shivas & Tan, 2009; Hang et al., 2010; Faedda et al., 2011).

Cebadores especie-específicos

Cebadores especie específicos, han sido usados con éxito en numerosos estudios para diferenciar *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* (Brown et al., 1996; Freeman et al., 2000; Álvarez et al., 2004; Talhinhos et al., 2002; Nguyen, 2010). Estos cebadores han sido diseñados en la región ITS del ADNr. Esto es debido a que por un lado los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 presentan variabilidad lo que permite diferenciar especies y por el otro es una región génica muy repetida en el genoma lo que facilita mucho su amplificación.

Los cebadores CgInt (Mills et al. 1992) y CaInt2 (Sreenivasaprasad et al., 1996) utilizados en combinación con el cebador universal ITS4 (White et al. 1990), amplifican específicamente las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* respectivamente (Figura 2). Estos cebadores han sido los más ampliamente utilizados para la identificación de estas dos especies (Adaskaveg & Hartin, 1997; Freeman et al., 2000; Ureña-Padilla et al., 2002; Lewis-Ivey et al., 2004; Garrido et al., 2008; Hang et al., 2010; Silva-Rojas & Ávila-Quezada, 2011).

Martínez-Culebras et al. (2003) diseñaron los cebadores Col-1 y Col-2 para identificar específicamente a *C. acutatum*, mientras que Mithun Raj et al. (2012) desarrollaron los cebadores CgsF1 y CgsR1, específicos para la especie *C. gloeosporioides*. Éstos últimos fueron diseñados para ser utilizados en un protocolo de detección de *C. gloeosporioides* directamente sobre material vegetal o suelo.

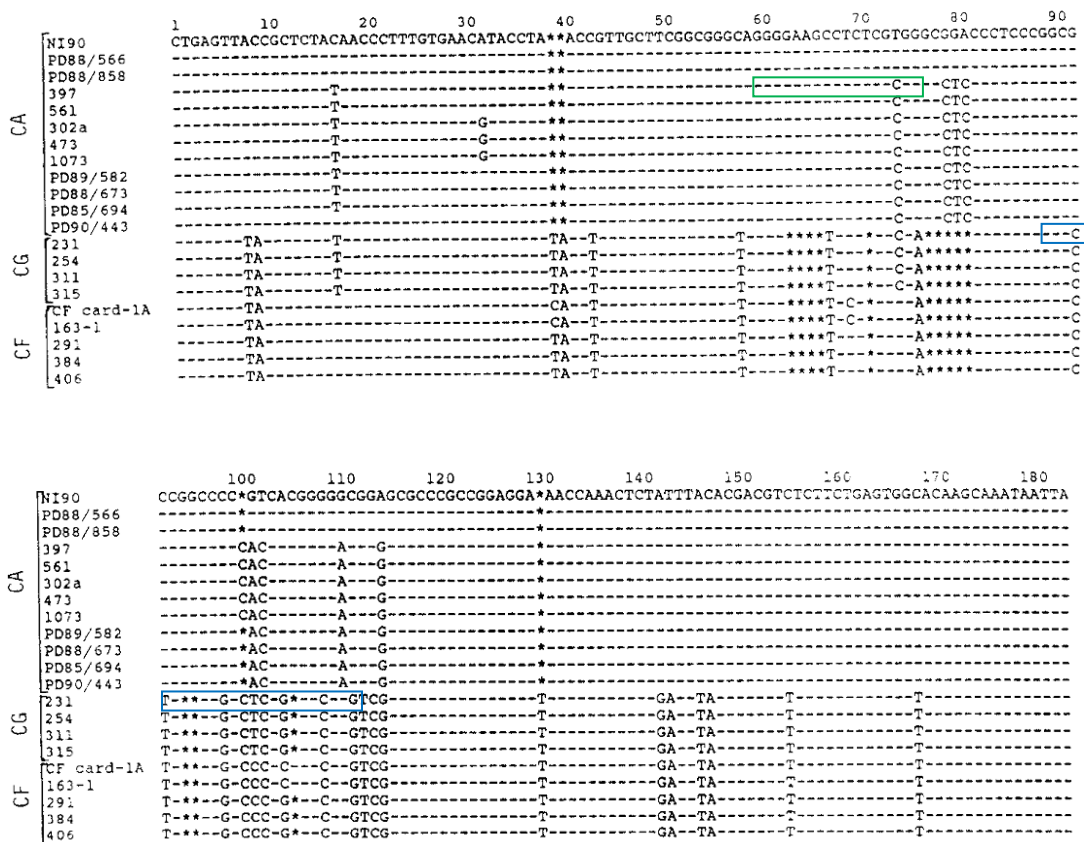


Figura 2: Secuencia de la región ITS1 de diferentes aislamientos de *C. acutatum* (CA), *C. gloeosporioides* (CG) y *C. fragariae* (CF). El Cebador CaInt2 se ubica entre el nucleótido 60 y 76 mientras que el cebador CgInt entre el nucleótido 89 y 112 (Modificado de Sreenivasaprasad et al., 1992).

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs).

El uso de enzimas de restricción ha sido ampliamente utilizado para la diferenciación entre individuos en todas las categorías taxonómicas. Estas enzimas cortan el genoma de cualquier organismo en pequeños fragmentos, llamados

fragmentos de restricción y con ellos se determinan patrones de bandas característicos, en inglés “Fingerprinting”, cuando son corridos por electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida (Watson et al. 2006).

También se utilizan éstas enzimas con secuencias cortas como por ejemplo la región ITS del ADNr amplificada con los cebadores universales ITS1 e ITS4. En el caso de *Colletotrichum*, el producto de la digestión de dicho fragmento con las enzimas *HaeIII* y *RsaI*, ha mostrado diferencias en los patrones de restricción, dando lugar a dos grupos correspondientes a las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Sreenivasaprasad et al. 1992; Álvarez et al., 2004).

Análisis de secuencias

La secuenciación de diferentes genes es utilizada para la identificación de especies de *Colletotrichum*. Dado que las diferencias entre especies no se detectan cuando se analiza un solo gen, en los últimos años se ha utilizado la secuenciación de varios genes simultáneamente para identificar las especies de este género. Recientemente se revisó exhaustivamente la taxonomía de los complejos de especies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, combinado nueve genes en un análisis multi-génico (Damm et al., 2012a, 2012b; Weir et al., 2012). Dentro de los complejos se identificaron nuevas especies y otras fueron incluidas en el taxón correspondiente, enfatizando los sinónimos.

Actualmente la mayoría de los investigadores proponen que la mejor estrategia para el estudio sistemático de *Colletotrichum* son las filogenias multi-génicas (Cannon et al, 2012; Damm et al., 2012b).

Hoy en día las regiones génicas más analizadas son la región ITS y los genes que codifican para las proteínas β - tubulina (TUB), Actina (ACT), Calmodulina (CAL), Histona 3 (HIS3), ADN liasa (APN2) y las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), glutamina sintetasa (GS), Quitina sintetasa1 (CHS-1) y Superóxido dismutasa de magnesio (SOD2) (Cai et al., 2009; Crouch et al., 2009b; Hyde et al., 2009a; Prihastuti et al., 2009; Damm et al., 2012a y b; Weir et al., 2012). Una vez obtenida la secuencia, la identificación de la especie se puede realizar mediante la comparación de la misma con bases de datos o utilizando análisis filogenéticos.

La base de datos más conocida es el GenBank (web: <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En esta base hay depositadas grandes cantidades de secuencias de prácticamente todas las especies de patógenos conocidas. La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas, nos permite rápidamente identificar a qué especie pertenece. Muchas de las secuencias depositadas en el GenBank cuentan con una publicación asociada de investigadores reconocidos, lo que da seguridad sobre los datos contra los cuales comparar. Sin embargo esto no siempre ocurre, en dichos casos la identificación es menos segura debido a que en ocasiones las secuencias depositadas pueden no haber sido correctamente identificadas (Cai et al. 2009).

La otra forma de identificación es mediante el análisis filogenético. Esta forma de identificación de las especies, se basa únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva entre las distintas especies. En el caso *Colletotrichum* y sobre todo en los últimos años, el análisis filogenético ha sido el método elegido, particularmente los que incluyen información de varias regiones génicas o también llamados análisis multi-génicos. En estos análisis se agrupa la información brindada por varios genes y se analizan en forma conjunta por los métodos, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana. (Than et al. 2008; Damm et al. 2012a y b; Weir et al 2012).

1.3 OBJETIVO

Identificar las especies del género *Colletotrichum* causantes de la podredumbre amarga del manzano en Uruguay mediante estudios moleculares y fenotípicos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Aislados utilizados

Se partió de una colección de 41 aislados monospóricos de *Colletotrichum* sp. pertenecientes a la colección de microorganismos del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía. Las cepas se encontraban almacenadas a -20 °C en papel de filtro colonizado y deshidratado con sílica-gel según Peever et al. (1999).

Los aislados fueron obtenidos a partir de frutos de manzana con síntomas típicos de podredumbre amarga. La colecta de frutos se realizó durante la temporada de producción del año 2010, de montes comerciales de manzana de diversas variedades localizados en las diferentes zonas de producción de este cultivo en el sur del país (Damasco, 2011). En la Tabla 1 se muestra información de los 41 aislados analizados.

En todos los análisis se incluyó una cepa de *Colletotrichum* proveniente de citrus, identificada como *C. gloeosporioides*. Este aislamiento fue cedido por el grupo de investigación de Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

Tabla 1. Colección de aislados de *Colletotrichum* spp. de manzana uruguayos utilizados en este estudio.

