

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMIA

Caracterización molecular de aislamientos de *Colletotrichum sp.* causante de antracnosis en lupino (*Lupinus sp.* L.) mediante marcadores ITS-RFLPs y RAPDs.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía.

Débora Fabiola Véliz Vallejos

VALDIVIA - CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE:

Ricardo Riegel S.
Ing. Agr., M. Agr., Dr. Rer. Sylv.

PROFESORES INFORMANTES:

Luigi Ciampi P.
Ing. Agr., MSc., Ph. D.

Laura Böhm S.
Ing. Agr.

AGRADECIMIENTOS

No quisiera dejar pasar esta oportunidad para agradecer a todas las personas que de alguna forma u otra colaboraron con la realización de este trabajo. A Semillas Baer quienes facilitaron el material biológico a evaluar, a mis profesores informantes por sus correcciones y tiempo y a mi profesor patrocinante Sr. Ricardo Riegel quién estuvo a mi lado alentándome a seguir adelante aún en momentos difíciles cuando todo parecía nada.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio Ricardo y Jorge Pérez, quienes me brindaron ánimo y ayuda en innumerables ocasiones. A Blanquita de Cuevas, quien me confortó cuando mas lo necesitaba. A mi amiga Janita y su familia, quien estuvo a mi lado en las buenas y en las malas durante todos estos años, brindándome su apoyo y amistad incondicional. A mi amiga Ivonne por su buena onda y cariño y a Pite que es mi sol.

Y por sobretodo agradezco a Dios por sus muchos cuidados y a mi familia: a mi madre, a mi padre y a Aly, Erich, Anja y Laurita por acogerme y ayudarme siempre durante mi estadía en Valdivia.

Sin duda quedan muchos compañeros y amigos por mencionar, cuyos nombres en este minuto atraviesan por mi mente, algunos de ellos incluso a la distancia no han dejado de ser cercanos, a todos, muchas gracias.

*A mi madre Angélica Vallejos, quien con esmero
y paciencia supo encaminar mis pasos,
para ver realizado este sueño.*

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Generalidades del cultivo del lupino	3
2.1.1	Descripción botánica	3
2.1.2	Factores nutricionales, antinutricionales y usos	3
2.1.3	Mercado económico	4
2.2	Antracnosis en lupino	5
2.2.1	Sintomatología y daño de la enfermedad	6
2.3	<i>Colletotrichum spp.</i>	7
2.4	Taxonomía	7
2.5	Relaciones fenéticas y cladísticas	10
2.6	¿Qué es un marcador molecular?	10
2.7	Amplificación de regiones ITS y restricción enzimática basada en PCR (ITS-RFLP).	11
2.8	Fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs)	13
3	MATERIAL Y METODO	15
3.1	Material	15
3.1.1	Material biológico	15
3.1.2	Material de laboratorio	16
3.1.2.1	Equipos	16

Capítulo		Página
3.1.2.2	Material desechable	17
3.1.2.3	Material reutilizable	17
3.1.2.4	Reactivos	18
3.2	Método	19
3.2.1	Colecta de aislamientos	19
3.2.2	Repique de aislamientos	19
3.2.3	Extracción de ADN	19
3.2.4	Calidad y cuantificación de ADN	21
3.2.5	Amplificación de regiones ITS y restricción enzimática (ITS-RFLP)	22
3.2.6	Fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs).	25
3.2.7	Electroforesis	26
3.2.8	Evaluación de los datos obtenidos	26
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
4.1	Extracción de ADN	28
4.2	Análisis de la diversidad interespecífica	29
4.3	Análisis estimativo de la diversidad intraespecífica	36
4.3.1	Distancias genéticas y formación de grupos fenéticos	38
4.3.2	Diversidad genética	43
4.3.3	Diferenciación de variedades	46
5	CONCLUSIONES	50
6	RESUMEN	52
7	SUMMARY	54
8	BIBLIOGRAFIA	56
	ANEXOS	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tipos de lupino según contenido de alcaloides presentes en la semilla.	3
2	Procedencia de los aislamientos de <i>Colletotrichum spp.</i> en estudio.	15
3	Secuencia de nucleótidos de los partidores utilizados en la amplificación de las regiones ITS 1 e ITS 2.	22
4	Set de partidores universales evaluados para las reacciones RAPDs.	26

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Evolución de la superficie de siembra (há) y producción (ton) de lupino en Chile (1989 a 2004).	5
2	Sintomatología característica de antracnosis en lupino.	7
3	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).	11
4	Esquema de las regiones ITS 1 e ITS 2 del ADN ribosomal.	13
5	Esquema de las regiones ITS 1 e ITS 2 con los respectivos partidores que amplifican dichas regiones y sitios de restricción de las enzimas TRU 1I y Bsh1236I para las tres especies de <i>Colletotrichum</i> en estudio.	24

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Cuantificación de ADN.	65
2	Distancias genéticas entre los aislamientos chilenos y cepas de referencia de <i>Colletotrichum</i> .	66

1 INTRODUCCION

Actualmente el uso de proteína vegetal en la alimentación animal es cada vez mas frecuente debido, principalmente al menor costo de producción, a su alta calidad y al menor riesgo de contraer enfermedades transmitidas por proteínas animales, como es el caso de la enfermedad de las vacas locas (encefalopatía espongiforme bovina). Entre dichos insumos vegetales destacan la soya, canola y lupino, presentando este último, la ventaja de adaptarse de mejor forma a climas fríos, como los de la zona Sur de Chile.

En Chile la superficie sembrada con lupino durante la temporada 2003-2004, alcanzó las 19.150 hectáreas. La producción generada por esta actividad se comercializa dentro del país, siendo su principal destino el consumo animal. Sin embargo, su rendimiento puede verse seriamente afectado por enfermedades tales como la mancha café y antracnosis provocadas por los hongos *Pleiochaeta setosa* y *Colletotrichum spp.*, respectivamente. Este último constituye el principal género que incluye agentes fitopatógenos de este cultivo.

En la actualidad se carece de clara información referente a la o las especies y su taxonomía relacionada con el patógeno causante de la antracnosis en lupino en Chile. La información existente proviene en su mayoría del extranjero, por esto es conveniente el desarrollo de investigaciones que abarquen particularmente la problemática para el país. Al conocer la o las especies y su diversidad genética, se podrán desarrollar en forma más eficiente, programas de mejoramiento de cultivares tolerantes y/o resistentes a la enfermedad.

El habitual concepto biológico de especie en eucariotas ha sido discutido y replanteado. Los sistemas de clasificación han sufrido constantes modificaciones a medida que han evolucionado los métodos de obtención de información. Actualmente, herramientas moleculares han ejercido un papel preponderante al contribuir en la investigación, clasificación y en algunos casos redescrición de taxas.

Hipótesis: Se plantea que aislamientos de *Colletotrichum* realizados desde lupino, corresponden a una especie diferente de *C. gloeosporioides* y que existe diversidad genética entre ellos.

Objetivo general: Caracterizar molecularmente los aislamientos de *Colletotrichum spp.* causante de antracnosis en lupino, mediante las técnicas de restricción enzimática del ADN ribosomal (ITS-RFLPs) y de amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPDs).

Objetivos específicos:

- Identificar la especie de *Colletotrichum* que afecta al lupino en Chile.
- Estimar la diversidad genética de los aislamientos de *Colletotrichum spp.*
- Determinar la distancia genética entre los aislamientos y graficar sus relaciones fenéticas.
- Establecer la relación entre el lugar geográfico de colecta, tipo de hospedero y aislamientos con la formación de grupos fenéticos.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Generalidades del cultivo del lupino

2.1.1 Descripción Botánica. *Lupinus sp.* L., conocido también como altramuz, tarwi, tauri, chocho o lupino, es una planta dicotiledónea anual, perteneciente a la Familia de las Fabáceas Subfamilia Papilionoideae representado aproximadamente por 500 especies de las cuales no más de 10 se encuentran en el país, y sólo cuatro de ellas son cultivadas: *Lupinus albus* L., *L. angustifolius* L., *L. luteus* L. todas de origen mediterráneo, y *L. mutabilis* Sweet que es de origen sudamericano (FAIGUENBAUM y MOUAT, s.f.).

2.1.2 Factores nutricionales, antinutricionales y usos. Todas las especies de lupino fueron originalmente amargas, pero a través del mejoramiento genético se han obtenido cultivares con un menor contenido de alcaloides, como lo muestra el Cuadro 1.

CUADRO 1 Tipos de lupino según contenido de alcaloides presentes en la semilla.

Clasificación del tipo de lupino	% de alcaloides
Dulce	Menor o igual a 0,05
Semi-dulce	0,05-0,15
Semi-amargo	0,15-0,30
Amargo	Sobre 0,30

FUENTE: Von Baer (1991), citado por RÍOS (2000).

RÍOS (2000), sugiere al lupino como una buena alternativa alimenticia sobretodo por su alto contenido de energía metabolizable, debido a los altos contenidos de aceites (5-18%) ricos en ácidos insaturados principalmente ác. oléico y linoléico; por su alta digestibilidad proteíca (alrededor del 90% en el

caso de harina de lupino, tanto para animales monogástricos como rumiantes y por sus vitaminas principalmente provitamina A, la que se expresa en un alto porcentaje de carotenos en las variedades dulces.

En Chile, el principal destino de la producción es utilizada para consumo animal, ya sea como forraje verde, o como grano introducido en la dieta como suplemento proteico. El lupino también se utiliza en la alimentación humana, aunque en menor medida, aprovechando sus altos contenidos de aceite y proteína 29-34% (similar a la soya). Además es preferido entre otras leguminosas, en las rotaciones de cultivo por tener una mayor rentabilidad y por permitir la sustentabilidad en los sistemas de producción a mediano y largo plazo (VALLEJOS *et al.*, 2003).

2.1.3 Mercado económico. Actualmente, Australia representa alrededor del 90% de la producción y exportación mundial de lupino. En términos de competencia de sustitutos de valor proteico, la que domina es la soya con EE.UU., Argentina y Brasil como principales proveedores (DESARROLLO, INNOVACIÓN Y GESTIÓN EN AGRONEGOCIOS, 2001).

En Chile, durante la temporada 2003-2004 el área sembrada se incrementó en un 21,8% respecto a la temporada anterior alcanzando 19.150 hectáreas, de las cuales 13.150 corresponden a lupino dulce (Figura 1).

El potencial más cierto y atractivo hacia el futuro está dado por la incursión del lupino en la industria de alimentos para salmones, la que mueve más de 600 mil toneladas de alimento al año. Sumado a esto se encuentra la relativa escasez en el abastecimiento de fuentes tradicionales de proteína y energía como el aceite y harina de pescado. Esto indica un claro período de recuperación para este cultivo (BANFI, 2004).

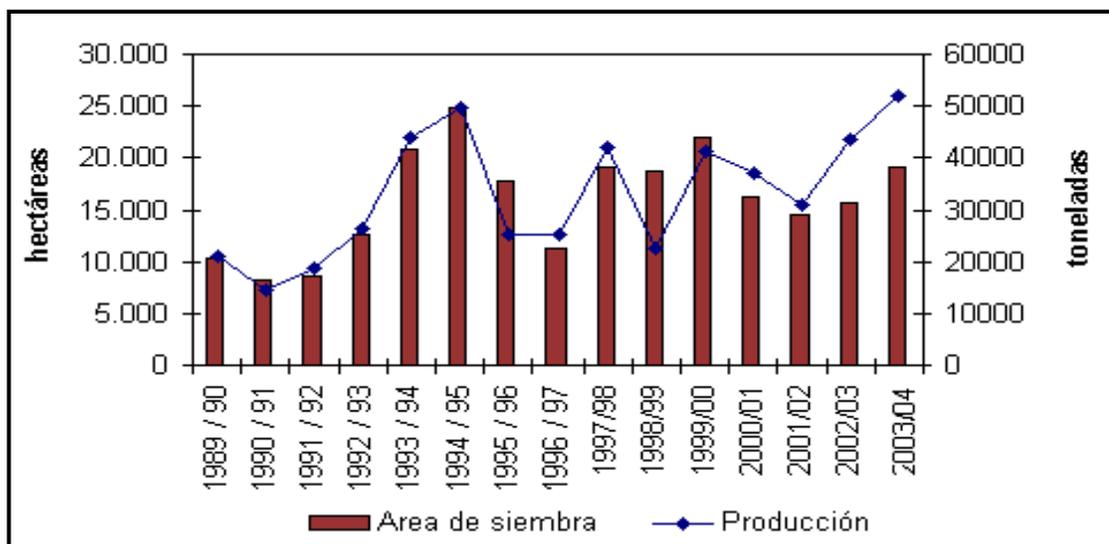


FIGURA 1 Evolución de la superficie de siembra (há) y producción (ton) de lupino en Chile (1989 a 2004).

FUENTE: Datos obtenidos de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) (BANFI, 2004).

Al mejorar las condiciones económicas ofrecidas en los contratos de siembra de lupino dulce, se pronostica para la temporada 2004-2005 un aumento en el área de cultivo a unas 25 mil hectáreas, de las cuáles 18 mil hectáreas corresponderían a lupino dulce (BANFI, 2004).

2.2 Antracnosis en lupino

Según HASHAGEN y VON BAER (1996), actualmente la antracnosis representa una de las enfermedades más importantes y devastadoras del lupino blanco en Chile y el mundo. Está presente en todas partes donde se cultive lupino, incluyendo Sudamérica, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia (YANG y SWEETINGHAM, 1998). Pérdidas de hasta el 50% en *L. angustifolius* y hasta el 100% en *L. albus* han sido registradas en campo (THALHINAS *et al.*, 2002).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1939 en Norteamérica asociada a *L. angustifolius* siendo identificado como agente causal a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Weimer, 1943). No obstante, NIRENBERG *et al.* (2002) señala que el primer reporte publicado fue en el año 1912 por Bondar en Brasil, indicando al agente causal como *Gloeosporium lupinus*.

2.2.1 Sintomatología y daño de la enfermedad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar lesiones necróticas hundidas, en hojas, tallos y frutos, cuyo agente patógeno son hongos que producen sus esporas asexuales en acérvulos (AGRIOS, 1997).

En siembras con semillas infectadas, los síntomas iniciales se observan tempranamente en las plántulas, las que se caracterizan por una deformación conocida como tirabuzón (Figura 2a). Cuando las infecciones comprometen todo el tallo las plántulas mueren (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1982).

Los síntomas más típicos se presentan a principios o durante la floración en la parte aérea de la planta donde se desarrollan lesiones necróticas en tallos, hojas, brotes terminales y vainas (Figura 2b-d) (GALDAMES y PEÑALOZA, 1995).

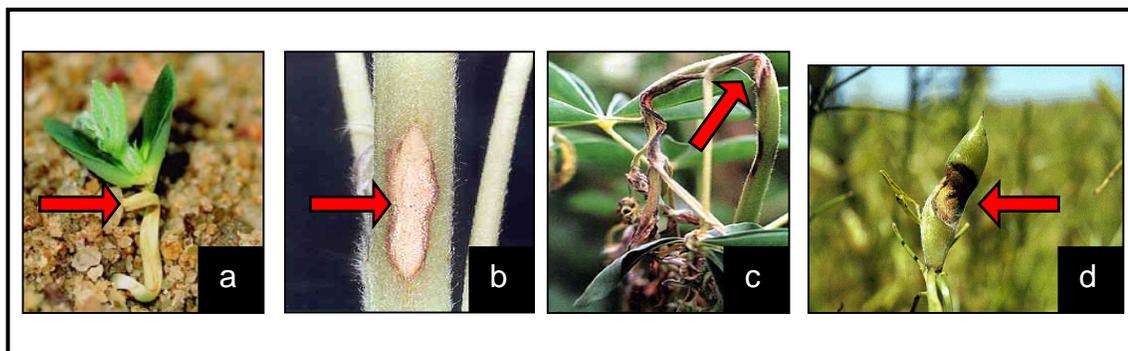


FIGURA 2 Sintomatología característica de antracnosis en lupino. a) torcedura del hipocótilo, b) lesión en tallo, c) y d) necrosis en vainas.

