



Universidad Austral de Chile

Escuela de Agronomía

**Determinación de especies de los géneros
Golovinomyces (Erysiphe) y *Alternaria* que afectan
el cultivo de achicoria (*Cichorium intybus* L. var.
sativum Biskoff) en Chile.**

Memoria presentada como parte de los
requisitos para optar al título de
Ingeniero Agrónomo

Mónica Daniela Almarza Almarza

Valdivia – Chile

2009

PROFESOR PATROCINANTE:

Nancy Andrade S.
Ingeniero Agrónomo, M.Sc.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:

Ricardo Riegel S.
Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Dr. Rer. Silv.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

Rodrigo Acuña L.
Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Dr. Hort.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

Este logro se lo dedico a mi mamá Doris,
que ha sido mi gran ejemplo
de esfuerzo y perseverancia

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pudo realizarse gracias a la importante y desinteresada ayuda de Nolberto Arismendi, estudiante de post grado de nuestra facultad; Don Ramón Alarcón y Don José Cárdenas, personal del Laboratorio de Fitopatología, el Profesor José Ricardo Peixoto de la Universidade de Brasilia, el Investigador de Embrapa Hortaliças Milton da Paz Lima, Don Vicente Colomer del servicio agronómico de la empresa Orafti Chile S.A. y mis profesores del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

También quiero agradecer el apoyo constante de mi mamá Doris, mi abuela Eva, mi hermana Katia, mi sobrina Daira y de toda la gente que fue parte de este proceso.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
1	INTRODUCCIÓN	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	<i>Cichorium intybus</i> L. var. <i>sativum</i>	4
2.2	Enfermedades causadas por hongos en achicoria	5
2.2.1	Patógenos del género <i>Golovinomyces</i> (<i>Erysiphe</i>)	5
2.2.2	Patógenos del género <i>Alternaria</i>	7
2.3	Uso de técnicas moleculares en la clasificación taxonómica	9
2.4	Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN	10
3	MATERIAL Y MÉTODO	12
3.1	Material	12
3.1.1	Material biológico	12
3.1.2	Equipos y material de laboratorio	14
3.1.2.1	Laboratorio de Fitopatología	14
3.1.2.2	Laboratorio de Biología Molecular en Plantas	14
3.1.3	Reactivos	14
3.2	Método	14
3.2.1	Toma de muestras	14
3.2.2	Caracterización morfológica	14
3.2.3	Obtención de micelio	15

3.2.4	Extracción de ADN, amplificación y análisis de secuencias	15
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
4.1	Caracterización morfológica del género <i>Golovinomyces</i>	19
4.2	Caracterización morfológica del género <i>Alternaria</i>	20
4.3	Extracción de ADN y amplificación de la región ITS del rADN	20
4.4	Análisis de secuencias e identificación de especies del género <i>Golovinomyces</i>	21
4.5	Análisis de secuencias e identificación de especies del género <i>Alternaria</i>	23
4.6	Relaciones filogenéticas de la familia Erysiphaceae	23
4.7	Relaciones filogenéticas del género <i>Alternaria</i>	25
4.8	Importancia de las especies patógenas determinadas	26
5	CONCLUSIONES	28
6	BIBLIOGRAFÍA	29
7	ANEXOS	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Linajes y tribus de la familia Erysiphaceae, establecidos en estudios recientes de evolución molecular.	6
2	Características de crecimiento en el medio CPA de algunos grupos de especies del género <i>Alternaria</i>	8
3	Identificación de los predios y fecha de muestreos	12
4	Mix de reacción para la amplificación de la región ITS de las muestras colectadas	16
5	Secuencias de especies de la familia Erysiphaceae obtenidas las bases de datos del EBI, utilizadas en la construcción del árbol filogenético.	17
6	Secuencias de especies del género <i>Alternaria</i> obtenidas las bases de datos del EBI, utilizadas en la construcción del árbol filogenético.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de los partidores que amplifican las secuencias del espacio transcrito interno ITS 1 e ITS 2 del rADN, que origina fragmentos de 400-900 pares de bases (bp).	10
2	Localización de los predios muestreados en la zona de Los Ángeles (A) y Chillán (B).	13
3	Conidióforos y conidias de <i>Golovinomyces</i> .	20
4	Características de un cultivo puro de <i>Alternaria</i> .	20
5	Gel de electroforesis del producto PCR luego de la amplificación por los partidores ITS5 e ITS4 del rADN de los aislamientos de <i>Golovinomyces</i> (a) y <i>Alternaria</i> (b) (Cuadro 3).	22
6	Árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining de secuencias de la región ITS del rADN de 17 especies la familia Erysiphaceae, incluyendo la secuencia obtenida del aislamiento en achicoria (Nº Acceso FN179366).	24
7	Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-Joining con 15 secuencias de la región ITS del rADN de especies del género <i>Alternaria</i> que incluye la secuencia obtenida del cultivo de achicoria (Nº de acceso FN179367).	26

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Signo de <i>Golovinomyces</i> (a) y síntoma de <i>Alternaria</i> (b) observados en hojas de achicoria en los predios muestreados	34
2	Medición de tamaño y número de células de conidias de <i>Alternaria</i>	35
3	Medición de tamaño de conidias y conidióforos de <i>Golovinomyces</i>	36
4	Alineamiento de secuencias de los aislamientos del género <i>Golovinomyces</i>	37
5	Alineamiento de secuencias de los aislamientos del género <i>Alternaria</i>	38

RESUMEN

La achicoria industrial (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*) utilizada para la producción de inulina, es un cultivo que ha sido introducido recientemente al país para ser incluido como alternativa de rotación por los productores de la zona centro sur de Chile. Durante el ciclo del cultivo, la incidencia de enfermedades provocadas principalmente por hongos de los géneros *Alternaria* y *Golovinomyces* (*Erysiphe*) ha ido en aumento, razón por la cual se hace necesario identificar a las especies patógenas que provocan estas enfermedades. Esto es trascendente para un adecuado manejo del cultivo y así evitar que estas enfermedades tengan un efecto significativo en el rendimiento. El objetivo de este estudio fue determinar mediante el uso de técnicas moleculares, las especies fitopatógenas de los géneros *Golovinomyces* y *Alternaria* que afectan al cultivo de achicoria entre las localidades de Los Angeles y Chillán. Se colectaron hojas de achicoria que presentaban síntomas y signos de las enfermedades. Se extrajo ADN a un total de nueve aislamientos del género *Golovinomyces* y siete del género *Alternaria* para amplificar la región del Espacio Trascrito Interno (ITS1, 5.8S e ITS2) del ADN ribosomal, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos amplificados en la reacción PCR fueron secuenciados por MACROGEN, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la información disponible en las bases de datos, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y sus relaciones evolutivas fueron comparadas con otras especies de hongos asociados. Para ello, se crearon árboles filogenéticos mediante el método Neighbor-Joining con bootstraps de 1000 repeticiones. Los resultados permitieron establecer que todos los aislamientos del género *Golovinomyces* corresponden a la especie *Golovinomyces cichoracearum* (D.C.) V.P. Heluta (sinónimo *Erysiphe cichoracearum*), coincidiendo con el agente causal de oídio en achicoria en otras regiones del mundo. En contraste, los siete aislamientos del género *Alternaria* correspondieron a la especie *Alternaria alternata* (Fries), un agente causal distinto al que ocasiona alternariosis en achicoria en otras localidades. Las relaciones evolutivas entre algunas especies de la familia Erysiphaceae incluyen a *G. cichoracearum* formando parte de un grupo monofilético con características correspondientes a la tribu Euoidium. A su vez, al analizar las relaciones evolutivas dentro del género *Alternaria*; la especie identificada, forma un grupo monofilético con las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas.

SUMMARY

Industrial chicory (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*) using in the inulin production, recently it has been including by producers within the crop rotation in south central area of Chile. During the cropping period, the diseases incidence caused primarily by *Alternaria* and *Golovinomyces* (*Erysiphe*) fungi have been increasing, reason why it is necessary to identify the pathogenic species that cause these diseases. It is required for a better crop management and avoiding these diseases having a significant effect in the chicory yield. The objective of this study was to determine by molecular techniques, the pathogen species of *Alternaria* and *Golovinomyces* that affecting the chicory crop located between Los Angeles and Chillan cities. Chicory leaves with signs and symptoms of the diseases were collected. DNA was extracted from nine isolates of *Golovinomyces* and seven of *Alternaria* fungi to amplify the Internal Transcribed Space region (ITS1, 5.8S and ITS2) of ribosomal DNA by polymerase chain reaction (PCR) technique. PCR products amplified were sequenced by MACROGEN, South Korea. The sequences obtained were compared with information available in databases using BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) and their evolutionary relationships was compared with another fungi species. Phylogenetic trees was created using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstraps replications. Results showed that all isolates belong to the genus *Golovinomyces* are asociated to *Golovinomyces cichoracearum* (DC) VP Heluta (syn. *Erysiphe cichoracearum*) coinciding with the causal agent of powdery mildew on chicory in other world regions. In contrast, the seven isolates of genus *Alternaria* were related to *Alternaria alternata* (Fries), a different causal agent of alternariosis in chicory reported elsewhere. The evolutionary relationships between some species of Erysiphaceae include to *G. cichoracearum* as part of a monophyletic group with characteristics of the tribe Euoidium. Likewise, the evolutionary relationships within the genus *Alternaria*, *A. alternata* form a monophyletic group with small spored *Alternaria* species.