Aislado	Año de colecta	Región geográfica		Variedad
		Localidad	Departamento	
C1	2010	Rincón de Melilla	Montevideo	Cripps Pink
C2	2010	Rincón de Melilla	Montevideo	Cripps Pink
C3	2010	Rincón de Melilla	Montevideo	Cripps Pink
C4	2010	Rincón de Melilla	Montevideo	Cripps Pink
C5	2010	Melilla	Montevideo	Oregon spur
C6	2010	Melilla	Montevideo	Oregon spur
C7	2010	Melilla	Montevideo	Oregon spur
C8	2010	Melilla	Montevideo	Oregon spur
C9	2010	Juanicó	Canelones	Granny Smith
C10	2010	Juanicó	Canelones	Granny Smith
C11	2010	Juanicó	Canelones	Granny Smith
C12	2010	Juanicó	Canelones	Granny Smith
C13	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C14	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C15	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C16	2010	Juanicó	Canelones	Granny Smith
C17	2010	Juanicó	Canelones	Granny Smith
C18	2010	Juanicó	Canelones	Early red one

(Continúa en la página siguiente)

(Continúa de la página anterior)

C19	2010	Progreso	Canelones	Cripps Pink
C20	2010	Progreso	Canelones	Cripps pink
C21	2010	Progreso	Canelones	Cripps Pink
C22	2010	Progreso	Canelones	Cripps Pink
C23	2010	Progreso	Canelones	Granny Smith
C24	2010	Melilla	Montevideo	Granny Smith
C25	2010	Melilla	Montevideo	Granny Smith
C26	2010	Melilla	Montevideo	Granny smith
C27	2010	Melilla	Montevideo	Granny Smith
C28	2010	Las Violetas	Canelones	Red Delicious
C29	2010	Las Violetas	Canelones	Cripps Pink
C30	2010	Las Violetas	Canelones	Cripps Pink
C31	2010	Las Violetas	Canelones	Cripps Pink
C32	2010	Progreso	Canelones	Granny Smith
C33	2010	Progreso	Canelones	Granny Smith
C35	2010	Progreso	Canelones	Granny Smith
C36	2010	Progreso	Canelones	Granny Smith
C37	2010	Progreso	Canelones	Granny Smith
C38	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C39	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C40	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C41	2010	Progreso	Canelones	Fuji
C42	2010	Progreso	Canelones	Fuji

2.2 Identificación molecular

Extracción de ADN

A partir de cada aislado monospórico crecido en placas con PDA durante 5 a 7 días a 25°C en oscuridad, se realizó la extracción de ADN de micelio y esporas según el siguiente el protocolo de extracción:

1. Retirar micelio y esporas con una espátula estéril y colocarlo en microtubo de 1.5 mL. Agregar 200µl de buffer de lisis (200mM Tris HCl pH 7.5; 250mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA+NaOH al 10%).
2. Llevar al freezer por al menos 2 horas.
3. Macerar micelio y agregar otros 200µl de buffer de lisis. Mezclar mediante agitación en vórtex por 10 segundos y llevar a baño a 65°C por 30 minutos
4. Agregar 300µl de NaCl 1M+0.1v/v Twing. Invertir tubo suavemente para homogeneizar.
5. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
6. Transferir sobrenadante a nuevo tubo.
7. Agregar 1 volumen de isopropanol a -20°C. Mezclar y colocar en freezer por al menos 30 minutos.
8. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos. Volcar sobrenadante.
9. Agregar 200µl de etanol 70% a -20°C y centrifugar por 2 minutos a 10.000rpm a 4°C.
10. Volcar Sobrenadante.

11. Secar pellet por lo menos 2 horas (temperatura ambiente) o en estufa a 50°C hasta que se evapore totalmente el alcohol.
12. Re-suspender el pellet en 50µl de TE, llevar a baño a 65°C por 15 minutos.
13. Almacenar ADN obtenido en microtubos en freezer a -20°C.

Amplificación con cebadores especie específicos

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el ADN de todos los aislados utilizando los cebadores especie específicos CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') (Mills et al., 1992) y CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3') (Sreenivasaprasad et al., 1996) que en combinación con el cebador universal ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) amplifican específicamente las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* respectivamente. En los casos en que no ocurrió amplificación o se observaron bandas inespecíficas, la PCR se repitió hasta tres veces.

La mezcla de reacción contenía 1X de tampón (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTPs, 0,4 µM de cada uno de los cebadores (SBS Genetech Co. Ltd., China), 1U de U-Taq ADN polimerasa (SBS Genetech Co. Ltd., China) y 1 µl de la solución de ADN. La mezcla se completó con agua ultrapura (MilliQ) (EASYpure™ LF, BARNSTEAD THERMOLYNE CORPORATION) a un volumen final de 20 µL. Las amplificaciones se efectuaron utilizando un termociclador MultiGene™ Mini (Labnet Internacional Inc., Estados Unidos) en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 5:00 min,

seguido por 34 ciclos compuestos por desnaturalización a 94°C por 0:45 min, hibridación a 55°C por 0:30 min y 0:45 min de extensión a 72°C. El paso final fue 72°C por 10 min para completar las extensiones.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (AMRESCO[®], Estados Unidos) al 1,5% en tampón TBE 0,5X (TBE 1X = tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH=8,0). Se incluyó marcador de peso molecular constituido por un mezcla de bandas de ADN de 100 pb de diferencia (Gene Ruler[™] 1kb DNA Ladder Plus, Fermentas, Alemania). Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron en solución acuosa con GelRed[™] (Biotium, Estados Unidos) (5 µL GelRed, 2 mL NaCl 0,1 M y 48mL de agua) durante al menos 30 minutos y se expusieron a luz UV en transiluminador (DyNA Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., Estados Unidos). Los geles se fotografiaron con un sistema de foto documentación DigiDoc-It[™] (Ultra-Violet Products Ltd., Reino Unido).

Amplificación de la región ITS

Se amplificó parte de la región ITS que comprende las secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 y el gen 5,8S que codifica para el ARNr, con los cebadores universales ITS1 (5-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3) e ITS4 (White et al., 1990). La mezcla de reacción contenía 1X de tampón (50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTPs, 0,4µM de cada uno de los cebadores (SBS Genetech Co. Ltd., China), 1U de U-

Taq ADN polimerasa (SBS Genetech Co. Ltd., China) y 1µl de la solución de ADN. La mezcla se ajustó con agua MilliQ a un volumen final de 40 µL. Las amplificaciones se efectuaron en el termociclador indicado anteriormente y en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido por 34 ciclos compuestos por desnaturalización a 94°C por 0,30 min, hibridación a 55°C por 0,30 min y 0,45 min de extensión a 72°C. El paso final fue 72°C por 10 min para completar las extensiones. Los productos de la amplificación se visualizaron según protocolo descrito anteriormente.

Análisis filogenético

Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados (forward) en Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal W (Larkin et al., 2007) incluido dentro del programa MEGA5.1 (Tamura et al., 2011). Posteriormente fueron editadas utilizando como apoyo los cromatogramas. En el alineamiento se incluyeron secuencias similares o filogenéticamente relacionadas (incluyendo los extype), pertenecientes a los complejos de especies de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* obtenidas de GenBank. Posteriormente se realizó el análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA 5.1. En la reconstrucción filogenética los espacios resultantes del alineamiento fueron tratados como datos faltantes. Todos los caracteres fueron tratados sin importar el orden y con igual peso. El soporte de los nodos de los árboles más parsimoniosos se obtuvo mediante 1000 réplicas de “bootstrap”.

2.3 Identificación fenotípica

Aspecto y coloración de las colonias

Luego de 7 días de crecimiento en medio PDA a 25°C y en oscuridad, se registró en todos los aislados las siguientes características: forma y coloración de las colonias, presencia de zonaciones (mutación con cambio de color) y aspecto del micelio.

Forma y tamaño de los conidios

Todos los aislados se hicieron crecer en PDA a 25°C con 12 horas de foto-período con luz ultravioleta cercana (T8 BLB de 220V) y luz fluorescente (LUZ DO DIA, OSRAM UNIVERSAL 20W, k8a8 C.6, Brasil) para favorecer su esporulación. En cada aislado se observaron bajo microscopio 50 conidios y se registró forma y tamaño (largo y ancho) de cada uno utilizando una cámara digital (Dino-Eye, Taiwan) con el programa DinoCapture 2.0. En el caso de la forma se consideraron tres clasificaciones, fusiforme (ambos extremos en punta), mixta (un extremo en punta y el otro redondeado) y obtusa (ambos extremos redondeados).

Efecto de la temperatura en el crecimiento radial de las colonias

De cada aislado se sembraron discos de agar con micelio en activo crecimiento (5 mm de diámetro) en el centro de placas conteniendo medio PDA. Se realizaron

tres repeticiones por aislado y las temperaturas evaluadas fueron 15, 20, 25 y 30 °C. El tiempo de incubación en todos los casos fue de 5 días y en oscuridad. Posteriormente se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro de las colonias, utilizando un calibre electrónico digital (KAMASA profesional KM-447). Con estos datos se calculó el radio de crecimiento diario de cada aislado en mm.día^{-1} . El experimento se efectuó dos veces.

