



Tesis presentada para optar por el título de
Licenciada en Ciencias Biológicas

**Caracterización de aislamientos del
hongo *Alternaria alternata*, causante de
la mancha marrón de los cítricos en
Uruguay**

María Isabel Rodríguez Assandri

Tutora: Ing. Agr. María Mercedes Peyrou Soares
de Lima, MSc.

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente
Estable
Departamento de Biología Molecular

Montevideo, Uruguay
2015

AGRADECIMIENTOS

A Mercedes Peyrou por los conocimientos y el entusiasmo transmitidos en la realización de este trabajo.

A Paola por su ayuda en los diferentes aspectos de los que constó este trabajo y en general a los integrantes del Departamento de Biología Molecular por su disposición para ayudar.

A Elena Pérez y Luis Díaz por proporcionarnos aislamientos y por su colaboración.

A Lina Bettucci y Elena Pérez por sus sugerencias y correcciones.

A mi familia por su apoyo durante todos estos años.

RESUMEN

La mancha marrón de los cítricos es una enfermedad ocasionada por el hongo *Alternaria alternata*. Produce daños en hojas, ramas y frutos, afectando el rendimiento y calidad de todas las especies de cítricos de interés comercial para Uruguay. Dentro de la especie *A. alternata* que afecta a los cítricos, se conocen dos patotipos diferentes basados en la producción de toxinas y la especificidad por el hospedero. El patotipo mandarina afecta mandarina y sus híbridos, y produce la toxina específica ACT. Existen varios antecedentes en el estudio de la diversidad genética de *A. alternata*, pero su identidad taxonómica no es clara debido al uso de diferentes criterios en su clasificación. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípica y genotípicamente aislamientos de *A. alternata* provenientes de distintas especies cítricas y zonas de producción de nuestro país por aspectos fisiológicos y moleculares, con el fin de conocer la diversidad de la población. Se comparó la velocidad de crecimiento en medio de cultivo de 57 aislamientos de *A. alternata*. La diversidad genética de 36 de ellos se estableció a través del análisis de la secuencia de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S, y de la secuencia parcial del gen endopoligalacturonasa para 57 aislamientos.

Se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento, así como en la morfología de los conidios, y de las colonias entre y dentro de un mismo aislamiento. Con las secuencias de la región D1/D2 analizadas se diseñó

un árbol filogenético que, con una fiabilidad >70, diferenció significativamente los aislamientos nacionales de la secuencia fuera de grupo y de un aislamiento de Florida-EE.UU. Estos resultados confirmaron molecularmente y por primera vez en Uruguay, que los aislamientos estudiados pertenecen a la especie *Alternaria alternata*. No obstante, en la población analizada, la región ribosomal secuenciada no fue lo suficientemente discriminadora dentro de la especie. Por su parte, con las secuencias parciales del gen endoPG se obtuvo un árbol filogenético que agrupó a los aislamientos con una tendencia de correlación con el hospedero, y con la región geográfica en algunos casos. Esta región resultó informativa y discriminadora para la población de aislamientos analizados.

Palabras clave: patología vegetal; micología; técnicas moleculares; caracterización de cepas; región ribosomal D1/D2; gen endoPG

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 Género <i>Alternaria</i>	7
1.2 Especies de <i>Alternaria</i> patógenas de vegetales	10
1.3 <i>Alternaria alternata</i>	14
Características	15
1.4 Caracterización de <i>Alternaria alternata</i>	18
1.5 Métodos moleculares de caracterización de hongos	22
1.6 Conservación de cepas de hongos	26
1.7 Mancha marrón de los cítricos	27
Origen y distribución	27
Agente causal	29
Síntomas y variedades cítricas susceptibles	31
Ciclo de la enfermedad	34
Impacto económico	38
Manejo de la enfermedad	41
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivos generales	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1 Obtención de aislamientos y confirmación de patogenicidad	45
3.2 Velocidad de crecimiento	48
3.3 Morfología de colonias y conidios	50
3.4 Extracción de ADN genómico	50
3.5 Secuenciación de la región D1/D2	51
Amplificación por PCR y secuenciado de la región D1/D2	51
Análisis filogenético	52
3.6 Secuenciación de un fragmento del gen endoPG	53
Amplificación por PCR y secuenciado de endoPG	53

Análisis filogenético.....	55
3.7 Conservación de cepas de hongos.....	56
4 RESULTADOS.....	57
4.1 Obtención de aislamientos y confirmación de patogenicidad.....	57
4.2 Velocidad de crecimiento.....	58
4.3 Morfología de colonias y conidios.....	59
4.4 Secuenciación de la región D1/D2.....	61
Amplificación por PCR y secuenciado de la región D1/D2.....	61
Análisis filogenético.....	62
4.5 Secuenciación de un fragmento del gen endoPG.....	66
Amplificación por PCR y secuenciado de endoPG.....	66
Análisis filogenético.....	67
5 DISCUSIÓN.....	69
6 CONCLUSIONES.....	72
7 PERSPECTIVAS.....	73
8 BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXO.....	82

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Alternaria*

El género *Alternaria* fue establecido en 1816 por Nees von Esenbeck describiendo a *Alternaria alternata* (originalmente *A. tenuis*) como el aislamiento tipo (Thomma, 2003; Lawrence *et al.*, 2013). Fue clasificado dentro de los *Fungi Imperfecti* debido a que no se le conoce teleomorfos a la mayoría de sus especies (Thomma, 2003). La característica destacable del género es la producción de conidios grandes, multicelulares y melanizados con septos longitudinales y transversales, en cadenas únicas o ramificadas sobre conidióforos (Thomma, 2003). Si bien *Alternaria* presenta conidios grandes comparado con otros géneros de hongos, dentro de este género se distinguen claramente especies que producen conidios más grandes (más de 100 μm de largo) de otras que producen conidios pequeños (20-50 μm de largo) (citado por Andrew *et al.*, 2009). Incluye un número importante de especies distribuidas en diferentes hábitats en el mundo, y difícil de estimar debido a la proliferación de nomenclaturas de dudosa validez taxonómica (Simmons, 1992).

Aunque la mayoría de las especies de *Alternaria* son saprófitos, existen especies patógenas de animales así como otras patógenos de plantas agronómicamente importantes: cereales, ornamentales, oleaginosas,

hortalizas como coliflor, brócoli, zanahoria y papa, frutos como tomate, cítricos y manzana (Thomma, 2003).

Muchas especies de *Alternaria* son patógenas de humanos debido a la capacidad de producir compuestos que son tóxicos para los mamíferos y las aves (micotoxinas) y alérgenos ocasionando problemas respiratorios (Jonsson y Rolfsen, 1989). Si bien las esporas de *Alternaria alternata* son los alérgenos más comunes y potentes -pudiendo causar asma fatal-, todas las especies de *Alternaria* son potencialmente alergénicas. Algunas especies se han encontrado asociadas a infecciones de córnea, cavidad oral y sinusal, tracto respiratorio, piel y nariz, y su presencia se correlaciona con ciertos tipos de cánceres. Esto ocurre particularmente en pacientes inmuno deprimidos (Lawrence, 2008).

Las especies fitopatógenas de *Alternaria* son necrótrofos, es decir que ocasionan muerte celular en el hospedero previo a la colonización. Esto se logra mediante la producción de toxinas las cuales desencadenan muerte celular programada o causan daño celular que resulta en necrosis (Lawrence, 2008).

Muchas especies fitopatógenas de *Alternaria* producen toxinas con amplio rango de hospedero, pero existe un grupo de especies que producen toxinas específicas de hospedero (HST por sus siglas en inglés) para un

rango menor de hospederos, a veces restringido a una sola especie o variedad (Peever *et al.*, 2004; Lawrence, 2008). Se conoce que las HST están presentes en menos de 20 hongos patogénicos y la mayoría son metabolitos secundarios de bajo peso molecular. Por su parte, las toxinas no específicas de hospedero pueden afectar muchas plantas sean o no el hospedero del hongo que las produce (Tsuge *et al.*, 2012). Estas toxinas de patógenos de plantas también pueden clasificarse como factores de patogenicidad o de virulencia. El primer factor refiere a la habilidad del patógeno de causar enfermedad y la mayoría de las HST se clasifican como tal; la virulencia, en cambio, hace referencia a la severidad de la enfermedad causada (citado por Tsuge *et al.*, 2012). El hecho que plantas susceptibles al patógeno sean sensibles a la toxina apoya el rol de las HST en la patogénesis. La función de las toxinas no específicas en la patogénesis no se conoce. Se piensa que algunas estarían implicadas en factores de virulencia, tales como el desarrollo de síntomas y la propagación del patógeno en la planta (Tsuge *et al.*, 2012).

A nivel evolutivo, la transición desde el estado de vida saprofítico al patogénico resulta de la adquisición de los genes que codifican y dirigen síntesis de toxinas específicas de hospedero, a través de la transferencia de cromosomas pequeños que los contienen, lo que representa un tipo de transferencia horizontal de genes (Lawrence, 2008).

Las especies de *Alternaria* también pueden colonizar los tejidos del hospedante como endófitos, es decir que habitan dentro de las plantas sin causar perjuicio aparente (Peever *et al.*, 2005).

Debido a que este género incluye muchas especies patógenas de plantas y humanos es importante una identificación precisa y una correcta caracterización a fin de conocer la diversidad de la población.

1.2 Especies de *Alternaria* patógenas de vegetales

Las distintas especies de *Alternaria* han sido comúnmente identificadas y clasificadas según características fenotípicas tales como la morfología de los conidios y las colonias (Hong *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2013). Los estudios de Simmons (1992) se basaron en la morfología y el tamaño de los conidios, delimitando al género en 14 grupos morfológicos cada uno tipificado por una especie representativa. Algunos ejemplos son: el grupo “*alternata*” que incluye especies de esporas pequeñas como *A. alternata*, y los grupos “*brassicicola*”, “*infectoria*” y “*tenuissima*”. Por su parte Andersen *et al.* (2005), para clasificar las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas, se basaron en las tasas de crecimiento a diferente temperatura, la morfología de colonia y los perfiles de metabolitos secundarios en condiciones estandarizadas

No obstante, la variabilidad en tamaño, forma y septación de conidios -tanto dentro de una misma especie como en una misma colonia- debido a factores ambientales (medio de cultivo, temperatura de incubación, etc.) ha resultado ser un inconveniente para utilizar estos parámetros para clasificar las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas (Hong *et al.*, 2005; Andrew *et al.*, 2009).

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, se intentó levantar algunas de las limitantes mencionadas, a través del estudio de los componentes genéticos del hongo que han demostrado ser más estables. Muchos de los grupos morfológicos propuestos por Simmons en 1992 han sido apoyados por estudios moleculares bajo la forma de linajes monofiléticos -llamados grupos de especies- demostrando una clara distinción entre las especies de esporas grandes y pequeñas. Sin embargo, continúa el debate sobre la distinción dentro de este último grupo, dada la controversia sobre la definición del límite que determina una nueva especie o en cambio representa variación intraespecífica (Andrew *et al.*, 2009).

Estudios de Pryor y Gilbertson (2000) basados en la secuencia del ADN de la subunidad pequeña ribosomal mitocondrial (mtSSU), ordenaron a los aislamientos de *Alternaria* en grupos de especies apoyando los grupos morfológicos. Sin embargo, con la secuencia del espaciador intergénico ribosomal nuclear (ITS), región típicamente usada en la sistemática

fúngica, tampoco se logró discriminar entre las especies de esporas pequeñas (Pryor y Gilbertson, 2000).

Dado que no se ha podido resolver la relación filogenética entre las especies de un mismo grupo, otra estrategia desarrollada ha sido la utilización de los datos de secuencia o mapeo de restricción de la región espaciadora intergénica de los ADNr nucleares (IGS) para discriminar entre poblaciones o especies muy estrechamente relacionadas en varias especies fúngicas entre ellas las de *Alternaria* (Hong *et al.*, 2005). Se trata de la región entre operones de los ADNr nucleares que presenta una alta variabilidad de secuencia. En su estudio, Hong *et al.* evaluaron la distribución de los sitios de restricción en la región IGS para diferentes especies de *Alternaria*, demostrando ser una región muy variable en tamaño y sitios de restricción entre estas especies. Para discriminar entre especies de *Alternaria* muy relacionadas (como las que integran el grupo “alternata”) los autores sugieren la secuenciación de la región 5’ de IGS que resultó ser la más variable.

Según Andrew *et al.* (2009) los genes codificadores de proteínas mayormente utilizados en la sistemática fúngica han resultado invariantes para las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas. Por este motivo, decidieron realizar análisis de haplotipos de la secuencia parcial del gen endopoligalacturonasa (endoPG) y de las regiones anónimas, OPA1-3 y

OPA10-2. EndoPG fue utilizado como marcador molecular por primera vez por Peever *et al.* en 2002 y se observó que la mayoría de las variaciones observadas en la secuencia de este gen estaban bajo selección neutral lo que lo hace adecuado para estudios filogenéticos. Sin embargo, en el estudio realizado por Andrew *et al.*, no fue posible determinar las relaciones filogenéticas de estas especies, sólo logrando separar las que se agruparon con *A. arborescens* de las otras especies de esporas pequeñas que se agruparon con *A. alternata* y *A. tenuissima*.

Para el caso particular de las especies de *Alternaria* patógenas de cítricos, también se han llevado a cabo estudios fenotípicos y genotípicos. Dentro del grupo de esporas pequeñas, Simmons en 1999 basado en los patrones de conidiación, describió diez especies de *Alternaria* patógenas de cítricos. Por su parte, para probar la correspondencia entre los conceptos morfológicos y filogenéticos de especie, Peever *et al.* (2004) utilizaron secuencias parciales de cinco regiones genómicas: la subunidad grande ribosomal mitocondrial (mtLSU), el gen de la beta tubulina, el gen endoPG y dos regiones genómicas anónimas OPA1-3 y OPA2-1. Este estudio permitió diferenciar especies de *Alternaria* de esporas grandes como *A. solani* de las especies de esporas pequeñas. Además, los datos concatenados de las secuencias de endoPG y las dos regiones anónimas permitieron diferenciar dentro del grupo de especies de esporas pequeñas revelando ocho clados. Tres de estos contenían más de una

morfoespecie y una de estas resultó ser polifilética, por lo tanto se decidió denominar a todos los aislamientos de *Alternaria* de esporas pequeñas y asociados a cítricos como una única especie filogenética: *A. alternata*.

Si bien los métodos genotípicos tienen mayor estabilidad y poder de discriminación que los fenotípicos, no es claro el límite del género *Alternaria* y su especiación (Hong *et al.*, 2005; Andrew *et al.*, 2009). Una correcta delimitación de las especies es importante no sólo para el estudio de la evolución de la patogenicidad sino también para asegurar la bioseguridad mundial permitiendo implementar restricciones que eviten el transporte del patógeno entre los países. Estas exigencias cuarentenarias pueden ocasionar elevadas pérdidas económicas al impedir el comercio de productos agrícolas o sus derivados, por lo que una exacta identificación de los patógenos es imprescindible para evitar error en las intercepciones de productos agrícolas y así, pérdidas injustificadas (citado por Stewart *et al.*, 2014).

1.3 *Alternaria alternata*

El hongo *Alternaria alternata* pertenece al Filo Ascomycota, Clase Euascomycetes, Orden Pleosporales y Familia Pleosporaceae (Isshiki *et al.*, 2003; Thomma, 2003). Como se mencionó para las especies del género *Alternaria*, su forma de vida puede ser saprófita, endófito o

patógena. Dentro de las especies patogénicas en vegetales, *A. alternata* es el agente causal de la enfermedad de la mancha marrón de los cítricos.