1 INTRODUCCION

La variedad de achicoria (*Cichorium intybus* L. var. *sativum* Biskoff) utilizada para la extracción de inulina es una planta de uso industrial que ha sido introducida recientemente en la zona centro sur de Chile. Este cultivo constituye una alternativa para ser incluida en la rotación por los agricultores ubicados entre Chillán y Los Ángeles en la Región del Bio-Bío.

Del proceso industrial de la raíz, se obtiene la inulina y oligofruktosa, dos fibras dietéticas naturales utilizadas mundialmente por sus propiedades nutricionales y su efecto positivo en el aparato digestivo. Entre sus aplicaciones se encuentra la adhesión en alimentos, en la industria cosmética y en la alimentación animal.

En Chile la superficie sembrada de achicoria industrial durante la temporada 2006-2007, alcanzó las 1.850 hectáreas, con rendimientos de hasta 50 ton/ha. En la zona de cultivo, la producción ha sido afectada por enfermedades, entre las que se encuentra oído provocado por hongos del género *Golovinomyces* y alternariosis ocasionada por patógenos del género *Alternaria*.

En la literatura científica disponible actualmente, no existe información que sustente cuáles son las especies patógenas que se relacionan con la manifestación de las enfermedades antes mencionadas en el cultivo de achicoria industrial en Chile. Por este motivo, se hace necesario determinar las especies patógenas que provocan estos problemas en la producción, para su adecuado control y conocimiento del cultivo.

La identificación de hongos históricamente se ha basado en el análisis de características morfológicas; sin embargo, hoy en día existen otras herramientas como las técnicas moleculares que complementan la taxonomía tradicional facilitando la sistemática de los organismos. Muchas de estas técnicas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el análisis de ácidos nucleicos que permite la identificación de organismos a nivel de especies o subespecies.

La hipótesis planteada en este trabajo es que el cultivo de achicoria (*C. intybus* L. var. *sativum*) en Chile, es afectado por *Golovinomyces cichoracearum* y *Alternaria alternata*.

Objetivo General:

Determinar las especies de hongos pertenecientes a los géneros *Golovinomyces* (*Erysiphe*) y *Alternaria* que afectan el cultivo de achicoria industrial en Chile, mediante el uso de técnicas moleculares.

Objetivos Específicos:

- Realizar un diagnóstico inicial caracterizando morfológicamente los patógenos de los géneros *Golovinomyces* y *Alternaria*, mediante observaciones microscópicas.
- Extraer ADN de ambos patógenos para amplificar la región ITS del ADN ribosomal, mediante PCR.
- Obtener la secuencia de la región amplificada del ADN ribosomal de los hongos de los géneros *Golovinomyces* y *Alternaria*.
- Determinar a qué especies corresponden los patógenos utilizando la información de las bases de datos disponibles en internet.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 *Cichorium intybus* L. var. *sativum*

Las plantas del género *Cichorium* (Asteraceae o compuestas) provienen de la región mediterránea de Europa y el norte de África (BREMER *et al.*, 1994). Dentro de este género se encuentran seis especies que presentan una mayor distribución en la región de origen, de las cuales cuatro son silvestres y dos son ampliamente cultivadas, siendo estas: *C. endivia* y *C. intybus* (KIERS *et al.*, 1999). La primera, es conocida con el nombre de endibia, escarola o achicoria (en Chile), y la segunda, incluye variedades de las que se obtienen raíces u hojas como el radicchio (KRARUP y MOREIRA, 1998).

La especie (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*), pertenece al grupo de la achicoria para obtención de raíces (o achicoria tostada) siendo utilizada por los antiguos griegos y romanos como planta medicinal y como bebida que se extraía de las raíces tostadas (TROCCHI, 1996). Actualmente se emplea para la elaboración de un sustituto del café y como fuente para la obtención de inulina, la principal forma de almacenamiento de carbohidratos en muchas asteráceas (VAN STALLEN *et al.*, 2001) y otras plantas como trigo (*Triticum aestivum* L.), ajo (*Allium sativum* L.), puerros (*Allium porrum* L.), cebollas (*Allium cepa* L.) (Mc DEVITT y PETERS, 2005) y topinambur (*Helianthus tuberosus* L.), (CABEZAS *et al.*, 2002).

La mayoría de la inulina y oligofructosa que se consume es sintetizada a partir de sacarosa o extraídos de raíces de achicoria, la cual contiene entre 15 a 20% de inulina y 5 a 10% de oligofructosa (NINESS, 1999). La inulina es un prebiótico, no digerible, libre de sabor y bajo en calorías, que se utiliza en la industria alimenticia por sus propiedades espesantes, para reemplazar la grasa y añadir fibra a muchos productos alimenticios (BALCAZAR *et al.*, 2003).

En Chile, la empresa Belga ORAFTI CHILE S.A., ha instalado una planta para extraer inulina, con el fin de producir en contra estación y extender la producción durante todo el año para satisfacer la demanda creciente en el mundo. Esta planta productora realiza un proceso similar al utilizado para la extracción de azúcar a partir de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.). La planta se ubica en la comuna de Pemuco, Región del Bío-Bío, donde recepciona y procesa las raíces de achicoria producidas por los agricultores ubicados entre Parral y Collipulli, la zona con mejores condiciones para el cultivo de esta variedad de achicoria (VELÁSQUEZ, 2005). Durante la temporada 2006-2007 se cultivaron 1.850 hectáreas en la zona productora y se obtuvieron rendimientos promedio de 48 t ha⁻¹(¹). Los rendimientos del país se asemejan a los obtenidos en evaluaciones de variedades en Nebraska, Estados Unidos; donde ha alcanzado las 55 t ha⁻¹ (WILSON *et al.*, 2004) y se encuentra muy superior a las 25,5 t ha⁻¹ obtenidas en Eslovaquia (CERNY *et al.*, 2008).

(¹) Comunicación personal con el Sr. Christian Wolf, Coordinador de Investigación y Desarrollo Agronómico de ORAFTI CHILE S.A.

2.2 Enfermedades causadas por hongos en achicoria

Al igual que muchos cultivos extensivos, en la producción de raíces de achicoria se desarrollan algunas enfermedades durante el ciclo de cultivo y tienen un efecto negativo sobre la calidad y el rendimiento. Se han reportado diferentes patógenos que afectan la parte aérea de la planta, entre los más comunes se encuentra *Cercospora cichorii*, que ocasiona el daño conocido como moteado de la hoja ("leaf spot"); también se presenta *Alternaria cichorii*, que causa alternariosis (BAIS y RAVISHANKAR, 2001) y *Golovinomyces cichoracearum* (sinónimo *Erysiphe cichoracearum*), que provoca la enfermedad conocida comúnmente como oídio (TRDAN *et al.*, 2004).

2.2.1 Patógenos del género *Golovinomyces*. Los hongos de este género son llamados oídios o cenicillas, se caracterizan por ser parásitos obligados y pertenecen al Phylum Ascomycota, Orden Erysiphales, familia Erysiphaceae (SAENZ y TAYLOR, 1999).

Para mantener el ciclo de vida como parásitos obligados, los hongos de esta familia han desarrollado mecanismos muy específicos y sofisticados, con el fin de evitar la resistencia del hospedero y obtener los nutrientes sin causarle mayor daño, además han sincronizado su ciclo de vida con el de sus hospederos (HIROSE *et al.*, 2005).

A diferencia de la mayoría de hongos fitopatógenos, los oídios tienden a desarrollarse en la superficie de sus hospederos, las hifas se producen sobre hojas, tallos, flores o frutos. Las conidias (esporas asexuales), se desarrollan de forma individual o en cadenas especializadas de hifas llamadas conidióforos. Al final de la temporada de cultivo, los oídios producen esporas sexuales, conocidas como ascosporas, dentro de ascos que se encuentran al interior de un cuerpo fructífero llamado cleistotecio, que generalmente es esférico con apéndices en la superficie llamados fulcras (HEFFER *et al.*, 2006).

La taxonomía de los hongos del orden Erysiphales recientemente fue objeto de una amplia revisión. Anteriormente, la identificación se basaba en características del estado telomorfo (fase sexual) como el número de ascos y ascosporas por ascos, además de la morfología del cleistotecio y sus apéndices (Junell 1967; Parmelee, 1977; Braun, 1987, citado por ADAM *et al.*, 1999). Pero la morfología de estas estructuras no es tan conservada como se había asumido, por lo que se incluyó los atributos del anamorfo (estado asexual), como la célula basal que soporta el conidióforo, la presencia o ausencia de cuerpos fibrosos dentro de las conidias y el análisis de caracteres que se encuentran en la superficie de las conidias observadas al microscopio electrónico de barrido (SAENZ y TAYLOR, 1999).

Braun *et al.* (2002), citado por TO-ANUM (2005) señala que las características del anamorfo son la base para la taxonomía de los géneros dentro del orden Erysiphales ya que reflejan la filogenia de este grupo de hongos. Añade que las características del telomorfo son menos importantes para determinar géneros, pero proporcionan caracteres útiles para la taxonomía a nivel de especies, aunque este estado no se presenta o rara vez ocurre en todos los oídios.

Luego de la revisión, que incluyó estudios de evolución molecular tipo de planta hospedera y morfología de los estados anamorfo y telomorfo; se identificaron cinco grandes linajes en la familia Erysiphaceae (MORI *et al.*, 2000), cada uno de los cuales

es actualmente reconocido como una tribu de la familia (Cuadro 1) (HIROSE *et al.*, 2005; HEFFER *et al.*, 2006).

CUADRO 1 Linajes y Tribus de la familia Erysiphaceae, establecidos en estudios recientes de evolución molecular.