Efecto del benomil en el crecimiento radial de las colonias

De cada aislado se sembraron discos de agar con micelio en activo crecimiento (5 mm de diámetro) en el centro de placas conteniendo medio PDA y PDA adicionado con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ o 10 mg.L^{-1} del principio activo del fungicida benomil (Benomyl 50, polvo mojable, SAUDU). Se realizaron tres repeticiones por aislado. Todas las placas se incubaron a 25°C en oscuridad. Transcurridos 5 días se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro de las colonias utilizando el calibre electrónico digital. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control (sin adición de fungicida). El experimento se efectuó dos veces.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los estudios fenotípicos se analizaron estadísticamente mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa PAST versión 2.16 (Hammer, 2012). Se incluyeron en este análisis las variables

continuas: cociente largo/ancho de los conidios, porcentaje de conidios obtusos, fusiformes y mixtos, promedio del crecimiento diario de las colonias en mm/día a las temperaturas de 15, 20, 25 y 30°C y porcentaje de crecimiento de la colonia en PDA enmendado con 0,5 mg.L⁻¹ y 10 mg.L⁻¹ de benomil (ver ANEXO).

Dado que las variables tienen magnitudes diferentes (porcentajes, micras y milímetros), el análisis se efectuó utilizando una matriz de correlaciones o varianza-covarianza normalizadas; esto implica la normalización de todas las variables mediante la división por sus desviaciones estándar (Hammer 2012). Asimismo, previo al análisis se procedió a diferenciar los aislados por especie según la identificación obtenida con el análisis filogenético.

En el caso de los datos de crecimiento de las colonias a diferentes temperaturas y sensibilidad a benomil primero se efectuó un análisis de varianza utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA) para determinar si se podían combinar los datos entre los dos experimentos realizados. El análisis indicó que para ambos experimentos no existían diferencias significativas entre experimentos ($P \geq 0,05$) por lo que el promedio de los datos fueron utilizados para el ACP.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación molecular

Amplificación con cebadores especie-específicos

El par de cebadores CgInt/ITS4 amplificaron un fragmento de ADN en torno a 460 pb en 35 de los aislados uruguayos y el aislado *C. gloeosporioides* proveniente de citrus; mientras que el par de cebadores CaInt2/ITS4 generó una banda de aproximadamente 490 pb en dos de los aislados uruguayos. Los aislados que fueron amplificados con el par de cebadores específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt/ITS4), no fueron amplificados con el par de cebadores específicos para *C. acutatum* (CaInt2/ITS4) y viceversa. En los restantes 4 aislados no se obtuvieron bandas, fueron inespecíficas y/o inconsistentes (Figura 3). En la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos.

Amplificación de la región ITS

Todos los aislados de *Colletotrichum* uruguayos así como el aislado de citrus identificado como *C. gloeosporioides*, fueron amplificados con los cebadores ITS1/ITS4. En todos los casos se generaron fragmentos de ADN de aproximadamente 560pb.

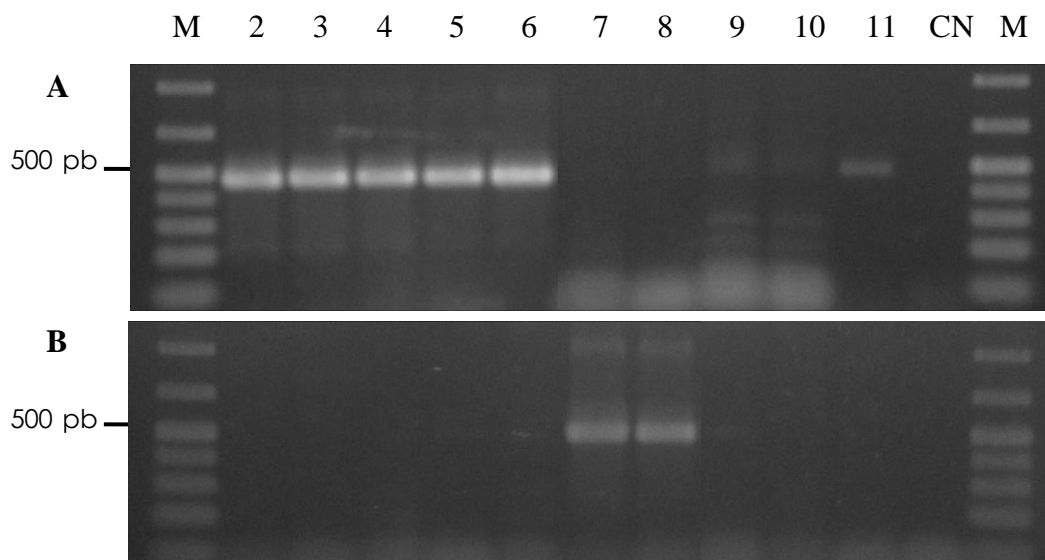


Figura 3. Productos de PCR amplificados con cebadores específicos A) para *C. gloeosporioides* CgInt/ITS4 y B) para *C. acutatum* CaInt2/ITS4. Carriles M: Marcador de peso molecular, carril 2 aislado de citrus previamente identificado como *C. gloeosporioides*, carriles 3 a 11 aislados de *Colletotrichum* spp. uruguayos (C5, C10, C28, C40, C11, C18, C15, C21 y C25 respectivamente) y carril CN: control negativo.

Análisis filogenético

El alineamiento editado con las secuencias de los aislados de manzana, de citrus y las secuencias obtenidas del GenBank de la región ITS, presentó un total de 505 caracteres de los cuales 7 fueron variables no informativos, 53 parsimoniosamente informativos y 445 constantes. El análisis filogenético por Máxima Parsimonia generó un total de 7 árboles más parsimoniosos y uno de ellos se muestra en la Figura 4.

Tabla 2. Resultado de la identificación molecular de los aislados de *Colletotrichum* utilizando cebadores específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt/ITS4) y *C. acutatum* (CaInt2/ITS4) y análisis filogenético de la región ITS del ADNr.

Aislado	PCR con cebadores específicos		Análisis filogenéticos de la región ITS
	<i>C. gloeosporioides</i> (CgInt/ITS4)	<i>C. acutatum</i> (CaInt2/ITS4)	
C1	+	-	<i>C. fructicola</i>
C2	+	-	<i>C. fructicola</i>
C3	+	-	<i>C. fructicola</i>
C4	+	-	<i>C. fructicola</i>
C5	+	-	<i>C. fructicola</i>
C6	+	-	<i>C. fructicola</i>
C7	+	-	<i>C. fructicola</i>
C8	+	-	<i>C. fructicola</i>
C9	+	-	<i>C. fructicola</i>
C10	+	-	<i>C. fructicola</i>
C11	-	+	<i>Colletotrichum</i> sp.
C12	+	-	<i>C. theobromicola</i>
C13	+	-	<i>C. fructicola</i>
C14	+	-	<i>C. fructicola</i>
C15	*	-	<i>C. theobromicola</i>
C16	+	-	<i>C. fructicola</i>
C17	+	-	<i>C. fructicola</i>
C18	-	+	<i>Colletotrichum</i> sp.

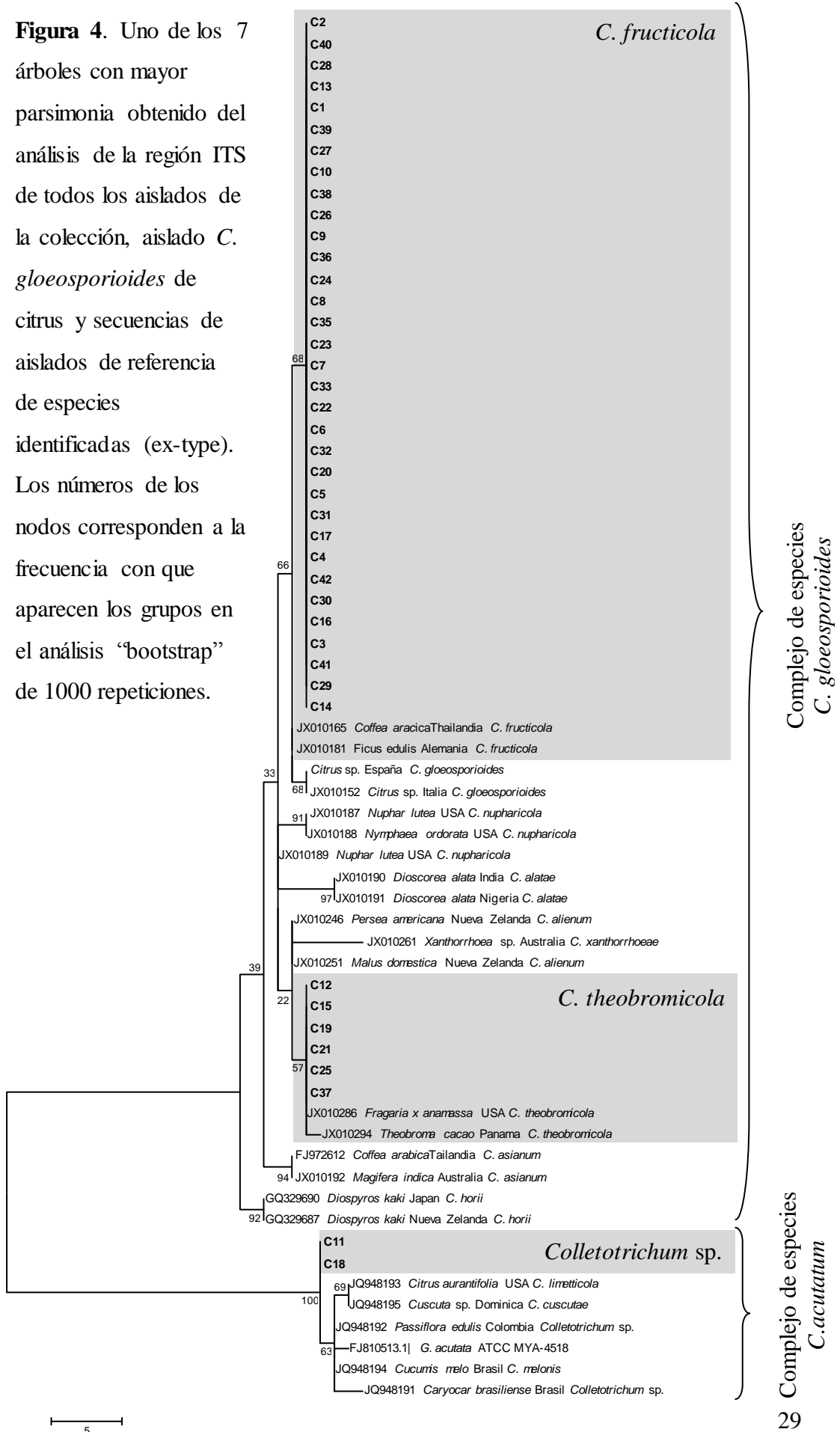
(Continúa en la página siguiente)