PEÑALOZA (1997), agrega daños en semillas como: disminución del calibre, alteración del color (manchas) y aumento de la humedad (disminución del tiempo de conservación), lo que afecta severamente la calidad del grano, la que se ve disminuida al igual que su precio.

2.3 *Colletotrichum* spp.

Este hongo pertenece al Dominio Eucariota, Reino Mycota, División Ascomycota, Orden Phyllachorales, Familia Phyllachoraceae, Género *Colletotrichum* Corda (1831) (AINSWORTH & BISBY, 1995). La forma sexual es bastante rara, siendo la forma conidial la que se detecta habitualmente sobre los órganos atacados (MESSIAEN y BLANCARD, 1995).

En Chile fue descrito por primera vez mediante taxonomía tradicional en 1988, asociado a plantas de *L. angustifolius* como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (PEREDO y VALENZUELA, 1988).

2.4 Taxonomía.

La taxonomía de los aislamientos de *Colletotrichum* Corda causante de la antracnosis en lupino ha estado sujeta a mucha discusión. Algunos autores han

descrito a *C. gloeosporioides* como el agente patógeno de esta enfermedad, otros a *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds. Incluso se ha propuesto la existencia de especies que provoquen antracnosis en lupino, completamente diferentes a las anteriormente citadas, tal como lo señala Koch (1996) citado por TALHINHAS *et al.* (2002), quién sugirió que el patógeno causante de la antracnosis en lupino es morfológicamente distinto, lo suficiente, como para justificar la propuesta de una nueva especie. En la actualidad el interés por dilucidar claramente la identidad del fitopatógeno asociado a la antracnosis en lupino ha llevado a NIRENBERG *et al.* (2002), a redescubrir a este patógeno como *C. lupini* (Bondar) Nirenberg, Feiler & Hagedorn, comb. nov. var. *lupini* y *C. lupini* var. *setosum* Nirenber, Feiler & Hagedorn, var. nov., al estudiar aislamientos de algunos países europeos y de Norte y Sudamérica. Asimismo se propuso una delineación diferente a todas las anteriormente citadas en la literatura. Esta redescubierta otorga un recurso a la disyuntiva de la clasificación de este patógeno. Numerosos aislamientos representativos de diversas localidades del mundo fueron comparados con diferentes especies de *Colletotrichum* mediante taxonomía tradicional, marcadores moleculares RAPDs y secuenciación de ADNr. Dentro de esta nueva especie se distinguieron dos variedades diferentes: *C. lupini* var. *lupini* constituida por aislamientos obtenidos de Belarus, Bolivia, Canadá, Rusia y Ucrania y *C. lupini* var. *setosum* constituida por aislamientos provenientes de Brasil, Alemania, Países Bajos, Austria y Polonia.

En cuanto a los parámetros morfológicos se encontraron diferencias significativas en la forma y tamaño conidial, temperatura óptima de crecimiento, color del micelio en PDA y presencia de setas, entre las seis especies de *Colletotrichum* evaluadas: *C. lupini* (ambas variedades), *C. fragariae*, *C. acutatum*, *C. trifolii*, *C. gloeosporioides* y *C. lupinicola*. Pequeñas diferencias detectadas mediante análisis de patrones RAPDs entre los aislamientos colectados desde lupino, contrastan con las grandes diferencias que se producen al ser

comparadas con las otras especies; esto soporta la conclusión de que *C. lupini* es una especie diferente y distanciada de las demás. Mediante secuenciación de ADNr también se encontraron diferencias entre *C. lupini* y las demás especies, soportadas con valores de “bootstrap” de 96% (NIRENBERG *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, las especies han sido identificadas por morfología de colonias y conidias, presencia o ausencia de setas, presencia o ausencia de teleomorfo, morfología del apresorio y tasa de crecimiento (VON ARX, 1974; GUNNELL y GUBLER, 1992). Este sistema de clasificación requiere de una amplia experiencia, dominio, y habilidad sobretodo al tratarse de especies complejas, con diversas variantes morfológicas las que infectan a un amplio rango de hospederos, como es el caso de *C. gloeosporioides* (Sutton 1980, citado por YANG y SWEETINGHAM, 1998). Sumado a lo anterior, se encuentra el efecto del medio ambiente en la expresión génica, el bajo polimorfismo genético y un cierto grado de subjetividad en el criterio del investigador (CAMPOS y SALVO, 1995; UFFO *et al.*, 2000).

La posibilidad de detectar diferencias entre individuos a nivel de la secuencia de su ADN y que estos polimorfismos se utilicen como marcadores, ha cambiado significativamente la aplicación de la genética y ha permitido el desarrollo de técnicas para el diagnóstico molecular de enfermedades (UFFO *et al.*, 2000). Por esto, los marcadores moleculares han sido de gran ayuda en la clasificación e identificación de especies, por ser capaces de detectar altos grados de polimorfismos genéticos, ser heredables, acceder a todas las regiones del genoma, no depender del estado de desarrollo del individuo y ser independientes de las condiciones ambientales.

Una identificación clara de las poblaciones fitopatógenas del lupino al igual que su variabilidad genética y especificidad, permite el desarrollo de

eficientes programas de mejoramiento genético de cultivares al seleccionar fuentes apropiadas de resistencia perdurable en el tiempo, los que en forma simultánea operan como control preventivo de la enfermedad (WINKA, 2000; ARAYA, 2003).

2.5 Relaciones fenéticas y cladísticas. Existen dos tipos de relaciones generadas del análisis de taxonomía numérica: relaciones cladísticas y relaciones fenéticas. Las primeras están basadas generalmente en la comparación de secuencias genómicas en cambio las fenéticas se basan en la comparación del mayor número posible de caracteres independientes, tanto fenotípicos como genotípicos. Su unidad de medida es el porcentaje de similitud o disimilitud, y tras el análisis se produce una agrupación de los individuos en función de sus semejanzas. Los resultados se suelen expresar en dendrogramas (ROSELLÓ-MORA, 1999).

Los estudios fenéticos son frecuentes en análisis de patrones electroforéticos de ADN como RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) (ROSELLÓ-MORA, 1999).

2.6 ¿Qué es un marcador molecular?

Según FERREIRA y GRATTAPAGLIA (1995) un marcador molecular se define como: “todo fenotipo molecular oriundo de un gen expresado o de un segmento específico de ADN”. Es decir, toda variabilidad de naturaleza bioquímica o molecular susceptible de ser de algún modo asociada con la variabilidad de algún parámetro morfológico y/o agronómico (CAMPOS, 1995).

En 1987 Mullis y Faloona crean una poderosa técnica de amplificación de ADN ampliamente utilizada en aplicaciones biomoleculares: la reacción de la polimerasa en cadena o Polymerase Chain Reaction (PCR). (SCHENELL y MENDOZA (1997) y GIOVANBATTISTA *et al.* (2001). Esta metodología permite

amplificar una secuencia específica de ADN a partir de una cadena molde usando partidores, nucleótidos, cloruro de magnesio y Taq polimerasa, bajo diferentes condiciones cíclicas de temperatura in vitro, generando múltiples fragmentos o copias de ADN (Figura 3) (BECERRA y PAREDES, 2000).

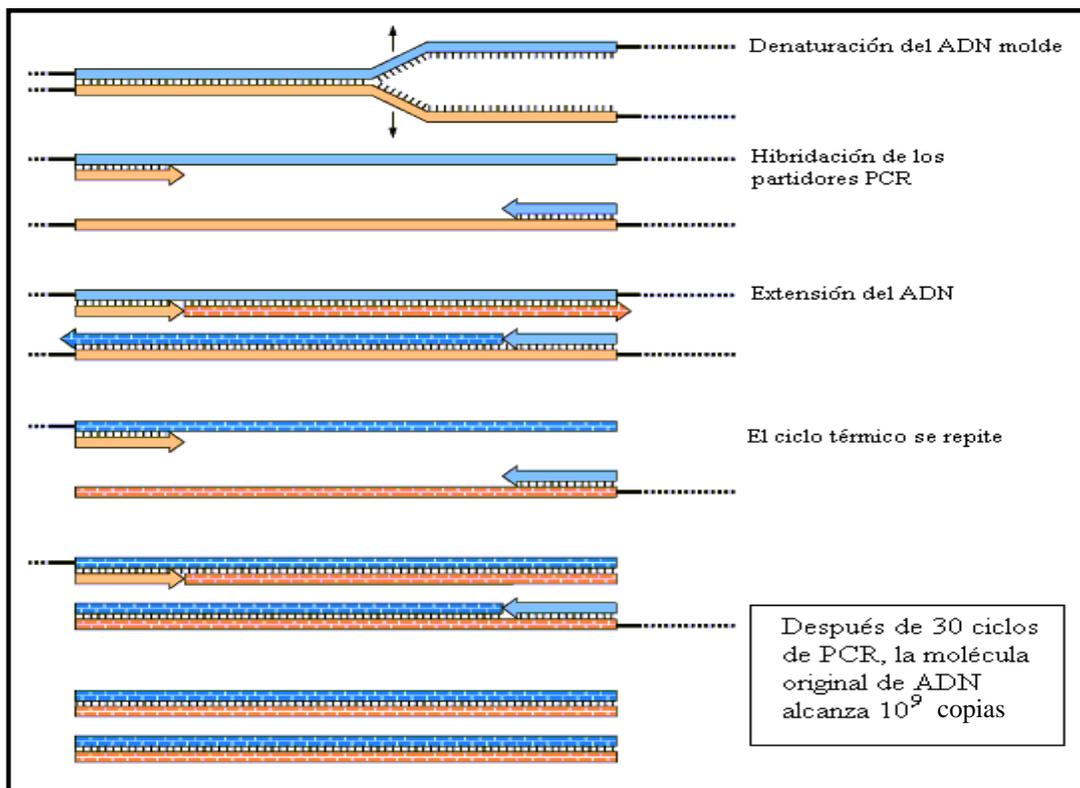


FIGURA 3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

A partir de la PCR se han generado una serie de técnicas tales como: fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD) y fragmentos de restricción de largo polimórfico basado en PCR (ITS-RFLPs).

2.7 Amplificación de regiones ITS y restricción enzimática basada en PCR (ITS-RFLP).

La detección e identificación de hongos usando partidores que amplifiquen regiones del espacio transcrito interno del ADN ribosomal o Internal Transcribed spacer (ITS), han sido ampliamente usados en estudios de

sistemática, debido a la poca confiabilidad de caracteres morfológicos, los cuales hasta ahora habían sido utilizados para la delimitación de taxas (DAUCH *et al.*, 2003).

En estudios previos, las regiones del ADNr 5,8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 junto con la técnica de RFLP, han resultado una gran ayuda a la identificación molecular de especies de *Colletotrichum*, (ABANG *et al.*, 2002 y ORBERÁ, 2004). En estos estudios se ha utilizado una variante de la técnica conocida como ITS-RFLP. Para ello se amplifican fragmentos específicos del ADN ribosomal, es decir, las regiones ITS, por medio de la reacción PCR para luego ser tratados con endonucleasas de restricción para obtener patrones específicos (Figura 4) (HORTON, 2002).

Las endonucleasas de restricción, son enzimas que generan fragmentos de ADN de tamaño moderado, mediante el corte de la hebra de ADN en sitios específicos, usualmente secuencias palindrómicas (CAMPOS, 1995).

La región 5,8S; 18S y 28S es conservada y muestra una baja variabilidad, sin embargo la región de los ITS que es una zona hipervariable permite el reconocimiento a nivel interespecífico. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distinto tamaño los que son examinados por electroforesis (ORBERÁ, 2004).

habla de un polimorfismo de ADN, es decir, las bandas visualizadas de diferente peso molecular representarían diferentes loci, lo que puede usarse como un marcador genético. Los polimorfismos son debidos a mutaciones puntuales que hacen aparecer o desaparecer zonas de hibridación con el partidor que se refleja en la presencia o ausencia de fragmentos amplificados visualizados como bandas en geles de agarosa (GARCIA-MAS *et al.*, 2000; BECERRA y PAREDES, 2000).

Además de los estudios de variación genética, RAPDs, tiene una gran potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica (BECERRA y PAREDES, 2000). Sin embargo las principales desventajas son su escasa reproducibilidad y su naturaleza dominante (CAMPOS y SALVO, 1995; CAMPOS, 1995). En el estudio de hongos, esta última problemática es solucionada debido al carácter haploide de sus genomas.

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Material

Para el presente estudio se utilizaron diversos materiales, clasificados en tres categorías; biológico, laboratorio y reactivos.

3.1.1 Material biológico. Se contó con 21 aislamientos de *Colletotrichum spp.* provenientes de diferentes localidades, especies y cultivares de lupino, colectados en el periodo 2002-2003, tal como lo muestra el Cuadro 2. Adicionalmente se dispuso de cuatro cepas introducidas de Alemania, las que se utilizaron como patrón de referencia para los análisis. Estas fueron: 70071, 71292, 63879 y 70358 las que corresponden a *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. lupini var. lupini* y *C. lupini var. setosum*, respectivamente (NIRENBERG *et al.*, 2002).

CUADRO 2 Procedencia de los aislamientos de *Colletotrichum spp.* en estudio.

Código	Localidad	Hospedero		Fecha aislamiento	Especie
A-1	Gorbea	<i>L. albus</i>	Línea	17/09/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-2	Cajón	<i>L. albus</i>	Cultivar Typtop	17/09/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-3	Cajón	<i>L. albus</i>	Línea	22/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-4	Cajón	<i>L. angustifolius</i>	Línea	22/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-5	Traiguén	<i>L. albus</i>	Cultivar Rumbo	25/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-6	Temuco	<i>L. albus</i>	Cultivar Rumbo	25/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-7	Boroa	<i>L. albus</i>	Tipo amargo	24/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-8	Boroa	<i>L. albus</i>	Tipo amargo	25/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>

A-9	Boroa	<i>L. albus</i>	Cultivar Perla	24/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-10	Cajón	<i>L. angustifolius</i>	Cultivar Ruso	24/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-11	Cajón	<i>L. angustifolius</i>	Línea	24/10/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-13	Perquenco	<i>L. albus</i>	Cultivar Rumbo	07/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-14	Cajón	<i>L. polyphyllus</i>	-	09/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-15	Victoria	<i>L. angustifolius</i>	-	14/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-16	Victoria	<i>L. albus</i>	-	14/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-17	Allipen	<i>L. albus</i>	Cultivar Rumbo	15/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-18	Cajón	<i>L. mutabilis</i>	Línea	20/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-19	Lautaro	<i>L. albus</i>	Tipo amargo	21/11/02	<i>Colletotrichum spp.</i>
A-20	Freire	<i>L. polyphyllus</i>	-	17/01/03	<i>Colletotrichum spp.</i>
P-1	-	<i>L. albus</i>	-	1998	<i>Colletotrichum spp.</i>
V-2	Vilcún	<i>L. albus</i>	-	1999	<i>Colletotrichum spp.</i>
BBA 70071*	Tailandia	Cítricos	-	-	<i>C. gloeosporioides</i>
BBA 71292*	Portugal	<i>L. albus</i>	-	-	<i>C. acutatum</i>
BBA 63879*	Bolivia	<i>L. mutabilis</i>	-	-	<i>C. lupini var. lupini</i>
BBA 70358*	Alemania	<i>L. albus</i>	-	-	<i>C. lupini var. setosum</i>

- sin información

FUENTE: * Información de cepas de referencia obtenidas de NIRENBERG *et al.* (2002). Antecedentes de cepas chilenas entregados por Semillas Baer (2003).