Linajes	Tribu	Clasificación anterior	Nuevos géneros	Hospederos
<i>Endophytic</i>	Phyllactineae	<i>Phyllactinia</i>	<i>Phyllactinia</i>	Árboles y arbustos
		<i>Leveillula</i>	<i>Leveillula</i>	Solanáceas
<i>Pseudoidium</i>	Erysipheae	<i>Erysiphe</i> sección <i>Erysiphe</i>	<i>Erysiphe</i> sección <i>Erysiphe</i>	Legumbres
		<i>Microsphaera</i>	<i>Erysiphe</i> sección <i>Microsphaera</i>	Árboles y arbustos
		<i>Uncinula</i>	<i>Erysiphe</i> sección <i>Uncinula</i>	Árboles y arbustos
<i>Monocot</i>	Blumeriae	<i>Blumeria/Erysiphe</i>	<i>Blumeria</i>	Gramíneas
<i>Euoidium</i>	Golovinomyceteae	<i>Erysiphe</i> sección <i>Golovinomyces</i>	<i>Golovinomyces</i>	Cucurbitáceas y compuestas
<i>Fibrosin</i>	Cystotheceae	<i>Podosphaera</i>	<i>Podosphaera</i> sección <i>Podosphaera</i>	Rosáceas
		<i>Sphaerotheca</i>	<i>Podosphaera</i> sección <i>Sphaerotheca</i>	Rosáceas

FUENTE: Adaptado de MORI *et al.* (2000); HIROSE *et al.* (2005) y HEFFER *et al.* (2006).

Respecto a la relación de oídio con el cultivo de achicoria, TRDAN *et al.* (2004) señalan que esta enfermedad se manifiesta principalmente al final de la temporada de crecimiento, siendo favorecida por la humedad, sin embargo puede presentarse en temporadas secas porque basta una pequeña película de agua sobre la superficie de la planta para que las esporas originen una infección. Una vez que la infección ha comenzado, el micelio continúa propagándose en la superficie de la planta, independiente de las condiciones de humedad en la atmósfera (AGRIOS, 1996).

Cada una de las especies de oídio suele tener una estrecha gama de hospederos, es así como estudios previos han establecido a la especie *G. cichoracearum* como el principal agente patógeno que provoca oídio en achicoria (TRDAN *et al.*, 2004) y en otras especies de la familia Asteraceae (LEBEDA y BUCZKOWSKI, 1986; ADAM *et al.*, 1999; SAENZ y TAYLOR, 1999; MATSUDA y TAKAMATSU, 2003 e HIROSE *et al.*, 2005).

2.2.2 Patógenos del género *Alternaria*. Este género está compuesto por hongos mitospóricos que pertenecen a la Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, familia Dematiaceae (THOMMA, 2003).


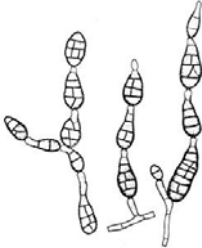
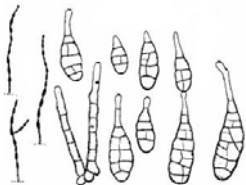
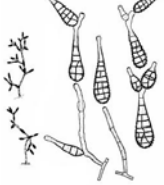

El género *Alternaria* está compuesto por especies saprófitas y otras patógenas. Se caracteriza por ser un hongo cosmopolita que puede encontrarse en un amplio rango de organismos. Como saprófito causa deterioro de alimentos y produce micotoxinas; como patógeno provoca serios problemas en la agricultura, porque reduce el rendimiento de los cultivos y de los productos almacenados (ANDERSEN *et al.*, 2001). En las plantas cultivadas este patógeno provoca manchas y tizones foliares, ocasionando también el ahogamiento de plántulas, pudriciones del cuello, pudriciones de frutos y tubérculos (AGRIOS, 1996).

La taxonomía tradicional de este género considera la morfología de las conidias y su concatenación (desarrollo de esporas en cadena). *Alternaria* presenta conidias pigmentadas de color café pálido a oscuro, una característica de la familia Dematiaceae, de forma ovaladas u oboclavadas, multicelulares con septos transversales, longitudinales y algunas veces oblicuos, con o sin prolongaciones filamentosas (SIMMONS, 1997) y pueden estar solitarias o formando cadenas. Estas conidias se encuentran sostenidas por conidióforos que poseen uno o más septos transversales con apariencia geniculada (Ellis, 1971, citado por FERNÁNDEZ, 2005).

El sistema de taxonomía basado en características morfológicas es poco claro porque estas características son fácilmente afectadas por las condiciones de crecimiento (CHOW y WU, 2002). Para facilitar la caracterización morfológica de especies dentro del género *Alternaria*, Simmons y Roberts (1993) citado por ANDERSEN *et al.* (2002) han establecido un medio estandarizado que consiste en el cultivo en el medio Agar Papa-Zanahoria (PCA siglas en inglés) combinado con la aplicación de luz fluorescente por 8 horas seguidas de 16 horas en la oscuridad que permite observar el patrón de esporulación tridimensional que considera el color de las colonias, el largo de los conidióforos primarios, el tipo y origen de las ramificaciones, la forma de las conidias y ornamentaciones visibles a través del microscopio electrónico (MERCADO *et al.*, 2006). Basándose en este patrón se han identificado grupos de especies, algunos de ellos se encuentran incluidos en el Cuadro 2.

Se ha reportado a *Alternaria cichorii* Nattrass como uno de los agentes patógenos que afecta el cultivo de achicoria y a otras plantas de la familia Asteraceae en algunas regiones de Estados Unidos (SIMMONS, 1997; KOIKE, 1998); India (BAIS y RAVISHANKAR, 2001) y Brasil (LIMA *et al.* 2003). *A. cichorii* pertenece al grupo de especies de *Alternaria* de conidias con proyecciones o pico filamentosos, dentro de este grupo existen al menos 27 especies que se encuentran asociadas a plantas de la familia Asteraceae (SIMMONS, 1997).

CUADRO 2 Características de crecimiento en el medio CPA de algunos grupos de especies del género *Alternaria*.

Grupo de especies	Características
<p data-bbox="313 363 719 390">Grupo de especies <i>A. arborescens</i></p> 	<p data-bbox="751 363 1421 724">Estas cepas se caracterizan por presentar una conidiogénesis muy ramificada, el cultivo presenta un desarrollo vertical, al menos parcialmente, muy alargado, como árboles (arborescentes). Los conidióforos se producen al exponer la colonia a la luz, y por la casi total falta de superficie debido al desarrollo de micelio durante el período de oscuridad. La ramificación en cadena se desarrolla a partir de conidióforos secundarios en el ápice de las conidias y rara vez de células basales o intercalares.</p>
<p data-bbox="313 735 683 762">Grupo de especies <i>A. alternata</i></p> 	<p data-bbox="751 735 1421 1060">Este grupo presenta cepas altamente ramificadas; con conidias en cadenas y conidióforos cortos que se desarrollan cerca de la superficie del agar. La ramificación de las conidias en cadenas surge principalmente de conidióforos secundarios o de células conidiales intercalares o basales, sólo en raras ocasiones de la célula apical. En PCA la esporulación se produce cerca de la superficie del agar, tanto a la luz como a la oscuridad en el cultivo.</p>
<p data-bbox="313 1071 708 1098">Grupo de especies <i>A. tenuissima</i></p> 	<p data-bbox="751 1071 1421 1302">Los aislamientos en PCA, producen cadenas de conidias relativamente rectas y largas. Las ramificaciones son ocasionales y se originan de un conidióforo secundario que se forma en la base de la cadena a partir de células intercalares. En el cultivo, las cadenas tienen una apariencia densa, con una posición vertical.</p>
<p data-bbox="313 1312 686 1339">Grupo de especies <i>A. infectoria</i></p> 	<p data-bbox="751 1312 1421 1543">El grupo se caracteriza por tener largos conidióforos secundarios apicales, con varios lóculos conidiogénicos, que originan una ramificación abierta. Los conidióforos primarios son cortos y se producen en manojos dando al cultivo un aspecto granular.</p>
<p data-bbox="313 1575 540 1759">Grupo de especies de <i>Alternaria</i> de conidias con proyecciones filamentosas (Ej.: <i>A. dauci</i>)</p> 	<p data-bbox="751 1575 1421 1776">Las especies de este grupo forman conidias solitarias con grandes picos o proyecciones filamentosas. Rara vez se desarrollan en cadenas de 2 o 3 conidias.</p>

FUENTE: Adaptado de SIMMONS (1997); ROBERTS *et al.* (2000); ANDERSEN *et al.* (2002); SERDANI *et al.* (2002); CHOU y WU (2002) y CARRILLO (2003).

2.3 Uso de técnicas moleculares en la clasificación taxonómica

El desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polimerasa Chain Reaction), desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años ochenta, es probablemente la invención más importante en la metodología de la biología molecular hasta la fecha. Esta técnica, se ha convertido en un procedimiento de rutina en cada laboratorio de biología molecular para la identificación y la manipulación de material genético (KOLMODIN y BIRCH, 2002).

La PCR se basa en la amplificación *in vitro* de una secuencia de ácidos nucleicos que requiere de una serie repetitiva de tres pasos fundamentales: desnaturalización del ADN; hibridación de los partidores compuestos por una secuencia de oligonucleótidos a la cadena de ADN desnaturalizada y la extensión enzimática de los partidores por una polimerasa termoestable para producir las copias que pueden servir como molde en los ciclos subsiguientes (HYNDMAN y MITSUHASHI, 2003).