Características

Es un hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman conidios muriformes de color pardo con septos transversales y verticales de disposición irregular, característicos del género. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio formándose largas cadenas de diez o más de ellos. Presenta colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días) afieltradas, de color gris al principio con una zona central que se torna más oscura mientras los bordes permanecen grisáceos. El reverso de la colonia es de color negro. Es tolerante al fungicida benomilo (Bial-Aristegui, 2002) (Figura 1.1).

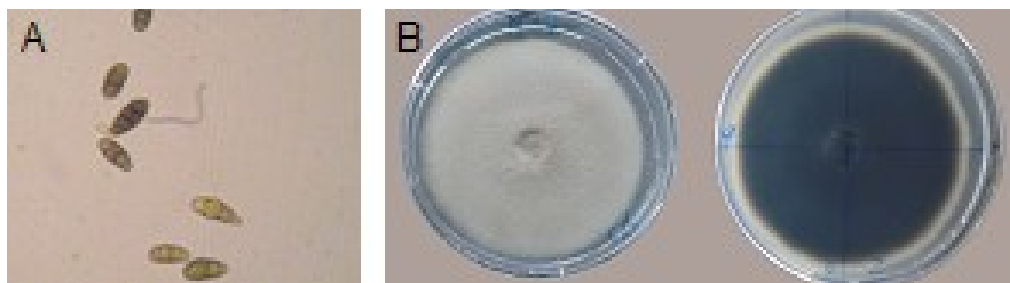


Figura 1.1. **A:** Conidios de *A. alternata* (40x). **B:** Haz y envés de colonia de *Alternaria alternata* crecida en PDA.

Alternaria alternata presenta distribución universal y se encuentra en espacios abiertos. Es común en abonos, plantas, alimentos, tejidos y distintos tipos de suelos. Los conidios se aíslan con frecuencia del aire libre durante el tiempo caluroso. El rango de temperatura de crecimiento varía entre 2 y 32°C, con temperaturas óptimas entre 25 y 28°C (Bial-Aristegui, 2002).

Entre los metabolitos secundarios producidos por *A. alternata* se encuentran varias micotoxinas. Entre ellos alternariol, monometileter de alternariol, altenueno, altertoxinas I, II y III, ácido tenuazónico y otros metabolitos menos tóxicos. El ácido tenuazónico es tóxico para algunas especies animales mientras que alternariol, monometileter de alternariol, altenueno y altertoxina I tienen una menor toxicidad. Alternariol, monometileter de alternariol y ácido tenuazónico han sido frecuentemente detectados en manzana, mandarina, tomate, semillas de girasol, sorgo y trigo; alternariol y monometileter de alternariol fueron detectados en frutos cítricos, frambuesa, zanahoria, cebada y avena, y monometileter de alternariol y ácido tenuazónico en melón (Ostry, 2008).

En cuanto a las enfermedades producidas en humanos, puede provocar lesiones cutáneas y subcutáneas en personas con inmuno supresión luego de sufrir traumatismos. Es causa de endoftalmitis postquirúrgica y de onicomycosis, y en pacientes con SIDA se han observado infecciones invasoras sistémicas. En China se ha sugerido una asociación entre el

ácido tenuazónico y el cáncer esofágico y también ha sido implicado en enfermedades hemáticas endémicas en África. *A. alternata* es uno de los hongos más extensamente distribuidos y uno de los principales alérgenos, determinándose la existencia de más de 20 alérgenos diferentes. La abundancia relativa de los conidios de este hongo en el aire libre y su presencia en las casas con humedad lo convierte en una fuente alérgica importante. La alergia a *A. alternata* es una causa común de asma (Bial-Aristegui, 2002).

Respecto a las especies fitopatógenas, *A. alternata* contiene siete patotipos, que producen toxinas que causan síntomas en diferentes plantas (fitotoxinas). Estos patotipos presentan similitud morfológica pero diferencias patológicas (Thomma, 2003). Entre ellas, la toxina AF causa síntomas en frutilla, la toxina AK afecta pera, la toxina ACT afecta específicamente mandarinas, tangores (híbridos de mandarina y naranja) y tangelos (híbridos de mandarina y pomelo), AM afecta manzana (Walton, 1996; Hatta *et al.*, 2002) y la toxina ACR o ACRL afecta limones (Issshiki *et al.*, 1997; Akimitsu *et al.*, 2003). Se conoce que la toxina ACT y la toxina ACR actúan a diferente nivel celular (citado por Walton, 1996).

1.4 Caracterización de *Alternaria alternata*

Respecto a la clasificación por características fenotípicas, como ya se mencionó, *A. alternata* integra el grupo “alternata” de esporas pequeñas que es el que presenta mayor controversia en su clasificación. Se dijo anteriormente, Simmons en 1999 describió diez especies patógenas de cítricos dentro de este grupo. Por su parte, Andersen *et al.* en 2005 también apoyaron la existencia de diferentes especies dentro de “alternata”. Por ejemplo, la especie considerada como *A. alternata* mostró diferente perfil metabólico que los otros aislamientos de espora pequeña estudiados (*A. gaisen*, *A. limoniasperae*, *A. longipes*, *A. tangelonis* y *A. turkisafrina*), siendo la única que produjo la micotoxina alternueno.

Ya se mencionó, la variabilidad observada en las características fenotípicas tales como forma y tamaño de conidios y patrones de conidiación impide utilizarlas como criterio único de clasificación (Hong *et al.*, 2005). Por este motivo, se han llevado a cabo diferentes trabajos con el objetivo de encontrar marcadores moleculares que permitan detectar variabilidad genética dentro de poblaciones de *A. alternata*. Como ya se indicó para el género *Alternaria*, existe incongruencia entre el número de especies definido bajo un concepto morfológico y según un criterio filogenético.

Como se dijo, Peever *et al.* en 2002 sugirieron la utilidad del gen que codifica para la enzima endopoligalacturonasa como marcador molecular. Emplearon aislamientos de *Alternaria* de esporas pequeñas y que causan la enfermedad de la mancha marrón de los cítricos obtenidos de diferentes países, para realizar estudios de filogeografía, que a su vez permitieron una caracterización genotípica. Analizando los haplotipos de la secuencia parcial del gen endoPG, los aislamientos se agruparon en tres clados que se correlacionaron con su origen geográfico. Un clado agrupó aislamientos de Florida-EE.UU y Colombia (ancestral), otro, aislamientos de Florida-EE.UU, Australia, Sud África e Israel, y un tercero, aislamientos de Australia, Israel, Sud África y Turquía. Cada uno de estos tres linajes habría sido introducido en forma independiente en cada región cítrica. Como el género *Citrus* es nativo del Sudeste de Asia, se propuso que el patógeno evolucionó con su hospedador en esa región y desde allí fue introducido en las otras regiones cítricas a través de plantaciones del hospedero.

Posteriormente Peever *et al.* (2004), a diferencia de Simmons (1992; 1999) y de Andersen *et al.* (2005), basados en la combinación de marcadores moleculares tales como las secuencias parciales del gen endoPG y de las dos regiones anónimas OPA1-3 y OPA2-1, consideraron nombrar a los aislamientos de esporas pequeñas de *Alternaria* y asociados a cítricos como patotipos de *A. alternata* y no como diferentes especies dentro del género *Alternaria*. Otros investigadores también han

considerado nombrar a las especies de esporas pequeñas de *Alternaria* patogénicas como patotipos de *A. alternata* según su especificidad de hospedero (citado por Andrew *et al.*, 2009).

Siguiendo la línea de investigación de Peever *et al.* (2002), Stewart *et al.* en 2014, estudiaron la filogeografía mundial de este patógeno ampliando el muestreo, mediante análisis de haplotipos de la secuencia parcial del gen endoPG representativos de la región de donde provenían los aislamientos. Estos fueron seleccionados para secuenciación de las regiones anónimas OPA1-3 y OPA2-1 y la secuencia flanqueante de microsatélites, Flank-F3. El análisis de coalescencia para endoPG, es decir la determinación del ancestro común más reciente, indicó la existencia de tres linajes concordando con el estudio de Peever *et al.* (2002), sin embargo este análisis para OPA1-3, OPA2-1 y Flank-F3 sólo permitió diferenciar, al presentar un fuerte apoyo de bootstrap, el Clado 2 de los Clados 1 y 3. Se decidió determinar la existencia de dos especies de *Alternaria* como máximo causantes de la enfermedad. Una de ellas presente en dos de los tres clados (Clados 1 y 3), está mundialmente representada, mientras la otra, presente en un solo clado (Clado 2), sólo se ha encontrado en América.

Huang *et al.* (2014) en su estudio plantearon determinar si existe diversidad genética adicional del patógeno en China y si esta región es el origen de la enfermedad. El primer reporte de la mancha marrón de los

cítricos en Asia, más específicamente en China, fue recién en 2010 (citado por Huang *et al.*, 2014). Utilizaron datos de secuencias de endoPG, y OPA1-3 y OPA2-1 de aislamientos de China y en el análisis filogenético incluyeron aislamientos de referencia de otros investigadores que definían tres linajes. En uno de ellos, definido como Clado 1, se agruparon algunos aislamientos de China, así como en el linaje definido como Clado 3. Sin embargo, ningún aislamiento de China se agrupó en el linaje definido como Clado 2 y algunos se agruparon en un clado que no incluía aislamientos de referencia de otros investigadores, el cual fue definido como Clado 4. Debido a la ausencia de aislamientos en uno de los clados antes descritos, y en base a los datos que se tienen, estos autores plantean la contradicción con la hipótesis que China haya sido el origen de la enfermedad. Los autores sugieren que el patógeno habría evolucionado con su hospedador en otra parte del sudeste asiático y desde allí habría sido introducido en China (Huang *et al.*, 2014).

Las técnicas basadas en marcadores moleculares inespecíficos: amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés) y polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) fueron aplicadas a poblaciones de *A. alternata* patógenas de cítricos en un mismo país logrando agrupar los aislamientos incluidos en el estudio en forma contundente y los resultados obtenidos por ambas técnicas son muy similares (Dini-Andreote *et al.*, 2009). RAPD también resultó ser una herramienta importante para

identificar diferencias genéticas entre aislamientos de *A. alternata* en estudios de Nasim *et al.* (2012).

1.5 Métodos moleculares de caracterización de hongos

Para definir los hongos al nivel de especie los micólogos han utilizado diferentes conceptos entre ellos el morfológico (clásico), politético, ecológico y biológico. La reciente incorporación de aproximaciones filogenéticas y de técnicas de biología molecular -en particular el análisis de secuencias de ADN- impulsadas por los avances en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la selección de cebadores universales específicos para hongos, ha cambiado la sistemática tradicional (Guarro *et al.*, 1999).

Las técnicas moleculares pueden utilizarse para realizar tanto estudios filogenéticos como taxonómicos, donde no se reflejan necesariamente las relaciones filogenéticas.

En los estudios filogenéticos una de las regiones genómicas más utilizadas es la que codifica para los ARN ribosomales (ARNr). También proveen información importante los intrones de algunos genes codificadores de proteínas: beta tubulina, actina, entre otros. Los genes ribosomales no son traducidos a proteínas, se encuentran en múltiples copias en tándem y son frecuentemente tratados como un único locus.

Además los ribosomas están presentes en todos los organismos, tienen un origen evolutivo común, algunas regiones están altamente conservadas y pueden utilizarse como punto de referencia para estudios de divergencia evolutiva. Las regiones conservadas alternan con regiones variables o dominios divergentes. Los ADN ribosomales (ADNr) 5.8S, 18S y 25S son transcritos junto con espaciadores externos e internos (ETS e ITS) que son eliminados del transcrito. Entre cada cluster hay un espaciador no transcrito o intergénico (NTS o IGS) que separan los repetidos entre sí a lo largo del cromosoma. Por su parte, el gen 5S tiene posición variable (Guarro *et al.*, 1999). (Figura 1.2).

Comparaciones del gen 18S también llamado subunidad pequeña (SSU), ha permitido estudiar relaciones filogenéticas del grupo principal de organismos vivos. En el caso de los hongos filamentosos, el 18S es usado completamente o en subunidades de 600 pares de bases. La información dada por los dominios variables de este gen es insuficiente para diagnóstico por lo que deben secuenciarse grandes partes de la molécula. Por su parte 5.8S es demasiado pequeño y tiene la menor variabilidad. Las regiones ITS son mucho más variables pero sus secuencias se alinean con confianza sólo entre taxones muy relacionados, se utilizan para diferenciación de especies aunque también pueden mostrar patrones de microevolución. Las regiones variables D1/D2 del gen 25S son utilizadas en levaduras casi exclusivamente, sin embargo su uso se ha extendido a heterobasidiomicetes y en ocasiones a

ascomicetes filamentosos. Estas regiones son muy informativas y permiten comparar desde niveles taxonómicos elevados hasta el nivel de especie, aunque sólo un número limitado de posiciones permanecen variables (Guarro *et al.*, 1999).

Los métodos usados para taxonomía al nivel de especie son la secuenciación y la electroforesis. Varios autores han secuenciado especies relacionadas para determinar sus relaciones taxonómicas. Entre los métodos electroforéticos, el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) es importante en taxonomía. Se digiere el ADN con un grupo de enzimas de restricción y los patrones generados pueden ser tabulados y comparados o pueden utilizarse para construir árboles fenéticos. RFLP se ha usado para comparar patrones de ADN mitocondrial (ADNmt) indicando diferencias por debajo del nivel de especie, aunque algunos autores han secuenciado en su lugar ADN de la subunidad pequeña ribosomal mitocondrial (mtSSU). También se ha utilizado el RFLP de ADNr amplificado por PCR que permitió determinar la relación entre hongos moderadamente distantes. Por su parte, los métodos de cebadores al azar han determinado relaciones taxonómicas por debajo del nivel de especie. Ejemplo de ese método es la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) donde los cebadores son decámeros, aunque este método se está abandonando por su baja reproducibilidad. En cuanto a los microsatélites (clase especial de repetidos en tándem), la comparación de perfiles permite el

reconocimiento de especies, y debido al alto polimorfismo, la comparación de bandas individuales es útil en la caracterización de cepas. Otro método empleado en la taxonomía es el cariotipado (migración de cromosomas bajo un campo eléctrico) pero se presentan dificultades para los hongos debido al pequeño tamaño de sus cromosomas. Otras técnicas como microscopía electrónica y electroforesis de campo pulsado han permitido determinar el cariotipo en levaduras y hongos filamentosos el cual presenta una alta variabilidad intraespecífica (Guarro *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se plantea la utilización de la región variable del gen ribosomal 26S, región D1/D2, como marcador molecular para la caracterización de aislamientos de *A. alternata*. Esta estrategia ha sido exitosa para la caracterización de géneros de levaduras, también pertenecientes a la división ascomicetes, permitiendo discriminar a nivel de especies e incluso individuos (Kurtzman y Robnett, 1998). También se plantea la utilización de la secuencia parcial del gen endopoligalacturonasa que ha resultado exitoso en la caracterización de *A. alternata* patógena de cítricos (Peever *et al.*, 2002; Peever *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014).

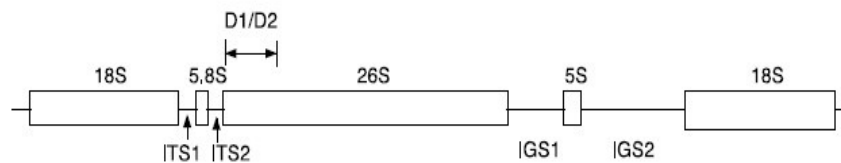


Fig. 1. Schematic Representation of the Fungal rRNA Gene
ITS, internal transcribed spacer; IGS, intergenic spacer; D1/D2, domains 1 and 2.

Figura 1.2. Cluster de genes ribosomales en hongos (extraído de Sugita y Nishikawa, 2003).