(Continúa de la página anterior)

C19	*	-	<i>C. theobromicola</i>
C20	+	-	<i>C. fructicola</i>
C21	*	-	<i>C. theobromicola</i>
C22	+	-	<i>C. fructicola</i>
C23	+	-	<i>C. fructicola</i>
C24	+	-	<i>C. fructicola</i>
C25	+	-	<i>C. theobromicola</i>
C26	+	-	<i>C. fructicola</i>
C27	+	-	<i>C. fructicola</i>
C28	+	-	<i>C. fructicola</i>
C29	+	-	<i>C. fructicola</i>
C30	+	-	<i>C. fructicola</i>
C31	+	-	<i>C. fructicola</i>
C32	+	-	<i>C. fructicola</i>
C33	+	-	<i>C. fructicola</i>
C35	+	-	<i>C. fructicola</i>
C36	+	-	<i>C. fructicola</i>
C37	-	-	<i>C. theobromicola</i>
C38	+	-	<i>C. fructicola</i>
C39	+	-	<i>C. fructicola</i>
C40	+	-	<i>C. fructicola</i>
C41	+	-	<i>C. fructicola</i>
C42	+	-	<i>C. fructicola</i>
España	+	-	<i>C. gloeosporioides</i>

+ amplificación, - no amplificación, * banda inespecífica y/o no reproducible

Figura 4. Uno de los 7 árboles con mayor parsimonia obtenido del análisis de la región ITS de todos los aislados de la colección, aislado *C. gloeosporioides* de citrus y secuencias de aislados de referencia de especies identificadas (ex-type). Los números de los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis “bootstrap” de 1000 repeticiones.



El árbol presentó dos clados principales. Uno de ellos está constituido por especies pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides* y donde se ubican la mayor parte de los aislados uruguayos. En este clado 33 de los aislados de manzana, que además presentan igual secuencia entre sí, se agruparon con las secuencias de aislados de *C. fructicola*, quedando identificados como pertenecientes a esta especie. Asimismo, otros seis aislados uruguayos que quedaron incluidos en este clado principal, se agrupan con las secuencias de los aislados de *C. theobromicola* en otro sub-clado, por lo que se definen como *C.theobromicola*. Tanto el aislado de citrus como la secuencia obtenida del GenBank perteneciente a un aislado de la especie *C. gloeosporioides*, se agrupan juntos y se ubican muy próximo a las secuencias de *C. fructicola* pero en otro sub-clado. Los valores de soporte de los nodos que definen estas dos especies fueron menores a 70%.

El otro clado principal agrupa especies pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum* y los restantes dos aislados uruguayos. Estos dos aislados, que presentan igual secuencia, quedaron separados del resto de las secuencias, por lo que no pueden ser identificados a nivel de especie. El resultado obtenido con el análisis filogenético se muestra en la Tabla 2.

3.2 Identificación fenotípica

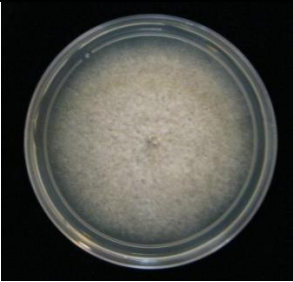
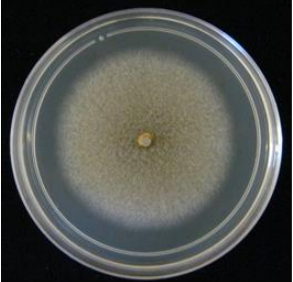


Aspecto y coloración de colonias

Los aislados se agruparon en 5 categorías de acuerdo al color de la colonia, tipo de borde, aspecto del micelio y presencia de zonación (Tabla 3). El color y aspecto de todas las colonias crecidas en PDA fue blanco a gris oscuro, con tonalidades verdosas y/o salmón. En cuanto a la densidad del micelio 10 aislados presentaron micelio ralo y el resto algodonoso. Estos 10 aislados pertenecen al grupo 2 y 3 ambos del complejo de especies *C. gloeosporioides*. Respecto a la forma de las colonias, en su mayoría (35) presentaron borde entero con simetría homogénea excepto los restantes 6 aislados que presentaron zonaciones generalmente de color gris oscuro y con densidad de micelio más o menos intensa que el resto de la colonia. Estos 6 aislados son los que integran el grupo 4 e identificados como *C. theobromicola*, especie perteneciente al complejo de especies *C. gloeosporioides*.

Forma y tamaño de los conidios

De los 41 aislados sólo los 2 pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum*, presentaron predominancia de conidios fusiformes ($41,5 \% \pm 2$), con un tamaño promedio de $15,1 (\pm 0,7) \mu\text{m}$ de largo y $4,95 (\pm 0,1) \mu\text{m}$ de ancho. Los 33 aislados identificados molecularmente como *C. fructicola* presentaron mayoritariamente conidios obtusos ($77 \% \pm 13$), con un tamaño promedio de $15,4 (\pm 2,5) \mu\text{m}$ de largo y $5,2 (\pm 0,9) \mu\text{m}$ de ancho. Finalmente los restantes 6 aislados, definidos molecularmente como *C. theobromicola*, tuvieron una mayor frecuencia de conidios mixtos ($58 \% \pm 11$), con tamaño promedio de $17,8 (\pm 3,0) \mu\text{m}$ de largo y $5,1 (\pm 0,7) \mu\text{m}$ de ancho (ANEXO). La figura 5 muestra los conidios típicos de los dos complejos de especies.

Tabla 3. Agrupación de los aislados en función de la coloración de las colonias, aspecto del micelio y presencia de zonación. Grupos 1 a 4 pertenecen al complejo de especies *C. gloeosporioides* y grupo 5 al complejo de especies *C. acutatum*.

Grupo	Aislados	Características	Colonia tipo
1	1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 – 10 – 13 – 16 – 17 – 20 – 22 – 23 – 24 – 30 – 31 – 32 – 35 – 40 – 41 – 42	Colonia blanca - gris claro, borde entero, micelio algodonoso.	
2	26 – 27 – 28 – 29 - 33 – 36 – 38 – 39	Colonia blanca - gris oscuro, borde entero, micelio raro.	
3	14 y aislado de citrus España	Colonia gris claro – naranja, borde entero, micelio raro	
4	12 – 15 – 19 – 21 – 25 – 37	Colonia blanca - gris claro a gris oscuro, borde entero, micelio algodonoso, presencia de zonación generalmente gris oscuro	

(Continúa en la página siguiente)

(Continúa de la página anterior)

5	11 – 18	Colonia blanca - naranja, borde entero, micelio algodonoso.
---	---------	---



La ubicación de los grupos en los dos complejos de especies de *Colletotrichum*, se definió de acuerdo al resultado del análisis molecular.

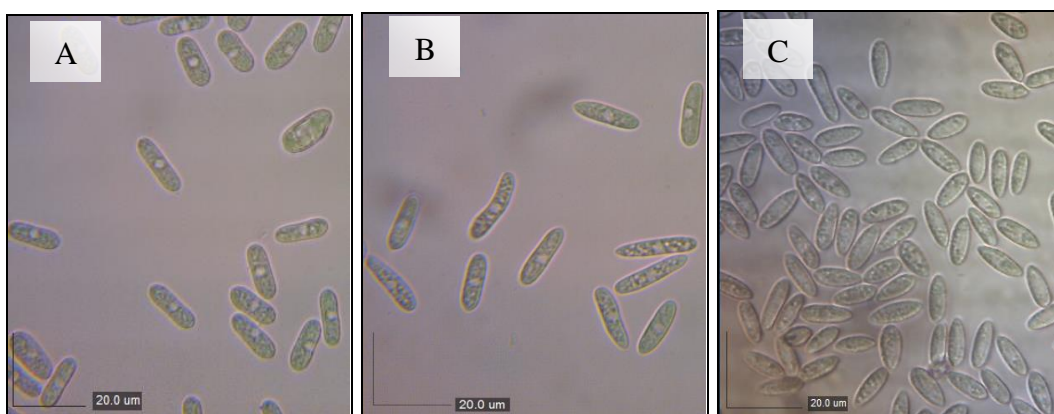


Figura 5. Aspecto de los conidios provenientes de colonias luego de seis días de crecimiento en medio de cultivo PDA. A) y B) Aislados C26 Y C12 identificados como *Colletotrichum fructicola* y *C. theobromicola* respectivamente, ambos pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides*. C) Aislado C18 perteneciente al complejo de especies *C. acutatum* y no identificado a nivel de especie.