La técnica de PCR permite amplificar diferentes regiones del ADN de los organismos, esta herramienta molecular ha sido incluida en los análisis taxonómicos y complementa los métodos morfológicos y bioquímicos utilizados en la identificación y clasificación de los organismos, entre ellos los hongos (ANDERSEN *et al.*, 2001; KONSTANTINOVA *et al.*, 2002; BRASILEIRO *et al.*, 2004; MARTIN y RYGIWICZ, 2005). En los análisis de sistemática molecular de hongos se utilizan diferentes métodos tales como la hibridación ADN-ADN, enzimas de restricción (RFLP), amplificación vía PCR y el análisis de secuencias de ADN (KOHN, 1992) que ha reducido enormemente el tiempo y el esfuerzo necesario para los estudios comparativos.

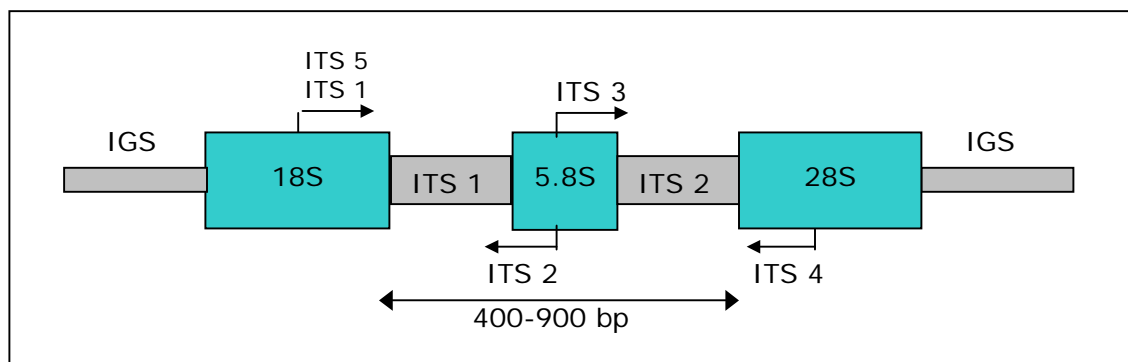
En el análisis de secuencias es importante seleccionar una región apropiada, para ello es necesario considerar aspectos como la tasa de evolución (secuencias demasiado conservadas o demasiado variables). Varios estudios de secuencias en hongos, se basan en el análisis de genes del rADN, principalmente por la presencia de regiones conservadas universalmente. Además, se encuentran regiones del ADN mitocondrial (mtADN) y regiones del RNA (BRUNS *et al.*, 1991). Una herramienta común en la sistemática moderna es el análisis de secuencias del ADN ribosomal (rADN), que se utiliza para establecer las relaciones filogenéticas moleculares en muchos grupos de hongos (PRYOR y GILBERTSON, 2000). El rADN (Figura 1) está compuesto por regiones altamente conservadas entre los organismos como los genes 18S, 5.8S y 28S y regiones variables, como los espacios intergénicos (IGS) y las regiones ITS (internal transcribed spacer) (BRASILEIRO *et al.*, 2004).

La región ITS varía en su composición y tamaño, sin embargo se caracteriza por ser a menudo altamente variable entre las especies de hongos morfológicamente diferentes, pero con una variación intraespecífica baja, sirviendo como herramienta en la identificación y clasificación de los organismos (Bruns *et al.*, 1991; Hillis y Dixon, 1991; citado por GOMES *et al.*, 2002) ya que permite el análisis de las variaciones intra o inter específicas, revelando diferencias entre organismos estrechamente relacionados (HIRATA y TAKAMATSU, 1996).

Una vez determinada la región para el análisis de secuencias, es preciso amplificarla, para ello se utilizan partidores que se encuentran disponibles y han sido diseñados para amplificar un amplio rango de organismos, incluyendo hongos, plantas, protistas y animales (White *et al.*, 1990; citado por GARDES y BRUNS, 1993). Sin embargo, los avances científicos han permitido desarrollar partidores específicos con un alto grado

de sensibilidad y de especificidad para amplificar ciertas regiones exclusivas de una determinada especie (MARTIN y RYGIEWICZ, 2005).

FIGURA 1 Esquema de los partidores que amplifican las secuencias del espacio transcrito interno ITS1 e ITS2 del rADN, que origina fragmentos de 400-900 pares de bases (bp).



FUENTE: BRASILEIRO *et al.* (2004).

2.4 Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN

Luego de conocer la secuencia de nucleótidos que conforman la región del ADN amplificada, estas pueden ser comparadas con la información que se encuentra disponible en las bases de datos mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

Las bases de datos bioinformáticas son colecciones de secuencias de nucleótidos de los distintos organismos que han sido generadas en los laboratorios del mundo y se encuentran disponibles para todo el público (MIZRACHI, 2007). Entre las bases de datos se encuentra "GenBank" del NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI), la base de datos del EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (EMBL) y el DNA DATA BANK OF JAPAN (DDBJ), ellas comparten toda la información y utilizan el mismo formato para asignarle un número de acceso a las secuencias que ingresan².

Para el análisis comparativo de secuencias se han desarrollado una serie de herramientas que facilitan el análisis de los datos y permiten la interpretación adecuada de los resultados obtenidos. En la actualidad, una herramienta habitual y difundida para identificar de manera rápida la relación entre secuencias semejantes es el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que permite buscar secuencias similares entre las secuencias de ADN o de proteínas que se encuentran disponibles en las bases de datos mundiales. La comparación incluye un respaldo estadístico, además del nombre y la descripción de las secuencias de las bases de datos y una demostración numérica y gráfica de los parámetros significativos (DO AMARAL *et al.*, 2007).

Para estudiar algún tipo de relación específica entre secuencias se realizan análisis filogenéticos que representan las relaciones históricas de ancestros comunes

² Análisis Filogenético de Secuencias de DNA. Apuntes curso de postgrado. Profesor Marcos Péres-Losada. Instituto de Ecología y Evolución. Universidad Austral de Chile (2009).

facilitando el estudio de la historia evolutiva desde los organismos simples hasta los más complejos (MORRISON, 2008).

Los análisis filogenéticos a partir de datos moleculares comienzan con la alineación de ácidos nucleicos o secuencias de proteínas. Para alinear y comparar secuencias existen programas como CLUSTALX que permite realizar alineamientos múltiples de manera interactiva, reduciendo significativamente el tiempo necesario para el análisis de datos (CHENNA *et al.*, 2003). El método se basa en una serie de alineaciones comparadas que siguen el orden de ramificación de un árbol filogenético guía y permite alinear secuencias globales, es decir, incluyendo toda su extensión (HIGGINS y SHARP, 1988). De este modo, las relaciones filogenéticas de genes o de organismos son presentadas en diagramas parecidos a un árbol compuesto por taxones y grupos que poseen un patrón de ramificación que depende del número de secuencias incluidas en el análisis (MORRISON, 2008).

La mayoría de las técnicas moleculares generan datos de caracteres que requieren ser transformados en distancias para que sean analizados, para ello existen métodos estadísticos que son utilizados para la construcción de árboles filogenéticos a partir de datos moleculares. Al respecto, PINZÓN (2006) señala que los métodos para la creación de árboles en estudios filogenéticos se dividen en dos categorías:

- Basados en distancia, dentro de los que se encuentra el método de vinculación promedio UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) y Neighbor-Joining.
- Basados en la composición de las secuencias, como el método de máxima parsimonia y el de máxima probabilidad.

Estos métodos crean árboles reduciendo toda la información a caracteres genéticos para determinados pares de bases considerando la similitud y diferencia (BRUNS *et al.*, 1991). El método más ampliamente usado es Neighbor-Joining, que ha probado ser bastante eficaz y funciona básicamente realizando una estimación de las distancias de los taxones considerados que luego los agrupa en el árbol filogenético de acuerdo a la proximidad o a la distancia más corta (FERNÁNDEZ, 2005).

Otro método estadístico que se utiliza en análisis filogenéticos es el valor bootstrap que ha sido desarrollado con el fin de eliminar la incertidumbre, estableciendo intervalos de confianza con los caracteres que se analizan (FELSENSTEIN, 1985). El bootstrap realiza un muestreo con múltiples sustituciones y la variación entre las estimaciones resultantes indica el tamaño del error en la toma de los datos originales, generando un valor de consenso donde 70% de soporte es considerado un resultado estadísticamente significativo con 95% de confianza². Muchos de los programas actuales que se utilizan para alinear secuencias incluyen este valor, generado de acuerdo al número de repeticiones (o sustituciones) que se requiera.

2 Análisis Filogenético de Secuencias de DNA. Apuntes curso de postgrado. Profesor Marcos Pères-Losada. Instituto de Ecología y Evolución. Universidad Austral de Chile (2009).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Material

La parte experimental de este estudio fue desarrollada en los Laboratorios de Fitopatología y de Biología Molecular en Plantas del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile. Para realizar los análisis se utilizó material que fue clasificado como biológico, equipos y reactivos de laboratorio.