3.1.2 Material de laboratorio.

3.1.2.1 Equipos. Para la conservación de los reactivos y muestras de ADN, junto con los productos amplificados de PCR, se contó con un refrigerador de 4°

C y -20° C. La esterilización del material de laboratorio y medios de cultivo se llevó a cabo en una autoclave de control manual.

Las siembras del hongo se realizaron en una cámara de flujo laminar (Factomet), posteriormente se cultivaron en una incubadora o estufa (Memmert) con temperaturas de $23-25^{\circ}$ C. Para el crecimiento del cultivo en medio líquido se requirió de una agitadora Lab-Line[®] Orbit Environ-Shaker.

Una vez crecido el micelio se filtró con una bomba de vacío (Gast). Para la extracción de ADN se necesitó: Una microcentrífuga para tubos eppendorf (DenverInstrument), micropipetas (Ranin), una balanza analítica (Ohaus), Vortex (Lab-Line Instruments) y un baño maría (Corning) utilizado para incubar y resuspender el ADN. La determinación de la cantidad de ADN en cada muestra fue hecha con un espectrofotómetro Milton Roy spectronic 3000 Array. La amplificación de los segmentos de ADN se ejecutó en un termociclador para 96 muestras marca PTC-100[™] (Mj Research [™]). La separación de estos fragmentos amplificados se realizó en una cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder (Sigma) y su visualización en un transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat). Los geles de agarosa fueron fotografiados con una cámara Kodak Digital Science [™], Electroforesis Documentation and Analysis System 120, facilitada por el Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral.

3.1.2.2 Material desechable. Guantes de látex, papel filtro Whatman N^o 1, tubos eppendorf de 1,5 mL y 0,2 mL y puntas plásticas.

3.1.2.3 Material reutilizable. Frascos Schott o matraces pequeños de 100 ml, placas Petri, embudo Bushner, sacabocado metálico de 5 mm de diámetro, morteros de porcelana con sus respectivos pistilos, varillas agitadoras magnéticas, espátulas metálicas, pinzas, bisturí, gradillas y material de vidrio en general para la preparación de soluciones.

3.1.2.4 Reactivos. Los reactivos utilizados en cada fase de la metodología se indican a continuación:

- Cultivo de aislamientos: Para el medio sólido 39 g de agar papa-dextrosa (APD) por litro y 12,5 g glucosa con 200 g de papa por litro de solución, para el medio líquido caldo papa-dextrosa (CPD).
- Extracción de ADN: Nitrógeno líquido. Tampón o buffer de extracción (Tris 1M pH 8,0; NaCl 3M; β mercaptoetanol; 20 %SDS; EDTA 0.5 M). Acetato de potasio 5M. Isopropanol frío a -20°C . Tampón TE (Tris 1M pH 8,0; etilendiaminotetra acetato (EDTA)) 0,5 M. RNAasa (10 mg/mL) (MBI-Fermentas). Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1). Acetato de sodio 3M. Etanol frío (-20°C) de 95 y 70%.
- Reacción PCR: tampón para PCR 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 500 mM KCl), MgCl_2 50 mM, 100 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen), Taq DNA polimerasa 5U/ μL (Invitrogen), agua destilada desionizada estéril y partidores específicos para amplificar regiones ITS (Internally Transcribed Spacer) y fragmentos de ADN polimorficos al azar (RAPDs) (10 pmol/ μL) (MWG-Biotech).
- Digestión enzimática: Se utilizaron dos enzimas de restricción; Tru 1I (10 U/ μL , buffer R^+ (*Mse I* Fermentas) y Bsh 1236I (10 U/ μL), buffer Y^+ (*Fnu DII* Fermentas).
- Electroforesis: Agarosa (SeaKem[®]). Tampón TBE pH 8,6 (Tris base (TCL), ácido bórico (Mallinckrodt), EDTA 0,5 M pH 8,0). Tampón de carga 6X (0,03% azul de bromofenol (Aldrich Chem. Co.), 60% glicerol (Fluka), 60 mM EDTA, 10mM de Tris-HCl pH 7,6 y 0,03% xilen cianol (Sigma)).

Marcador de peso 1 kb DNA Ladder (MBI-Fermentas). Tinción de geles con bromuro de etidio 10 mg/ml (Gibco Brl®).

3.2 Método

3.2.1 Colecta de aislamientos. Los aislamientos fueron colectados en campo a partir de tallos, hojas y vainas infectadas de plantas con antracnosis. Inicialmente se cultivaron en un medio sólido de agar papa-dextrosa (APD). El aislamiento se llevó a cabo según el protocolo descrito por AGRIOS (1996). Los cultivos monospóricos se almacenaron a 4 °C en tubos de ensayo conteniendo APD inclinado. Estos aislamientos fueron proporcionados por Semillas BAER, Cajón, Temuco IX Región.

3.2.2 Repique de aislamientos. El primer repique se realizó en APD, previamente esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min, mediante un sacabocado de 5 mm de diámetro, depositándose el disco de micelio al centro de cada placa Petri estéril. Se incubó a 25 °C por 7 días. El segundo repique se llevo a cabo en frascos Schott o matraces pequeños, con 25 ml de caldo papa-dextrosa (CPD). Se inocularon del mismo modo que el primer repique, siempre con la precaución de tomar los discos de micelio del margen de los cultivos (zona de activo crecimiento) anteriormente repicados. Se incubaron a temperatura ambiente en un agitador a 150 revoluciones por minuto (r.p.m.) por 7 días (KURAMAE-IZIOKA *et al.*, 1997), con el propósito de facilitar la suficiente obtención de micelio para la extracción de ADN.

3.2.3 Extracción de ADN. El ADN genómico de las 25 muestras fue extraído usando únicamente el método de GOODWIN *et al.*, (1992), utilizado con *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, mediante algunas modificaciones de laboratorio, tales como: utilización de tejido fungoso sin previa liofilización, una prolongación del tiempo de incubación del buffer de extracción (40 min más de

lo establecido), una reducción de la temperatura de incubación de la RNAsa de 37°C a 24°C o temperatura ambiente. El ADN fue precipitado con acetato de sodio en vez de NaO y finalmente resuspendido solo en buffer TE sin CsCl. La homogenización del tejido fungoso fue en forma mecánica, utilizando N liquido, el lavado y purificado de ADN se realizó con isopropanol y etanol frío y la resuspensión con buffer o tampón TE.

El micelio fue colectado y filtrado mediante papel filtro Whatman N°1, lavándose repetidas veces por ambos lados con agua destilada desionizada estéril, cuidando de cambiar el papel filtro y esterilizar pinzas en cada muestra. Luego el micelio limpio y seco se depositó en los morteros para ser molido con N liquido con el objeto de romper las paredes celulares. Una vez reducido a polvo fino, el micelio se trasvasijó a tubos eppendorf de 1,5 mL previamente rotulados.

A cada tubo se le adicionó 900 μ L de tampón de extracción (Tris 0,1M pH 8,0; NaCl 0,5M; 0,7% β mercaptoetanol; 0,25% %SDS; EDTA 0,05 M) y se agitaron con Vortex incubándose luego a 65 °C por 1 hora. Posteriormente a cada tubo se le agregó 300 μ L de acetato de potasio 5M, se agitaron en Vortex y se mantuvieron en hielo por 20 min para luego ser centrifugados a 12.000 r.p.m. por 10 min. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un tubo eppendorf limpio de 1,5 mL y se añadieron 700 μ L de isopropanol a -20 °C. El contenido de cada tubo se mezcló por inversión varias veces hasta visualizar el ADN incubándose por 30 min en hielo. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 12.000 r.p.m. por 10 min para separar el sobrenadante (que se descartó) del pelet, el que se secó a temperatura ambiente. Una vez seco, el pelet se resuspendió con 500 μ L de tampón TE (Tris 0,01 M pH 8,0 y EDTA 0,001M) en baño María a 65 °C por 15 a 20 min,

adicionando 2 μL de ARNasa (10 mg/mL), la suspensión fue incubada durante 15 min a temperatura ambiente o en incubadora a 24 °C.

Con el objeto de lavar el ADN de otros compuestos como proteínas y polisacáridos, a cada muestra se le añadió un solvente orgánico, en este caso 500 μL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se homogenizó en Vortex y se centrifugó a 12.000 r.p.m. por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se la transfirió cuidadosamente a un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml (no más de 400 μl). Luego se adicionó un volumen de 50 μL de acetato de sodio y 800 μL de etanol 95 % frío para ser incubado a -20 °C un mínimo de 10 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 12.000 r.p.m. eliminándose el sobrenadante. Nuevamente el pelet se lavó con 200 μl de etanol frío (-20 °C) al 70 % volviéndose a centrifugar por 2 min. Finalmente se secó el ADN en una estufa por 20 - 30 min y se resuspendió en 50 μL de TE tampón, para luego ser almacenado a -20° C por periodos largos o hasta su utilización.

3.2.4 Calidad y cuantificación de ADN. La verificación de la presencia y calidad del ADN extraído, se evaluó visualmente en geles de agarosa al 1% peso/volumen (p/v) teñidos con bromuro de etidio. La cuantificación de ADN se determinó mediante espectrometría, midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Milton Roy espectral 3000 Array. La concentración de ADN (ng/ μL) se cuantificó realizando diluciones de la solución stock en la misma cubeta de cuarzo, tomando una alícuota de 5 μL de cada muestra mezclados con 1000 μL de agua destilada desionizada estéril. Para el cálculo de la cantidad de ADN, se asumió que una unidad de absorbancia de ADN de doble hebra (ADN ds) o densidad óptica a 260 nm (optical density OD₂₆₀) equivale a 50 μg de ADN por ml de solución (ver formula). Finalmente el ADN

se ajustó a una concentración aproximada de 30 ng/μL con buffer TE, siendo almacenado a -20 °C (SAMBROOK y RUSSELL, 2001).

$$\text{Cantidad de ADN} = \frac{OD_{260} \times 50 \times \text{Volumen medido}}{\text{Volumen ADN tomado}} \quad (3.1)$$

3.2.5 Amplificación de regiones ITS y restricción enzimática (ITS-RFLP).

Con el objeto de identificar a que especie o especies corresponden los aislamientos colectados, se llevó a cabo la técnica ITS-RFLP. Las regiones ITS 1 e ITS 2 fueron amplificadas por los partidores ITS 5M - ITS 2 e ITS 3 - ITS 4, respectivamente (Cuadro 3). Estas regiones se amplificaron para todos los aislamientos y cepas en estudio.

CUADRO 3 Secuencia de nucleótidos de los partidores utilizados en la amplificación de las regiones ITS 1 e ITS 2.

Partidor	Secuencia nucleotídica (5' - 3')
ITS 2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS 3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS 5M	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG

FUENTE: (WHITE *et al.*, 1990).

Se preparó una mezcla para un volumen total de 25 μL para cada reacción, constituida por: Buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl), 2,4 mM de MgCl₂, 2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), Taq DNA polimerasa 0,5 U y 0,4 pmol de cada partidor ITS MWG-Biotech. Una vez depositado el ADN en cada tubito de 0,2 mL, se le agregó la mezcla antes mencionada hasta completar un volumen final de 25 μL.

Todas las muestras se introdujeron en un termociclador PTC-100™ con los siguientes tiempos y temperaturas de amplificación: 1 ciclo a 94° C por 3 min para la denaturación del ADN molde; 39 ciclos a 94 °C por 30 seg de denaturación, 59 °C por 1 min de hibridación del partidor, 72 °C por 1 min de extensión y finalmente un ciclo de elongación a 72 °C por 5 min efectuando un total de 40 ciclos de PCR.

La amplificación de la región ITS 1 para *C. acutatum* proporcionó fragmentos de 285 pb, para *C. lupini* de 285 pb y para *C. gloeosporioides* de 275 pb. De la misma forma para la región ITS 2 se obtuvieron fragmentos de: 346 pb, 346 pb y 347 pb correspondientes a *C. acutatum*, *C. lupini* y *C. gloeosporioides*, respectivamente.

Se verificó la presencia de producto de amplificación de las regiones ITS, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Con el fin de encontrar mutaciones que permitan la diferenciación entre las especies, se alinearon las secuencias génicas de las regiones ITS 1 e ITS 2 de *Colletotrichum* (2 de *C. gloeosporioides*, 7 de *C. acutatum* y 12 de *C. lupini*) obtenidas desde la base de datos de EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute), provenientes de estudios realizados por NIRENBERG *et al.*, (2002). Luego se procedió a la búsqueda de sitios de restricción, con el objeto de diferenciar interespecíficamente las cepas.

Una vez identificados estos sitios, se realizó la búsqueda de enzimas que reconozcan estas mutaciones puntuales, y de este modo diferenciar los aislamientos a nivel de especie. Las enzimas que se utilizaron para la detección de polimorfismos en las regiones ITS fueron: Tru 1I y Bsh 1236I.

La enzima Tru 1I reconoce el sitio de restricción 5`...T↓TAA...3` en la región ITS 2 por lo tanto todos los fragmentos amplificados correspondientes a *C. acutatum*, serán digeridos por la enzima, obteniéndose tres fragmentos de 141, 182 y 23 pb. Asimismo, la enzima Bsh 1236I reconoce el sitio 5`...CG↓CG...3` en la región ITS 1, por lo tanto solo digiere los fragmentos correspondientes a *C. acutatum* y *C. lupini*, obteniéndose dos fragmentos de 125 y 160 pb (Figura 5). La combinación de la mutación en la región ITS 1 con aquella de la región ITS 2 hacen posible la identificación de la o las especies de *Colletotrichum* en estudio.