Efecto de la temperatura en el crecimiento radial de las colonias

Los 41 aislados crecieron a todas las temperaturas ensayadas. La temperatura óptima de crecimiento se ubicó en torno a 25°C. Se observaron diferencias en la

tasa de crecimiento de los aislados. Los aislados pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum* tuvieron una tasa de crecimiento notoriamente inferior que aquellos pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides* a todas las temperaturas evaluadas (Figura 6 y ANEXO). A modo de ejemplo: a la temperatura de 25 °C los primeros crecen 3,27-3,93 mm.día⁻¹ mientras que los segundos lo hacen a una tasa de 5,06 -7,14 mm.día⁻¹.

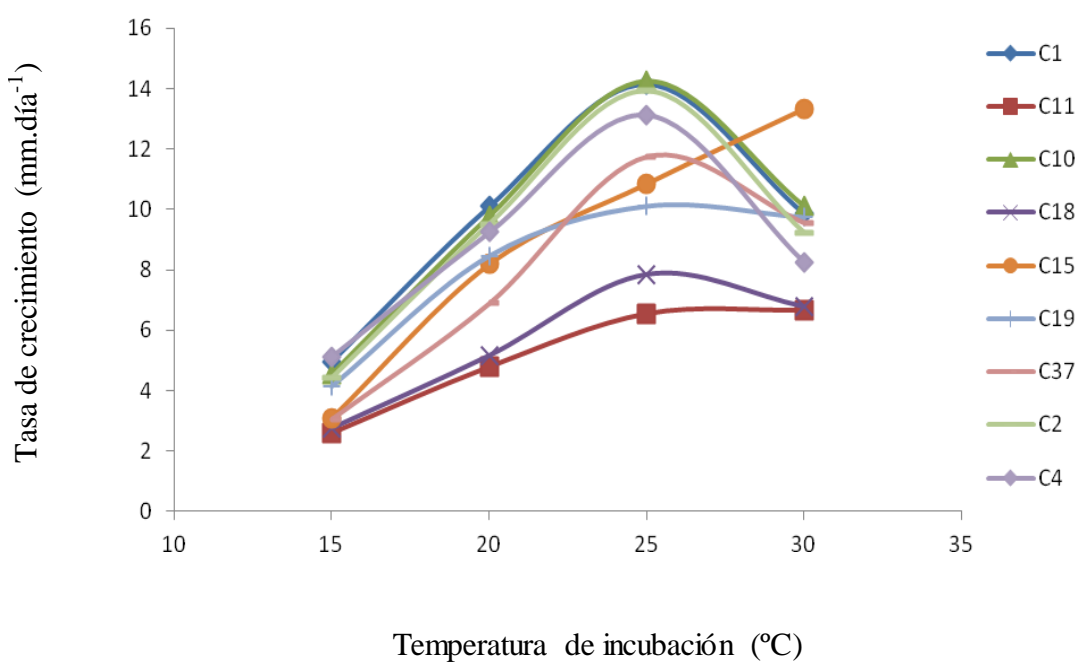


Figura 6. Tasa de crecimiento diario de las colonias (mm.día⁻¹) en medio PDA a las temperaturas de 15, 20, 25 y 30°C de 9 aislados: C1, C2, C4, C10, C15, C19 y C37 pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides* y C11 y C18 pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum*

Efecto del benomil en el crecimiento radial de las colonias

La adición de benomil al medio de cultivo provocó una reducción del crecimiento en todos los aislados de entre el 50 y el 100 % en las concentraciones ensayadas. Los aislados pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides* fueron fuertemente inhibidos, en algunos casos hasta en un 100% a la concentración mayor de benomil (10 mg.L^{-1}) y en torno al 85% a la concentración menor de benomil (5 mg.L^{-1}). Por otra parte, los dos aislados pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum* experimentaron una menor disminución del crecimiento, en torno al 60% para la concentración mayor de benomil (10 mg.L^{-1}) y de aproximadamente 40% para la concentración menor de benomil (5 mg.L^{-1}) (Figura 7 y ANEXO).

Análisis estadístico

Del Análisis de Componentes Principales de los caracteres fenotípicos, se seleccionaron los componentes 1 y 2 que en conjunto explicaron el 74.9 % de la varianza (55,198% y 19,727% respectivamente). La figura 8 muestra la ubicación de los aislados en el plano según los componentes 1 y 2. Los aislados forman dos agrupamientos bien diferenciados. Uno de ellos engloba a la mayor parte de los aislados estudiados y al aislado *C. gloeosporioides* de citrus, todos pertenecientes al complejo de especie *C. gloeosporioides*. El otro grupo incluye a los dos restantes aislados ambos pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum*.

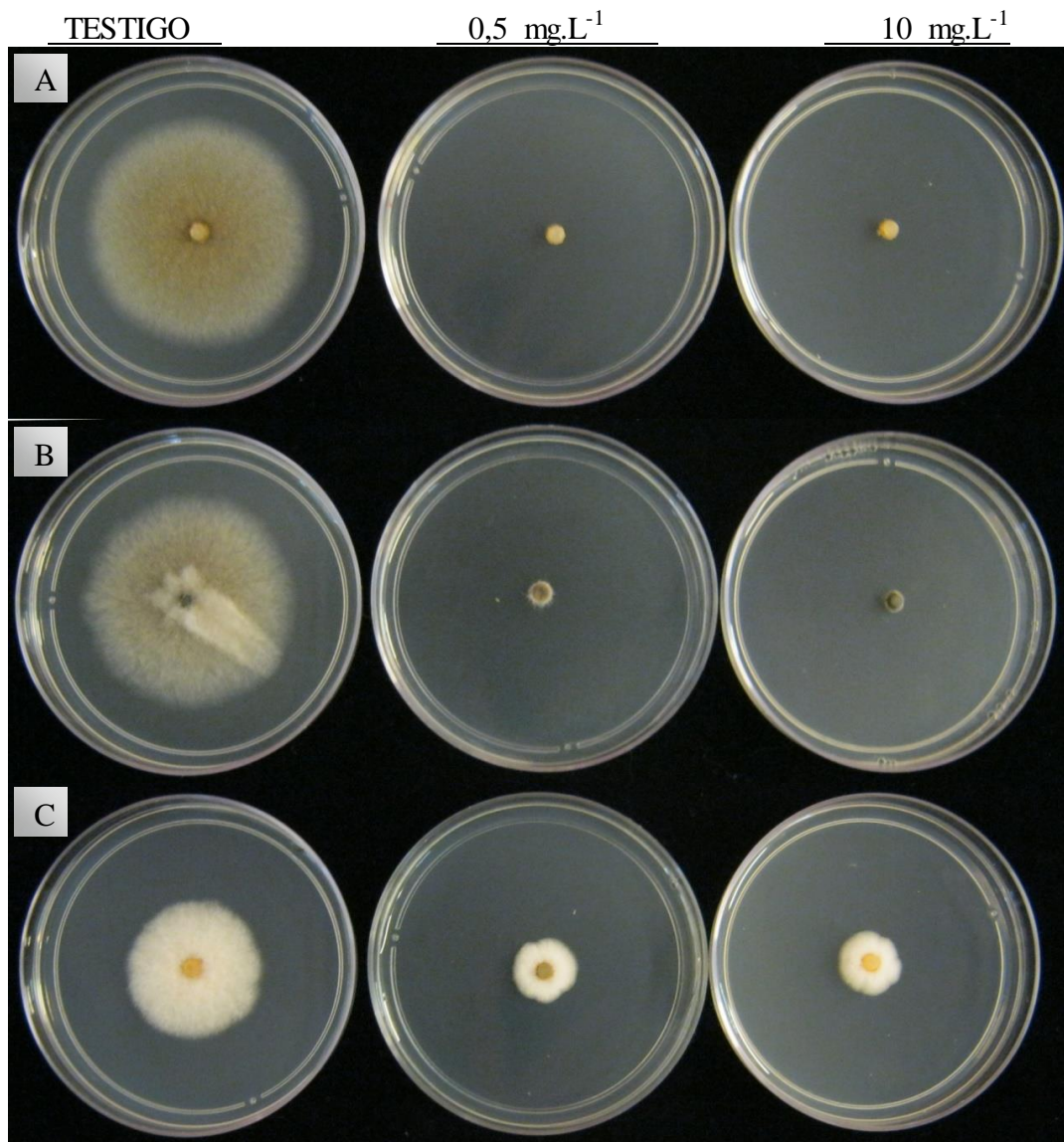


Figura 7. Aspecto de las colonias luego de 5 días de crecimiento en medio PDA enmendado con 0 (testigo), 0,5 y 10 mg.L⁻¹ de benomil. A) y B) Aislados C29 y C21 identificados como *Colletotrichum fructicola* y *C. theobromicola* respectivamente, ambos pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides*. C) Aislado C11 perteneciente al complejo de especies *C. acutatum* y no identificado a nivel de especie.

Las variables que contribuyen en mayor medida al total de la varianza dentro del componente 1 fueron: porcentaje de conidios fusiformes y obtusos, tasa de crecimiento diario a las temperaturas de 20°C y 25°C y porcentaje de inhibición de las colonias crecidas en PDA enmendado con benomil a 0,5 o 10mg.L⁻¹ respecto al control (sin fungicida). Mientras que para el componente 2 fueron: cociente largo/ancho de los conidios, porcentaje de conidios mixtos y en menor medida el porcentaje de conidios obtusos (Figura 9).