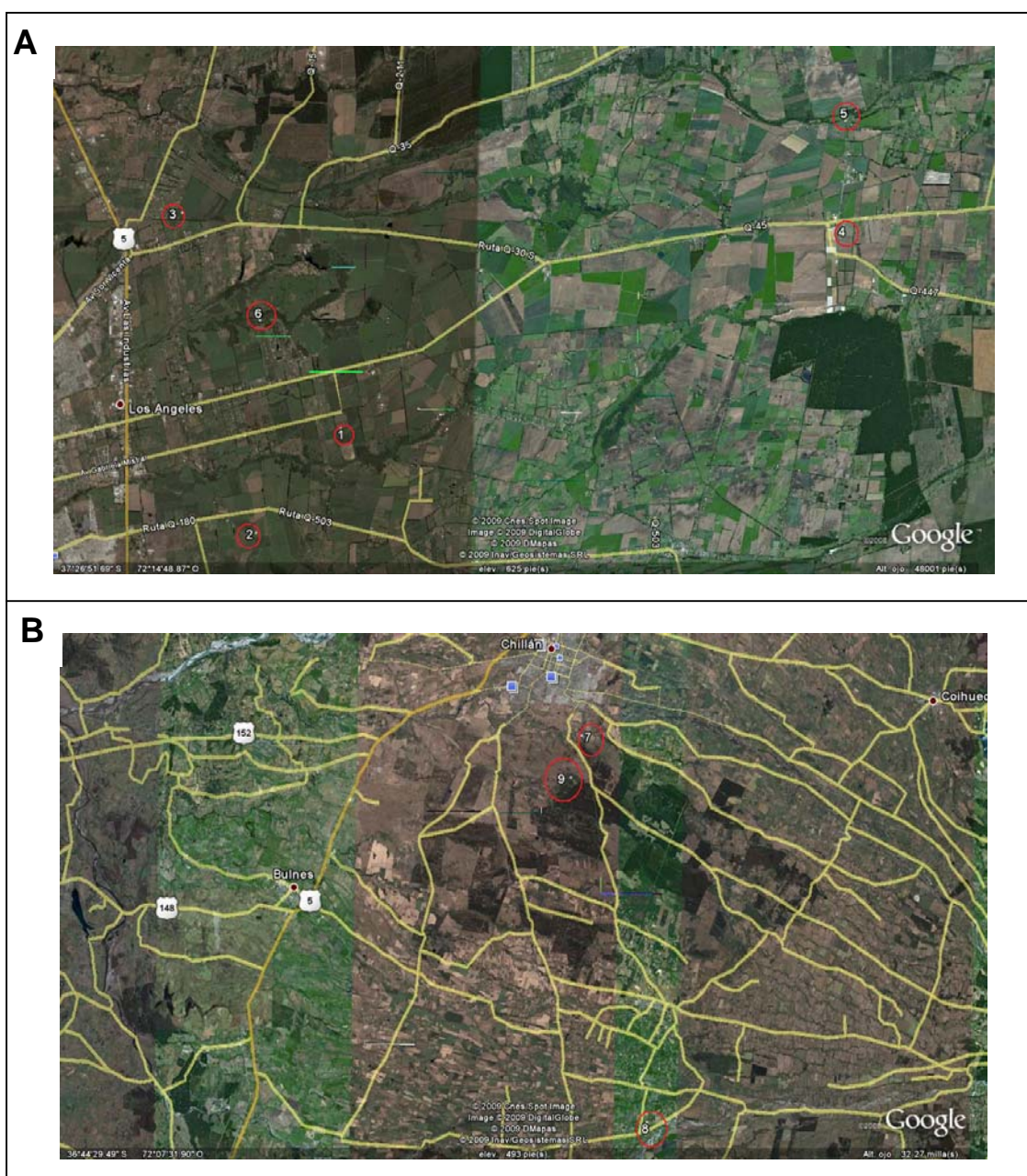
3.1.1 Material biológico. Se tomaron muestras de hojas de achicoria en las que se observó signos correspondientes a oídio (Anexo 1a) y la sintomatología que caracteriza el daño de *Alternaria* (Anexo 1b). Las hojas fueron colectadas en predios de agricultores cuya producción ha sido contratada por la empresa ORAF TI CHILE S.A. (Cuadro 3); y se encuentran ubicados en las cercanías de Los Ángeles y Chillán (Figura 2).

CUADRO 3 Identificación de los predios y fecha de muestreos.

Fecha	Predio	Coordenadas	Ubicación en el mapa	Muestra	Aislamiento
13/04/2007	Dirk Collen (Los Ángeles)	37° 28' S 72° 17' O	1	<i>Golovinomyces</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	Gol 1 Alt 1
13/04/2007	Oliva (Los Ángeles)	37° 29' S 72° 18' O	2	<i>Golovinomyces</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	Gol 2 Alt 2
10/05/2007	Pacheco (Los Ángeles)	37° 25' S 72° 13' O	3	<i>Golovinomyces</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	Gol 3 Alt 3
10/05/2007	Suazo (Los Ángeles)	37° 26' S 72° 11' O	4	<i>Golovinomyces</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	Gol 4 Alt 4
10/05/2007	Arismendi (Los Ángeles)	37° 25' S 72° 11' O	5	<i>Golovinomyces</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	Gol 5 Alt 5
10/05/2007	Stegmeier (Los Ángeles)	37° 27' S 72° 18' O	6	<i>Golovinomyces</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	Gol 6 Alt 6
17/05/2007	Jara (Chillán)	36° 39' S 72° 05' O	7	<i>Golovinomyces</i> sp.	Gol 7
17/05/2007	Caballo (Chillán)	36° 52' S 72° 02' O	8	<i>Golovinomyces</i> sp.	Gol 8
17/05/2007	Fuentealba (Chillán)	36° 39' S 72° 05' O	9	<i>Alternaria</i> sp. <i>Golovinomyces</i> sp.	Alt 7 Gol 9

Para el transporte de las muestras se utilizaron bolsas de papel y de nylon y un cooler con capacidad para 32 litros.

FIGURA 2 Localización de los predios muestreados en la zona de Los Ángeles (A) y Chillán (B). (Imagen satelital disponible en Google Earth 2009).



3.1.2 Equipos y material de laboratorio: Las muestras fueron procesadas en los laboratorios antes mencionados, donde se utilizaron los siguientes equipos:

3.1.2.1 Laboratorio de Fitopatología. Microscopio (ICS modelo KF2), lupa (Motic), y material reutilizable.

3.1.2.2 Laboratorio de Biología Molecular en Plantas. Incubadora (Stuart Scientific), microcentrífuga refrigerada para tubos Eppendorf (Heraeus modelo Biofuge Fresco), termociclador para 96 muestras (Thermo, modelo Px2), micropipetas (Rainin), vortex (Boeco, modelo V-1), transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat), cámara Kodak DC 120, material reutilizable y desechable.

3.1.3 Reactivos. Para la extracción de ADN se utilizaron: Agar papa-dextrosa (APD) + ácido láctico (2%), buffer de extracción (100 mM Tris -HCl pH 8.0, 3% cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB), 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% 2-mercaptoetanol), cloroformo-octanol 24:1, acetato de Amonio 7,5 M, isopropanol (TCL); etanol 70% (TCL), buffer TE (Tris-HCl 10 mM (TCL), ajustado a pH 8.0 con Hidróxido de Sodio (TCL) y EDTA 1 mM (Invitrogen); ajustado a pH 8.0 con Hidróxido de Sodio (TCL).

En la reacción PCR se incluyeron los siguientes reactivos: Buffer PCR 10x (Fermentas), MgCL₂ 50 mM (Fermentas), 100 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Invitrogen), Taq DNA polimerasa 5U/μl (Invitrogen) y los partidores ITS 5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3') e ITS 4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3').

Para la electroforesis se utilizaron: Agarosa (SeaKem), Buffer SB pH 8 (NaOH, Ácido Bórico (TCL) y agua destilada), Buffer de carga (0,0025% azul de bromofenol (Aldrich Chem Co.), glicerina y tampón SB 1X), marcador de peso 1 kb DNA Ladder (MBI-Fermentas) y bromuro de etidio 10 mg/ml (Gibco Brl).

3.2 Método

3.2.1 Toma de muestras. Se realizó un muestreo por conveniencia (o por selección intencionada), colectando hojas de plantas que presentaban síntomas y/o signos típicos del ataque de los patógenos pertenecientes a los géneros *Golovinomyces* y *Alternaria*.

Para la obtención de muestras con presencia de oídio se colectaron hojas en las que se observaba un conjunto de micelio y conidias color blanco grisáceo cubriendo la superficie de las hojas afectadas (Anexo 1a). Se contó con nueve aislamientos del género *Golovinomyces*, procedentes de los predios muestreados (Cuadro 3).

Para coleccionar material con presencia de patógenos del género *Alternaria* se tomaron hojas en las que se observaron manchas necróticas delimitadas con formación de anillos concéntricos de color café oscuro (Anexo 1b); se obtuvieron siete aislamientos de los predios muestreados correspondientes al género *Alternaria* (Cuadro 3).

Las muestras fueron colectadas durante la mañana, el material fue identificado con el nombre del agricultor y luego almacenado en bolsas de papel dentro de bolsas de nylon. El traslado de las muestras se hizo en un "cooler" con hielo para evitar la deshidratación de las hojas y del micelio que las cubría.

3.2.2 Caracterización morfológica. Las hojas recolectadas fueron analizadas bajo la lupa y el microscopio en el laboratorio de Fitopatología, para comprobar la presencia de los patógenos considerados en este estudio; a continuación fueron caracterizados morfológicamente.

En la caracterización morfológica de los aislamientos del género *Golovinomyces* se consideraron aspectos como hospedero y características observadas al microscopio, tales como número de conidias en cadena, la forma y el tamaño de los conidióforos y

conidias. Para conocer el tamaño se midieron 100 conidióforos y conidias con un ocular micrométrico.

Para caracterizar morfológicamente los aislados de *Alternaria* se utilizó la clave descrita por SIMMONS (1997) que considera aspectos como: hospederos, tipo de esporulación en medios de cultivo, ramificaciones, tamaño y número de septos de las conidias. Los aislamientos colectados fueron cultivados en Agar Papa Dextrosa (APD) + ácido láctico (2%) a 25 ± 1 °C durante diez días, hasta obtener un cultivo puro donde se vio la coloración de las colonias que se desarrollaron en las placas y luego se observó al microscopio las características como número de conidias que componen una cadena y tamaño de las conidias, para ello se utilizó un ocular micrométrico con el que se midieron 100 conidias y se contó el número de septos transversales y longitudinales de cada una de ellas.