1.6 Conservación de cepas de hongos

El mantenimiento y conservación de los hongos en cultivo mientras están siendo estudiados o para preservarlos para estudios futuros, siempre es necesario. Los hongos son difíciles de mantener en buenas condiciones debido a que son inherentemente variables. Muchos mutan rápidamente produciendo cambios morfológicos, aunque también pueden ocurrir cambios en caracteres fisiológicos, bioquímicos y de patogenicidad sin cambios morfológicos obvios. Además los cultivos pueden contaminarse con otros microorganismos y con ácaros (Stockdale *et al.*, 1988).

Se recomienda que cada aislamiento sea conservado por al menos dos métodos. La elección del método depende del equipamiento disponible en el laboratorio así como del propósito de la colección. Para conservar aislamientos irremplazables los mejores métodos son nitrógeno líquido y

liofilización, los cuales además mantienen la estabilidad genética. Si este no es el caso, métodos más simples serían suficientes (Stockdale *et al.*, 1988).

Los métodos de conservación pueden ser a corto plazo (los hongos pueden ser conservados algunos años pero deben ser transferidos a intervalos a medio fresco) o a largo plazo (los hongos pueden almacenarse por 5 o más años y no necesitan ser transferidos). Entre los primeros se encuentran los sub cultivos repetidos y la conservación a temperatura ambiente o en heladera. Ejemplos de los segundos son la conservación en agua, bajo aceite mineral, sílica gel, liofilización, y congelamiento y almacenamiento a -20 °C, -80°C o en nitrógeno líquido (-150°C hasta -196°C) (Stockdale *et al.*, 1988).

1.7 Mancha marrón de los cítricos

Origen y distribución

En cítricos se han descrito hasta el momento cuatro enfermedades producidas por especies de *Alternaria*: mancha marrón que afecta mandarinas y varios híbridos de mandarina; mancha foliar que afecta limón rugoso; la podredumbre negra de los cítricos, una enfermedad de

post cosecha; y mancha foliar de los cítricos en lima mexicana (Peever *et al.*, 2004).

En el caso de la enfermedad mancha marrón, los síntomas fueron observados por primera vez en mandarina Emperor en Australia en 1903 aunque su agente causal no fue identificado hasta 1959 (Kiely, 1964). En las últimas décadas comenzó a ser observada en otros países productores como Estados Unidos (Whiteside, 1976), Israel (Solel, 1991 y Solel y Kimchi, 1997), Cuba (Herrera-Isla, 1992), Sud África (Schutte *et al.*, 1992), España (Vicent *et al.*, 2000), Brasil (Goes *et al.*, 2001), Argentina (Peres *et al.*, 2003), Grecia (Elena, 2006) y Uruguay (DGSSAA, 2009). Actualmente, la enfermedad está extendida por las principales áreas cítricas del mundo tanto de clima subtropical húmedo como semiárido (Timmer *et al.*, 2003), mostrando una gran diversidad en su epidemiología, rango y sensibilidad de hospedero.

Como se mencionó, se han llevado a cabo diferentes estudios enfocados en la filogeografía mundial del agente causal de la mancha marrón de los cítricos. Estos sugirieron la introducción independiente de diferentes linajes del patógeno en diferentes localidades (Peever *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014).

Agente causal

Se ha considerado que la mancha marrón y la mancha foliar pueden ser causadas por diferentes patotipos de *A. alternata* que se diferencian en el rango de hospederos que afectan (citado por Peever *et al.*, 2004). Para el caso de la podredumbre negra de los cítricos, al principio se consideró a *A. citri* como el agente causal pero según Peever *et al.* (2005) puede ser causada por varias especies de *Alternaria* y no sólo por *A. citri*. Por su parte, la mancha foliar de los cítricos es causada por *A. limicola* (citado por Peever *et al.*, 2004).

Sin embargo, la identidad taxonómica del o los hongos que causan la mancha marrón y la mancha foliar de los cítricos no es clara. Originalmente fue identificado como *A. citri* debido a su similitud morfológica con aislamientos causantes de la podredumbre negra de los cítricos, pero sus características patogénicas y la producción de toxinas específicas de hospedero lo distinguieron como una cepa diferente (citado por Peever *et al.*, 2004). Estos patógenos fueron posteriormente tratados como *A. alternata* en base a estudios publicados sobre la morfología y tamaño de los conidios de esta especie (citado por Peever *et al.*, 2004). Este hongo también ha sido denominado *A. alternata* pv. *citri* (Solel, 1991) para diferenciarlo de los aislamientos saprófitos de *A. alternata* (Peever *et al.*, 2004).

Basado en los patrones de conidiación, Simmons en 1999 llegó a caracterizar diez especies patógenas de cítricos ninguna de las cuales fue representativa de *A. alternata* ni *A. citri*. Esta clasificación fue posteriormente revisada por Peever *et al.* (2004) que concordaron con otros autores en considerar una única especie *alternata* y diferentes patotipos. Según esto, la mancha marrón es producida por el patotipo mandarina y la mancha foliar por el patotipo limón rugoso.

Como se mencionó para el género *Alternaria* en general, la patogenicidad está determinada por la producción de toxinas que permiten al patógeno superar las defensas del vegetal provocando previamente muerte celular y lograr así la colonización de los tejidos (Lawrence, 2008). El patotipo mandarina produce la toxina ACT específica para mandarinas (*Citrus reticulata* Blanco), pomelos (*Citrus paradisi* Macfad), híbridos mandarina x pomelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) (Peever *et al.*, 2002) e híbridos mandarina x naranjas dulces (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) (Peever *et al.*, 2000). ACT es una micotoxina formada por ácido tenuazónico que en contacto con la planta actúa en la membrana plasmática (citado por Walton, 1996). El patotipo limón rugoso produce la toxina ACRL que es específica para limón rugoso (*Citrus jambhiri*) y lima Rangpur (*Citrus limonia*) (citado por Peever *et al.*, 2000) y afecta la mitocondria (citado por Walton, 1996).

Masunaka *et al.* en 2005 describieron un aislamiento de *A. alternata* patógeno para limón rugoso y mandarina capaz de producir la toxina ACRL y la toxina ACT.

Además de la patogenicidad señalada, se han encontrado aislamientos saprófitos sobre todos los tejidos aéreos de las plantas cítricas pudiendo también colonizar los tejidos del hospedero como endófitos (Peever *et al.*, 2005).

Síntomas y variedades cítricas susceptibles

La enfermedad mancha marrón de los cítricos provoca daños en hojas, ramas y frutos (Pegg, 1966) lo que afecta negativamente el rendimiento y la calidad comercial del producto. En ataques severos puede llegar a producir la defoliación total de las brotaciones nuevas (Vicent *et al.*, 2004). En los frutos la lesión es marrón oscura con una depresión en el centro, usualmente con exudación líquida de consistencia viscosa rodeada por un halo amarillo, el centro de la lesión se puede endurecer formando pústulas que se salen fácilmente dejando orificios en la superficie. Las lesiones quedan restringidas a la corteza y no afectan los lóculos (cavidades del fruto). En las ramas la lesión es necrótica de tamaño variable y de color marrón oscuro. En las hojas jóvenes las lesiones son necróticas e inicialmente pequeñas, de color marrón o negro, con halos

amarillos alrededor. Con el tiempo las lesiones aumentan de tamaño y toman grandes áreas de la superficie de la hoja siguiendo las nervaduras (Feichtenberger *et al.*, 2005; Vicent *et al.*, 2008; Dini-Andreote *et al.*, 2009) (Figura 1.3).

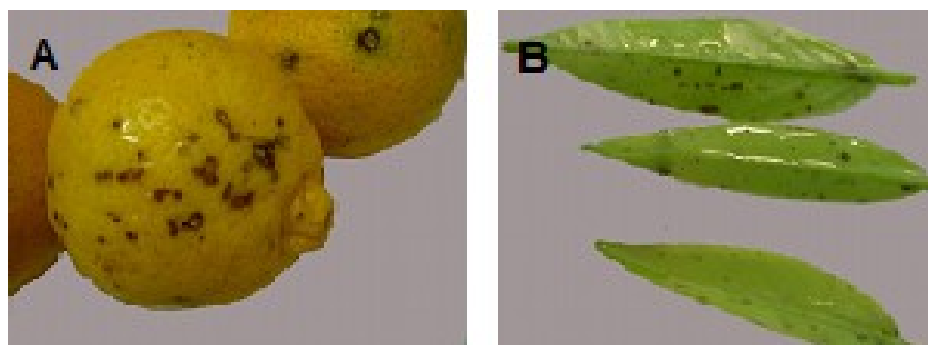


Figura 1.3. A: Síntomas de la mancha marrón en frutos de mandarina Nova. **B:** Síntomas en hojas de mandarina Nova.

En lo que respecta a la susceptibilidad de las diferentes especies y variedades cítricas, esta enfermedad es un serio problema para las mandarinas, los tangores y los tangelos siendo el tangelo Minneola particularmente sensible (Peever *et al.*, 1999). Según Timmer *et al.* (2003) relativamente pocas especies cítricas son susceptibles a la enfermedad de la mancha marrón de los cítricos.

Existe un núcleo básico de variedades sensibles al patógeno compuesto por los tangelos Minneola y Orlando, el tangor Murcott y las mandarinas Dancy, Fortune, Nova y Page (Solel y Kimchi, 1997; Kohmoto *et al.*, 1991; Hutton y Mayers, 1988; Elena, 2006; Reis *et al.*, 2007).

Aunque se ha señalado que la mayor susceptibilidad ocurre en las variedades que pertenecen a la progenie de la mandarina Dancy: tangelos Minneola y Orlando, y mandarinas Nova, Lee y Sunburst, esta enfermedad también ocurre en variedades que no tienen a Dancy como parental: tangor Murcott y mandarinas Emperor y Ponkan (Timmer *et al.*, 2003) y en tangor Ellendale, mandarina Idith y calamondines (Solel y Kimchi, 1997).

A pesar de que existe un núcleo básico de variedades sensibles al patógeno, la susceptibilidad o tolerancia puede cambiar en distintas regiones y con distintos aislamientos del patógeno. La mandarina Kara fue sensible a un aislamiento de *A. alternata* obtenido en Israel (Solel y Kimchi, 1997) y resistente a un aislamiento de Japón (Kohmoto *et al.*, 1991). Naranjas dulces como Valencia y W. Navel fueron resistentes según Gardner *et al.* (1986) y Elena (2006) o sensibles como lo describe Vicent en España (Vicent *et al.*, 2004). En el caso del tangor Ellendale fue sensible a *A. alternata* en Israel (Solel y Kimchi, 1997) y resistente en Australia (Hutton y Mayers, 1988).

La mancha marrón también se ha observado en pomelo rojo en Israel (Solel y Kimchi, 1997), y pomelo en Florida-Estados Unidos (Timmer y Peever, 1997) lo que se asocia a la presencia de la enfermedad en mandarinas y sus híbridos en cultivares cercanos (Timmer *et al.*, 2003).

En Uruguay la enfermedad se manifiesta con gran severidad en mandarinas Nova (Bernal, 2009), y en tangor Murcott, en menor medida en mandarina Fortune y tangelo Orlando tanto en el sur como en el norte, así como también en naranjas Navel y Salustiana e inclusive Valencia (DGSSAA, 2012). Observaciones puntuales la reportan sobre tangor Ellendale y otras especies cítricas como pomelo e incluso limón (DGSSAA, 2012).

Los resultados de los ensayos de susceptibilidad presentan diferente comportamiento según la inoculación sea natural o artificial, obteniéndose en hojas desprendidas respuestas al patógeno en variedades que no presentaron la enfermedad en el campo (Solel y Kimchi, 1997; Vicent *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2007; Claro de Souza *et al.*, 2009).

Ciclo de la enfermedad

El ciclo es relativamente simple debido a que no se conoce forma teleomorfa del patógeno (Timmer, 1999). *A. alternata* se reproduce sobre todos los tejidos enfermos, siendo las hojas la principal fuente de inóculo (Timmer *et al.*, 2000). Los conidios se producen sobre la superficie de la lesión ya sea en hojas maduras en el árbol o que han caído al suelo, y su liberación es desencadenada en zonas húmedas por la lluvia o por cambios en la humedad relativa, y en zonas semiáridas por el rocío

(Timmer *et al.*, 1998; Timmer *et al.*, 2003). Luego son dispersados por el viento y se depositan sobre la superficie de frutos u hojas jóvenes y susceptibles donde germinan rápidamente si hay humedad y empiezan a producir la toxina antes de colonizar el tejido. La entrada a la hoja puede ocurrir directamente o a través del estoma (Akimitsu *et al.*, 2003) (Figura 1.4).

Las hojas son susceptibles a la infección durante todo el período de formación hasta que se encuentran completamente expandidas y endurecidas (Timmer *et al.*, 2000). Las hojas maduras se consideran resistentes (Pegg, 1966), habiéndose observado una correlación negativa entre la susceptibilidad y la edad de la hoja (Solel y Kimchi, 1998). Para la fruta la susceptibilidad se inicia tempranamente desde pétalo caído, pudiendo ser susceptible hasta cuando alcanza un tamaño de 3 cm (Canihos *et al.*, 1999) o durante todo el período de crecimiento (Vicent *et al.*, 2004).

El proceso de infección de *A. alternata* es muy rápido. Desde la formación de los tubos germinativos hasta la observación de los síntomas pueden transcurrir solamente 48 horas (Solel y Kimchi, 1998). En tangelo Minneola se observó que la temperatura y el tiempo en que la hoja permaneció mojada fueron determinantes del nivel de infección y los aislamientos interactuaron significativamente con el tiempo de hoja

mojada indicando una posible diferencia de agresividad entre ellos a altos tiempos de hoja mojada (Canihos *et al.*, 1999).

Se han observado diferentes temperaturas óptimas para el desarrollo de las lesiones en las distintas localidades. Por ejemplo en Florida-Estados Unidos entre 23 y 27°C y en Israel entre 22 y 25°C dejando en evidencia que existe una adaptación del patógeno a las temperaturas que corresponden en cada localidad (Canihos *et al.*, 1999). Cuando se analizó el comportamiento de diferentes cepas de una misma localidad se observó que no había diferencias de comportamiento según la temperatura (Canihos *et al.*, 1999). Pero la respuesta de diferentes aislamientos a la temperatura y período de hoja mojada no ha sido muy investigada y en *Alternaria mali* le atribuyen muchas de las diferencias observadas a la presencia de aislamientos con diferente agresividad (Filajdic y Sutton, 1992).

En Uruguay se realizó un estudio de la susceptibilidad de las hojas de mandarina Nova en distintos estadios de crecimiento mediante inoculación de brotes in vitro, destacándose la mayor sensibilidad en el estadio B2 (Pérez *et al.*, 2012). Con respecto a la fruta, se hizo un seguimiento en campo de la expresión de la enfermedad luego del cambio de color de la fruta, a principios del mes de marzo. Se observaron nuevas lesiones de la enfermedad durante los meses de marzo y abril, registrándose lesiones nuevas hasta el día anterior a la cosecha (Pérez *et*

al., 2013). En nuestro país, se observó que las hojas son las que presentan mayor cantidad de síntomas con inóculo (Pérez, E. comunicación personal).