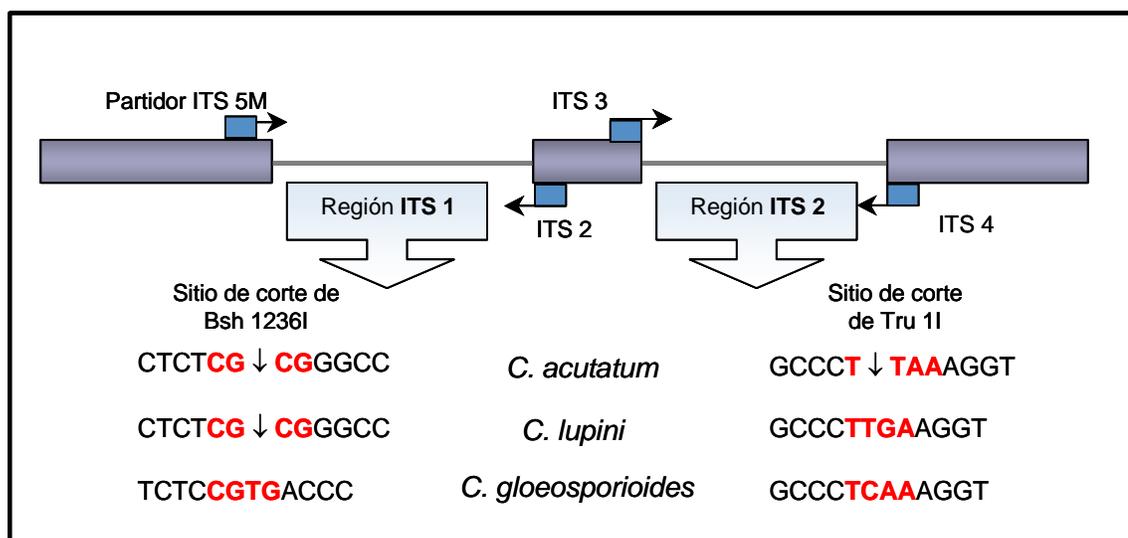


FIGURA 5 Esquema de las regiones ITS 1 e ITS 2 con los respectivos partidores que amplifican dichas regiones y sitios de restricción de las enzimas TRU 1I y Bsh1236I para las tres especies de *Colletotrichum* en estudio.

Los procesos enzimáticos se realizaron tomando 10 µL de producto PCR; 5,5 µL de agua desionizada estéril; 4,0 µL del buffer correspondiente especificado por el fabricante y 5 U de la respectiva enzima, siendo incubada por cuatro horas a 65 °C en el caso Tru 1I y a 37 °C para Bsh 1236I.

Los fragmentos de restricción se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con un marcador de peso de 50 pb DNA Ladder (ABANG *et al.*, 2002).

3.2.6 Fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs). Una vez identificados los aislamientos, se procedió a evaluar su diversidad genética mediante la técnica molecular RAPDs (fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar).

Para el desarrollo de esta técnica se seleccionaron la mayor cantidad posible de partidores polimórficos (Cuadro 4). Cada partidor fue evaluado con cinco aislamientos escogidos al azar, mediante visualización directa en el gel. El criterio de elección radicó principalmente en el grado de loci polimórficos generados, calidad o nitidez de las bandas y la previa participación de algunos de estos partidores en trabajos asociados con *Colletotrichum spp.*

Para las reacciones RAPDs se preparó una mezcla en un tubo eppendorf de 1,5 mL que constó de: Buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl), 4 mM de $MgCl_2$, 2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), Taq ADN polimerasa 5U/ μ L, 0,04 pmol de cada partidor MWG-Biotech. Se estandarizó la técnica variando las cantidades de ADN, Taq ADN polimerasa y $MgCl_2$ hasta lograr una optima combinación.

CUADRO 4 Set de partidores universales evaluados para las reacciones RAPDs.

Partidores		
BKR- 4923	OPE-01	OPB-01
OPA-09	OPE-06	OPB-08
OPA-10	OPE-11	OPD-05
OPA 17	OPE-09	OPD-09
OPA-16	OPE-08	ORF-09
PSM-72*	OPE-20	ORF-08
PSM-86*	OPB-06	ORF-07

* partidores utilizados por NIRENBERG *et al.*, (2002).

FUENTE: Partidores de Operon-Tecnologies.

Todas las muestras se introdujeron en un termociclador PTC-100™ con los siguientes tiempos y temperaturas de amplificación: 1 ciclo a 94° C por 3 min para la denaturación del ADN molde; 40 ciclos a 94° C por 45 segundos de denaturación, 35° C por 45 segundos de hibridación del partidor, 72 °C por 1,30 min de extensión y finalmente un ciclo de elongación a 72 °C por 5 min efectuando un total de 41 ciclos de PCR.

3.2.7 Electroforesis. Después de la PCR, los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% peso/volumen (p/v); esto es, 0.02 g de agarosa por cada mL de tampón TBE 0,5X. Antes de cargar el gel se añadieron 8 µL de tampón de carga (60% glicerol; 0,12% azul de bromofenol; 0,12% de xilen cianol) a los 25 µL de cada muestra. El gel fue corrido a 50 Volts por aproximadamente 3 a 4 hrs. Después de finalizada la electroforesis el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

3.2.8 Evaluación de los datos obtenidos. Los loci polimórficos detectados para cada aislamiento de *Colletotrichum spp.* se analizaron de acuerdo a la

presencia o ausencia de los fragmentos amplificados. Con estos datos se diseñaron matrices binomiales, las cuales constituyeron la base para la determinación de la diversidad genética (Nei, 1978, software POPGENE ver. 1.32 (Yeh y Boyle, 1997)), distancia genética (Nei y Li, 1979; WINBOOT (Yap y Neelson, 1996)) y construcción de un dendrograma (UPMGA, software PHYLIP (Felsenstein, 1989); 1000 bootstrap, software WINBOOT).

4 PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Extracción de ADN.

La metodología utilizada (ver 3.2.3) de extracción resultó ser satisfactoria y confiable, puesto que el ADN extraído fue de buena calidad, por lo que los resultados obtenidos a partir de las reacciones PCR fueron útiles y certeros, a pesar de que el ADN genómico, al ser visualizado en un gel de agarosa al 1%, no presentó bandas tan nítidas debido a la reducida cantidad extraída.

Los inconvenientes de este proceso fueron: la gran demanda de tiempo, la incapacidad de realizar múltiples aislamientos simultáneos debido a los requerimientos de instrumentos capaces de analizar un amplio número de muestras (no disponibles en el laboratorio) y la exigencia de una gran cantidad de materiales estériles, que son ocupados individualmente para cada muestra con el fin de prevenir la contaminación cruzada, además de las precauciones necesarias para el uso de N líquido.

Es por esto que el uso de métodos sensibles, rápidos y eficientes de extracción de ADN fúngico, es una necesidad imperante. GRIFFIN *et al.* (2002) compararon dos diferentes paquetes de extracción bajo condiciones uniformes, tomando una pequeña cantidad de micelio (2,5 mg). Uno basado en congelamiento y descongelamiento del tejido y el otro basado en un agitado con microesferas metálicas. El método de extracción mediante congelado y descongelado resultó ser el más confiable, rápido, económico y sin requerimientos de equipos especiales, además de permitir la extracción simultánea de ADN a partir de un número mayor de muestras.

El ADN se cuantificó por espectrofotometría, verificando así su calidad. Se obtuvo rangos de ADN entre 562,8 ng/ μ L y 1085,4 ng/ μ L. El promedio de la

razón OD_{260}/OD_{280} obtenida fue de 1,3 (ver Anexo 1). Aunque valores de 1.8 a 2.0 son considerados apropiados para estudios genéticos que requieran ADN de calidad, la literatura cita la existencia de cuocientes aproximadamente de 1,2. Esto se debe a que a medida que aumenta la relación OD_{260}/OD_{280} , el porcentaje de ácidos nucleicos es superior al porcentaje de proteínas, por lo tanto la pureza del ADN es mayor (SAMBROOK y RUSSELL, 2001).

4.2 Análisis de la diversidad interespecífica.

Los partidores ITS 5M e ITS2 fueron utilizados para amplificar la región ribosomal ITS 1, asimismo los partidores ITS 3 e ITS 4 se utilizaron en la amplificación de la región ITS 2. Estas reacciones PCR se realizaron bajo condiciones estándares de temperaturas y tiempos; denaturación, hibridación de ambos partidores y elongación de la nueva cadena de ADN. Los resultados fueron verificados en geles de agarosa al 1% p/v, siendo estos satisfactorios. Se estandarizaron los reactivos de PCR, tomando algunas muestras a las que se modificaron concentraciones, hasta encontrar una optima concentración de ADN, $MgCl_2$ y Taq ADN polimerasa.

Los productos PCR fueron digeridos por dos enzimas de restricción; Bsh1236I y Tru 1I, para las regiones ITS 1 e ITS 2, respectivamente. Los patrones obtenidos de la digestión enzimática de los productos de la región ITS 1, se representan en la Figura 7. Se puede observar que todos los aislamientos en estudio junto con las cepas de referencia: BBA71292, BBA70358 y BBA63879, correspondientes a las especies *C. acutatum*, *C. lupini* var *setosum* y *C. lupini* var *lupini*, respectivamente, contaron con la mutación puntual que permitió el reconocimiento y posterior restricción por parte de la enzima Bsh1236I. Sólo la cepa BBA70071 correspondiente a *C. gloeosporioides* no presentó dicha mutación, por lo tanto no fue reconocida por la enzima. Esto demuestra la presencia de la o las especies *C. lupini* y/o *C. acutatum* en los

aislamientos en estudio y descarta categóricamente la existencia de aislamientos correspondientes a la especie *C. gloeosporioides*.

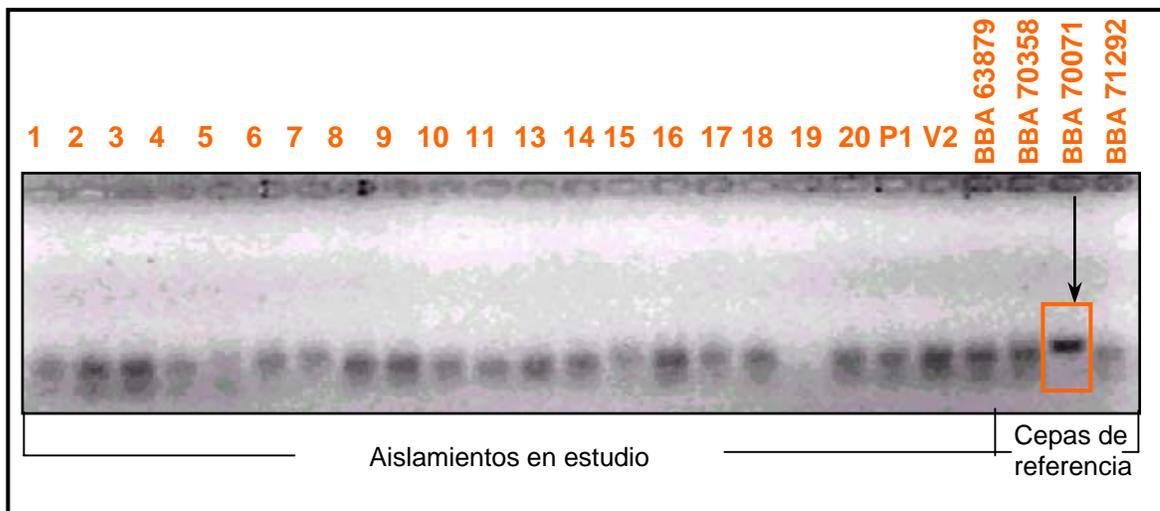


FIGURA 7 Fragmentos de restricción enzimática correspondientes a la región ITS1, digeridas con la enzima Bsh1236I en cepas de *C. acutatum* y *C. lupini* visualizadas en un gel de agarosa al 1%.

En la Figura 8 se observa que la única cepa digerida por la enzima fue la cepa de referencia BBA71292, correspondiente a la especie *C. acutatum*. Todos los aislamientos restantes incluyendo las cepas de referencia BBA70071 (*C. gloeosporioides*), BBA70358 (*C. lupini* var *setosum*) y BBA63879 (*C. lupini* var *lupini*), carecieron de la secuencia específica reconocida por la enzima Tru 1I y que solo la especie *C. acutatum* posee. Por lo tanto ninguno de los aislamientos pertenece a dicha especie. Este análisis es complementario al análisis anterior (restricción enzimática de la región ITS 1), porque diferencia las especies *C. lupini* de *C. acutatum*, definiendo por descarte la especie presente en los aislamientos en estudio como *C. lupini*. Consiguientemente la diversidad interespecífica es igual a cero, es decir, todos los aislamientos pertenecen a una sola especie *C. lupini*. Sin embargo esta técnica no es capaz de diferenciar entre las variedades *lupini* y *setosum*.

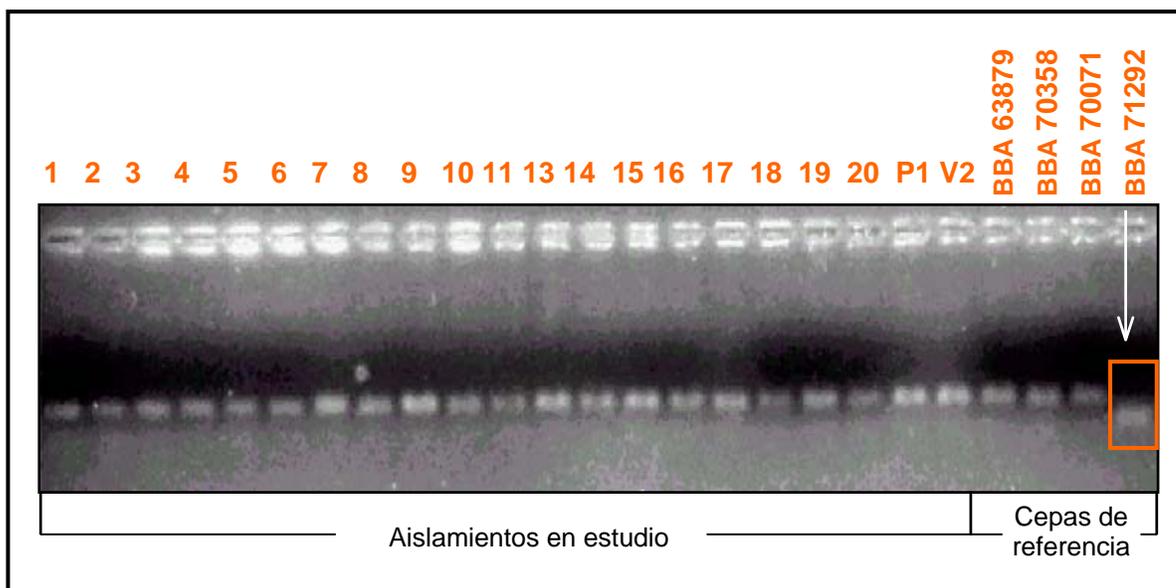


FIGURA 8 Fragmentos de restricción enzimática correspondientes a la región ITS 2, digeridos con la enzima Tru 1I en cepas de *C. acutatum* visualizadas en un gel de agarosa (1%).

El género *Colletotrichum* comprende algunos de los hongos fitopatógenos de mayor importancia económica en el mundo (MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.*, 2000). La revisión de este género por Von Arx (1957) citado por FAGBOLA y ABANG (2004), fue una primicia en la taxonomía de fitopatógenos, en los cuales 750 “especies” fueron reducidas a 11 taxas basadas en parámetros morfológicos mas que por especificidad de hospedero. Estudios mas detallados en morfología, características de cultivo y patogenicidad han incrementado el número de especies actualmente aceptadas.

Numerosas técnicas moleculares han sido utilizadas en la sistematización de especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en lupino. La mayoría de estas técnicas persigue la clarificación de las dos principales especies involucradas en los debates taxonómicos; *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.

SREENIVASAPRASAD *et al.* (1994), reportaron como agente causal de la antracnosis en lupino a *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds, evaluando el uso potencial de secuenciación de nucleótidos de ADNr (ITS 1) para la correcta determinación de relaciones filogenéticas y diagnóstico de especies en *Colletotrichum*. La mayoría de los aislamientos utilizados en su estudio, originalmente identificados mediante taxonomía tradicional como *C. gloeosporioides*, mostraron un mayor porcentaje de homología para *C. acutatum* (97-100%) que para *C. gloeosporioides* (79-81%).