3.2.3 Obtención de micelio. En el Laboratorio de Fitopatología se realizaron procedimientos diferentes, según la capacidad de cada patógeno de desarrollarse en medios artificiales.

Para los aislamientos del género *Golovinomyces*, se obtuvo material directamente de la zona afectada de la hoja. Por tratarse de un parásito obligado no se pudo cultivar en medios artificiales, por lo tanto; el conjunto de micelio y conidias obtenido fue suspendido en un Buffer TE, a una concentración aproximada de 1000 conidias por ml y almacenado en tubos Eppendorf de 1,5 ml a 4° C.

En el caso de *Alternaria*, se extrajo tejido de la zona necrosada que fue cultivado APD + ácido láctico 2% durante tres días a una temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C; luego repicado y nuevamente incubado durante 7 días a la misma temperatura hasta obtener un cultivo puro, el inóculo obtenido fue suspendido en Buffer TE a una concentración aproximada de 6000 conidias por ml de buffer y luego fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml a 4° C.

3.2.4 Extracción de ADN, amplificación y análisis de secuencias. Se extrajo ADN del material obtenido, utilizando como base la metodología descrita por VILLAGRA (2001) que fue modificada en el laboratorio y consistió en los siguientes procedimientos:

Los tubos Eppendorf que contenían la suspensión del micelio fueron centrifugados para eliminar el buffer TE y luego lavados con agua destilada, posteriormente el contenido de los tubos fue macerado e incubado por 30 minutos con 500 μ L de Buffer de extracción (CTAB/ 2-mercaptoetanol), precalentado a 65° C. Luego se agregó 500 μ L de cloroformo-octanol (24:1) previamente almacenado a -20° C; todo fue mezclado por inversión. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 6000 xg; por 5 min. a 4° C. Inmediatamente se extrajo la fase acuosa superior que fue traspasada a un nuevo tubo de 1,5 ml al que se agregaron 500 μ L de cloroformo-octanol. Nuevamente los tubos fueron centrifugados a 6000 xg; por 5 min. a 4° C y se extrajo el sobrenadante. Finalmente se agregaron 175 μ L de Acetato de Amonio 7,5 M que fue mezclado por inversión.

Para que precipitaran los ácidos nucleicos, se añadieron 370 μ L de Isopropanol previamente almacenado a -20° C, que fue mezclado por inversión para luego dejarlo actuar hasta el día siguiente (máximo 24 horas) a 4° C. El precipitado (un pellet blanquecino que se observó en el fondo del tubo) fue centrifugado a 13.600 xg por 20

minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado con 500 µL de etanol 70%, previamente almacenado a -20° C; nuevamente los tubos fueron centrifugados a 13.600 xg. por 5 min. a 18° C, este paso se repitió dos veces. Finalmente, el precipitado se secó a temperatura ambiente (aprox. 30 minutos) y fue resuspendido en 100 µL de buffer TE.

Para determinar a que especie o especies correspondían los aislamientos obtenidos, se amplificó mediante PCR la región del espacio transcrito interno ITS 1 e ITS 2 del ADN Ribosomal utilizando los partidores ITS 5 e ITS 4 y para comprobar la calidad de estos partidores, se amplificó la región ITS de trigo (*Triticum aestivum* L.).

En la reacción PCR se preparó un mix con un volumen total de 25 µL por muestra, cuya composición se detalla en el Cuadro 4.

CUADRO 4 Mix de reacción para la amplificación de la región ITS de las muestras colectadas.

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer PCR 1X	2,5
MgCl ₂	1,0
DNTP's	1,0
Partidor ITS 5	1,0
Partidor ITS 4	1,0
Taq ADN Polimerasa	0,2
ADN hongo	1,0
H ₂ O destilada estéril	17,3
Volumen Total	25,0

La reacción PCR se realizó en un termociclador programado con los siguientes tiempos y temperaturas de amplificación: 1 ciclo a 94° C por 3 minutos para la denaturación del ADN molde; 40 ciclos a 94° C por 30 segundos de denaturación cíclica, 59° C por 1 minuto de hibridación del partidor al ADN molde, 72° C por 1 minuto de extensión y finalmente un ciclo de elongación para la síntesis del nuevo fragmento de ADN, a 72° C por 5 minutos efectuando un total de 40 ciclos de PCR.

Después de la reacción PCR, se verificó la presencia de producto de amplificación de las regiones ITS mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% p/v en tampón SB teñido con bromuro de etidio; al que se adicionaron 5 µL de producto de la amplificación, mezclado con 1 µL de buffer de carga. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 volt. durante 25 a 30 minutos. Las bandas de ADN amplificado se visualizaron en un transiluminador de luz UV y posteriormente fueron fotografiadas.

Los productos PCR amplificados fueron secuenciados directamente en ambos sentidos, usando los partidores ITS 5 e ITS 4 por el Laboratorio MACROGEN de Corea del Sur. Las secuencias obtenidas fueron ingresadas a la base de datos de secuencias de nucleótidos EMBL para que le asignara un número de acceso.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados para determinar la o las especies de hongos pertenecientes a cada género incidentes en los sectores muestreados, para ello las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando la herramienta ClustalW del European Bioinformatics Institute (EBI) para determinar la similitud entre las secuencias consideradas en cada género.

Para definir a que especie correspondía cada una de las secuencias derivadas del análisis, éstas fueron ingresadas en el programa BLAST que comparó de manera interactiva la secuencia introducida con la información disponible en las bases de datos.

Para complementar los resultados se construyeron árboles filogenéticos que permitieron analizar las relaciones evolutivas de las especies determinadas con hongos relacionados, cuyas secuencias se encuentran disponibles de las bases de datos. Para analizar las secuencias se utilizó el método de Neighbor-Joining con “bootstraps” de 1000 repeticiones.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de hongos de la familia Erysiphaceae (Cuadro 5).

CUADRO 5 Secuencias de especies de la familia Erysiphaceae obtenidas las bases de datos del EBI, utilizadas en la construcción del árbol filogenético.

Especies	Número de acceso	Hospedero
<i>Golovinomyces cichoracearum</i> (D.C.) V.P. Heluta	AF031282	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh
<i>Golovinomyces orontii</i> (Castagne) V.P. Heluta	AB077652	<i>Veronica arvensis</i> L.
<i>Golovinomyces sordidus</i> (L. Junell) V.P. Heluta	AB077658	<i>Plantago asiatica</i> L.
<i>Erysiphe betae</i> (Vanha) Weltzien	AB104516	<i>Beta vulgaris</i> L.
<i>Erysiphe polygoni</i> (D.C.)	AB104522	<i>Polygonum</i> sp.
<i>Erysiphe cruciferarum</i> (Opiz)	EU140958	<i>Brassica rapa</i> L.
<i>Erysiphe pisi</i> (D.C.)	AF011306	<i>Lathyrus latifolius</i> L.
<i>Erysiphe convolvuli</i> (D.C.)	AF011298	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
<i>Erysiphe howeana</i> (U. Braun)	AF011301	<i>Oenothera biennis</i> L.
<i>Blumeria graminis</i> (D.C.)	AF011287	<i>Triticum aestivum</i> L.
<i>Sphaerotheca pannosa</i> (Wallr.) Lévl.	AF011322	<i>Rosa</i> sp.
<i>Uncinula necator</i> (Schw.) Burr	AF011325	<i>Vitis vinifera</i> L.
<i>Podosphaera leucotricha</i> (Ellis & Everh.) Salmon	AB027231	<i>Malus pumila</i> (Mill.)
<i>Phyllactinia guttata</i> (Wallr.) Lévl.	AF011314	<i>Calycanthus occidentalis</i> (Hook. y Arn.)
<i>Leveillula taurica</i> (Levl.) Arn.	AF011310	<i>Capsicum annuum</i> L.
<i>Microsphaera magnifica</i> (U. Braun)	AF011312	<i>Magnolia liliflora</i> Desr.

Estas secuencias se encuentran disponibles en las bases de datos y se encuentran asociados a diferentes plantas hospederas. En el análisis se incluyeron los géneros *Erysiphe*, *Golovinomyces*, *Blumeria*, *Sphaerotheca*, *Podosphaera* y *Uncinula* que fueron comparadas con las secuencias obtenidas de la zona muestreada. Para conocer las relaciones evolutivas se incluyó el género *Phialocephala* (Nº de acceso FJ158058) como grupo distante o “outgroup” el cual fue utilizado en un estudio similar por SAENZ y TAYLOR (1999).

Para analizar las relaciones evolutivas dentro del género *Alternaria*, fueron incluidas las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de distintas especies pertenecientes a este género que fueron extraídas de las bases de datos (Cuadro 6), para ser comparadas con las secuencias obtenidas de los aislamientos colectados en la zona muestreada. En este caso no todos los accesos incluían la información del hospedero a partir del cual fueron aisladas las distintas especies incluidas en el análisis filogenético. Como grupo distante fue incluida la especie *Exserohilum pedicellatum* (Nº de acceso AF229478), que fue utilizada en un análisis de relaciones evolutivas por PRYOR y BIGELOW (2003).

CUADRO 6 Secuencias de especies del género *Alternaria* obtenidas las bases de datos del EBI, utilizadas en la construcción del árbol filogenético.