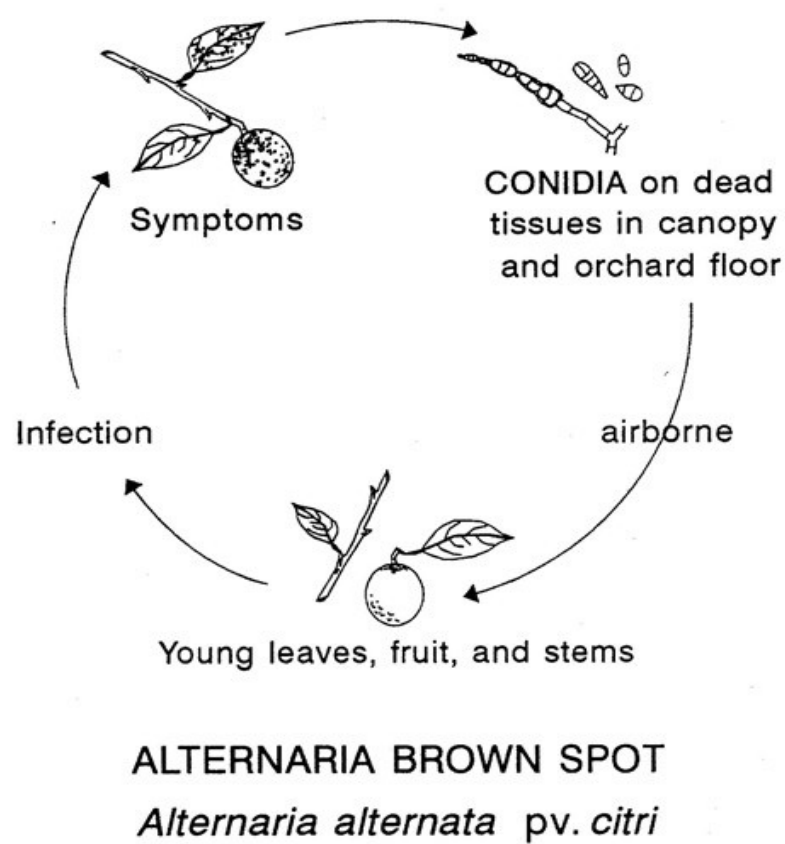


Figura 1.4. Ciclo de la enfermedad mancha marrón de los cítricos (Fuente: http://www.crec.ifas.ufl.edu/crec_websites/fungal/DiseaseCyclePathogen.shtml).

Impacto económico

Es una enfermedad seria en regiones húmedas donde muchas veces ha impedido la producción de cultivares susceptibles. Incluso es un problema importante en zonas semiáridas ya que a pesar de la escasa lluvia, el rocío prolongado provee las condiciones suficientes para la infección (citado por Akimitsu *et al.*, 2003).

Los daños afectan principalmente la calidad externa de la fruta, aunque la caída de frutos puede reducir también el rendimiento productivo de los árboles al igual que las defoliaciones durante la primavera (Vicent *et al.*, 2008). En parcelas muy afectadas se citan reducciones en la producción de más de un 50% y hasta un 95% de frutos afectados (citado por Vicent *et al.*, 2008).

Otro inconveniente de la enfermedad es que limita el uso de cultivares de buena aceptación en el mercado. Por ejemplo, debido a las pérdidas económicas, el tangelo Minneola se dejó de plantar en Estados Unidos y más recientemente en Grecia (Peever *et al.*, 2000; Elena, 2006). Por su parte, en España esta enfermedad es un serio problema para la producción de la mandarina Fortune (Vicent *et al.*, 2004).

Por otro lado, aumenta los costos de producción porque se deben realizar muchas aplicaciones de fungicida por zafra debido a que el control químico, única herramienta efectiva al presente, no alcanza resultados aceptables. Además, presenta el inconveniente de la acumulación de plaguicidas en la fruta, fitotoxicidad, generación de resistencia, costos ambientales, etc. (Bernal, 2009).

Esta enfermedad fue incluida en la lista de alerta de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) desde 1998 hasta 2001, año en que fue retirada dado que no se presentaron problemas extremadamente importantes en los países productores de cítricos (EPPO, 2001). La *U.S. Department of Agriculture* (USDA, 2007) no consideró a *Alternaria alternata* como un fitopatógeno de importancia cuarentenaria. Hoy en día continúa fuera de la lista de alerta de plagas reglamentadas. Si bien no es una enfermedad cuarentenaria, se confunde con cancro cítrico y mancha negra, aumentando los costos de transporte cuando hay alguna intercepción sospechosa.

En Uruguay la citricultura representa un rubro de importancia económica y social relevante, que ha logrado desarrollar y mantener un producto con características competitivas para la exportación. El 78% del área productiva se ubica en el norte del país y el 22% en el sur (DIEA, 2012). El 51% de la producción son naranjas, el 35% mandarinas, el 13% limones y 1,3% pomelos (DIEA, 2012). En los últimos años, por las

tendencias del mercado, se observa un aumento progresivo del área dedicada a las mandarinas, y su composición varietal apunta a satisfacer la demanda del hemisferio Norte en momentos del año donde la escasez de la oferta determina los mejores precios (Caputti y Montes, 2010).

Las mandarinas que componen el parque varietal en Uruguay se cosechan escalonadamente entre los meses de febrero a agosto. El 32% de las mandarinas se compone de variedades sensibles al patógeno (Nova, Murcott y Ellendale) (DIEA, 2010). Mandarina Nova y tangor Murcott cumplen con las exigencias del mercado, pero el descarte y disminución del rinde debido a la enfermedad mancha marrón pone en riesgo la permanencia de estas variedades en su oferta de cítricos.

En Uruguay, aunque la enfermedad es relativamente reciente, su importancia se ha ido incrementado y en los últimos años, como ya se mencionó, se han reportado ataques de alta severidad en mandarina Nova y en tangor Murcott. También se ha observado en mandarina Fortune, tangelo Orlando, tangor Ellendale, y naranjas Navel, Salustiana y Valencia (Bernal, 2009; DGSSAA, 2012).

La mancha marrón de los cítricos es un nuevo desafío para conservar la calidad de la fruta uruguaya, mantener y abrir nuevos mercados. Como se mencionó, a pesar de que no se trata de una enfermedad reglamentada, la similitud de los síntomas con los producidos por cancro cítrico o mancha negra, ha provocado intercepciones de algunos embarques,

generando inconvenientes en la comercialización con la Unión Europea. Este tipo de daño indirecto representa para Uruguay una importante amenaza debido al destino principal de nuestra producción.

Manejo de la enfermedad

Dentro del concepto moderno del manejo de las enfermedades de las plantas, se han propuesto varias medidas integradas, con el propósito de no hacer un uso abusivo del control químico. Por ejemplo, se recomienda una buena aireación de las plantas para disminuir el tiempo de hoja mojada y así evitar las infecciones (Timmer *et al.*, 2000). Sin embargo, sólo esta medida no es suficiente, siendo el control químico imprescindible, requiriendo aplicaciones fungicidas para obtener un control satisfactorio con fruta de buena calidad (Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000; Peres y Timmer, 2006; Claro de Souza *et al.*, 2009).

Fungicidas como los cúpricos y estrobilurinas son los más utilizados para el control de la enfermedad, y dado el rápido crecimiento del follaje y los frecuentes períodos de esporulación e infección del patógeno, las aplicaciones deben ser frecuentes (Timmer *et al.*, 2000). En variedades muy susceptibles para obtener fruta de buena calidad se mencionan entre 12 y 15 aplicaciones por zafra (Peres y Timmer, 2006; Claro de Souza *et al.*, 2009).

En lo referente al control, en Uruguay se reproducen las dificultades mostradas en otros países. En trabajos realizados utilizando seis aplicaciones de productos de contacto y sistémicos, no se logró obtener más del 76% de fruta sana (Bernal, 2009; Rubio, 2012).

El patógeno tiene un largo período de actividad por lo tanto la posibilidad de controlarlo va a estar dada por la determinación de los momentos de susceptibilidad de la planta y condiciones climáticas que favorezcan la enfermedad. En Uruguay las condiciones climáticas son muy favorables para el desarrollo de la enfermedad, existiendo poca información respecto a la variabilidad del patógeno lo que puede estar determinando que no se cuente con un método de control eficiente (INIA, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Este trabajo se propone contribuir a un mejor conocimiento del patógeno causante de la mancha marrón de los cítricos en Uruguay a través de caracterización fenotípica y genotípica. Para la caracterización fenotípica se propone el estudio de los aspectos fisiológicos. Para la caracterización genotípica se utilizarán herramientas moleculares que permitan agrupar los aislamientos en forma consistente y conocer la diversidad de la población. De esta manera se espera contribuir a estudios futuros tendientes al control de la enfermedad de la mancha marrón de los cítricos.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Obtención de aislamientos de *Alternaria alternata* patógenas de cítricos a partir de frutas u hojas con síntomas de diferentes variedades y zonas de producción.
- 2) Caracterización fenotípica en base a características fisiológicas.

- 3) Caracterización genotípica por secuenciación de la región D1/D2 y de la secuencia parcial del gen endopoligalacturonasa, y análisis de su posible relación filogenética.
- 4) Mantenimiento de los aislamientos obtenidos mediante tres métodos de conservación para su inclusión en la colección de *A. alternata* existente en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de aislamientos y confirmación de patogenicidad

De los 63 aislamientos pertenecientes a la colección, 49 fueron colectados en Uruguay (Norte y Sur del país) y fueron cedidos por el laboratorio de Fitopatología de INIA Salto Grande y por el Dpto. de Biología Molecular del IIBCE. Ocho aislamientos provinieron de: España (3), EE.UU (2) y Argentina (3). Los seis aislamientos restantes (ICE AI 68 al ICE AI 73), fueron realizados como parte de la presente actividad y fueron obtenidos a partir de muestras de hojas o frutas de mandarina Nova del sur del país con síntomas típicos de la enfermedad.

Para aislar el patógeno, las lesiones en hojas o frutas fueron cortadas y se lavaron en etanol 70% durante un minuto, luego fueron desinfectadas en una solución con hipoclorito de sodio 1% durante 3 minutos y se hicieron enjuagues con agua destilada estéril. Cada lesión se cortó en 4 trozos los cuales se sembraron en una placa de Petri con medio *Potato Dextrose Agar* (PDA-DIFCO®). Las placas se incubaron a 27°C durante una semana. Las colonias con las características culturales y reverso típicos de *Alternaria alternata* se repicaron en PDA e incubaron una semana a 27°C. Las cepas fueron posteriormente conservadas en agua destilada, desecadas en papel, y en glicerol.

En la Tabla 3.1 se resume, para el total de los aislamientos, la información sobre el año en que fueron obtenidos, el hospedero y órgano del que fueron aislados, la procedencia y el código proporcionado por el investigador.

Tabla 3.1. Código, año de colecta, hospedero, órgano y procedencia de los aislamientos de *A. alternata* utilizados para la caracterización fenotípica y genotípica

Código	Año	Hospedero	Órgano	Procedencia
AL1NQ30	2011	Mandarina Nova	Fruta	Salto
AL2NQ29	2011	Mandarina Nova	Fruta	Salto
AL3PNQ30	2011	Mandarina Nova	Pétalos	Salto
AL4aHNQ30	2011	Mandarina Nova	Hoja	Salto
AL4bHNQ30	2011	Mandarina Nova	Hoja	Salto
AL5HNQ30	2011	Mandarina Nova	Hoja	Salto
AL6HEF	2012	Tangor Ellendale/Page	Hoja	Salto
AL7HEF	2012	Tangor Ellendale/Page	Hoja	Salto
AL8FEF	2012	Tangor Ellendale/Page	Fruta	Salto
AL9FOAZ	2012	Tangelo Orlando	Fruta	Paysandú
AL10HOAZ	2012	Tangelo Orlando	Hoja	Paysandú
AL11FOAZ	2012	Tangelo Orlando	Fruta	Paysandú
AL12HMAZ	2012	Tangelo Minneola	Hoja	Paysandú
AL13FMAZ	2012	Tangelo Minneola	Fruta	Paysandú
AL14HNAZ	2012	Mandarina Nova	Hoja	Paysandú
AL15HNAZ	2012	Mandarina Nova	Hoja	Paysandú
AL16FNAZ	2012	Mandarina Nova	Fruta	Paysandú
AL17FNAZ	2012	Mandarina Nova	Fruta	Paysandú
AL18HEF	2012	Tangor Ellendale/Page	Hoja	Salto
AL19FNCA	2012	Mandarina Nova	Fruta	Argentina
AL20FNCA	2012	Mandarina Nova	Fruta	Paysandú
AL21FNCO	s/d	Mandarina Nova	Fruta	Paysandú
AL22FEF	2012	Tangor Ellendale/Page	Fruta	Paysandú
AL23FNCA	2012	Mandarina Nova	Fruta	Paysandú
AL24FNCA	2012	Mandarina Nova	Fruta	Paysandú
AL26FNES	2012	Mandarina Nova	Fruta	Salto

AL27HNSA	2012	Mandarina Nova	Hoja	Paysandú
AL28FMM	2012	Tangelo Minneola	Fruta	Río Negro
AL29FSC	2012	Naranja Salustiana	Fruta	Argentina
AL30FMC	2012	Tangor Murcott	Fruta	Argentina
AL31HNSA	2012	Mandarina Nova	Hoja	Paysandú
AL32FNQ25	2013	Mandarina Nova	Fruta	Salto
AL33FNQ25	2013	Mandarina Nova	Fruta	Salto
AL34FNQ25	2013	Mandarina Nova	Fruta	Salto
AL35FNQ25	2013	Mandarina Nova	Fruta	Salto
ICE AI 51	2011	Tangor Ellendale	Fruta	Salto
ICE AI 52	2012	Naranja Valencia	Fruta	Salto
ICE AI 53	2012	Naranja Valencia	Fruta	Salto
ICE AI 54	2012	Naranja Valencia	Fruta	Salto
ICE AI 55	2012	Naranja Valencia	Fruta	Salto
ICE AI 56	2012	Tangor Ellendale	Fruta	Salto
ICE AI 57	2012	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 58	2012	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 59	2012	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 60	2012	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 61	2012	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 62	2012	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 63	2012	Limón	Fruta	Salto
ICE AI 64	2012	Limón	Fruta	Salto
ICE AI 65	2012	Limón	Fruta	Salto
ICE AI 66	2012	Mandarina Nova	Hoja	Canelones
ICE AI 67	2012	Mandarina Nova	Hoja	Canelones
ICE AI 68	2014	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 69	2014	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 70	2014	Mandarina Nova	Fruta	San José
ICE AI 71	2014	Mandarina Nova	Hoja	San José
ICE AI 72	2014	Mandarina Nova	Hoja	San José
ICE AI 73	2014	Mandarina Nova	Hoja	San José
SH-MIL	2013	Tangelo Minneola	s/d	EE.UU
AC 325	s/d	Limón rugoso	s/d	EE.UU
A033	s/d	s/d	s/d	España
A046	s/d	s/d	s/d	España
A051	s/d	s/d	s/d	España

Nota. Los aislamientos de Argentina fueron cedidos por el Ing. Agr. Sergio Garrán, los de EE.UU por Dr. L. Timmer y los de España por Dr. A. Vicent. s/d=sin dato

Para confirmar la patogenicidad de los aislamientos realizados, en primer lugar se siguió el procedimiento propuesto por Canihos *et al.*, 1999 con modificaciones, para inducir la producción de conidios y su posterior extracción. La colonia de cada aislamiento crecida en PDA se cortó en cuadraditos de 0.5 mm de lado que fueron transferidos a una placa con un medio con carbonato de calcio (30 g.L⁻¹ de CaCo₃, 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 20 g.L⁻¹ de agar). A cada placa se le agregó agua destilada estéril y fueron incubadas con luz fluorescente durante 4 días a 27°C. Los conidios se extrajeron añadiendo agua destilada estéril con Tritón X100 al 1% como agente tensoactivo. Posteriormente, para confirmar la patogenicidad, se realizó la inoculación de hojas desprendidas según Vicent *et al.*, 2004 con modificaciones. La suspensión de conidios obtenida se ajustó a una concentración de 10⁵ conidios/ml mediante cámara Neubauer, y se inocularon por aspersión 3 hojas de mandarina Nova en estado de desarrollo B2 por aislamiento. Se colocaron en cámara húmeda en condiciones de oscuridad y temperatura de 29°C, junto con un tratamiento control inoculado con agua. La evaluación de los síntomas se realizó a las 24, 36 y 48 horas.