Más tarde, ADASKAVEG y HARTIN (1997) lograron diferenciar las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* mediante partidores especie-específicos que amplifican la región ITS del ADNr mediante PCR. De la misma forma en trabajos realizados por MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.* (2000) de identificación de especies de *Colletotrichum* responsables de la antracnosis en frutilla, en donde se llevó a cabo una restricción enzimática de los productos amplificados de las regiones ITS 1 e ITS 2 del ARNr, se encontraron tres enzimas (de las nueve examinadas) capaces de lograr una diferenciación interespecífica entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. La enzima Mvnl digirió los aislamientos pertenecientes a *C. gloeosporioides* y *C. kahawae*, la enzima Ser F1 digirió los de *C. acutatum* y la enzima Pvull digirió los de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, en su mayoría aislados desde frutilla.

Sin embargo, en estudios posteriores realizados por YANG y SWEETINGHAM (1998) se puso en duda la veracidad de los resultados obtenidos por ADASKAVEG y HARTIN (1997), al probar los partidores específicos Cglnt para *C. gloeosporioides* y Calnt 1 y Calnt 2 para *C. acutatum*, ya que dos de las cepas de referencia de *C. gloeosporioides* (CBS862.70 e IMI 351246) no amplificaron con el par de partidores específicos para esta especie, sino por el contrario, amplificaron con los partidores específicos para *C. acutatum*, lo que sugiere que esos partidores no serían especie-específicos.

YANG y SWEETINGHAM (1998) concluyeron, mediante una identificación morfotaxonómica según Sutton (1980) y grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs), que todos los aislamientos colectados desde *Lupinus*, correspondieron a *C. gloeosporioides*, inclusive tres cepas de referencia de *C. acutatum* (IMI 351260, IMI 351249 e IMI 351244) empleadas en los trabajos de SREENIVASAPRASAD *et al.* (1994). No obstante los resultados que obtuvieron mediante marcadores RAPDs, se opusieron con el criterio morfológico. Los aislamientos en estudio mostraron relaciones fenéticas con un alto coeficiente de similitud entre ellos, no así al ser comparados con cepas de referencia de *C. gloeosporioides* o *C. acutatum*, donde se observó un bajísimo nivel de similitud.

Pese a esto, numerosos autores cuestionan la confiabilidad de la taxonomía tradicional, debido a las dificultades encontradas en el uso de caracteres morfológicos. TALHINHAS *et al.* (2002), señalan que el uso de estos caracteres para el diagnóstico de especies son limitados, a excepción de la tasa de crecimiento de la colonia y forma de las conidias. Sin embargo NIRENBERG *et al.* (2002), señalan que no solo la producción del conidiomata, apresorio y coloración del micelio, son influenciados por el medio de cultivo y las condiciones de luminosidad, sino también la forma y tamaño de las conidias. Cannon *et al.* (2000), citado por FAGBOLA y ABANG (2004), señala que muchas especies de *Colletotrichum* producen conidias secundarias en cultivo, las que son generalmente mas pequeñas y de formas variadas, especialmente a través de cada repique o cuando los cultivos son viejos. La supuesta existencia de formas intermedias entre especies, la plasticidad morfológica y la expresión fenotípica, hacen dificultosa la clasificación taxonómica y complica el uso del criterio clásico de identificación en estos patógenos. Esto constituye un problema en la determinación de caracteres homólogos que permitan un diagnóstico certero del fitopatógeno. En contraste, técnicas de biología molecular proveen métodos alternativos adicionales convirtiéndose en importantes herramientas para resolver los problemas asociados a la

identificación de especies dentro de *Colletotrichum* (MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.*, 2000; WANDERLEI-SILVA *et al.*, 2003; LARDNER *et al.*, 1999).

La propuesta de NIRENBERG *et al.* (2002), otorga una respuesta a esta disyuntiva. Así mediante marcadores moleculares ITS-RFLPs se pudo diferenciar en este trabajo, las tres especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en lupino, en aislamientos chilenos los que pertenecieron en su totalidad a *C. lupini*.

Todos los aislamientos colectados desde *L. albus* estudiados por YANG y SWEETINGHAM (1998), fueron clasificados como *C. gloeosporioides* equivalente a *C. lupini* según NIRENBERG *et al.* (2002), a excepción de dos aislamientos (Acores 1 y Montemor) los que fueron clasificados como COL 3 o *C. acutatum*. Además cabe destacar que estos aislamientos fueron colectados en Portugal, lugar donde también se constató la presencia de *C. lupini* en *L. albus* por medio del aislamiento Acores 2 el que fue identificado dentro del grupo VCG 2 o COL 2. La cepa de referencia de *C. acutatum* (WAC 2897, utilizada en este estudio) fue colectada desde frutilla (*Fragaria* × *Ananassa*), y resultó ser morfológica y molecularmente muy similar a los aislamientos Acores 1 y Montemor asociados a *L. albus*, solo que su grado de patogenicidad hacia lupino es bajo. Esta declaración es confirmada por estudios realizados por LARDNER *et al.* (1999), en donde aislamientos de *C. acutatum* colectados desde frutas no resultaron ser patogénicos a lupino. Esto sugiere que *C. acutatum* es primariamente un patógeno de frutas, como en este caso frutilla, desde las cuales realizaría infección cruzada con lupino mediante colonizaciones saprofitas las que son esporádicas, ya que en posteriores exploraciones realizadas en las islas Azores no se han encontrado aislamientos VCG 1 pertenecientes a *C. acutatum* hospedando lupino (TALHINHAS *et al.*, 2002).

TALHINHAS *et al.* (2002), señaló al patógeno causante de antracnosis en lupino como *C. acutatum*, debido a los resultados obtenidos en su investigación con diversos marcadores moleculares, los que han evidenciado un mayor porcentaje de homología con *C. acutatum* que con *C. gloeosporioides*, logrando diferenciar grupos interespecíficos con el resto de los aislamientos hospederos de lupino, utilizados en su estudio. Según NIRENBERG *et al.* (2002), de estas dos especies involucradas en los debates taxonómicos, *C. gloeosporioides* es ampliamente separada de todas las otras especies y aislamientos asociados a antracnosis en lupino. Estos argumentos dejan al descubierto una mayor probabilidad de encontrar aislamientos pertenecientes a *C. acutatum* que a *C. gloeosporioides*. Por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo son aun más concluyentes, sobretodo por que la cepa de referencia BBA 71292 correspondiente a *C. acutatum* utilizada en este estudio, fue aislada desde *L. albus* en las islas Azores, Portugal, único lugar en el mundo en que se han encontrado dos especies diferentes de *Colletotrichum* atacando a lupino (YANG y SWEETINGHAM, 1998; NIRENBERG *et al.*, 2002; TALHINHAS *et al.*, 2002).

Si bien existen métodos precisos de caracterización molecular de variabilidad inter e intraespecífica, como el análisis de gradiente de denaturación en geles de electroforesis de fragmentos amplificados del ADNr (DGGE) mediante reacción PCR (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), estos no permiten un diagnóstico rápido y certero de identificación rutinaria de especies de *Colletotrichum*, ya que las técnicas existentes han sido creadas con el fin de caracterizar la especie (CULEBRAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2000; FAGBOLA y ABANG, 2004). Sin embargo, la amplificación de regiones ITS 1 e ITS 2 seguida de una restricción enzimática específica, con las enzimas Bsh1236I y Tru 1I ofrecen una clara y fácil identificación de las tres especies fitopatógenas involucradas en la antracnosis en lupino.

A su vez la cepa de referencia para *C. lupini* var *lupini* aislada de *L. mutabilis* desde Bolivia representa el patógeno mas antiguo atacando lupino dentro de la colección de cultivos fúngicos de NIRENBERG *et al.* (2002), y por lo tanto es la cepa mas conocida por ellos.

4.3 Análisis estimativo de la diversidad intraespecífica.

De los 21 partidores arbitrarios evaluados, cinco fueron escogidos para desarrollar esta técnica (Cuadro 5). El criterio de elección se basó principalmente en el número de loci polimórficos y el grado de nitidez de los fragmentos amplificados. Esta cifra representa aproximadamente un 16% del total de partidores evaluados, lo que concuerda con la experiencia de otros estudios similares de determinación de diversidad genética, donde generalmente el porcentaje de selección no sobrepasa el 20% del total de partidores evaluados y teniendo en cuenta que el número de partidores probados en este estudio fue reducido. Esto ultimo obedece al hecho de que evaluar una mayor cantidad de partidores habría involucrado un mayor costo.

CUADRO 5 Secuencias de partidores utilizados en el análisis RAPDs para estimar la diversidad genética de los aislamientos de *C. lupini*.

Partidores	Secuencia nucleotídica (5'- 3')
OPA 10	CAGCACCCAC
OPE 20	GATGACCGCC
PSM 72	GTGATCGCAG
PSM 86	TGAGCGGACA
OPD 05	AACGGTGACC

La reducida temperatura (35°C) utilizada para el alineamiento del partidor, permitió disminuir la especificidad de la reacción PCR, lo que proporcionó un incremento de los sitios de hibridación y en consecuencia un incremento en la

proporción del genoma escaneado (Gidekel *et al.*, 1999 citado por GÓMEZ, 2001).

Las condiciones de amplificación *in vitro* fueron estandarizadas en laboratorio. Los resultados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior teñido con bromuro de etidio, obteniéndose resultados satisfactorios, como los que se observan en la Figura 9.

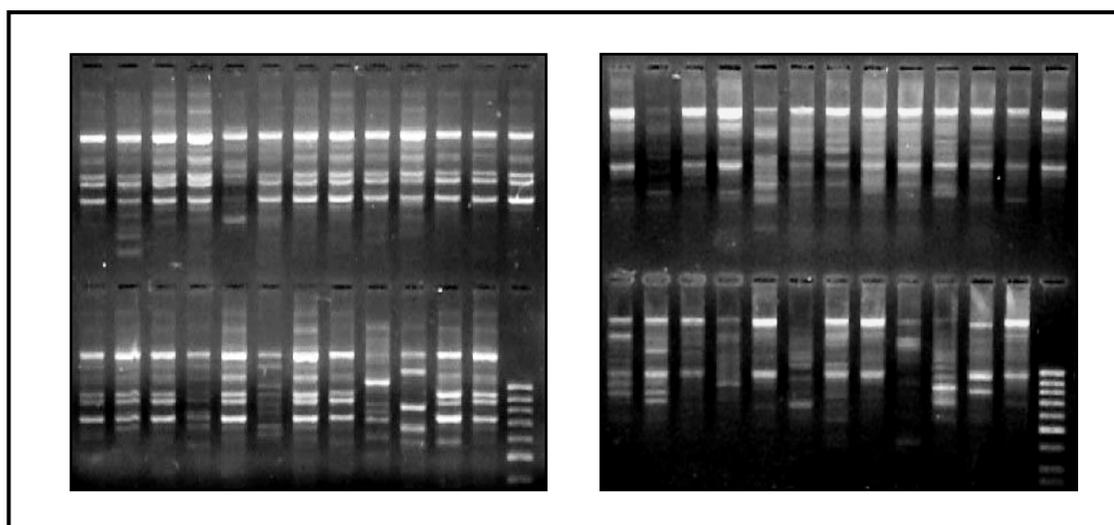


FIGURA 9 Visualización de fragmentos amplificados con el partidor OPE 20 (izquierda) y partidor PSM 72 (derecha) en geles de agarosa al 2%.

Todos los partidores escogidos presentaron loci polimórficos, aunque en número reducido, a excepción de PSM 72 y PSM 86 los que presentaron los más altos grados de diferenciación obteniendo 8 y 15 patrones polimórficos, respectivamente. El partidor OPA 10 fue el único que no presentó loci polimórficos entre las cepas chilenas, pero si a nivel de especie. En total 48 loci polimórficos fueron seleccionados por ser los de mayor reproducibilidad, con un promedio de 9,6 fragmentos polimórficos por partidor, lo que concuerda con la

literatura citada, en este tipo de estudio con diversas especies (BECERRA y PAREDES, 2000).

Para la presencia y/o ausencia de las bandas se asignaron los valores 1 y 0 respectivamente. Con estos valores se construyó una matriz, la que constituyó la información básica para el procesamiento de datos en los programas genéticos Popgene y NTSYS.

De los 21 aislamientos analizados en 48 loci polimórficos, se pueden identificar 16 haplotipos (se entiende por haplotipo a la suma total de todos los genes presentes en un individuo haploide, es decir, el haplotipo es el equivalente al genotipo en genomas diploides). Los aislamientos que constituyen estos haplotipos son los siguientes: A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, A-14, A-15, A-16, A-17, A-18, A-19, A-20 y P-1, cada uno de ellos correspondiente a un haplotipo diferente; mientras que los aislamientos: A-7 y A-9 por un lado y A-8, A-10, A-11, A-13 y V-2 por otro, poseen un mismo patrón genético por lo tanto, para este análisis, constituyen dos haplotipos distintos. Cabe destacar que los aislamientos de este último haplotipo fueron aislados desde localidades, especie-hospedero (especies y tipos de lupino), y fechas de recolección diferentes, no así los aislamientos A-7 y A-9, los que fueron aislados a partir de la misma localidad, fecha y especie-hospedero (Cuadro 2).

4.3.1 Distancias genéticas y formación de grupos fenéticos. Según los patrones de bandas polimórficas RAPDs encontrados en este estudio, los aislamientos más distantes genéticamente entre sí son A-5 y A-3 con una distancia genética de 0,57 los que fueron colectados desde distintos genotipos de *L. albus* en Traiguén y Cajón, respectivamente. Entre los aislamientos A-5, A-6, A-13 y A-17 que se encontraron atacando al mismo genotipo de *L. albus* (cv. Rumbo), los que presentan mayores distancias genéticas entre sí fueron A-5 y A-13 con un valor de 0,53. De los aislamientos pertenecientes a una misma

área geográfica, A-2 y A-18 colectados en la localidad de Cajón, fueron los que presentaron la mayor distancia genética con un valor de 0,53.

Con el objeto de visualizar las distancias genéticas de los 25 aislamientos en estudio, se construyó un dendrograma aplicando el algoritmo UPMGA. Esta esquematización de los resultados, permitió inferir las distintas relaciones fenéticas, mediante la formación de grupos a partir de los aislamientos analizados. En la Figura 10 se observa a la mayoría de los aislamientos chilenos (A-1, A-3, A-4, A-6, A-7, A-8, A-9, A-10, A-11, A-13, A-14, A-15, A-16, A-17, A-19, P-1 y V-2) reunidos bajo un mismo conjunto, el que se denominó Grupo 1, representado por 17 aislamientos de diferentes hospederos y áreas geográficas. Por lo tanto no existe una correlación hospedero-específica con las diversas accesiones, tales como: *L. albus*, *L. angustifolius* (tipos amargos y dulces) y *L. polyphyllus*. Asimismo los aislamientos A-7 y A-9 (los que a su vez constituyen un haplotipo), fueron colectados en la misma fecha, localidad y especie-hospedero. Sin embargo, A-7 se encontró hospedando un tipo de lupino amargo, en cambio A-9 un cultivar dulce Perla. Asimismo los aislamientos A-8 y A-19, también se encuentran en lupinos amargos, mientras que el resto de los aislamientos pertenecientes al haplotipo donde se encuentra A-8, están presentes en lupinos dulces. Esto corrobora lo expresado por HUYGHE (1997), ya que estos aislamientos no diferencian entre líneas isogénicas de lupinos dulces y amargos, lo cual indica una adaptación o tolerancia por parte del hongo al contenido de alcaloides presentes en las distintas accesiones de lupinos. Así mismo tampoco se observa una agrupación que correlacione los aislamientos con el origen geográfico ni la fecha de colecta.