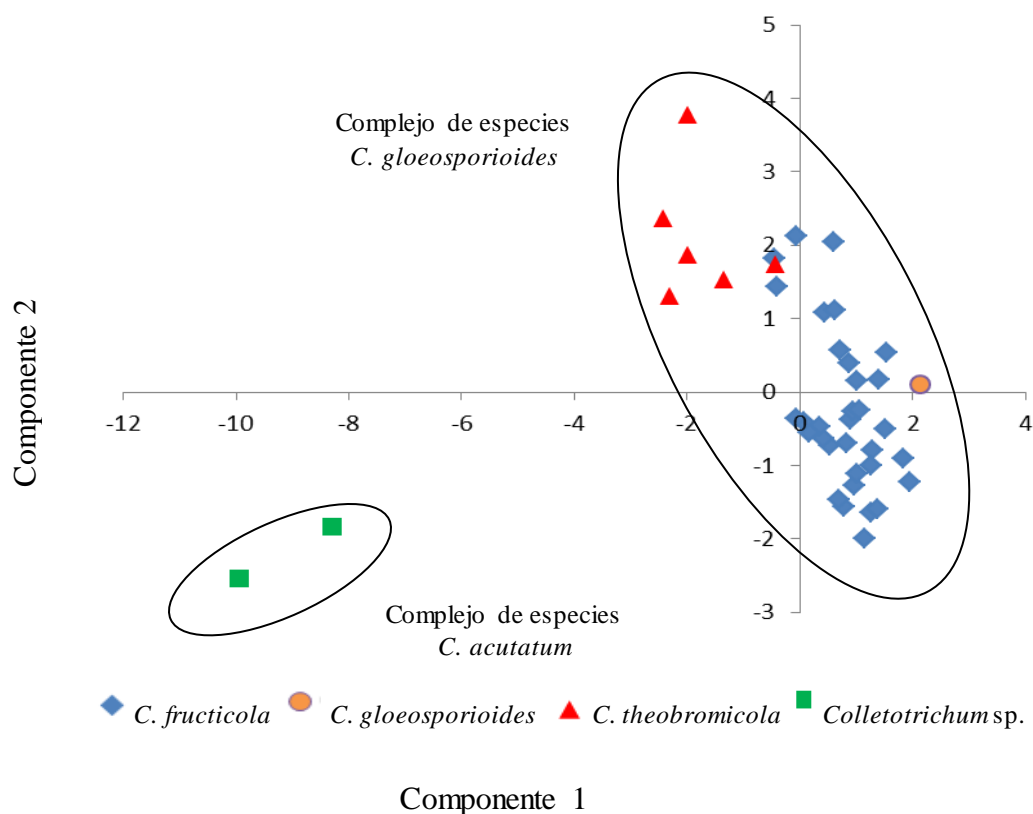


Figura 8. Representación gráfica de los aislados de *Colletotrichum* según los componentes 1 y 2 extraídos del análisis de Componentes Principales.

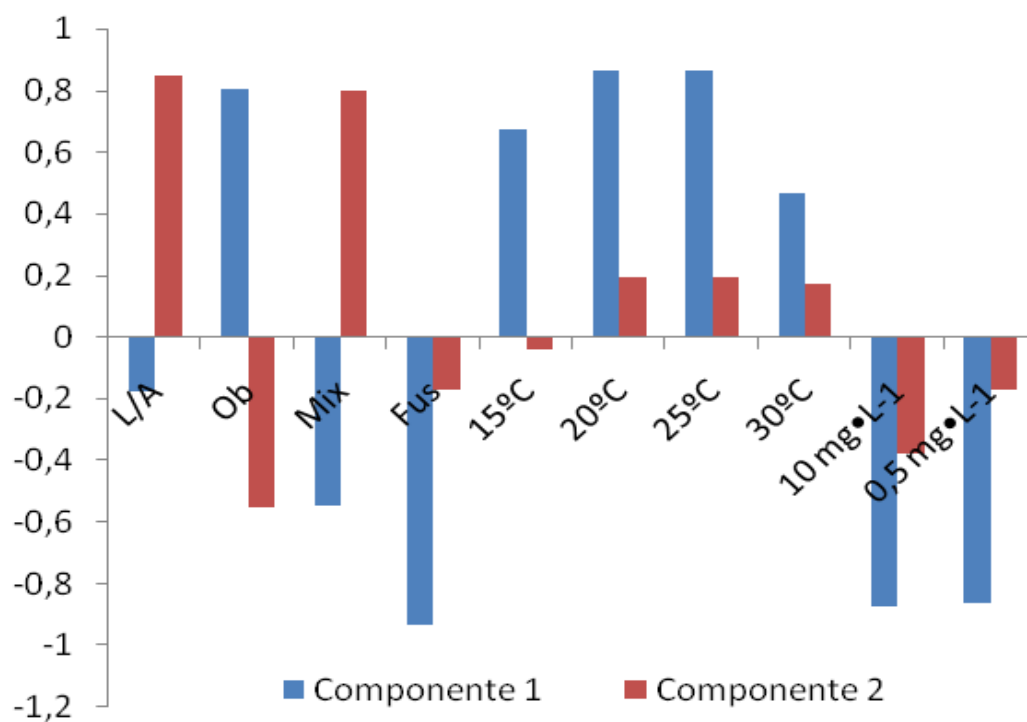


Figura 9. Aporte de cada variable a los componentes 1 y 2 extraídos del análisis de Componentes Principales. L/A: cociente largo/ancho de conidios; Ob: porcentaje de conidios obusos; Mix: porcentaje de conidios mixtos; Fus: porcentaje de conidios fusiformes; 15 °C, 20 °C, 25 °C y 30 °C: tasa de crecimiento a las temperaturas indicadas y 0,5 mg.L⁻¹ y 10 mg.L⁻¹ porcentaje de crecimiento en PDA enmendado con benomil a dichas concentraciones.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizaron mediante análisis moleculares y fenotípicos, una colección de 41 aislados de *Colletotrichum* obtenidos de frutos de manzano con síntomas típicos de podredumbre amarga en Uruguay. A partir de los análisis moleculares se identificaron dos especies de *Colletotrichum* asociadas a la podredumbre amarga del manzano en nuestro país *C. fructicola* y *C. theobromicola*, mientras que dos aislados no pudieron ser identificados a nivel de especie.

La especie predominante fue *C. fructicola* representada por 33 aislados (80%), mientras que la segunda especie en importancia fue *C. theobromicola* con 6 aislados (15%). Estas dos especies pertenecen al complejo de especies *C. gloeosporioides* (Cai et al. 2009; Weir et al. 2012). Finalmente los dos aislados (5%) que no pudieron ser identificados a nivel de especie, se definieron como pertenecientes al complejo de especies *C. acutatum* (Cannon et al. 2012; Damm et al. 2012a). Sorprendentemente *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, especies tradicionalmente asociadas a esta enfermedad (Jones y Aldwinckle, 2002, Berstein et al., 1995, Jones et al., 1996 Sutton, 1992), no fueron detectadas entre las cepas de la colección.

Partiendo de la hipótesis de que en Uruguay, al igual que en otros países del mundo, la podredumbre amarga estaba siendo causada por *C. gloeosporioides* y/o *C. acutatum* (Sutton, 1992; Berstein et al., 1995; Jones et al., 1996; Jones y

Aldwinckle, 2002; González, et al., 2006), inicialmente se utilizaron cebadores especie-específicos de estas dos especies. Los pares de cebadores escogidos fueron CgInt/ITS4 (específico para *C. gloeosporioides*) y CaInt2/ITS4 (específico para *C. acutatum*) utilizados en numerosos trabajos anteriores, dónde se habían identificado con éxito estas especies del género *Colletotrichum* (Garrido et al., 2008; Hang et al., 2010; Silva-Rojas & Ávila-Quezada, 2011). En base a este análisis se concluyó que la mayoría de las cepas Uruguayas (35 aislados) pertenecían a la especie *C. gloeosporioides* al igual que el aislado Español previamente identificado como *C. gloeosporioides*, dos a la especie *C. acutatum* y cuatro muy probablemente correspondían a otra u otras especies debido a que no amplificaban con ninguno de los dos pares de cebadores o los amplicones que se producían eran inespecíficos o no reproducibles.

El análisis filogenético de las secuencias de la región ITS permitió dilucidar la identidad de todos los aislados a nivel de complejos de especies. Este análisis determinó que los cuatro aislados que no pudieron ser identificados con cebadores especie-específicos y dos de los aislados identificados inicialmente como *C. gloeosporioides*, corresponden a la especie *C. theobromicola*. Asimismo los restantes aislados previamente identificados como *C. gloeosporioides* pertenecen a la especie *C. fructicola*, ambas especies incluidas en el complejo de especies *C. gloeosporioides*. Finalmente los aislados identificados como *C. acutatum* (C11 y C18) si bien pertenecen a este complejo, no son *C. acutatum* y permanecen aún sin identificar a nivel de especie. Estos resultados ponen en evidencia la falta de especificidad de los cebadores CgInt/ITS4 y CaInt2/ITS4 ya que ambos

amplificaron, aunque dentro del mismo complejo, otras especies de este hongo. Recientemente otros investigadores han propuesto utilizar estos cebadores para identificar los complejos de especies de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Álvarez et al., 2014; Afanador-Kafuri et al., 2014). Sin embargo, en nuestro trabajo cuatro de los aislados pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides*, no fueron amplificados con los cebadores CgInt/ITS4, lo que pone en duda su utilidad para este fin.