3.2 Velocidad de crecimiento

Para evaluar la velocidad de crecimiento de la colonia se utilizaron 57 aislamientos mencionados en la Tabla 3.1, exceptuando los aislamientos

ICE AI 68 al ICE AI 73. Se realizó en medio de cultivo PDA y fue estimada según Andersen *et al.* (2005) con algunas modificaciones. El diámetro de la colonia fue evaluado a los 5 y 9 días de crecimiento en placa. Se partió de placas con una colonia única y pura con una semana de crecimiento a 27°C. De la zona de crecimiento activo se tomó un disco con un sacabocados estéril de 1,1 cm de diámetro y se sembró en el centro de una placa con PDA del que previamente se extrajo un disco de medio de diámetro similar. Las placas se incubaron a 30°C en oscuridad. Se realizaron tres repeticiones por aislamiento. El ensayo fue realizado en tres subgrupos en fechas diferentes, el primero con 15 aislamientos y los otros dos con 21 aislamientos cada uno. En los subgrupos segundo y tercero se incluyeron tres aislamientos testigos (AI 17, AI 12 y AI 32) incluidos en el primer ensayo, con velocidad de crecimiento baja, media y alta respectivamente para poder unificar los datos. A los 5 y 9 días se evaluó el crecimiento midiendo dos diámetros ortogonales de cada colonia. Se promediaron los valores de ambos ejes, y con ellos se calculó el crecimiento promedio de cada fecha de evaluación y el desvío estándar de las tres repeticiones respecto al promedio. Para el experimento se consideró un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los promedios del crecimiento del micelio de todos los aislamientos fue sujeto a un análisis de varianza (ANAVA) y las diferencias mínimas significativas entre las medias de los tratamientos se analizaron por el test de Tukey Kramer ($p \leq 0.05$). Se utilizó el

procedimiento estadístico GLM del paquete estadístico SAS®, versión 9.4.

3.3 Morfología de colonias y conidios

Luego del ensayo de velocidad de crecimiento, se realizaron observaciones de la morfología de las colonias de *A. alternata* en PDA. También se observó la morfología de colonia de las repeticiones de un mismo aislamiento hechas en el ensayo de velocidad de crecimiento, para determinar si existen diferencias morfológicas entre estas. Se tuvo en cuenta el color, la textura y la forma del borde de la colonia. Con algunas de las suspensiones obtenidas en el ensayo de patogenicidad se realizaron observaciones de la morfología de los conidios al microscopio óptico.

3.4 Extracción de ADN genómico

La producción y extracción de conidios se realizó de la misma manera que en el ensayo de patogenicidad. La suspensión de conidios obtenida fue inoculada en el medio Caldo de Papa Dextrosa (PDB por sus siglas en inglés) e incubada durante una semana con agitación para inducir producción de masa micelial. El micelio fue filtrado y luego molido en

mortero con nitrógeno líquido. A partir del molido se realizó la extracción de ADN mediante DNeasy® Plant mini kit de Qiagen según protocolo del fabricante. Las concentraciones de ADN se midieron utilizando el equipo NanoDrop.

3.5 Secuenciación de la región D1/D2

Amplificación por PCR y secuenciado de la región D1/D2

Para la amplificación se utilizaron los cebadores descritos por Kurtzman y Robnett, 1998 (Tabla 3.2). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 100 µl conteniendo 1X Buffer $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (Fermentas®), 1,5 mM de MgCl_2 , 250 µM de cada dNTP, 0,35 mM de ambos cebadores, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas®) y 1 µl de ADN con una concentración de 10 ng. Las condiciones del ciclo de reacción fueron 5' a 95°C; 30 ciclos de 1' a 94°C, 2' a 56°C y 2' a 72°C, y extensión final 10' a 72°C según Kurtzman y Robnett, 1998 con modificaciones. El termociclador utilizado fue el modelo Prime de la marca Techne.

Las electroforesis para visualizar los productos de amplificación se realizaron en gel de agarosa 1,5 % en solución Buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) durante 45 minutos a 65 V. Se

cargaron 3 µl de las muestras y junto a estas se incluyó un pocillo con 3 µl del marcador λ /HindIII (ADN de λ digerido con la enzima HindIII) para poder estimar su peso molecular, y la concentración de las muestras por comparación con la intensidad de fluorescencia. Previamente se agregó 1 µl de Stop Buffer a cada muestra y al marcador. Este se preparó en el laboratorio con EDTA 0.1 M, Bromophenol Blue 0.1%, Xylene Cyanol 0.2%, glicerol 50% y SDS 1%. Luego de la electroforesis se realizó la tinción con Bromuro de Etidio (1 µg/ml) durante 5 minutos y se fotografió bajo luz Ultravioleta. Los productos de PCR fueron enviados para su purificación y secuenciación a la empresa Macrogen Inc. Seúl, Corea.

Tabla 3.2. Cebadores utilizados para la amplificación de la región D1/D2

Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5´- 3´)
NL- 1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL- 4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Análisis filogenético

Las secuencias enviadas por Macrogen fueron editadas y corregidas utilizando la información de ambas hebras secuenciadas, mediante el programa BioEdit versión 7.0.1 (Hall, 1999). Se realizó el alineamiento de las secuencias que presentaron buena calidad y las secuencias alineadas fueron llevadas a la misma longitud, mediante el programa MEGA versión

6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Paralelamente se realizó otro alineamiento incluyendo las secuencias parciales del gen 26S de ARNr de la cepa IFM 41348 de *Alternaria alternata* (número de acceso AB100675.1) y de la cepa EGS 34-015 de *Alternaria tenuissima* (número de acceso EF031053.1) obtenidas de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Para cada uno de los dos alineamientos se construyó un árbol filogenético mediante el método basado en distancias Neighbor-joining, el modelo de sustitución de nucleótidos Jukes-Cantor, y para asegurar la confiabilidad del agrupamiento se realizó el test de bootstrap con 1000 repeticiones. Para esto se utilizó el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

3.6 Secuenciación de un fragmento del gen endoPG

Amplificación por PCR y secuenciado de endoPG

Para la amplificación de 489 pares de bases del gen endoPG se utilizaron los cebadores descritos por Peever *et al.*, 2002 (Tabla 3.3).

Previamente a la amplificación de las muestras se ajustó la reacción de PCR incluyendo el marcador de peso molecular λ /HindIII para confirmar

que se obtenía una banda única, del tamaño esperado y en cantidades suficientes para su secuenciación.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 100 µl conteniendo 1X Buffer $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (Fermentas®), 2,5 mM de MgCl_2 , 200 µM de cada dNTP, 0,4 mM de ambos cebadores, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas®) y 1 µl de ADN con una concentración de 10 ng. Las condiciones del ciclo de reacción fueron 2' a 95°C; 35 ciclos de 1' a 95°C, 1' a 50°C y 1' a 72°C, y extensión final 5' a 72°C según Peever *et al.*, 2002. El termociclador utilizado fue Perkin Elmer.

Para confirmar la amplificación, se cargaron 3 µl de cada reacción con 1 µl de Stop Buffer, en un gel de agarosa 1% en Buffer TAE 1X y se realizó la electroforesis a 60 V durante 45 min. Junto con las muestras se incluyó un pocillo con un marcador de peso molecular similar. Luego de la electroforesis se realizó la tinción con Bromuro de Etidio (1 µg/ml) durante 5 minutos y se fotografió bajo luz Ultravioleta. Los productos de PCR fueron enviados para su purificación y secuenciación a la empresa MacroGen Inc. Seúl, Corea.

Tabla 3.3. Cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen endoPG

Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')
PG2	RCARTCRTCYTGRTT
PG3	TACCATGGTTCTTTCCGA

Análisis filogenético

Las secuencias enviadas por Macrogen fueron editadas y corregidas utilizando la información de ambas hebras secuenciadas, mediante el programa BioEdit versión 7.0.1 (Hall, 1999). Se realizó el alineamiento de las 57 secuencias, que resultaron tener buena calidad, y las secuencias alineadas fueron llevadas a la misma longitud, mediante el programa MEGA versión 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

Se construyó un árbol filogenético mediante el método basado en caracteres Máxima Verosimilitud, el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2 parámetros y test de bootstrap con 1000 repeticiones. Se utilizó el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

3.7 Conservación de cepas de hongos

Las cepas fueron conservadas mediante tres métodos. Uno de ellos fue el Método de Castellani o Preservación en agua destilada. Las colonias puras del hongo crecidas en PDA fueron cortadas en cuadraditos y colocadas en un pequeño frasco conteniendo agua destilada esterilizada. El frasco fue posteriormente sellado y almacenado a 4°C (Dhingra y Sinclair, 1995).

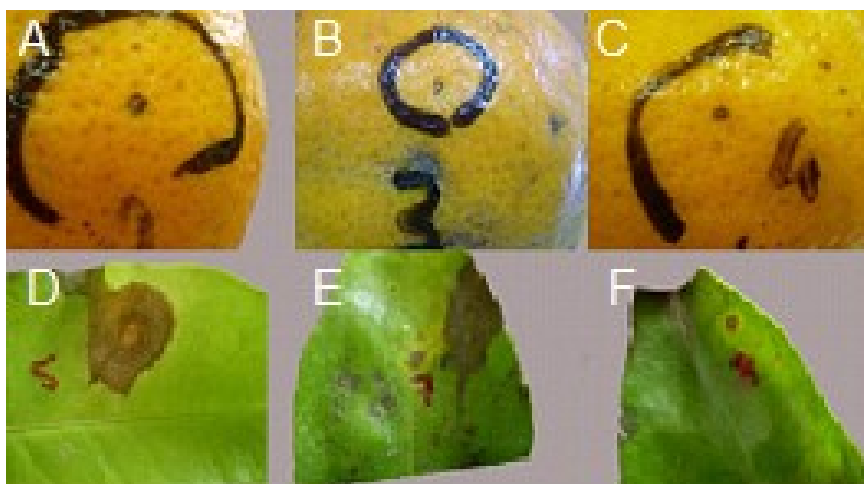
Para el método de conservación en papel desecado (Peever *et al.*, 1999) se repicaron los aislamientos en placas de Petri conteniendo PDA y se colocaron trozos de papel de filtro de 1 cm², previamente esterilizados en autoclave, adyacentes al inóculo. Se incubaron a 27°C, hasta que el micelio cubriera la superficie del papel de filtro. Los trozos de papel fueron retirados de la placa, colocados en sobres de papel estériles, secados en estufa y conservados a -20°C.

El tercer método utilizado fue la suspensión de conidios en glicerol. Se obtuvo una solución de conidios según describió Canihos *et al.* (1999). Los conidios extraídos fueron cuantificados mediante Cámara Neubauer. A la suspensión de conidios con concentración de 10⁶ conidios/ml se le agregó glicerol estéril a una concentración final de 28%, la mezcla fue homogeneizada con pipeta y colocada en criotubos identificados, a -80°C.

4 RESULTADOS

4.1 Obtención de aislamientos y confirmación de patogenicidad

Fue posible realizar seis aislamientos a partir de síntomas producidos por *Alternaria alternata* tanto en frutos como en hojas de mandarina Nova del sur del país. Los aislamientos resultaron ser patógenos luego de realizar el ensayo de patogenicidad. En la Figura 4.1 se muestra el síntoma y las colonias provenientes de aislamientos de cada mancha. Estos aislamientos fueron incluidos en la colección de *A. alternata* existente en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE.



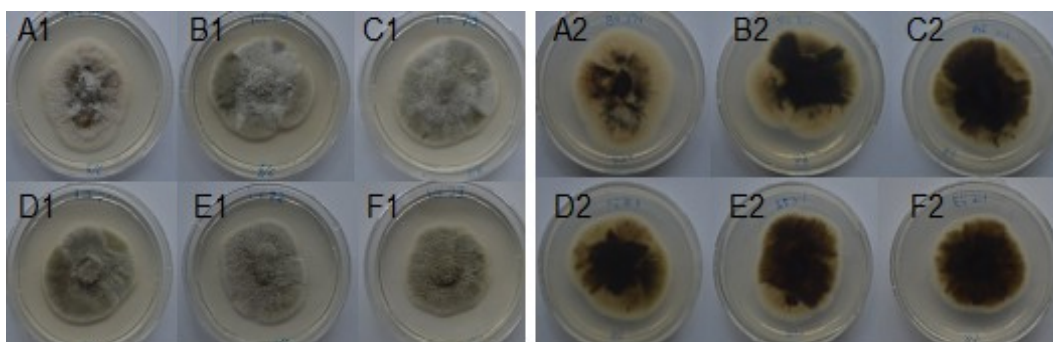


Figura 4.1. Colonias de aislamientos de *A. alternata* de síntomas en frutos y hojas de mandarina Nova (A-F). Haz (1) y envés (2) de las colonias crecidas en PDA.

4.2 Velocidad de crecimiento

Se evaluó el diámetro de las colonias a los 5 días de crecimiento en placa. No fue posible evaluar a los 9 días debido a que algunos aislamientos alcanzaron el borde de la placa. De los tres aislamientos testigo sólo se utilizó Al 32 para unificar estadísticamente los tres subgrupos de aislamientos, ya que fue el que presentó la menor varianza. Se observó variación estadísticamente significativa en las velocidades de crecimiento de los distintos aislamientos. La representación gráfica permitió identificar visualmente tres grupos con rangos de velocidad de crecimiento baja (diámetro de colonia de hasta 30 mm), media (entre 30 y 50 mm) y alta (mayor de 50 mm) (Figura 4.2). La mayoría de los aislamientos se ubicaron en el segundo grupo.

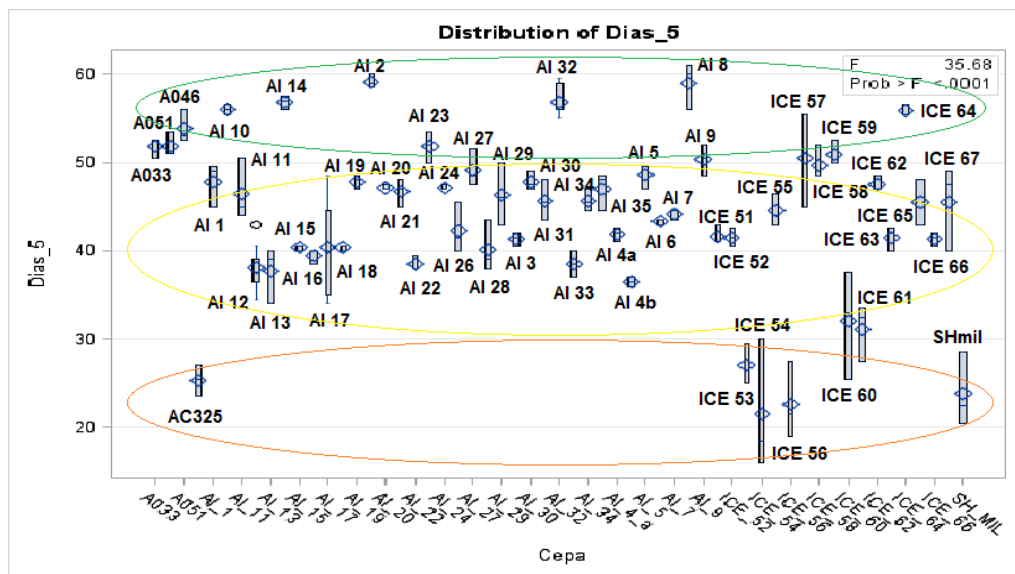


Figura 4.2. Velocidad de crecimiento de aislamientos de *A. alternata* en PDA a los 5 días a 30°C. Se compararon los diámetros (en mm) de las colonias. Los círculos de color naranja, amarillo y verde engloban a los aislamientos por su velocidad de crecimiento baja, media y alta respectivamente.