Especies	Número de acceso
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler	AY433814
<i>Alternaria arborescens</i> (E.G. Simmons)	AY154706
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze: Fries) Wiltshire	AF397226
<i>Alternaria dauci</i> (Kühn)	AF267130
<i>Alternaria solani</i> (Ell. y Mart.) Jones y Grout	AF229475
<i>Alternaria brassicae</i> (Berkeley) Saccardo	UO5253
<i>Alternaria porri</i> (Ellis) Ciferri	AF229470
<i>Alternaria radicina</i> (Meier, Drechsler y E.D. Hedí)	EU781949
<i>Alternaria cichorii</i> (Nattrass)	AM237286
<i>Alternaria brassicicola</i> (Schweinitz) Wiltshire	AF229462
<i>Alternaria infectoria</i> (E. Simmons)	AF229458
<i>Alternaria petroselini</i> (Neergaard) Simmons	AF229454
<i>Alternaria japonica</i> (Yoshii)	AF229474
<i>Alternaria triticina</i> (Prasada y Prabhu)	AY278834

Las distancias genéticas generadas a partir de las secuencias obtenidas de los aislamientos de ambos géneros fueron visualizadas gráficamente en un filograma que fue elaborado por el programa Treeview.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de determinar las especies fitopatógenas que se encuentran afectando el cultivo de achicoria introducido recientemente a Chile, se realizaron análisis morfológicos y moleculares a un total de 9 aislamientos del género *Golovinomyces* y 7 de *Alternaria*, asociados a lesiones foliares y manchas observadas en hojas de achicorias que se cultivan en la zona centro sur de Chile.

La caracterización morfológica de los géneros de ambos patógenos incluidos en este estudio se basó en el análisis de las cualidades del estado anamorfo, a partir de las cuales fue posible confirmar a qué género correspondían los hongos cuyas especies luego fueron determinadas mediante técnicas moleculares.

Las características morfológicas como tamaño, color o características de alguna estructura observable en las esporas de un hongo son útiles para determinar según el caso, el orden la familia o el género al que pertenece el organismo que se está analizando.

En la actualidad los taxónomos no solo analizan las características morfológicas para llegar a determinar especies de hongos, también incluyen otras herramientas como las técnicas moleculares que además de facilitar la determinación y clasificación de las especies, analiza las relaciones evolutivas que existen entre ellas. La introducción de estas herramientas a la sistemática de hongos se debe a que en muchos casos las características morfológicas son simples; la ausencia del estado sexual en algunos hongos o la interdependencia de muchos caracteres y el efecto de las condiciones ambientales en las características del hongo (KOHN, 1992).

4.1 Caracterización morfológica del género *Golovinomyces*.

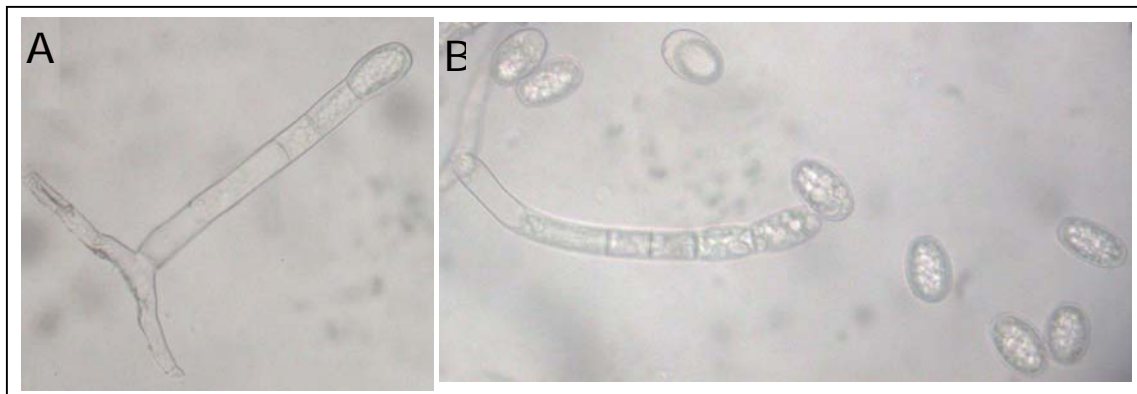
Las hojas de achicoria afectadas por patógenos de este género se encontraban cubiertas de una capa color blanco compuesta por micelio y conidias (Anexo 1A) correspondientes al estado anamorfo del hongo. A partir de las hifas que se desarrollan en la superficie de la hoja se originan conidióforos simples, hialinos, compuesto por tres células alargadas incluyendo la célula pie (Figura 3B), que miden entre 32,5-137,5 μm de largo por 7,5-15 μm de ancho (Anexo 3), considerado largo según la descripción de ADAM *et al.* (1999), de los cuales se originan 3 a 5 conidias dispuestas en cadena de forma ovoide a elipsoide (Figura 3B) que miden entre 12,5-35 μm de largo por 10-20 μm de ancho (Anexo 3).

Considerando el hospedero, en este caso una Asteraceae y la disposición de las conidias en cadenas verdaderas es posible comprobar que corresponde al género *Golovinomyces*, antes llamado *Erysiphe* sección *Golovinomyces*, según descripciones de MORI *et al.* (2000) y TO-ANUM *et al.* (2005).

Golovinomyces ha sido clasificado como una de las tres secciones del género *Erysiphe* y pertenece a la Tribu *Golovinomyceteae* que ha sido recién creada en base a un análisis filogenético molecular (MORI *et al.*, 2000). Se trata de un grupo de hongos que derivan de un ancestro común y se caracterizan por ser ectoparásitos que desarrollan

ascos poliascales y el estado anamorfo es de tipo Euoidium, con conidias en cadenas sin cuerpos fibrosos (MATSUDA y TAKAMATSU, 2003).

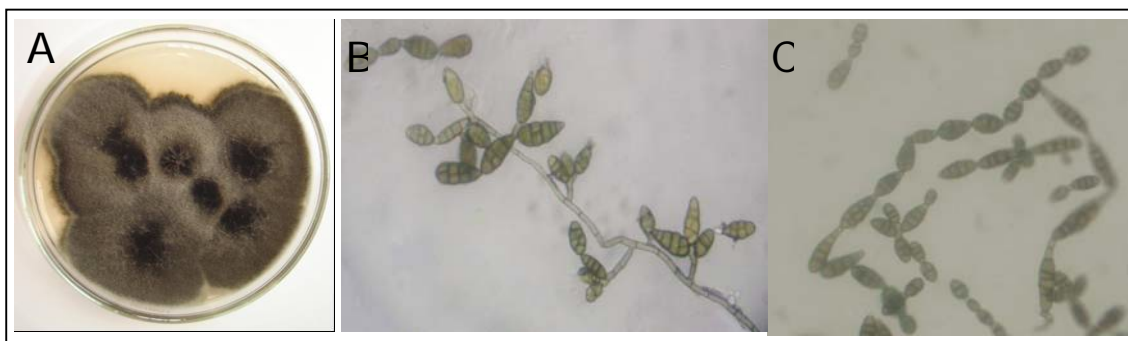
FIGURA 3 Conidióforos y conidias de *Golovinomyces* (aumento 400x).



4.2 Caracterización morfológica del género *Alternaria*.

Este patógeno se manifiesta en achicoria formando manchas necróticas delimitadas y anillos concéntricos de color café oscuro (Anexo 1B), el material extraído de las lesiones foliares fue cultivado en APD, donde se obtuvieron colonias de 50 a 70 milímetros de diámetro, que después de diez días presentaron un desarrollo micelial denso color gris algodonoso, negro al centro de la colonia y al reverso de la placa (Figura 4A). Al microscopio se observaron conidióforos simples de color café oscuro y tabicados (Figura 4B) que originaban cadenas de conidias compuestas por 3 a 11 conidias (Figura 4C); con tamaños que van de 10 - 42,5 μm de largo por 7,5 - 12,5 μm de ancho, compuestas por 1 a 7 septos transversales y 0 a 3 longitudinales u oblicuos (Anexo 2), cuyo número varía según el grado de desarrollo de las conidias. Estos septos presentan intercepciones en más de un plano y son conocidos como dictioesporas (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

FIGURA 4 Características de un cultivo puro de *Alternaria*. A, Cultivo de un aislamiento en APD + ácido láctico al 2% a 25 ± 1 °C durante diez días. B, Conidias y conidióforos de (aumento 400x). C, Cadenas de conidias.



En APD fue difícil observar el patrón de esporulación de los conidióforos y conidias (Figura 4A y 4B), debido a que este medio no es ideal para observarlo (ROBERTS *et al.*, 2000). Según ANDERSEN *et al.* (2001), cuando se cultiva *Alternaria* en un medio no estandarizado y sin control de las condiciones de crecimiento, se produce un crecimiento excesivo de micelio aéreo que impide observar las características tridimensionales del patrón de esporulación. Al respecto añade que el medio de cultivo PCA combinado con la aplicación de luz fluorescente y oscuridad, permite observar el patrón de esporulación y la forma de las conidias para diferenciar morfológicamente las especies de *Alternaria*.

SERDANI *et al.* (2002) señalan que por mucho tiempo se utilizó como único criterio de identificación el tamaño y la forma de las conidias, lo que inducía a una confusión porque las especies de esporas pequeñas suelen tener características morfológicas y tamaños similares. Incluso los hongos del género *Alternaria* suelen ser confundidos con hongos de otros géneros, como *Stemphylium*, *Nimbya*, *Ulocladium* y *Embellisia* (Rotem, 1994; citado por FERNÁNDEZ, 2005) que también poseen conidias formadas por dictioesporas con una forma similar a las de algunas especies de *Alternaria* (PRYOR y BIGELOW, 2003).