Dentro de los aislamientos de *C. lupini* pertenecientes al Grupo 1, A-4 y A-19 son los que presentan una menor distancia genética hacia las cepas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* con valores de 0,47 y 0,65 respectivamente. Si bien A-4 y A-19 son los aislamientos más cercanos a estas cepas, los valores

de distanciamiento genético son altos, por lo cual son significativamente diferenciados de ambas cepas de referencia. Al mismo tiempo al comparar las cepas de referencia y los aislamientos chilenos, se corroboraron los resultados obtenidos con la técnica ITS-RFLPs, al distinguir tres grandes grupos que categóricamente constituyen las tres especies de *Colletotrichum* en estudio. Las dos especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* que han sido usualmente mencionadas en la literatura como el agente causal de la antracnosis en lupino y *C. lupini* redescrita en el año 2002 como una nueva especie a la que pertenecen todos los aislamientos chilenos (YANG y SWEETINGHAM, 1998; NIRENBERG *et al.*, 2002; TALHINHAS *et al.*, 2002).

El primer grupo constituido por *C. gloeosporioides* se encuentra a una distancia de 0,78 del segundo grupo conformado por *C. acutatum* y a una distancia promedio de 0,81 de ambas variedades de *C. lupini*, constituyendo una mayor separación genética hacia las cepas *C. lupini*, que a *C. acutatum*. *C. gloeosporioides* es distinguido en forma clara como una cepa aislada del resto de cepas y aislamientos pertenecientes a este estudio, con valores de distanciamiento genético que no disminuyen de un 65%, lo que está soportado por valores de bootstrap de 87% (uno de los valores de bootstrap más altos obtenidos en este estudio). Esto indica que *C. gloeosporioides* es ampliamente separado del resto de aislamientos. Así lo señalan NIRENBERG *et al.* (2002), en su estudio en donde la misma cepa BBA 70071 utilizada como cepa de referencia en este estudio para la especie *C. gloeosporioides*, junto con las cepas *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomenes* y *C. musae*, fueron claramente separadas del resto de las especies de *Colletotrichum*. A su vez, el tercer grupo constituido por las cepas de referencia de *C. lupini* y los aislamientos chilenos, puede ser a su vez subdividido en subgrupos (Figura 10).

La mayor distancia genética entre los aislamientos pertenecientes al Grupo 1 corresponde a 0,22 entre los aislamientos A-6 y A-19. Al comparar

estos aislamientos con ambas cepas de referencia de *C. lupini*, se observa una mayor cercanía a la variedad *setosum*. A-6 con una distancia genética de 0,23 a *C. lupini var setosum* y con un valor de 0,26 hacia la variedad *lupini*. En el caso de A-19 una distancia genética de 0,19 lo separa de la variedad *setosum* y un valor de 0,22 de la variedad *lupini*. Considerando que los valores de diferenciación entre ambas variedades son leves y que la formación de grupos fenéticos del estudio obedece mas bien a un grupo polifenético es inadmisibles indicar a cual de las dos variedades corresponden los aislamientos chilenos.

Los cuatro aislamientos restantes A-2, A-5, A-18 y A-20 son muy heterogéneos entre si, diferenciándose del resto de los aislamientos (Grupo 1). El aislamiento A-5 fue colectado desde *L. albus* en la localidad de Traiguén y el aislamiento A-20 fue colectado desde *L. polyphyllus* en la localidad de Freire. Estos aislamientos poseen una distancia genética de 0,29 lo que permitiría agruparlos en un mismo cluster debido a su similitud, mientras que los aislamientos A-2 y A-18 que fueron aislados en Cajón desde *L. albus* y *L. mutabilis* respectivamente, poseen una distancia genética de 0,53 lo que permitiría separarlos. Sin embargo, no se pueden distinguir a estos cuatro aislamientos como grupos claramente definidos.

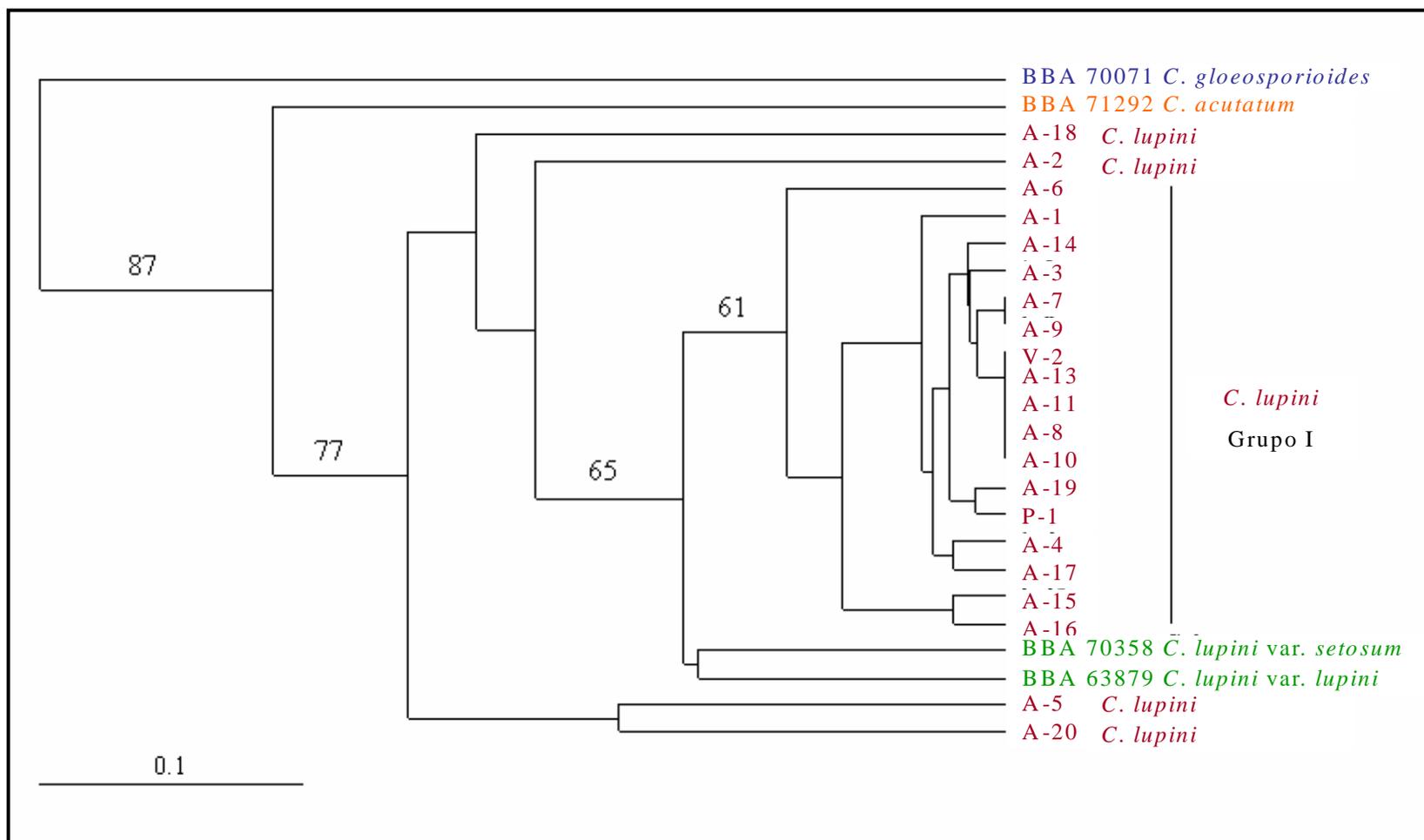


FIGURA 10 Dendrograma de las distancias genéticas de todos los aislamientos y cepas de referencia en estudio, mediante análisis UPMGA.

4.3.2 Diversidad genética. La diversidad genética calculada según NEI (1987), de todos los aislamientos chilenos en estudio es de 0,1513. Sin embargo, si se evalúan solo los aislamientos colectados en la localidad de Cajón, este valor se incrementa a 0,1609, con un valor de 0,1439 para las 13 cepas restantes. Esta situación es interesante, ya que es de esperarse una mayor diversidad en la totalidad de los aislamientos y no en una porción de ellos como es el caso de los aislamientos provenientes de Cajón, que a pesar de ser reducidos en número, siete en total, mostró ser el grupo de mayor diversidad genética. Esto posiblemente es debido a la recurrencia del mejoramiento genético del cultivo de lupino en esta localidad, el cual incluye el desarrollo de tolerancia a antracnosis mediante resultados de ensayos de campo con inoculaciones del patógeno, es decir, por un flujo de genes a la población.

Con respecto a estudios previos realizados en este género, con cepas colectadas desde diversos países en donde se cultiva lupino y está presente la enfermedad, la diversidad genética encontrada en este trabajo es alta, al igual que la cantidad de haplotipos, (un total de 16 haplotipos distintos, de 21 aislamientos estudiados) lo cual es relevante, sobretodo porque los aislamientos se encuentran situados dentro de una limitada zona geográfica. Por lo tanto estos resultados se contraponen categóricamente a los estudios realizados sobre este patógeno afectando lupino alrededor del mundo. Así lo demuestran estudios realizados por NIRENBERG *et al.*, (2002), los que señalan que la mayoría de los aislamientos colectados en diversas áreas del mundo, usados en su estudio pertenecen a una sola especie de *Colletotrichum*, cuya diversidad es bastante baja. Del mismo modo YANG y SWEETINGHAM (1998), establecen a VCG2/COL2 (*C. lupini* var. *setosum*) asociado a la antracnosis del lupino como un grupo altamente homogéneo, distribuido a través del mundo. Esta uniformidad fue demostrada con perfiles RAPDs, los que resultaron ser idénticos con los 11 primers utilizados. Esto propone una reproducción clonal del hongo, el que se habría diseminado rápidamente por el mundo mediante el

intercambio económico de semillas de lupino infectadas. Estos resultados apoyan la teoría que supone a Sudamérica como el centro de origen de este fitopatógeno, de donde probablemente fue introducido hacia Europa (NIRENBERG *et al.*, 2002; SHIVAS *et al.*, 1998).

Si bien la mayoría de los aislamientos locales se agrupan en un solo cluster, también se observa dentro del mismo a la mayoría de los haplotipos reconocidos en este estudio (12 haplotipos distintos) con aislamientos que se diferencian hasta en un 22% de los fragmentos estudiados. Por consiguiente los aislamientos considerados en este estudio integran un grupo polifenético. SHIVAS *et al.* (1998), señalaron a Chile como un posible centro de origen de este patógeno, aunque la carencia de estudios en el resto de Sudamérica, especialmente Bolivia y Perú, imposibilita aseverar definitiva y confiablemente el centro de origen de *C. lupini*.

Según HUYGHE (1997), el patógeno causante de la antracnosis en lupino es hospedero-específico, es decir, puede encontrarse asociado en forma exclusiva a diferentes especies y tipos de plantas del género *Lupinus*. FAGBOLA y ABANG (2004), señalan que dentro del género *Colletotrichum* diversas taxas han sido consideradas como formas hospedero-específicas. Actualmente se desconocen los rangos de hospederos de la mayoría de las especies de *Colletotrichum*. Por consiguiente en posteriores estudios, estas formas hospederos-específicas fueron redefinidas como especies, criterio que se mantiene en la actualidad, pero que sigue generando discusión. Aún no existe una delimitación clara de estos grupos. Se ha encontrado a *C. lupini* infectando a *Urtica dioica* (AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003). Esto podría explicarse como una colonización facultativa del hongo, ya que según SREENIVASAPRASAD *et al.* (1994), *Colletotrichum* comprende una diversa colección de especies fitopatógenas y saprofitas. Otra alternativa es que pueda poseer hospederos alternantes en los cuales complete su ciclo de vida,

constituyendo una fuente de diseminación o inóculo para posteriores infecciones del hongo.

Los principales mecanismos por los cuales se puede generar diversidad genética en las poblaciones de microorganismos fitopatógenos son las mutaciones, el flujo de genes en la población y la recombinación sexual y asexual (AGRIOS, 1996). En este sentido la recombinación asexual y las mutaciones son eventos esporádicos, cuya frecuencia de aparición no podrían originar tal diversidad genética en la población estudiada. Es por esto que es probable la existencia de una recombinación sexual y/o un flujo de genes, que al migrar desde un lugar a otro, permitiría la aparición de nuevos patotipos, explicando en parte, la gran diversidad genética presentada en este estudio.

La recombinación sexual es el mecanismo más eficiente para incorporar diversidad en poblaciones de organismos fitopatógenos. Sin embargo, la recombinación también se puede lograr por medio de parasexualismo (AGRIOS 1996). Los altos valores de diversidad genética encontrados en la reducida área geográfica estudiada y la considerable cantidad de haplotipos, podrían suponer la presencia del estado sexual o teleomorfo del hongo, lo que se contrapone a la teoría propuesta por NIRENBERG *et al.* (2002), los que señalan que en todos los estudios realizados en Europa, nunca han encontrado el teleomorfo, llegando a postular la inexistencia de este o la posibilidad que pueda producirse solo bajo condiciones prevalecientes en el sur de Norteamérica.

Una completa ausencia de la fase sexual durante las colecciones de campo, no solo en Europa sino también en Sudamérica, Weimer (1952) citado por NIRENBERG *et al.* (2002), describió el peritecio del teleomorfo *Glomerella* sobre lesiones en hojas de *L. angustifolius* en Norteamérica; pero lamentablemente este descubrimiento no puede ser confirmado, debido al extravío de la cepa original. Después de este hallazgo, en ninguna descripción

subsecuente de antracnosis en lupino ha sido descubierto el teleomorfo. Sólo en el año 1997 Gueber y Correll citado por TALHINHAS *et al.* (2002), proporcionaron el primer reporte de teleomorfo en *C. acutatum* como *Glomerella acutata*, sugiriendo así la potencial diseminación de cepas originadas sexualmente y la posible adaptación y evolución a nuevos y diversos hospederos. ABANG *et al.* (2002), señaló el caso de *C. gloeosporioides* y *Glomerella cingulata* causante de antracnosis en ñame (*Dioscorea spp.*), en el que hay dudas acerca de la existencia del teleomorfo, insinuándose la posibilidad de que el mismo hongo halla sido identificado con dos nombres diferentes, uno correspondiente al anamorfo y el otro al teleomorfo. Grupos de aislamientos fueron definidos mediante secuenciación de ADNr, aportando evidencia de una integración de aislamientos mitospóricos y meiospóricos en esta especie.

La ausencia de teleomorfo reportada en estudios anteriores, probablemente se deba al requerimiento de condiciones medio ambientales muy específicas y que además, estas condiciones no puedan presentarse en todos los entornos naturales donde está presente el hongo. Sumado a lo anterior, se encuentra la escasez de recursos para la búsqueda e investigación exhaustiva de la fase sexual en el o los posibles lugares de origen de este patógeno y/o que la búsqueda solo se ha concentrado en plantas de lupino, descartando otros posibles hospederos.