4.3 Morfología de colonias y conidios

Se observaron diferencias en la morfología de las colonias tanto dentro como entre aislamientos, y en la morfología de los conidios entre aislamientos (Figuras 4.3 y 4.4). El color del micelio, varió, según los aislamientos, de color gris claro a oscuro, gris verdoso o marrón y el envés de la colonia de color negro, gris oscuro o marrón claro a oscuro, uniforme o con vetas. La zona de crecimiento presentaba un borde entero o irregular y la textura del micelio era de afelpada a algodonosa. Los conidios presentaron diferencias en el tamaño y la forma. Dado que una

caracterización morfológica no estaba dentro de los objetivos, no se realizó una cuantificación de dichas características.

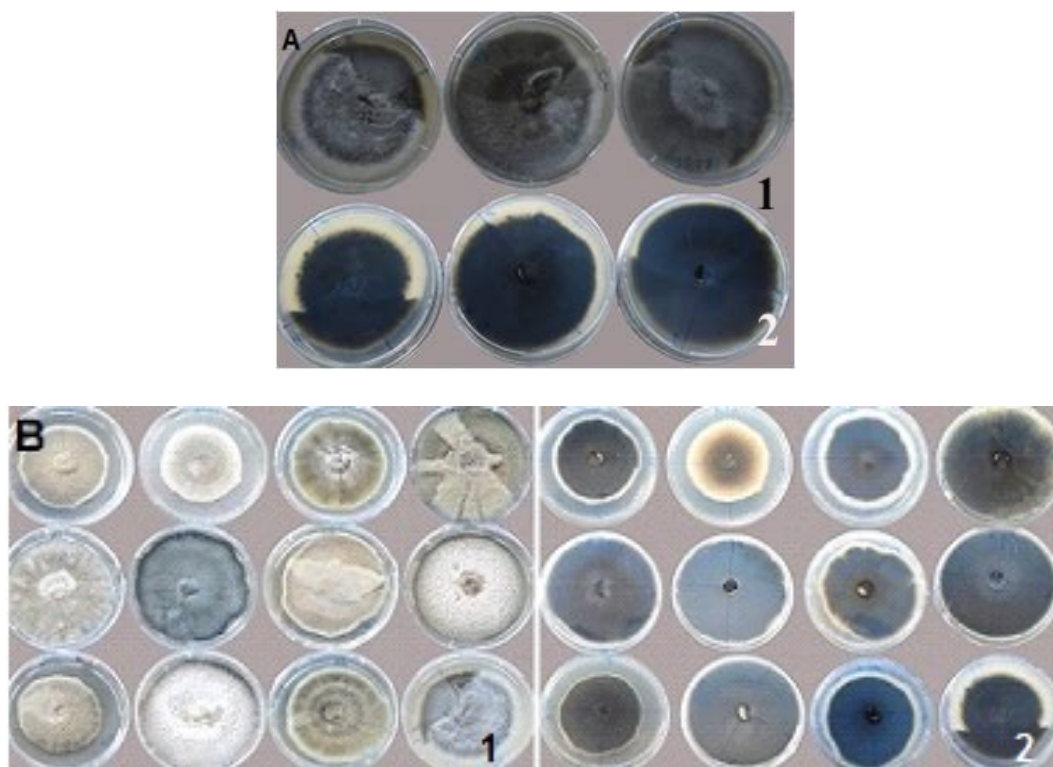


Figura 4.3. Diferencias de morfología dentro de un aislamiento (A) y entre aislamientos (B), en haz (1) y envés (2) de colonias de *A. alternata* crecidas en PDA.

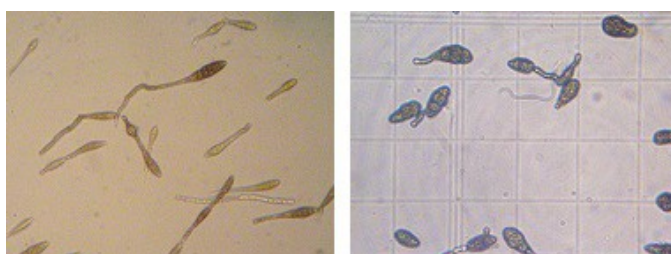


Figura 4.4. Diferencias morfológicas en los conidios entre dos aislamientos de *A. alternata*. 40x.

4.4 Secuenciación de la región D1/D2

Amplificación por PCR y secuenciado de la región D1/D2

En la electroforesis de los productos de PCR para la región D1/D2 se observaron bandas de los tamaños esperados (aproximadamente 600 pares de bases) y de concentraciones de ADN cercanas a 20 ng/μl para los 57 aislamientos amplificados (Figura 4.5).

Las secuencias que presentaron buena calidad fueron 36 correspondientes a 32 aislamientos de nuestro país (25 del norte y 7 del sur), 2 de Argentina, 1 de España y 1 de EE.UU.

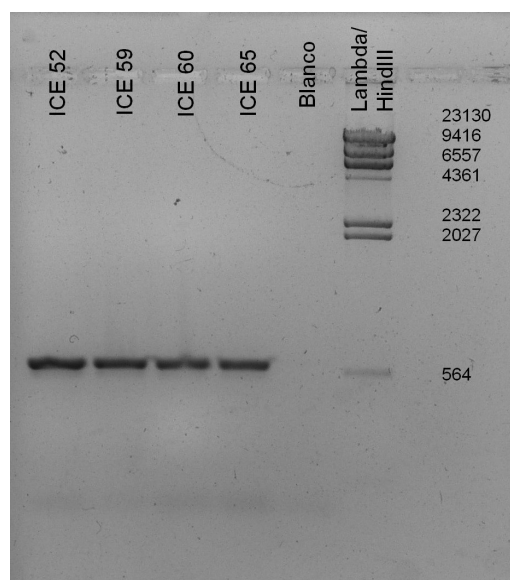


Figura 4.5. Amplificación por PCR de la región D1/D2. El marcador de peso molecular es λ /HindIII. Blanco: sin ADN molde

Análisis filogenético

La longitud de las secuencias en el alineamiento fue de 548 nucleótidos y en el alineamiento que incluye las cepas de Genbank fue de 554 por la presencia de gaps. Se observó gran homología entre las secuencias estudiadas y para los aislamientos que presentaron diferencias de nucleótidos éstas ocurrieron hacia el extremo 3'. Estos fueron: SH mil con diferencias en dos nucleótidos, ICE 55 en un nucleótido e ICE 60 en dos, respecto a las secuencias del resto de los aislamientos (Ver Anexo).

En la Figura 4.6 se muestra el árbol filogenético realizado a partir del alineamiento de las secuencias de 36 aislamientos pertenecientes a la colección de *A. alternata*. En la Figura 4.7 se muestra el árbol realizado incluyendo también las secuencias parciales del gen 26S de ARNr de la cepa IFM 41348 de *A. alternata* y de la cepa EGS 34-015 de *Alternaria tenuissima*.

El primer árbol tuvo un fuerte apoyo de bootstrap (cercano a 70%) para el nodo que agrupa a aislamientos nacionales, los de Argentina y el de España, separándose de dos aislamientos nacionales y del aislamiento de Florida-EE.UU. En el segundo árbol se agruparon los aislamientos nacionales, los de Argentina, el de España y la secuencia de *A. alternata* obtenida de Genbank con una fiabilidad mayor al 70% separándose significativamente de la secuencia fuera de grupo y del aislamiento de Florida-EE.UU. Dentro del agrupamiento de cepas de Uruguay, con una

fiabilidad del 58%, se separaron dos aislamientos (ICE 55 e ICE 60) que difieren entre sí en su hospedero y origen geográfico, que a su vez se agruparon con la cepa *A. alternata* de Genbank.

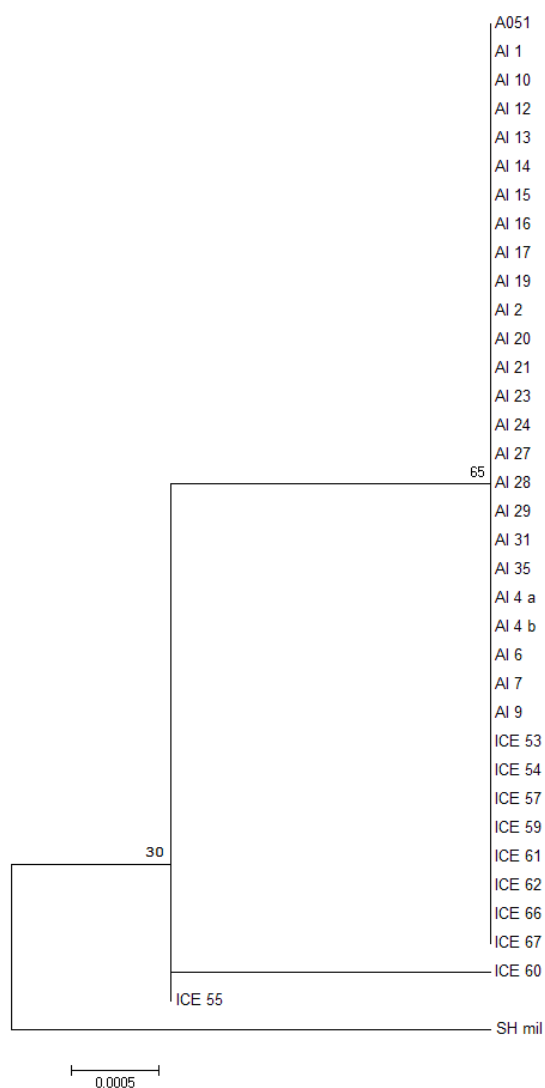
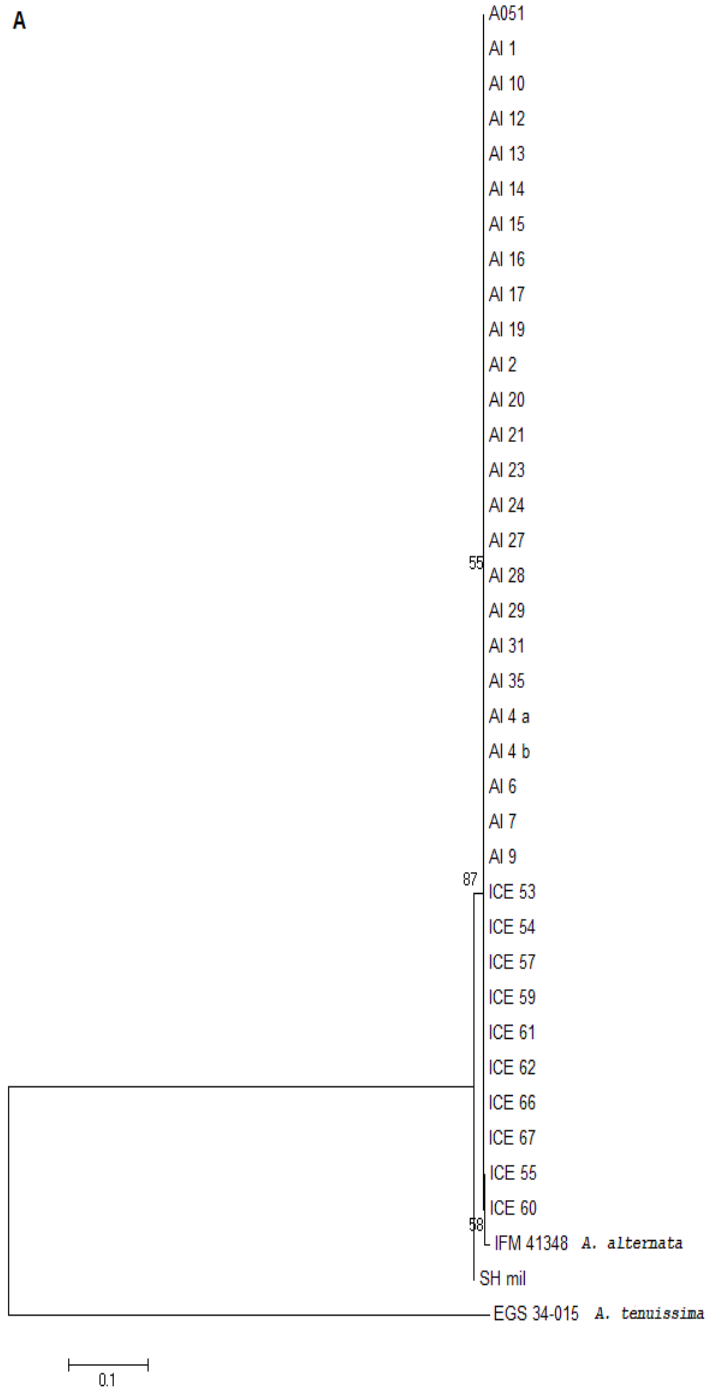


Figura 4.6. Árbol filogenético construido a partir de la región ribosomal D1/D2 del gen 26S para 36 aislamientos de la colección de *A. alternata*. Se utilizó el método basado en distancias Neighbor-joining y el modelo de sustitución de nucleótidos Jukes-Cantor. Los porcentajes en los nodos indican el apoyo de bootstrap para 1000 repeticiones. La barra indica la distancia genética de 0.0005 sustituciones por posición de nucleótido.



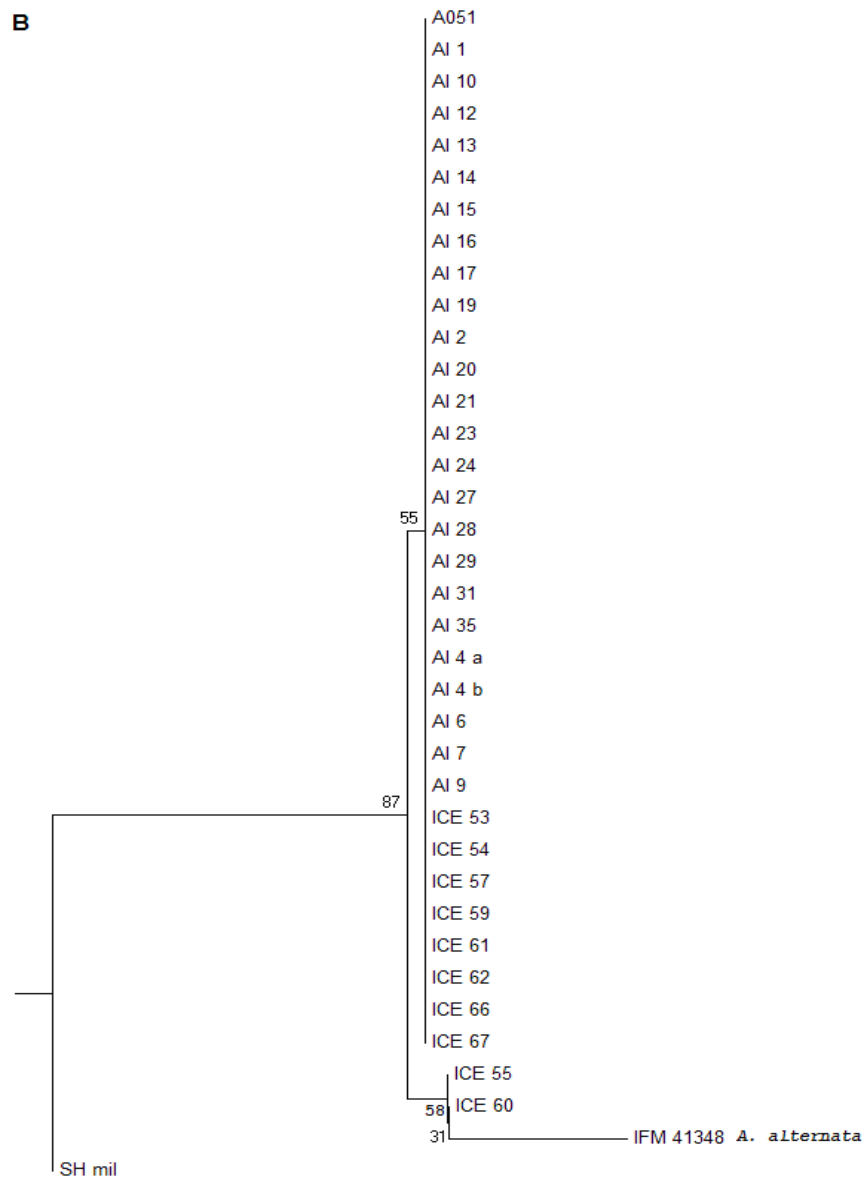


Figura 4.7. A. Árbol filogenético construido a partir de la región ribosomal D1/D2 del gen 26S, para 36 aislamientos de la colección de *A. alternata* y dos cepas de Genbank. Se utilizó el método basado en distancias Neighbor-joining, el modelo de sustitución de nucleótidos Jukes-Cantor y análisis de bootstrap para 1000 repeticiones. La barra indica una distancia genética de 0.1. En **B** se muestran las relaciones filogenéticas dentro del clado que presenta bootstrap de 87%.