El análisis filogenético de la región ITS permitió clarificar la identidad de la mayoría de los aislados, sin embargo será necesario analizar otros genes que permitan identificar a nivel de especie los aislados C11 y C18 y confirmar la identidad de los restantes aislados. El árbol generado con la secuencia de esta región génica, si bien agrupó correctamente las secuencias de aislados *C. fructicola* y *C. theobromicola*, el soporte de los nodos estuvo por debajo del valor establecido como crítico que es de 70% (Hillis and Bull, 1993). Varios investigadores afirman que es necesario utilizar análisis multigénicos para obtener una correcta identificación de las especies de *Colletotrichum* (Cannon, 2012). Para este género los segmentos génicos más utilizados son los que codifican para β -tubulina, Histona 3 y la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Than et al. 2008; Cai et al. 2009, Crouch et al. 2009b, Hyde et al. 2009b, Prihastuti et al. 2009, Damm et al. 2012a y b, Weir et al. 2012).

El estudio de las características fenotípicas permitió identificar los aislados a nivel de complejos de especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La mayoría de los

aislados (39) presentaban colonias predominantemente de color blanco a gris claro o gris oscuro, conidios mayoritariamente con extremos obtusos o mixtos, crecimiento rápido ($5,06 - 7,14 \text{ mm.día}^{-1}$ a 25°C) y altamente sensibles a benomil (grupos 1 a 4), características que coinciden con las usualmente descritas para la especie *C. gloeosporioides* (Sonoda & Pelosi, 1988; Martín & García-Figueres, 1999; Sutton, 1992). Sin embargo, Weir et al. (2012) en su reciente descripción del complejo de especies *C. gloeosporioides* afirman que todos los taxones aceptados dentro del mismo, presentan características morfológicamente similares a los tradicionalmente descritos para *C. gloeosporioides*.

Solo dos aislados (grupo 5) eran de color blanco con tonalidades salmón, conidios mayoritariamente fusiformes, lento crecimiento ($3,27 - 3,93 \text{ mm.día}^{-1}$ a 25°C) y con tolerancia a benomil, que se ajusta con lo descrito para la especie *C. acutatum* (Sutton, 1992; Wharton & Dominguez-Uribeondo, 2004; Cai et al. 2009; Cannon et al., 2012). En este caso sucede algo similar, estas características se ajustan a la descripción de esta especie y a las filogenéticamente relacionadas (Damm et al, 2012a).

El análisis de componentes principales permitió identificar los complejos de especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Los aislados se agruparon en dos grupos bien definidos. Uno de ellos incluyó al grupo mayoritario y al aislado *C. gloeosporioides* Español, todos pertenecientes al complejo de especies *C. gloeosporioides*. En el otro se agruparon los restantes dos aislados incluidos en el complejo de especies *C. acutatum*. Esto coincide con lo indicado por Phoulivong

et al. (2010) quienes también afirman que las características fenotípicas resultan útiles para identificar complejos de especies de *Colletotrichum* pero no es suficiente para identificar a nivel de especies.

Los caracteres fenotípicos que más contribuyeron a la separación de los complejos fueron: tasa de crecimiento diario a las temperaturas de 20 y 25°C, crecimiento relativo de las colonias con fungicida benomil y forma y tamaño de los conidios. Los aislados del complejo de especies *C. gloeosporioides* se caracterizaron por presentar mayor tasa de crecimiento que los aislados del complejo de especies *C. acutatum* y fueron inhibidos ante la presencia de benomil mientras que los del complejo de *C. acutatum* fueron solo parcialmente inhibidos. Finalmente, los aislados del complejo de especies *C. gloeosporioides* presentan conidios predominantemente obtusos o mixtos mientras que los del complejo de *C. acutatum* predominantemente fusiformes.

La presencia de zonaciones en las colonias es una característica descrita por Brooks (1931) para la especie *C. fragariae* sinónimo de *C. theobromicola* (Weir et al, 2012). Dicha característica la presentaron todos los aislados de esta especie (grupo 4), sin embargo, no fue constante en los sucesivos repiques por lo que, en nuestra opinión, no es una característica que pueda ser utilizada de forma confiable para identificar *C. theobromicola*.

Freeman (1998) y Cai (2009) aseveran que las características fenotípicas con frecuencia presentan ciertas limitaciones para la identificación de las especies de

Colletotrichum, debido a que muchas de estas se superponen entre aislados generando confusiones al momento de definir las especies. Además, la plasticidad e inestabilidad de los rasgos morfológicos y la falta de unificación de las condiciones en las que se realizan los ensayos, resulta en una identificación ambigua y dependiente de los criterios de cada investigador.

En resumen, en este trabajo se identificaron las especies *C. fructicola*, *C. theobromicola* del complejo de especies *C. gloeosporioides* y dos aislados del complejo de especies *C. acutatum* asociadas a la podredumbre amarga del manzano en Uruguay. Las especies tradicionalmente asociadas a la podredumbre amarga, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, no fueron identificadas en este estudio. Estos hallazgos son una contribución importante a la etiología de la podredumbre amarga en el cultivo de manzana en Uruguay, dado que se establece la existencia de una mayor diversidad de *Colletotrichum* spp. asociada a esta enfermedad. Este hallazgo debe servir de base para futuros diagnósticos, estudios epidemiológicos y manejo integrado de esta enfermedad.

5. CONCLUSIONES

En Uruguay la podredumbre amarga del manzano es causada por al menos tres especies de *Colletotrichum*, *C. fructicola*, especie predominante, *C. theobromicola* y al menos otra especie aun no identificada.

Las especies que tradicionalmente se han reportado como causantes de la podredumbre amarga en otros países, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, hasta el momento no se han encontrado en Uruguay.

Los pares de cebadores CgInt/ITS4, específico para *C. gloeosporioides*, y CaInt2/ITS4, específico para *C. acutatum*, no son útiles para identificar estas dos especies.

El análisis de la región ITS permite identificar las especies *C. gloeosporioides* y *C. theobromicola* pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*. Sin embargo, no resulta útil para identificar especies dentro del complejo de especies *C. acutatum*.

Las características fenotípicas permiten identificar de forma confiable los complejos de especies de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, pero no las especies dentro de estos complejos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adaskaveg, J. E., Föster, H. (2009). Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. B., eds. *Colletotrichum: Host specificity, pathology, and host-pathogen interactions*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota pp. 317-336.

Adaskaveg, J., Hartin, R. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987.

Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañan, L., Mejía, J. F., Cardona, N., Álvarez, E. (2014). Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease* 98: 1503-1513.

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* 5th ed., San Diego, California. Elsevier 494-495 p.

Álvarez, E., Ospina, C. A., Mejía, J. F., Llano, G. A. (2004). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle de Cauca. *Fitopatología Colombiana* 28: 1-8.

- Álvarez, E., Gañan, L., Rojas-Triviño, A., Mejía, J. F., Llano, G. A., González A. (2014). Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *European Journal of Plant Pathology* 139: 325-338.
- Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A., Shabi, E. (1995). Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. *Plant Disease* 79: 478-482 p.
- Brooks, A. N. (1931). Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n. sp. *Phytopathology* 21: 739-744.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., Timmer, L. W., (1996). Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523-527.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C., Johnston, P.R. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.

- Crouch, J.A., Clarke, B. B., White, J. F., Hillman, B. I. (2009a). What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101: 648–656.
- Crouch, J.A., Clarke, B. B., White, J. F., Hillman, B. I. (2009b). Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia* 101: 717–732.
- Damasco, D. G. (2011). Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae* causantes de la podredumbre amarga en manzano Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Agronomía 55p.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous P.W. (2012a). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37-113.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G., Crous, P.W. (2012b). The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1-3.
- Faedda, R., Agosteo, G., Schena, L., Mosca, S., Frisullo, S., Magnano Di San Lio, G., Cacciola, S. O. (2011). *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the

- causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 283-302.
- Freeman, 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82: 596-605.
- Freeman, S., Shabi, E., Katan, T. (2000). Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.) *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5267-5272.
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F.J., Vallejo, I., Colyer, A., Cantoral J.M. (2008). Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of strawberry in south west Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 120: 409-415.
- González, E., Sutton, T.B., Correll, J.C. (2006). Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* 96: 982-992.
- Guerber, J. C., Correll, J. C. (2001). Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* 93: 216–229.

Hammer Ø, Natural History Museum, University of Oslo. (2012). PAST, Paleontological Statistics Version 2.16, Reference manual. <http://www.nhm2.uio.no/norlex/past/pastmanual.pdf>

Hang, P. T., Pettersson, O.V., Olsson, P., Liljeroth, E. (2010). Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. European Journal of Plant Pathology 127: 73-87.

Harp, T.L., Pernezny, K., Ivey, M.L.L., Miller, S.A., Kuhn, P.J., Datnoff, L. (2008) The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. Crop Protection 27: 1380-1384.

Hillis, D., Bull, J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic Biology 42: 182-192.

Hyde, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnston, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E.H. C., Moriwaki, J. Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R. G., Tan, Y. P., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Yang, Y. L., Zhang, J. Z. (2009a) *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39: 147-182.

Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z., Prihastuti, H. (2009b). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. Fungal Diversity 39: 1-17.

- Jones, A.; Aldwinckle, H. (2002). Compendium of apple and pear diseases. St. Paul, MN, USA, APS 100 p.
- Jones, A. L., Ehret, G. R., Meyer, M. P., Shane, W. W. (1996). Occurrence of bitter rot on apple in Michigan. *Plant Disease* 80: 1294-1297.
- Lewis-Ivey, M. L., Nava-Diaz, C., Miller, S.A. (2004). Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. *Plant Disease* 88: 1198-1204.
- Lubbe, C. M., Denman, S., Cannon, P. F., Groenewald, J. Z., Lamprecht, S. C., Crous, P.W. (2004). Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. *Mycologia* 96: 1268-1279.
- Martín, M. P., García-Figueres, F. (1999) *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European journal of Plant Pathology* 105: 733-741.
- Martín, M. P., García-Figueres, F.; Trapero, A. (2002). Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 28: 43-50.