4.3.3 Diferenciación de variedades. YANG y SWEETINGHAM (1998) analizaron 43 aislamientos de *Colletotrichum* colectados desde distintas especies de *Lupinus* cultivadas en diversos lugares del mundo. De estos aislamientos se definieron claramente tres grupos mediante 11 partidores arbitrarios RAPDs y un análisis de grupos de compatibilidad vegetativa o “vegetative compatibility group” (VCGs). Estos fueron: VCG1 o COL 1, VCG 2 o COL 2 y COL 3. Los aislamientos de este último grupo mostraron una gran

similitud con *C. acutatum* y un considerable distanciamiento con el resto de las cepas, por lo que se concluyó que pertenecían a esta especie. Cabe destacar que 37 de los 43 aislamientos estudiados por YANG y SWEETINGHAM (1998), correspondieron al grupo VCG 2. Dentro de este grupo encontraron aislamientos mundialmente distribuidos en países como: Australia, Francia, Alemania, Portugal, Polonia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Reino Unido, Estados Unidos y Chile, constituyéndose el grupo mas común asociado a la antracnosis en lupino alrededor del mundo. A su vez estos VCGs y su distribución geográfica coinciden con los dos grupos VCG 1 y VCG 2 definidos por SHIVAS *et al.* (1998).

NIRENBERG *et al.* (2002), determinaron que los grupos fenéticos establecidos en su investigación coincidían con los descubiertos por YANG y SWEETINGHAM (1998), por lo tanto el grupo COL 1 o VCG 1 es idéntico con *C. lupini* var. *lupini* y el grupo COL 2 o VCG 2 con *C. lupini* var. *setosum*. La única cepa chilena incluida en este estudio fue aislada desde *L. angustifolius* proveniente de Temuco, la que fue clasificada dentro del grupo VCG 2. Según NIRENBERG *et al.* (2002), en Sudamérica existen las dos variedades de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en lupino: *C. lupini* var. *lupini* presente en Bolivia y *C. lupini* var. *setosum* presente en Brasil. NIRENBERG *et al.* (2002), definió subgrupos dentro de las especies de *C. lupini*, tal como se propuso en estudios anteriores (YANG y SWEETINGHAM, 1998). El término variedad engloba el concepto de subgrupos dentro de una misma especie. Estos subgrupos están constituidos por cepas con características morfológicas comunes, a menudo relacionadas con un rango específico de hospederos (CIAMPI, 2002). Ambas variedades, *C. lupini* var. *lupini* y *C. lupini* var. *setosum*, son establecidas mediante ligeras características morfológicas de coloración micelial, presencia de setas y forma de conidias del micelio aéreo, pero ambas infectan indistintamente a diferentes especies de lupino.

Posteriormente esta clasificación fue ratificada con marcadores RAPDs y secuenciación de ADN. La diferenciación fue otorgada por una o dos bandas polimórficas (según los partidores arbitrarios utilizados en los perfiles RAPDs) y una mutación de una base en la región ITS 2 en la secuenciación del ADN ribosomal (NIRENBERG *et al.*, 2002) No obstante, estas diferencias son leves, por lo cual si no se cuenta con un análisis de secuenciación, es difícil un diagnóstico certero y rápido mediante análisis morfológico y/o marcadores RAPDs. Los partidores arbitrarios PSM 72 y PSM 86, proporcionaron dos fragmentos adicionales en presencia de *C. lupini* var. *lupini*. Por lo tanto ambas variedades son definidas por la presencia o ausencia de estas bandas polimórficas.

En este trabajo no se logró la diferenciación de ambas variedades de *C. lupini* mediante perfiles electroforéticos RAPDs, debido a la difícil reproducibilidad entre laboratorios, tan propia de este marcador, lo que dificultó la identificación de las dos bandas polimórficas presentes en *C. lupini* var *lupini* y ausentes en *C. lupini* var *setosum*, en presencia de los marcadores PSM 72 o PSM 86 (NIRENBERG *et al.*, 2002). Sin embargo, al observar los perfiles electroforéticos es posible deducir la existencia de una o incluso más variedades.

Ni el Grupo 1, ni el resto de los aislamientos se correlacionan con la clasificación existente de ambas variedades de *C. lupini* (BBA 70358 y BBA 63879), sino por el contrario, estas cepas de referencia se encuentran a una distancia genética entre sí de 0,23 conformando un grupo muy estrecho, (con valores de bootstrap de 61%) distanciándose genéticamente del resto de los aislamientos chilenos. Por lo tanto no se pueden clasificar los aislamientos dentro de una de las variedades de *C. lupini*. En el dendograma (Figura 10) se aprecia el Grupo 1 con sus subgrupos y los aislamientos restantes los que

podrían constituir otras variedades de *C. lupini*, como anteriormente se ha propuesto (NIRENBERG *et al.*, 2002).

Idealmente se podrían diseñar partidores específicos para diferenciar las especies *C. acutatum* y *C. lupini*, con el objeto de identificarlas fácil y rápidamente. Esto tendría sentido si al mismo tiempo se desarrollaran pruebas de virulencia del agente fitopatógeno y resistencia del hospedero a las diversas variantes del patógeno.

Este estudio es un importante avance preliminar, ya que se determinó la especie asociada a antracnosis en lupino en Chile y la diversidad genética presente en la población estudiada. Investigaciones futuras acerca de las interacciones y asociaciones entre las cepas del patógeno y la relación hospedero-patógeno, darán información práctica para la realización de programas en el mejoramiento del lupino, los que incluyan resistencia a esta enfermedad. En este sistema es necesario conocer las cepas presentes para seleccionar y evaluar los materiales genéticos con resistencia a esas variantes para iniciar la introgresión de esos genes en los cultivares comerciales.

5 CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología basada en herramientas moleculares, que permitió diferenciar las tres especies de *Colletotrichum* asociadas a antracnosis en lupino: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. lupini*.
- Todos los aislamientos fúngicos colectados desde *Lupinus sp.* dentro de la IX Región de Chile pertenecen a la especie *C. lupini*.
- Mediante la técnica molecular RAPDs y la visualización de las distancias genéticas por medio del dendrograma, se corroboró la diferenciación entre las tres especies de *Colletotrichum* involucradas en la antracnosis del lupino. *C. gloeosporioides* fue la especie con una mayor distancia genética hacia el resto de las especies y aislamientos.
- Se determinó una alta diversidad genética dentro de los aislamientos en estudio.
- La mayor diversidad genética se encontró en los aislamientos provenientes de la localidad de Cajón. Esta diversidad, incluso fue mayor que la presentada por la totalidad de los aislamientos en estudio.
- La mayoría de los aislamientos chilenos se agruparon bajo un mismo conjunto fenético denominado Grupo 1, dentro del cual se diferenciaron 12 haplotipos. Fuera de este grupo existen cuatro haplotipos, los que son bastante heterogéneos entre si.

- La gran diversidad, el número de haplotipos y el hecho de que los aislamientos chilenos no formaron grupos fenéticos, con ninguna de las dos variedades de *C. lupini* utilizadas como referencia en este estudio, evidencia la presencia de otras variedades en Chile.
- No se estableció una correlación entre la formación de los distintos grupos fenéticos, con el lugar geográfico de colecta y tipo de hospedero.

6. RESUMEN

Actualmente la antracnosis representa una de las enfermedades más importantes y devastadoras del lupino en Chile y el mundo, llegando a ocasionar pérdidas en campo, de hasta el 50% en *L. angustifolius* y el 100% en *L. albus*.

La taxonomía de los aislamientos del hongo *Colletotrichum* causante de antracnosis en lupino ha sido ampliamente estudiada y discutida. Algunos autores lo han descrito como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. y otros como *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds. Tradicionalmente los aislamientos fúngicos se han diferenciado mediante análisis morfotaxonómico. Sin embargo este análisis posee numerosas desventajas, las que han sido subsanadas, con el desarrollo de herramientas moleculares, las que a su vez han constituido un apoyo a la sistemática tradicional. Recientemente este patógeno ha sido redescrito mediante análisis de taxonomía tradicional y el uso de herramientas moleculares como una nueva especie, *Colletotrichum lupini*.

Se plantea que los aislamientos chilenos pertenecen a otra especie y que la diversidad genética presentada por ellos es alta.

En este trabajo se desarrolló una metodología, que permitió la diferenciación de las tres especies de *Colletotrichum* asociadas a antracnosis en lupino. Mediante marcadores moleculares ITS-RFLPs, se determinó que todos los aislamientos chilenos en estudio, pertenecen a la especie *C. lupini*.

Marcadores moleculares RAPDs fueron utilizados para analizar la diversidad genética de 21 aislamientos colectados en la IX Región de Chile. Esta diversidad resultó ser alta, sobretodo en los aislamientos provenientes de la localidad de Cajón, los que superaron el valor de diversidad genética encontrada en la totalidad de los aislamientos estudiados.

La mayoría de los aislamientos se agruparon en un grupo fenético heterogéneo, el cual presentó 12 haplotipos distintos. Los cuatro haplotipos restantes, no constituyeron grupos claramente definidos. La gran diversidad genética, el número de haplotipos encontrados y la formación de grupos independientemente de las variedades *lupini* y *setosum*, suponen la presencia de otras variedades en los aislamientos chilenos. No se estableció una correlación entre la formación de los distintos grupos fenéticos, con el lugar geográfico de colecta y el tipo de hospedero.

Este trabajo es un primer paso para el desarrollo de tolerancia y/o resistencia a antracnosis en los programas de mejoramiento genético de lupino realizados en Chile. Se requieren de futuras investigaciones de patogenicidad de los aislamientos de *C. lupini* y de las interacciones ecológicas entre estos y los diversos genotipos de lupino.

7. SUMMARY

At present the anthracnose represents one of the most important and devastating diseases of the lupin in Chile and the world, causing lost in field from 50% in *L. angustifolius* until 100% in *L. albus*.

The taxonomy of the fungi isolations *Colletotrichum* causing the anthracnose on lupin has been widely studied and discussed. Some authors have described it like *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. and others like *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds. Traditionally the isolations have been distinguished assessed by morphotaxonomic analysis. Nevertheless this analysis has numerous disadvantages. These have been corrected with the development of molecular tools, and these have constituted a support to the traditional systematics. Recently this pathogen has been redescribed like a new specie, *Colletotrichum lupini*.

It is said that Chilean isolations belong to another specie and its genetic diversity is high.

In this work a methodology, that allowed the differentiation of three species of *Colletotrichum* associated to the anthracnose of the lupin assessed by ITS-RFLPs molecular markers, was developed. It was determined that all the Chilean isolations in study belong to specie *C. lupin*.

Molecular markers as RAPDs were used to analyze the genetic diversity of 21 isolations collected in the IX region of Chile. This diversity was high, coverall in the isolations belonged of the locality of Cajón. These isolations

surpassed the genetic diversity value founded in the totality of the studied isolations.

The majority of the isolations was grouped in a heterogeneous phenetic group, which presented 12 different haplotypes. The four remaining haplotypes did not constitute groups defined clearly. The great genetic diversity, the number of haplotypes founded and the formation of groups independently of the varieties *lupini* and *setosum* suppose the presence of other varieties in the Chilean isolations. A relationship between the formation of different phenetic groups, with the geographic place of collect and the type of host-plant was not established.

This work is a first step for the development of tolerance and/or resistance to anthracnose in the programs of genetic improvement of lupin realized in Chile. But future researches of the pathogenicity of *C. lupini* isolations and their ecological interactions with the different genotypes of lupins will be required.

8 BIBLIOGRAFIA

- ABANG, M., WINTER, S., GREEN, K., HOFFMANN, P., MIGNOUNA, H. y WOLF, G. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology USA* 51: 63-71.
- ADASKAVEG, J. y HARTIN, R. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology USA* 87:979-987.
- AFANADOR-KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M. y FREEMAN, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology USA* (93 (5): 579-587.
- AGRIOS, G. 1996. *Fitopatología*. 2ª edición. Mexico. Limusa pp: 285-290.
- AGRIOS, G. 1997. *Plant Pathology*. 4ª ed. Florida. Academic. 635 p.
- AINSWORTH, G. C. & BISBY, G. R. 1995. *Dictionary of the fungi*. 8ª ed. Londres. CABI. 616 p.
- ARAYA, C. 2003. Coevolución de Interacciones Hospedante-Patógeno en frijol común. *Fitopatología Brasileira* 28(3): 221-228.

- BANFI, S. 2004. Leguminosas y papas (On line). Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. <<http://www.odepa.cl>> (18 Ago. 2004).
- BECERRA, V. y PAREDES, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica (Chile) 60(3): 270-279.
- CAMPOS, H. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. Agro Sur (Chile) 23(1): 68-75.
- CAMPOS, H. y SALVO, H. 1995. Marcadores Moleculares: aplicaciones al mejoramiento genético de plantas. Agro Sur (Chile) 23(2): 173-185.
- CIAMPI, L. 2002. Introducción a la patología vegetal. Valdivia Chile. América. 232 p.
- DAUCH, A., WATSON, A., JABAJI-HARE, S. 2003. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. Journal of Microbiological Methods 55: 51-64.
- DESARROLLO, INNOVACIÓN Y GESTIÓN EN AGRONEGOCIOS LTDA. (DIG). 2001. Informe final diagnóstico sector leguminosas de grano-lupino y taller estratégico del sector. (On line). <http://www.sitec.cl/boletines/leguminosas/diagnostico_lupino.pdf>. (28 oct. 2002).
- FAGBOLA, O. y ABANG, M. 2004. *Colletotrichum circinans* and *Colletotrichum coccodes* can be distinguished by DGGE analysis of PCR-amplified 18S rDNA fragments. African Journal of Biotechnology 3(3): 195-198.

- FAIGUENBAUM, H. Y MOUAT, P. s.f. Biología de cultivos anuales (On line). Universidad Católica <http://www.uc.cl/sw_educ/cultivos/index3.htm> (20 Sept. 2004).
- FERREIRA, M. Y GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília, Embrapa.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 1982. El cultivo y la utilización del tarwi, *lupinus mutabilis* sweet. Roma, Italia. FAO 236 p.
- GALDAMES, R. Y PEÑALOZA, E. 1995. Enfermedades del lupino en el sur de Chile, mancha café y antracnosis. Tierra Adentro 2:32-35.
- GARCIA-MAS J., GRACIANO, E., ARANZANA, M., MONFORTE, A., OLIVER, M., BALLESTER, J., VIRUEL, M. y ARUS, P. 2000. Marcadores de ADN: Concepto, Tipos, Protocolos. In: Nuez, F. y Carrillo, J. (eds). Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. España. Universidad Politécnica de Valencia. pp: 93-151.
- GIOVAMBATTISTA, G., RIPOLI, M., LIRÓN J., KIENAST, M., VILLEGAS, E., CASTAGNASO, DULOUT, F., PERAL GARCÍA, P. 2001. Aplicación de las técnicas de polimorfismo de ADN en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad. Analecta Veterinaria 21(1): 5-11 On line. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol21n1/038_VE21n1_giobambattista_polimorfismo_dna.pdf> (23 Sept. 2004).
- GÓMEZ, R. 2001. Selección y caracterización molecular de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* resistentes al frío. Lic. Bíoq. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 62 p.