4.5 Secuenciación de un fragmento del gen endoPG

Amplificación por PCR y secuenciado de endoPG

En la electroforesis de los productos de PCR para la secuencia parcial del gen endoPG se observaron bandas de los tamaños esperados (aproximadamente 489 pares de bases) y de concentraciones de ADN cercanas a 20 ng/ μ l para los 57 aislamientos amplificados (Figura 4.8).

Las secuencias de los 57 aislamientos presentaron buena calidad, correspondientes a 49 aislamientos de nuestro país (41 del norte y 8 del sur), 3 de Argentina, 3 de España y 2 de EE.UU.

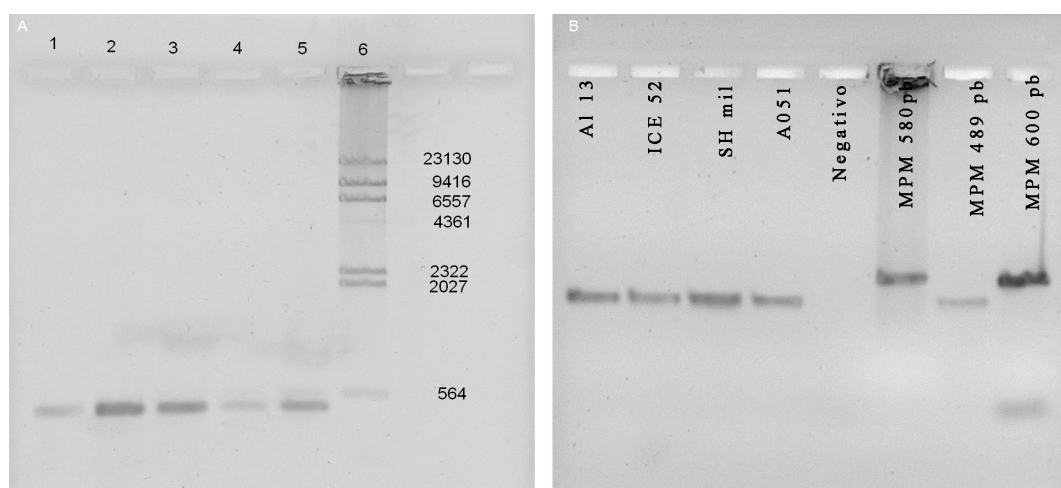


Figura 4.8. A. Ajuste de PCR de un fragmento del gen endoPG. Carriles: 1: 1 μ l de Rx de 100 μ l, 2: 10 μ l de Rx de 100 μ l, 3: 20 μ l de Rx de 100 μ l, 4: 1 μ l de Rx de 25 μ l, 5: 10 μ l de Rx de 25 μ l y 6: λ /HindIII. **B.** Amplificación por PCR de un fragmento de endoPG. MPM: marcador de peso molecular. Negativo: sin ADN molde.

Análisis filogenético

La longitud de las secuencias en el alineamiento fue de 437 y se observaron diferencias en varias posiciones de nucleótidos (Ver Anexo).

En la Figura 4.9 se muestra el árbol filogenético realizado a partir del alineamiento de las secuencias de 57 aislamientos pertenecientes a la colección de *A. alternata*. En el árbol se observaron cuatro clados. El Clado 1, con un fuerte apoyo de bootstrap (95%) agrupó a 16 aislamientos de distintos orígenes geográficos: nacionales tanto del sur como del norte del país, uno de Argentina y otro de EE.UU. En cuanto al hospedero, 13 de los 16 provinieron de mandarina Nova (13/16) y 3 de los 16 de tangelos Minneola y Orlando (3/16). En el Clado 2 (bootstrap de 51%) se agruparon 13 aislamientos: nacionales (mayoritariamente del norte) y dos de Argentina. Fueron obtenidos de mandarina Nova (6/13), de tangores Ellendale y Murcott (4/13), y de naranjas Valencia y Salustiana (3/13). El Clado 3 presentó bootstrap de 62%, agrupó 5 aislamientos solamente nacionales del sur y norte, obtenidos de mandarina Nova (3/5), tangor Ellendale (1/5) y naranja Valencia (1/5). En el Clado 4, con un alto porcentaje de bootstrap (70%), se agruparon 17 aislamientos: nacionales del sur y norte, los tres de España y uno de EE.UU. Los hospederos de los que provenían eran mandarina Nova (6/17), tangelos Minneola y Orlando (4/17), limón (3/17) y limón rugoso (1/17), para los de España no se tiene dato del hospedero. Seis

aislamientos no se agruparon en ninguno de estos clados, son nacionales del norte y sur, de mandarina Nova (2/6), tangor Ellendale (3/6) y naranja Valencia (1/6).

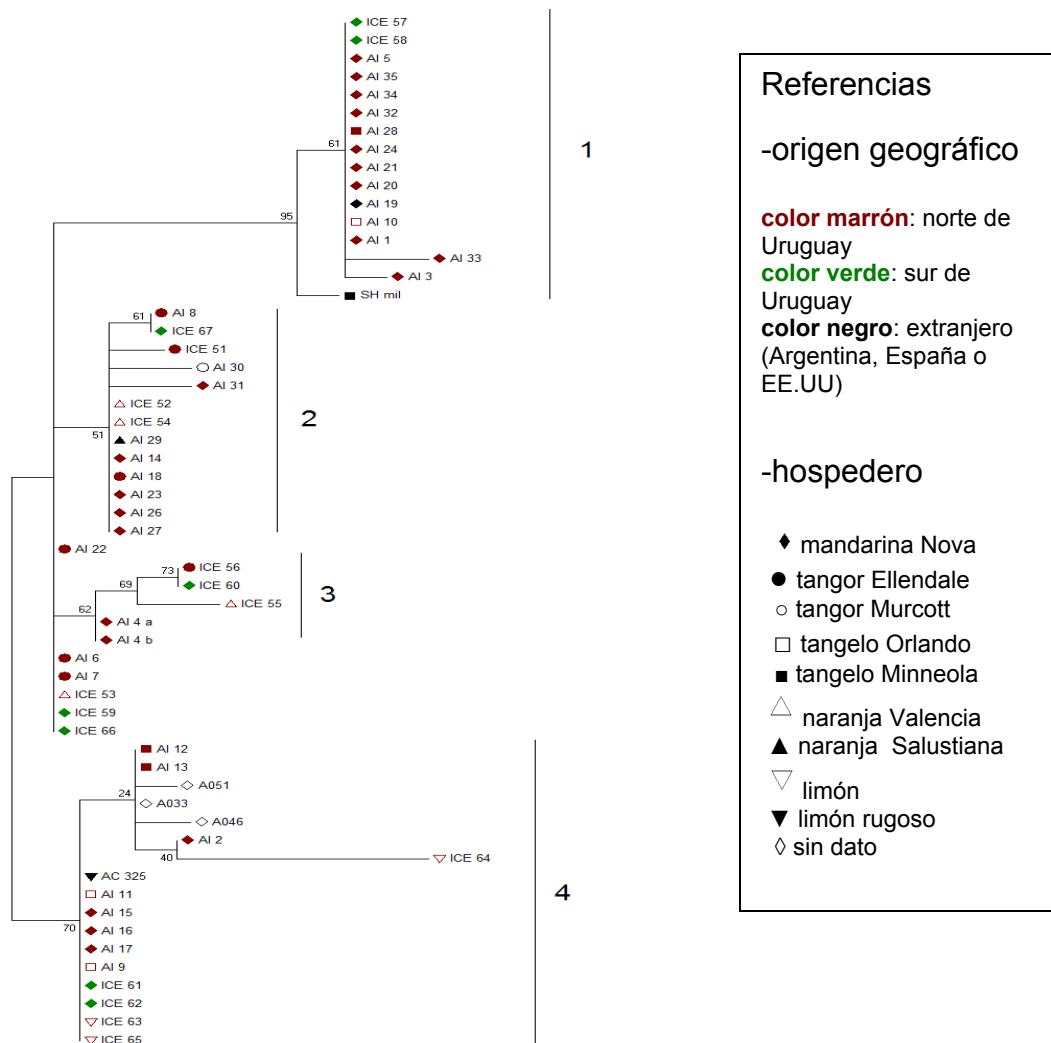


Figura 4.9. Árbol filogenético construido a partir de un fragmento del gen endoPG para 57 aislamientos de la colección de *A. alternata*. Se utilizó el método basado en caracteres Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2 parámetros. Los porcentajes en los nodos indican el apoyo de bootstrap para 1000 repeticiones.

5 DISCUSIÓN

Este trabajo representa la primera determinación a nivel molecular de *Alternaria alternata* presente en plantas cítricas de nuestro país, así como la primera caracterización de aislamientos de *Alternaria alternata* obtenidos de diferentes especies cítricas y regiones productoras, por métodos fisiológicos y moleculares.

En cuanto a la caracterización fenotípica por aspectos fisiológicos, el ensayo de velocidad de crecimiento en PDA permitió separar a los aislamientos en tres grupos con diferente rango de velocidad. En el ensayo realizado por Andersen *et al.* (2005) el diámetro de la colonia de *A. alternata* en el medio de cultivo Dichloran Rosa de Bengala y en Agar Sacarosa Extracto Levadura (DRYES por sus siglas en inglés) se midió luego de 7 días y a diferentes temperaturas, siendo a 30°C de 51 $\pm$ 7 mm. Aunque su ensayo se realizó en otro medio de cultivo y se midió luego de 7 días y no 5, la mayoría de nuestros aislamientos se ubicaron en ese rango de crecimiento.

Por su parte, en la observación de aspectos macro y micro morfológicos, se identificaron diferencias en la morfología de las colonias entre e incluso dentro de un mismo aislamiento, y de los conidios entre los aislamientos. Sin embargo la variabilidad observada dentro de un mismo aislamiento no lo harían un método confiable en la caracterización (Hong *et al.*, 2005; Andrew *et al.*, 2009).

El agrupamiento obtenido a partir de la secuenciación de la región ribosomal D1/D2 del gen 26S confirmó la identidad de los aislamientos estudiados como *A. alternata* al estar incluidos en el mismo clado que la cepa de *A. alternata* de Genbank. En cuanto a la caracterización por esta región, si bien el análisis filogenético no se validó con otros métodos de agrupamiento, los aislamientos nacionales se separaron con un fuerte apoyo de bootstrap de la secuencia de Florida-EE.UU y de la secuencia fuera de grupo. Sin embargo, la región estudiada no resultó ser discriminatoria en esta especie para esta población, sólo lográndose separar dos aislamientos nacionales del resto, y dicha separación no se correlacionó ni con el hospedero ni con la región geográfica.

Por su parte, el análisis de secuencia del fragmento del gen endoPG, permitió agrupar a los aislamientos en diferentes clados. En el análisis no se incluyó un grupo externo, debido a la no existencia en Genbank de secuencias registradas de ese fragmento para otras especies que pudieran ser utilizadas como tal. Respecto a una correlación geográfica de dicha separación, esta sólo se observó para los aislamientos de España. En cuanto a una correlación con el hospedero, a pesar de que éstos tuvieron diferente representación en la muestra estudiada, se observó una tendencia en el agrupamiento. Los aislamientos provenientes de tangores (híbridos de mandarina y naranja) se ubicaron en los Clados 2 y 3 así como los obtenidos de naranja. Los obtenidos de tangelos

(híbridos de mandarina y pomelo) se ubicaron en los Clados 1 y 4 agrupándose con los de limón y limón rugoso sólo presentes en el Clado 4. Por su parte, los obtenidos de mandarina se ubicaron en los cuatro clados.

Al igual que para el agrupamiento obtenido a partir de la región D1/D2, los mismos dos aislamientos nacionales se agruparon juntos aunque sin evidenciar correlación con región geográfica ni hospedero. A diferencia de la región D1/D2, la secuencia parcial del gen endoPG resultó informativa y discriminatoria entre los aislamientos estudiados.

En la literatura mencionada en este trabajo, se han utilizado marcadores moleculares que permitieron detectar diferencias genotípicas entre los aislamientos de *A. alternata* estudiados. Estos son la secuencia parcial del gen endoPG, mediante análisis de sus haplotipos (Peever *et al.*, 2002), la secuencia de este gen y las regiones anónimas OPA1-3 y OPA2-1 (Peever *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2014) y las mismas regiones y además la región flanqueante de microsatélites Flank-F3 (Stewart *et al.*, 2014). A través del análisis de los haplotipos de la secuencia parcial de endoPG y utilizando los otros marcadores antes descritos, se podría realizar una caracterización de nuestros aislamientos.

6 CONCLUSIONES

El agrupamiento obtenido a partir de la secuencia de la región ribosomal 26S confirmó la identidad de los aislamientos estudiados como *Alternaria alternata*. En cuanto a la caracterización, la región D1/D2 agrupó con alta fiabilidad todos los aislamientos nacionales, separando únicamente el aislamiento de EE.UU.

Por su parte, la secuencia parcial del gen endoPG permitió detectar diferencias genotípicas dentro de la población de *A. alternata* agrupando los aislamientos en cuatro clados. Se evidenció una correlación de dicha separación con la región geográfica solamente para los aislamientos de España. En cuanto a una correlación con el hospedero, se observó una tendencia de agrupamiento.

El ensayo de velocidad de crecimiento en PDA permitió separar los aislamientos en tres grupos con diferente rango de velocidad. En cuanto a la observación de las características morfológicas de las colonias y de los conidios, se pudieron identificar diferencias.

7 PERSPECTIVAS

Sería fundamental contar con un método genotípico, por ejemplo basado en PCR, para detectar *Alternaria alternata* patotipo mandarina que afecta cítricos y que lo diferencie de los aislamientos saprófitos. Esto permitiría una identificación más rápida pudiendo así detectar la enfermedad en una etapa temprana. Además, se evitarían los inconvenientes en la comercialización generados por una incorrecta identificación debido a la similitud de sus síntomas con algunos patógenos que presentan restricciones fitosanitarias.

Dada la variabilidad observada entre aislamientos en el ensayo de velocidad de crecimiento, sería importante poder determinar si ésta correlaciona con alguna de las características epidemiológicas como la capacidad del patógeno de infectar y establecerse en la planta.

En cuanto al estudio de la diversidad genotípica de nuestros aislamientos, sería útil realizar un análisis de haplotipos de la secuencia parcial del gen endoPG y posteriormente secuenciación utilizando los otros marcadores moleculares empleados por otros investigadores, y que han sido exitosos en la caracterización. De esta manera se podrían universalizar los resultados y determinar si nuestros aislamientos pertenecen a alguno de

los linajes existentes y si es así a cuál o cuáles de ellos, o si pertenecen a un linaje no descrito antes.

Por lo anterior se evidencia la importancia de contar con una colección de organismos patógenos para la identificación de especímenes, estudios de variabilidad genética en el espacio y en el tiempo, evaluación de resistencia a plaguicidas, resistencia del hospedero a la enfermedad, etc. Además, los organismos internacionales exigen a sus países miembros contar con especímenes viables de los patógenos presentes en su territorio, así como con la información básica para su identificación y ubicación. Es de fundamental importancia que dicha colección sea mantenida por diferentes métodos conociendo previamente las condiciones de conservación de esos patógenos y el tiempo que se mantienen viables en dichas condiciones. Por esto, sería útil evaluar la eficiencia de los métodos de conservación utilizados en este trabajo.