- Martínez-Culebras, P. V., Querol, A., Suárez-Fernández, M. B., García-López, M. D., Barrio, E. (2003). Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primers for their identification. *Journal of Phytopathology* 151: 135-143.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E. (1992). Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 98: 137-144.
- Moggia, C., Yuri, J. (2004). Apple postharvest practices in Chile. En: Proceedings 99th Annual Meeting 2003. Washington State Horticultural Association: 149-159.
- Moral, J., Oliveira, R., Tello, J. C., Trapero, A. (2007). Caracterización fisiológica y patogénica de aislados de " *Colletotrichum*" spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 33: 219-234.
- Nguyen, P. T. H., Vinnere, O., Olson, P., Liljeroth, E. (2010). Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European Journal of Plant Pathology* 127: 73-87.
- Olivera, R., Moral, J., Bouhmidi, K., Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 31: 531-548.

- Peever, T. L., Canihos, Y., Olsen, L., Ibañez, A., Liu, Y.-C., Timmer, L. W. (1999). Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola* tangelo and rough lemon in Florida. *Phytopathology* 89: 851-860.
- Peres, N. A. R., Kuramae, E. E., Dias, M. S. C., Souza, N. L. (2002). Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology* 150: 128-134.
- Peres, N.A.R., Souza, N. L., Peever, T.L., Timmer, L. W. (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88:125-130.
- Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D., Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18: 117-133.
- Phoulivong, P., Cai, L., Chen, H., McKenzie, H. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44: 33-43.

- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89-109.
- Raj, M., Jeeva, M. L., Hegde, V., Vidyadharan, P., Archana, P. V., Senthil alias Sankar, M., Vishnu Nat, S. (2012). Polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive detection, and identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing greater yan anthracnose. *Molecular Biotechnology* 52: 277-284.
- Shi, Y, Correl J. C., Rom C. R. (1996). Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant Disease* 80: 692-696.
- Shivas, R. G., Tan, Y. P. (2009). A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* com. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Biology* 39: 111-122.
- Silva-Rojas, H.V., Ávila-Quezada, G.D.(2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60: 899-908.
- Sreenivasaprasad, S. Brown, A. E., Mills P. R. (1992). DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 265-281.

- Sreenivasaprasad, S. Sharada, K. Brown, A. E., Mills P. R. (1996). PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45: 650-655.
- Smith, B. J., Black, L. L. (1990). Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.
- Sonoda, R. M., Pelosi, R. R. (1988) Characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River area of Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 101: 36-38.
- Sutton, T. B. (1990). In: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Sutton, B. C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J. A., Jeger, M. J., eds. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, U.K., CAB International, 1-26.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. (2002). Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92: 986-996.
- Than, P.P., Shivas, R.G., Jeewon, R., Pongsupasamit, S., Marney, T.S., Taylor, P.W.J., Hyde, K.D. (2008). Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds. *Fungal Diversity* 28: 97-108.
- Ureña-Padilla, A. R., MacKenzie, S. J., Bowen, B. W., Legard, D. E. (2002). Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology* 92:1245-1252.
- Villanueva-Arce, R; Yáñez-Morales, M. de J.; Hernández-Anguiano, A.M. (2008). Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) *Agrociencia* 42: 689-701.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2006). *Biología molecular del gen* (5ª ed.). Editorial Médica Panamericana, Madrid 800 pp.
- Weir, B., Johnston, P.R., Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

Wharton, P. S., Dominguez-Uribeondo, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del jardín botánico de Madrid* 61: 3-22.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y: Academic Press, Inc. pp. 315–322.

Yarden, O., Katan, T., (1993). Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83, 1478-1483.

Yoder, K. S., Biggs, A. R. (1996?). Table of apple cultivar susceptibility to the bitter rot fungi. Virginia, West Virginia University (en línea). Consultado enero 2012. Disponible en:

<http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/tables/bitterrotsus.html>

Anexo. Variables fenotípicas utilizadas para el análisis ACP.

Aislados	Características de los conidios						Crecimiento de las colonias en mm día ⁻¹ a diferentes temp.				***Porcentaje de crecimiento de las colonias en PDA /benomil	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	L/A**	Obtuso (%)	Mixto (%)	Agudo (%)	15°C	20°C	25°C	30°C	10 µg·L ⁻¹	0,5 µg·L ⁻¹
C1	12,7	4,45	2,86	87	13	0	2,48	5,05	7,07	4,93	1,5	10,4
C2	14,2	4,17	3,39	77	23	0	2,21	4,76	6,97	4,62	1,6	11,9
C3	15,5	5,09	3,04	77	23	0	2,50	4,92	6,05	4,51	2,4	7,6
C4	16,9	6,41	3,39	97	3	0	2,56	4,62	6,57	4,13	1,9	11,2
C5	15,9	5,60	3,39	60	37	3	2,31	4,81	6,59	4,38	1,5	3,5
C6	13,4	4,78	2,80	77	23	0	2,03	4,88	6,52	4,16	1,5	5,1
C7	11,8	4,03	2,90	70	27	3	2,59	4,57	5,97	5,18	0,0	0,0
C8	15,5	4,53	3,42	50	50	0	2,22	4,87	6,76	6,11	1,4	8,4
C9	17,7	5,95	2,97	70	30	0	2,18	4,73	6,95	5,60	2,1	9,7
C10	18,5	6,23	2,96	83	17	0	2,27	4,89	7,13	5,05	1,4	10,5
C13	18,7	6,02	3,11	70	30	0	2,42	4,90	7,14	5,83	1,4	7,4
C14	13,0	5,00	2,50	93	7	0	2,07	3,97	6,07	5,60	0,0	0,3
C16	15,0	4,83	3,11	100	0	0	2,54	4,88	6,59	4,38	1,8	1,8
C17	18,1	5,99	3,01	73	27	0	2,70	4,69	6,63	3,89	2,1	3,5
C20	14,4	4,25	3,38	83	17	0	2,40	4,98	6,57	4,95	1,4	6,1
C22	15,3	4,77	3,20	57	43	0	2,45	4,87	6,82	5,36	1,5	14,9
C23	14,0	3,98	3,53	47	50	3	1,91	4,98	6,99	5,22	1,7	14,0
C24	12,4	3,16	3,92	60	40	0	2,18	4,45	6,40	3,54	1,6	10,5
C26	14,2	4,91	2,89	97	3	0	1,70	4,24	5,95	5,21	1,8	1,8

(Continúa en página siguiente)

Anexo. (Continúa de la página anterior)

C27	18,2	6,10	2,98	83	17	0	1,89	4,19	6,02	5,23	1,7	1,7
C28	17,3	6,06	2,86	77	23	0	1,92	4,14	5,99	5,40	1,7	1,7
C29	16,8	6,61	2,55	83	17	0	1,91	4,13	6,11	5,39	1,7	1,7
C30	14,3	5,35	2,68	90	10	0	2,43	4,64	6,19	4,83	2,5	7,4
C31	12,9	4,44	2,90	73	27	0	2,29	4,45	5,90	5,10	1,7	11,3
C32	15,9	4,97	3,21	67	33	0	2,41	4,50	6,52	5,82	2,8	10,0
C33	17,3	5,93	2,92	77	23	0	1,66	4,20	6,01	5,05	1,7	1,7
C35	18,2	6,14	2,97	73	27	0	2,06	4,54	6,02	4,62	1,9	13,5
C36	17,6	6,01	2,93	93	7	0	2,02	4,21	5,89	5,57	1,7	1,7
C38	15,3	5,85	2,62	90	10	0	2,24	4,33	6,25	5,57	1,6	1,6
C39	14,3	4,94	2,89	87	13	0	2,36	4,37	6,10	5,54	1,6	1,6
C40	14,8	4,70	3,14	73	23	3	2,27	4,22	5,90	4,79	2,5	11,9
C41	16,5	6,06	2,73	83	17	0	2,23	4,85	6,18	5,26	2,0	11,9
C42	11,7	3,21	3,65	60	40	0	2,01	4,34	6,37	4,16	1,5	9,9
C.glo*	14,4	4,49	3,20	83	17	0	2,74	4,64	6,55	6,77	0,0	1,6
C12	19,7	5,48	3,60	33	63	0	1,11	4,01	5,73	4,31	1,8	14,5
C15	18,7	5,95	3,15	23	60	17	1,55	4,09	5,43	6,67	0,0	6,7
C19	12,8	3,75	3,41	40	50	10	2,07	4,23	5,06	4,87	0,0	0,8
C21	16,6	4,74	3,50	43	50	7	2,86	3,78	5,53	5,85	0,0	0,8
C25	17,5	4,45	3,94	20	77	3	1,90	4,16	5,53	5,12	0,0	9,9
C37	21,5	6,17	3,49	43	47	10	1,53	3,44	5,87	4,77	1,8	13,8
C11	14,4	5,09	2,83	10	47	43	1,29	2,39	3,27	3,33	48,5	63,7
C18	15,0	4,80	3,13	20	40	40	1,48	2,59	3,93	3,39	41,2	49,0

*C.glo: Colletotrichum gloeosporioides Español; **L/A: Cociente largo ancho; ** *Porcentaje de crecimiento con respecto al con trol (PDA).