- GOODWIN, S., DRENTH, A. y FRY, W. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* 22: 107-115.
- GRIFFIN, D. W., KELLOGG, C. A., PEAK, K. K. y SHINN, E. A. 2002. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. *Applied Microbiology* 34: 210-214.
- GUNNELL, P. y GUBLER, W. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia USA* 84(2): 157-165.
- HASHAGEN, W. y VON BAER, E. 1996. ¿Cómo convivir con la antracnosis?. In: Avances de Investigación en Lupino. Temuco, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro regional de Investigación Carillanca. 222 p.
- HORTON, T. 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* 244: 29–39 (On line). <<http://www.esf.edu/efb/horton/horton2002.pdf>> (27 sept. 2004).
- HUYGHE, C. 1997. White lupin (*Lupinus albus* L.). *Field Crops Research* 53:147-160.
- KELEMU, S., SKINNER, D., BADEL, J., MORENO, C. y RODRIGUEZ, M. 1999. Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. *European Journal Plant Pathology* 105: 261-272.

- KURAMAE-IZIOKA, E., LOPES, R., SOUZA, L. y MACHADO, A. 1997. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum spp.* from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 103 (4): 323-329.
- LARDNER, R., JOHNSTON, P., PLUMMER, K. y PEARSON, M. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycological Research (Reino Unido)* 103(3): 275-285.
- MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.; BARRIO, E.; GARCÍA, D. y QUEROL, A. 2000. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacer of the ribosomal region. *Microbiology Letters (España)* 189: 97-101.
- MESSIAEN, M. y BLANCARD, D. 1995. *Enfermedades de las hortalizas*. Madrid. Mundi Prensa. 575p.
- NIRENBERG, H.; FEILER, U. y HAGEDORN, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. Nov. in modern terms. *Mycologia (Alemania)* 94(2): 307-320.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590. *Molecular population genetic and evolution*. Nueva York, Columbia University. 512 p.
- ORBERÁ, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21:15-19. On line. <<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/015019.pdf>> (22 Sept. 2004).

- PEÑALOZA, H. E. 1997. El lupino para grano en: alternativas para la modernización y diversificación agrícola. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) p 213-220. (Original no consultado). Compendiado en BIBA NR 24314.
- PEREDO, H. y VALENZUELA, E. 1988. Nuevas determinaciones de hongos patógenos forestales en Chile. Boletín Micológico (Chile). p 251.
- RÍOS, M. 2000. Estudios de aspectos tóxicos y productivos al incorporar 1/10 dl_{50} de perclorato de lupalina en raciones de pollos Broilers. Tesis Lic. Med. Veter. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 44p.
- ROSELLÓ-MORA, R. 1999. Sobre el concepto de especie en microbiología. Actualidad SEM, Sociedad Española de Microbiología 27:18-22.
- SAMBROOK, J. y RUSSELL, D. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory 3: A20-A21.
- SCHENELL, S. y MENDOZA, C. 1997. Theoretical description of the polymerase chain reaction. J. Theor. Biol. 188 313-318 (On line). <http://www.informatics.indiana.edu/schnell/papers/jtb188_313.pdf> (23 Sept. 2004).
- SHIVAS, R., Mc CLEMENTS, J. y SWEETINGHAM, M. 1998. Vegetative compatibility amongst isolates of *Colletotrichum* causing lupin anthracnose. Australiassan Plant Patology 27(4): 269-273. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 19991001109.

- SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P. y AVERIL, E. 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycol. Research (Reino Unido)* 98(2):186-188.
- THALHINAS, P., SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS J. y OLIVEIRA H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology (USA)* 92 (9): 986-996.
- UFFO, O., SANZ, A. y MARTINEZ, S. 2000. Marcadores Moleculares en el mejoramiento y la genética animal. La Habana, Cuba. Edicensa. 94 p.
- VALLEJOS, E., SILVA, P., y ACEVEDO, E. 2003. Evaluación del rendimiento de nueve genotipos de lupino en la zona central. Tesis Lic. Agr. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 37 p.
- VON ARX. 1974. The genera of fungi, sporulating in pure culture. 2nd edition. Alemania. Strauß & Cramer. 315 p.
- WANDERLEI-SILVA, D.; RAMALHO, E. Y HANLIN, R. 2003. Molecular systematics of the Phyllachorales (Ascomycota, Fungy) based on 18S Ribosomal DNA sequences. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Brasil)* 46 (3): 315-322.
- WEIMER, J. 1943. Anthracnose of lupines. *Phytopatology (USA)* 33: 249-252.
- WHITE, T., BRUNS, S. y TAYLOR, W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. y White, T. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York. Academic Press. pp: 315-322.

WINKA, K. 2000. Phylogenetic relationships within the Ascomycota based on 18S rDNA sequences. Tesis de Doctorado. Umeå University, Sweden. Department of Ecology and Environmental Science. 91 p.

YANG, H. y SWEETINGHAM, M. 1998. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. Aust. J. Agric. Res. 49: 1213-1223.

ANEXOS

ANEXO 1 Cuantificación de ADN.

Aislamiento	Alícuota ADN	OD₂₆₀	OD₂₈₀	OD₂₆₀/OD₂₈₀	Concentración de ADN ds (ng/ μL)	Dilución RAPDs ADN + TE
A-1	5 μ L	0,073	0,054	1,350	733,65	1 + 23
A-2	5 μ L	0,075	0,058	1,307	753,75	1 + 24
A-3	5 μ L	0,085	0,064	1,327	854,25	1 + 27
A-4	5 μ L	0,090	0,065	1,391	904,50	1 + 29
A-5	5 μ L	0,078	0,056	1,387	783,90	1 + 25
A-6	5 μ L	0,085	0,061	1,389	854,25	1 + 27
A-7	5 μ L	0,102	0,079	1,284	1025,1	1 + 33
A-8	5 μ L	0,092	0,059	1,543	924,60	1 + 30
A-9	5 μ L	0,108	0,080	1,343	1085,4	1 + 35
A-10	5 μ L	0,090	0,071	1,270	904,50	1 + 29
A-11	5 μ L	0,078	0,057	1,370	783,90	1 + 25
A-13	5 μ L	0,088	0,068	1,294	884,40	1 + 28
A-14	5 μ L	0,094	0,069	1,358	944,70	1 + 30
A-15	5 μ L	0,092	0,064	1,439	924,60	1 + 30
A-16	5 μ L	0,081	0,062	1,318	814,05	1 + 26
A-17	5 μ L	0,081	0,057	1,412	814,05	1 + 26
A-18	5 μ L	0,070	0,050	1,392	703,50	1 + 22
A-19	5 μ L	0,058	0,042	1,382	582,90	1 + 18
A-20	5 μ L	0,075	0,052	1,431	753,75	1 + 24
P-1	5 μ L	0,069	0,049	1,407	693,45	1 + 22
V-2	5 μ L	0,062	0,047	1,337	623,10	1 + 20
70071	5 μ L	0,056	0,042	1,332	562,80	1 + 18
70358	5 μ L	0,070	0,050	1,404	703,50	1 + 22
63879	5 μ L	0,075	0,053	1,422	753,75	1 + 24
71292	5 μ L	0,057	0,042	1,362	572,85	1 + 18

ANEXO 2 Distancias genéticas entre los aislamientos chilenos y las cepas de referencia de *Colletotrichum*.

A-1 0.00000 0.33333 0.06667
A-2 0.33333 0.00000 0.40000 0.30233
A-3 0.06667 0.40000 0.00000 0.06122 0.56757
A-4 0.08333 0.30233 0.06122 0.00000 0.50000 0.20000
A-5 0.50000 0.54839 0.56757 0.50000 0.00000 0.39394 0.48718
A-6 0.12195 0.27778 0.19048 0.20000 0.39394 0.00000 0.13636 0.16279
A-7 0.06383 0.38095 0.04167 0.05882 0.48718 0.13636 0.00000 0.02041 0.00000
A-8 0.04348 0.36585 0.02128 0.04000 0.52632 0.16279 0.02041 0.00000 0.02041 0.00000
A-9 0.06383 0.38095 0.04167 0.05882 0.48718 0.13636 0.00000 0.02041 0.00000 0.02041 0.02041
A-10 0.04348 0.36585 0.02128 0.04000 0.52632 0.16279 0.02041 0.00000 0.02041 0.00000 0.00000 0.00000
A-11 0.04348 0.36585 0.02128 0.04000 0.52632 0.16279 0.02041 0.00000 0.02041 0.00000 0.00000 0.00000 0.02128
A-13 0.04348 0.36585 0.02128 0.04000 0.52632 0.16279 0.02041 0.00000 0.02041 0.00000 0.00000 0.00000 0.02128 0.12500
A-14 0.06667 0.35000 0.04348 0.06122 0.51351 0.14286 0.04167 0.02128 0.04167 0.02128 0.02128 0.02128 0.00000 0.10638 0.10204
A-15 0.13044 0.31707 0.14894 0.12000 0.42105 0.11628 0.10204 0.12500 0.10204 0.12500 0.12500 0.12500 0.10638 0.00000 0.04000 0.12500
A-16 0.12500 0.30233 0.14286 0.07692 0.45000 0.15556 0.09804 0.12000 0.09804 0.12000 0.12000 0.12000 0.10204 0.04000 0.00000 0.12000 0.43590
A-17 0.08696 0.36585 0.06383 0.04000 0.47368 0.20930 0.06122 0.04167 0.06122 0.04167 0.04167 0.04167 0.06383 0.12500 0.12000 0.00000 0.40541 0.08696
A-18 0.37143 0.53333 0.38889 0.38462 0.40741 0.43750 0.36842 0.35135 0.36842 0.35135 0.35135 0.35135 0.38889 0.45946 0.43590 0.40541 0.00000 0.37143 0.46667
A-19 0.09091 0.38462 0.06667 0.08333 0.55556 0.21951 0.06383 0.04348 0.06383 0.04348 0.04348 0.04348 0.06667 0.17391 0.16667 0.08696 0.37143 0.00000 0.43590 0.02222
A-20 0.38462 0.29412 0.45000 0.34884 0.29032 0.33333 0.42857 0.41463 0.42857 0.41463 0.41463 0.41463 0.40000 0.36585 0.34884 0.36585 0.46667 0.43590 0.00000 0.40000 0.41463
P-1 0.06667 0.35000 0.04348 0.06122 0.51351 0.19048 0.04167 0.02128 0.04167 0.02128 0.02128 0.02128 0.04348 0.14894 0.14286 0.06383 0.33333 0.02222 0.40000 0.00000 0.02128
V-2 0.04348 0.36585 0.02128 0.04000 0.52632 0.16279 0.02041 0.00000 0.02041 0.00000 0.00000 0.00000 0.02128 0.12500 0.12000 0.04167 0.35135 0.04348 0.41463 0.02128 0.00000
71292 0.56098 0.66667 0.47619 0.46667 0.69697 0.63158 0.50000 0.48837 0.50000 0.48837 0.48837 0.48837 0.52381 0.53488 0.51111 0.48837 0.56250 0.56098 0.55556 0.52381
70071 0.70000 0.82857 0.65854 0.68182 0.75000 0.83784 0.67442 0.66667 0.67442 0.66667 0.66667 0.66667 0.70732 0.71429 0.72727 0.66667 0.93548 0.65000 0.82857
70358 0.23810 0.29730 0.25581 0.21739 0.52941 0.23077 0.24444 0.22727 0.24444 0.22727 0.22727 0.22727 0.20930 0.27273 0.26087 0.22727 0.39394 0.19048
63879 0.26829 0.44444 0.28571 0.28889 0.51515 0.26316 0.22727 0.25581 0.22727 0.25581 0.25581 0.25581 0.23810 0.25581 0.24444 0.25581 0.56250

(Continúa)

Continuación Anexo 2.

A-1 0.08333 0.50000 0.12195 0.06383 0.04348 0.06383 0.04348 0.04348 0.04348 0.06667 0.13044 0.12500 0.08696 0.37143 0.09091 0.38462 0.06667 0.04348 0.56098 0.70000 0.23810
 0.26829
A-2 0.54839 0.27778 0.38095 0.36585 0.38095 0.36585 0.36585 0.36585 0.35000 0.31707 0.30233 0.36585 0.53333 0.38462 0.29412 0.35000 0.36585 0.66667 0.82857 0.29730 0.44444
A-3 0.19048 0.04167 0.02128 0.04167 0.02128 0.02128 0.02128 0.04348 0.14894 0.14286 0.06383 0.38889 0.06667 0.45000 0.04348 0.02128 0.47619 0.65854 0.25581 0.28571
A-4 0.05882 0.04000 0.05882 0.04000 0.04000 0.04000 0.06122 0.12000 0.07692 0.04000 0.38462 0.08333 0.34884 0.06122 0.04000 0.46667 0.68182 0.21739 0.28889
A-5 0.52632 0.48718 0.52632 0.52632 0.52632 0.51351 0.42105 0.45000 0.47368 0.40741 0.55556 0.29032 0.51351 0.52632 0.69697 0.75000 0.52941 0.51515
A-6 0.13636 0.16279 0.16279 0.16279 0.14286 0.11628 0.15556 0.20930 0.43750 0.21951 0.33333 0.19048 0.16279 0.63158 0.83784 0.23077 0.26316
A-7 0.02041 0.02041 0.02041 0.04167 0.10204 0.09804 0.06122 0.36842 0.06383 0.42857 0.04167 0.02041 0.50000 0.67442 0.24444 0.22727
A-8 0.00000 0.00000 0.02128 0.12500 0.12000 0.04167 0.35135 0.04348 0.41463 0.02128 0.00000 0.48837 0.66667 0.22727 0.25581
A-9 0.02041 0.04167 0.10204 0.09804 0.06122 0.36842 0.06383 0.42857 0.04167 0.02041 0.50000 0.67442 0.24444 0.22727
A-10 0.02128 0.12500 0.12000 0.04167 0.35135 0.04348 0.41463 0.02128 0.00000 0.48837 0.66667 0.22727 0.25581
A-11 0.12500 0.12000 0.04167 0.35135 0.04348 0.41463 0.02128 0.00000 0.48837 0.66667 0.22727 0.25581
A-13 0.12000 0.04167 0.35135 0.04348 0.41463 0.02128 0.00000 0.48837 0.66667 0.22727 0.25581
A-14 0.06383 0.38889 0.06667 0.40000 0.04348 0.02128 0.52381 0.70732 0.20930 0.23810
A-15 0.45946 0.17391 0.36585 0.14894 0.12500 0.53488 0.71429 0.27273 0.25581
A-16 0.16667 0.34884 0.14286 0.12000 0.51111 0.72727 0.26087 0.24444
A-17 0.36585 0.06383 0.04167 0.48837 0.66667 0.22727 0.25581
A-18 0.33333 0.35135 0.56250 0.93548 0.39394 0.56250
A-19 0.04348 0.56098 0.65000 0.19048 0.21951
A-20 0.55556 0.82857 0.40541 0.44444
P-1 0.65854 0.20930 0.23810
V-2 0.48837 0.66667 0.22727 0.25581
71292 0.48837 0.00000 0.78378 0.74359 0.73684
70071 0.65854 0.66667 0.78378 0.00000 0.89474 0.72973
70358 0.40541 0.20930 0.22727 0.74359 0.89474 0.00000 0.23077
63879 0.21951 0.44444 0.23810 0.25581 0.73684 0.72973 0.23077 0.00000