8 BIBLIOGRAFÍA

Akimitsu, A., Peever, T.L., Timmer. 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. Mol. Plant. Path. 4: 435-446.

Andersen, B., Hansen, M.E., Smedsgaard, J. 2005. Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. Phytopatology 95: 1021-1029.

Andrew, M., Peever, T.L., Pryor, B.M. 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. Mycologia 101:95-109.

Bernal, R. 2009. Control de Sarna y *Alternaria* en Cítricos. Serie de Actividades de difusión INIA. Nro. 575. Salto. 24 de Junio.

Bial-Aristegui. 2002. Rev. Iberoam. Micol. pp. 19-21

Canihos, Y., Peever, T., Timmer, L. 1999. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* sp. Plant Dis. 83:429-433.

Caputi, P., Montes, F. 2010. Plan estratégico y diseño institucional para el sector citrícola de Uruguay Proyecto TCP/URU/3301-FAO 106p.

Claro de Souza, M., Sánchez Stuchi, E., de Goes, A. 2009. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. Scientia Horticulturae 123: 1-4.

DGSSAA. 2009. Clínica de diagnóstico Fitopatológico. Departamento Laboratorios Biológicos. Informe interno.

DGSSAA, 2012. Clínica de diagnóstico Fitopatológico. Departamento Laboratorios Biológicos. Informe interno.

DIEA, 2010. Anuario Estadístico Agropecuario. 218 pp.

DIEA, 2012. Anuario Estadístico Agropecuario. 244 pp.

Dini-Andreote, F., Pietrobon, V.C., Silva Romão, A., Bellato, M., Araújo, W.L. 2009. Genetic variability of Brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. Braz. J. Microb. 40: 670-677.

Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. Basic plant pathology methods. 2 ed. Boca Raton: CRC Press. 1995. 434 p.

Elena, K. 2006. Alternaria brown spot of Minneola in Greece; evaluation of citrus species susceptibility. Europ. J. of Plant pathology 115: 259-262.

EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*). 2001. Appendix 1 (2001-01): EPPO A1 List of Pests Recommended for Regulation as Quarantine Pests.

Feichtenberger, E.; Spósito, M.B.; Pio, R.M.; Castro, J.L. 2005. Seleção de híbridos de tangerinas e híbridos de citros para tolerância à mancha marrom de Alternária (*Alternaria alternata* Keissler). Citricultura Atual, v.8, n.45, p.8-10.

Filajdic, N., Sutton, T.B. 1992. Influence of temperature and wetness duration on infection of apple leaves and virulence of different isolates of *Alternaria mali*. Phytopathology 82: 1279-1283.

Gardner, J.M., Kono, Y., Chandler, J.L. 1986. Bioassay and host selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rouge lemon and mandarins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 29: 293-304.

Goes, A., Montes de Oca, A.G., Reis, R.F. 2001. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* en mandarina Dancy en el estado de Rio Janeiro. Fitopatología Brasileira 26 (Supl) 386.

Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A.M. 1999. Developments in fungal Taxonomy. Clinical Microbiology Reviews. Vol 12 p 454-500.

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

Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Tsuge, T. 2002. A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. Genetics 161: 59–70.

Herrera-Isla. 1992. La mancha parda de los cítricos en Cuba. Levante Agrícola 2:49-50.

Hong, S.G, Liu, D., Pryor, B.R. 2005. Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. Mycol. Res. 109: 87-95.

- Huang, F., Fu, Y., Nie, D., Stewart, J., Peever, T.L., Li, H. 2014. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. *Fungal Biology* 1-11.
- Hutton, D.G., Mayers, P.E. 1988. Brown spot of Murcott tangor caused by *Alternaria alternata* in Queensland. *Australasian Plant Pathology* 17:69-73.
- Isshiki A., Akimitsu, K., Nishio, K., Tsukamoto, M., Yamamoto, H. 1997. Purification and characterization of an endopolygalacturonase from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*, the cause of citrus brown spot disease. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 51, 155–167.
- Isshiki, A., Othani, K., Kyo, M., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2003. Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. *Phytopathology* 93, 768–773.
- Jonsson, P., Rolfsen, W. 1989. Specific IgE *Alternaria alternata*. *Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* 90: 155-161.
- Kiely, T.B. 1964. Brown spot of emperor mandarin. *Agri. Gaz. New South Wales*, 75, 854–856.
- Kohmoto, K., Akimitsu, K., Otani, H. 1991. Correlation of resistance and susceptibility of Citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxin. *Phytopathology* 81:719-822.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- Lawrence, C.B., Mitchell, T.K., Craven, K.D., Cho, Y., Cramer Jr., R.A., Kim, K. 2008. At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *Plant Pathol J.* 24: 101-111.
- Lawrence, D.P, Gannibal, P.B., Peever, T.L., Pryor, B.M. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species group concepts. *Mycologia* 105(3): 530-546.
- Masunaka, A., Ohtani, K., Peever, T. L., Timmer, L. W., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2005. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology* 95:241-247.

Nasim, G., Khan, S., Khokhar, I. 2012. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship of some *Alternaria alternata* isolates Pak. J. Bot., 44: 1267-1270.

Ostry, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. 2008. World Mycotoxin Journal 1: 175-188.

Peever, T.L., Olsen, L., Ibañez, A., Timmer, L.W. 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. Phytopathology 90: 407-414.

Peever, T.L., Ibañez, A., Akimitsu, K., Timmer, L.W. 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. Phytopathology 97: 794-802.

Peever, T.L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L. 2004. Molecular systematics of Citrus associated *Alternaria* species. Mycologia 96 (1): 119-134.

Peever T.L., Carpenter-Boggs L., Timmer L.W., Carris L.M., Bhatia A. 2005. Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. Phytopathology 95(5):512-518.

Pegg, K.G. 1966. Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the casual organism of brown spot of Emperor mandarin. Queensland J. Agric. Anim. Sci 23:15-18.

Peres, N.A., Agostini, J.P., Timmer, L.W. 2003. Outbreaks of *Alternaria* Brown spot of citrus in Brazil and Argentina. Plant disease 87: 750.

Peres, N.A., Timmer, L.W. 2006. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. Crop protection 25: 454-460.

Pérez, E., Rubio, L. 2012. Control químico de la mancha marrón de los Citrus. Avances de resultados en Protección Vegetal Citrícola. INIA.

Pérez, E. 2012. Resultados de avances en investigación en protección vegetal citrícola. Serie de Actividades de difusión INIA Nro 688.

Pérez, E. 2013. Resultados de avances en investigación en protección vegetal citrícola. [www.inia.org.uy /otros documentos](http://www.inia.org.uy/otros documentos).

Pryor, B.M., Gilberston, R.L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. Mycol.Res. 104:1312-1321.

Reis, R.F.; de Almeida, T.F.; Stuchi, E.S.; de Goes, A. 2007. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria Brown spot. Scientia Horticulturae 113: 336-342.

Rubio, L. 2012. Resultados de avances en investigación en protección vegetal citrícola. Serie de Actividades de difusión INIA Nro 688.

Schutte, G.C., Lesar, K.H., Pelser, P.T., Swart, S.H., 1992. The use of tebuconazole for control of *Alternaria alternata* on Minneola tangelos and its potential to control post-harvest decay when applied as a pre-harvest spray. Proceedings of the International Society of Citriculture 7, 1070-1074.

Simmons, E.1992. *Alternaria* taxonomy. Current status, viewpoint, challenge. In: Chelkowski J; Visconti, A, editors. *Alternaria: Biology, plant diseases and metabolites*. Amsterdam. Elsevier, p 91-107.

Simmons, E. 1999. *Alternaria* themes and variations: host-specific toxin producers. Mycotaxon vol. 70: 325-369.

Solel, Z. 1991. *Alternaria* brown spot on Minneola tangelos in Israel. Plant Pathology, 40:145- 147.

Solel, Z, Kimchi, M. 1997. Susceptibility and resistance of Citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv.Citri. J. Phytopathology 145: 389-391.

Solel Z., Kimchi M., 1998. Histopathology of infection of Minneola tangelo by *Alternaria alternata* pv.citri and the effect of host and environmental factors on lesion development. J. of Phytopathology 146: 557–561.

Stewart, J.E., Timmer, L.W., Lawrence, C.B., Pryor, B.M., Peever, T.L. 2014. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. BMC Evolutionary Biology, 14:38.

Stockdale, Smith, Campbell. 1988. The maintenance and preservation of fungi. En: E.G.V. Evans, M.D. Richardson (Eds), Clinical Mycology (pp. 187-200). Oxford, Reino Unido: IRL Press.

- Sugita, T., Nishikawa, A. 2003. Fungal identification method based on DNA sequence analysis: reassessment of the methods of the pharmaceutical society of Japan and the Japanese pharmacopoeia. *J. of Health Science*, 49(6): 531-533.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.06. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Thomma, B. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4: 225-236.
- Timmer, L.W., Peever, T.L. 1997. *Alternaria* brown spot found on Sunburst and grapefruit. *Citrus Industry* 78(9), 46.
- Timmer, L., Solel, Z., Gottwald, T., Ibañez, A., Zitko, S. 1998. Environmental actors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology* 88:1218-1223.
- Timmer, L.W. 1999. Diseases of fruit and foliage. In: *Citrus Health Management* (L.W. Timmer, L.W. Duncan, ed.), APS Press, St. Paul, MN, USA, 107–115.
- Timmer, L.W., Darhower, H.M., Zitko, S.E., Peever, T.L., Ibañez, A.M., Bushong, P.M. 2000. Environmental factors affecting the severity of *Alternaria* brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. *Plant Disease* 84, 638-643.
- Timmer, L.W., Peever, T.L., Solel, Z., Akimitsu, K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus – Novel pathosystems *Phytopathol. Mediterr.* 42, 00–00
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Othani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M., Otani, H. 2012. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00350.x>
- USDA (U.S. Department of Agriculture). 2007. Regulated Plant Pest List.
- Vicent, A., Armengol, J., Sales, R., García-Jiménez, J., Alfaro, F. 2000. First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. *Plant disease* 84:1044.

Vicent, A., Badal, M.J., Asensi, N., Armengol, J., García-Jiménez, J. 2004. Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on Fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. citri. Europ. J. of Plant Pathol. 110: 245-251.

Vicent, A., Armengol, J., Cuenca, F., Alfaro-Lassala, F., García-Jiménez, J. 2008. Avances en el control de la mancha marrón de las mandarinas causada por *Alternaria alternata*. Levante agrícola. pp 1-7.

Walton, J.D. 1996. Host-selective toxins: agents of compatibility. The Plant Cell, Vol. 8, 1723-1733.

Whiteside, J.O. 1976. A newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. Plant Dis. Rep. 60: 326-329.

Alineamiento de la región D1/D2



ICE_61
ICE_62
ICE_66
ICE_67
A._alternata
SH_mil

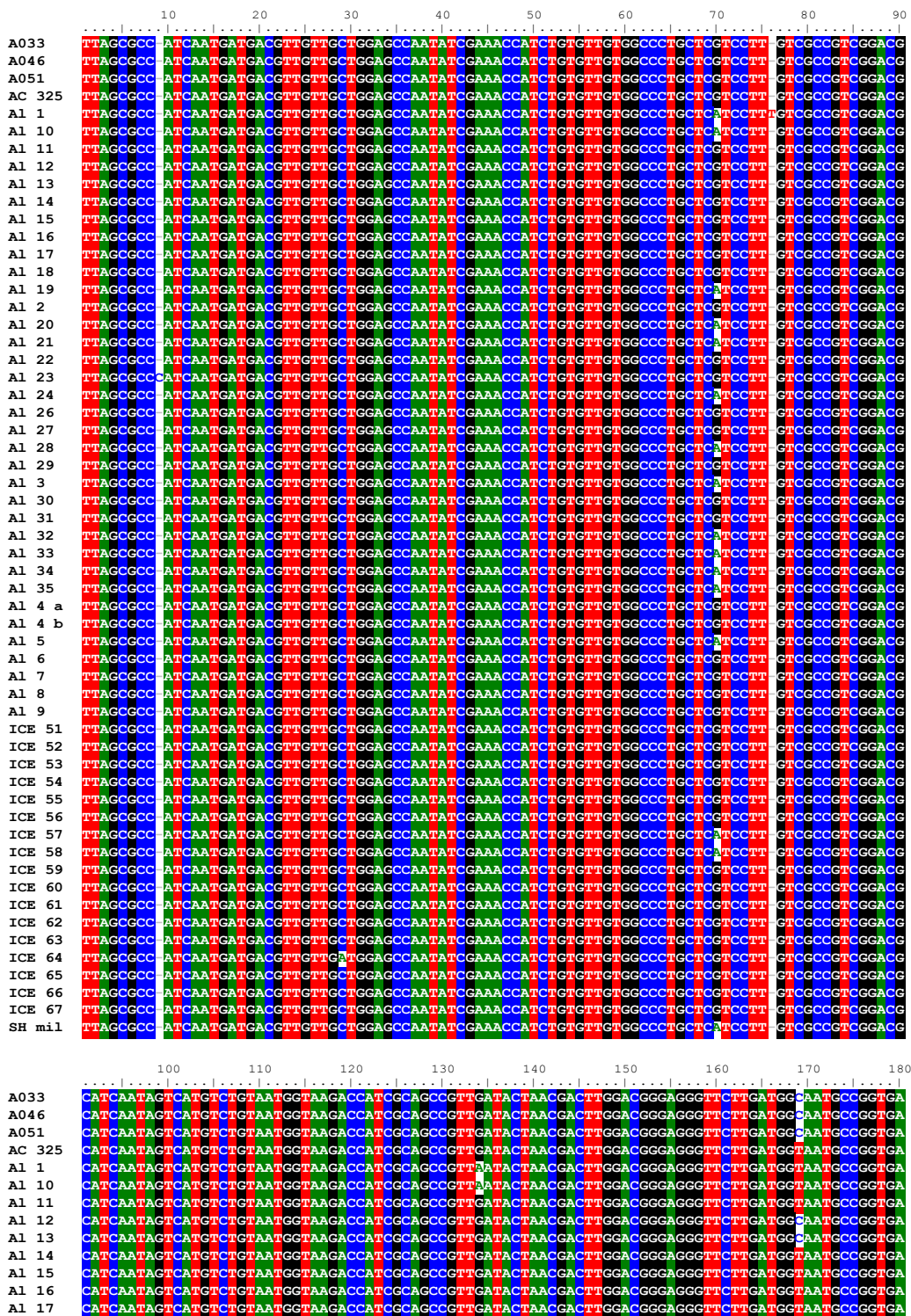
170 180 190 200 210 220 230 240

A051
Al_1
Al_10
Al_12
Al_13
Al_14
Al_15
Al_16
Al_17
Al_19
Al_2
Al_20
Al_21
Al_23
Al_24
Al_27
Al_28
Al_29
Al_31
Al_35
Al_4_a
Al_4_b
Al_6
Al_7
Al_9
A._tenuissima
ICE_53
ICE_54
ICE_55
ICE_57
ICE_59
ICE_60
ICE_61
ICE_62
ICE_66
ICE_67
A._alternata
SH_mil

250 260 270 280 290 300 310 320

A051
Al_1
Al_10
Al_12
Al_13
Al_14
Al_15
Al_16
Al_17
Al_19
Al_2
Al_20
Al_21
Al_23
Al_24
Al_27
Al_28
Al_29
Al_31
Al_35
Al_4_a
Al_4_b
Al_6
Al_7
Al_9

Alineamiento de un fragmento del gen endoPG



[illegible]

[illegible]