Debido a la plasticidad morfológica que caracteriza a este género, existe una gran controversia y confusión en su clasificación taxonómica, dificultando el diagnóstico certero de especies si se considera solamente la morfología. Por este motivo, se hace necesario una revisión adicional usando métodos modernos de sistemática como el análisis de micotoxinas u otros metabolitos secundarios (ANDERSEN *et al.*, 2002) o técnicas de biología molecular que faciliten la clasificación e identificación de especies dentro de este género.

4.3 Extracción de ADN y amplificación de la región ITS de rADN.

El método utilizado ha sido descrito en procedimientos para extracción de ácidos nucleicos en fitoplasmas (VILLAGRA, 2001), sin embargo se obtuvieron resultados satisfactorios en la extracción de ADN de hongos, lo que fue confirmado con las reacciones PCR posteriores.

La reacción PCR ocurrió bajo condiciones estándares de temperaturas y tiempos; los partidores ITS 5 e ITS 4 amplificaron directamente fragmentos de la región ITS del rADN. Los resultados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa donde se obtuvieron bandas de aproximadamente 600 pares de bases, incluyendo las secuencias de los partidores.

En el gel de agarosa se observa el resultado de la amplificación de la región ITS del rADN de los aislamientos de *Golovinomyces* y *Alternaria* (Figura 5). Lo que se observa en esta figura no permite distinguir entre especies dentro de cada género considerado en este estudio ya que las bandas de ADN tienen igual tamaño en todos los aislados. Este resultado no necesariamente indica que se trata de la misma especie patógena perteneciente a cada género que se encuentra afectando las plantas de achicoria en la zona muestreada, pero es de gran importancia para comprobar la presencia de ADN y la ausencia de contaminantes durante la reacción PCR.

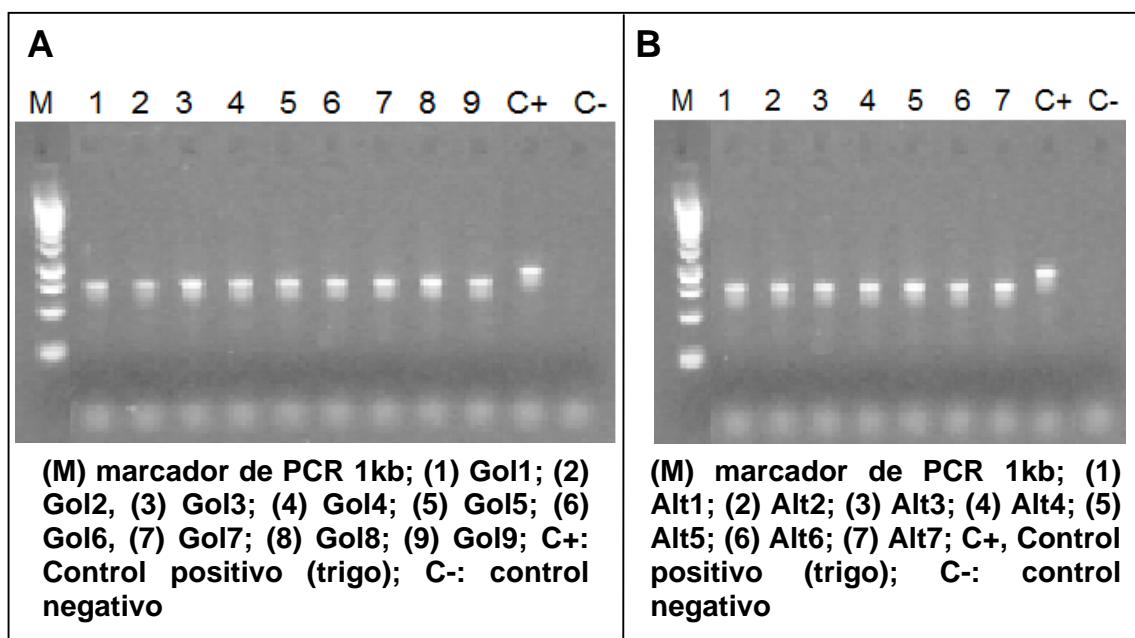


FIGURA 5 Gel de electroforesis del producto PCR luego de la amplificación por los partidores ITS5 e ITS4 del rADN de los aislamientos de *Golovinomyces* (a) y *Alternaria* (b) (Cuadro 3).

Para obtener resultados concluyentes luego de realizar una electroforesis, es necesario utilizar partidores específicos que amplifiquen una región que solo esté presente en la especie que se quiere identificar. Al respecto, FALACY (2003), desarrolló partidores específicos mediante la alineación de secuencias de la región ITS del rADN y la elección de las regiones únicas del patógeno *Uncinula necator* que afecta la vid. Ello le permitió diferenciar a este hongo de otros oídios estrechamente relacionados, amplificando una pequeña región que puede ser visualizada mediante electroforesis, con ello redujo los costos y tiempos necesarios para determinar este patógeno al nivel de especie con resultados confiables.

4.4 Análisis de secuencias e identificación de especies del género *Golovinomyces*.

Este género incluye 27 especies que se distribuyen comúnmente en el mundo y por tratarse de un parásito obligado, el rango de hospederos se encuentra restringido a la mayoría de las plantas herbáceas de las familias Asteraceae, Bolaginaceae, Scrophulariaceae y Cucurbitaceae (MATSUDA y TAKAMATSU, 2003). Esta información es de gran importancia para conocer a que género corresponde el patógeno que provoca la enfermedad conocida comúnmente como oídio en el cultivo de achicoria.

La secuenciación del producto PCR y el posterior alineamiento de las secuencias obtenidas permitieron determinar que los nueve aislamientos de este género corresponden a una sola especie ya que presentaron un 100% de homología a nivel de secuencias de la región comparada (Anexo 4). Dichas secuencias revelaron un coeficiente de similitud de 99,6% entre la secuencia obtenida de los aislamientos de achicoria y la especie *Golovinomyces cichoracearum* (DC) V.P. Heluta, lo cual coincide con estudios realizados por ADAM *et al.* (1999); SAENZ y TAYLOR (1999) y

MATSUDA y TAKAMATSU (2003). La secuencia obtenida, fue ingresada a la base de datos del EMBL (Nº acceso FN179366).

Así se pudo demostrar que el agente causal de oídio en el cultivo de achicoria en la zona productora de Chile, es el mismo que afecta a este cultivo en otras regiones del mundo, según las publicaciones de LEBEDA y BUCZKOWSKI, 1986; ADAM *et al.*, 1999; SAENZ y TAYLOR, 1999; MATSUDA y TAKAMATSU, 2003; TRDAN *et al.*, 2004 e HIROSE *et al.*, 2005.

4.5 Análisis de secuencias e identificación de especies del género *Alternaria*.

Las secuencias obtenidas del producto de la reacción PCR fueron alineadas y se pudo comprobar que las secuencias de los siete aislamientos correspondían a una misma especie del género *Alternaria* ya que se observó un 100% de homología entre los aislados (Anexo 5).

Para determinar la especie, la secuencia fue ingresada en el programa BLAST y luego de ser comparada con la información disponible en las bases de datos presentó un porcentaje de similitud de 99,6% con la especie *Alternaria alternata* (Fries), resultado que coincide con determinaciones realizadas por KANG *et al.* (2002). La secuencia obtenida fue ingresada a la base de datos del EMBL (Nº de acceso FN179367).

En determinaciones de especie anteriores, se atribuía el nombre *A. alternata* a todas las especies que presentaban esporas pequeñas, sin un examen crítico del comportamiento del hongo bajo condiciones de crecimiento definidas, o sin especificar los criterios de identificación utilizados. Además, muchos autores se basaban únicamente en el tamaño de las esporas, o en patógenos que se encontraban asociadas a los principales cultivos (ROBERTS *et al.*, 2000).

Sin embargo, numerosos autores cuestionan la confiabilidad de la taxonomía tradicional, debido a las dificultades encontradas en el uso de caracteres morfológicos, es así como han surgido nuevas técnicas para clasificar las especies y grupos de especies dentro de este género; considerando características como la producción de micotoxinas y otros metabolitos secundarios (SERDANI *et al.* 2002). Actualmente los análisis moleculares constituyen una herramienta cada vez más utilizada para identificar y clasificar las especies de *Alternaria*, aunque con resultados variables.

ROBERTS *et al.* (2000) compararon las características morfológicas con datos moleculares obtenidos de fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD, sigla en inglés), concluyendo que bajo condiciones de crecimiento definidas, la plasticidad fenotípica de *Alternaria* disminuye y la clasificación taxonómica basada en las características morfológicas de este género resulta válida. El método RAPD, ha sido muy utilizado en estudios de variación genética, porque permite crear grupos morfológicos para representar, por ejemplo, el tamaño de esporas de un hongo y luego analizarlos en un dendrograma (KONSTANTINOVA *et al.*, 2002).

4.6 Relaciones filogenéticas de la familia Erysiphaceae.

En el árbol filogenético (Figura 6) se puede apreciar que el aislamiento obtenido (Nº de Acceso FN179366), molecularmente se encuentra muy cercano a la especie *G. cichoracearum* (Nº de acceso AF031282) y forma un grupo monofilético con *G. orontii* y *G. sordidus*, relación que cuenta con un soporte de 100% valor bootstrap. Este grupo

corresponde al linaje *Euoidium* establecido por MORI *et al.* (2000), que se caracteriza por presentar conidias en cadenas sin cuerpos fibrosos en su estado anamorfo.

Estudios realizados por MATSUDA y TAKAMATSU, (2003) han demostrado que se ha generado una co-especialización hospedero-parásito entre plantas de la familia Asteraceae y hongos del género *Golovinomyces*, especialmente en las primeras etapas de su evolución.

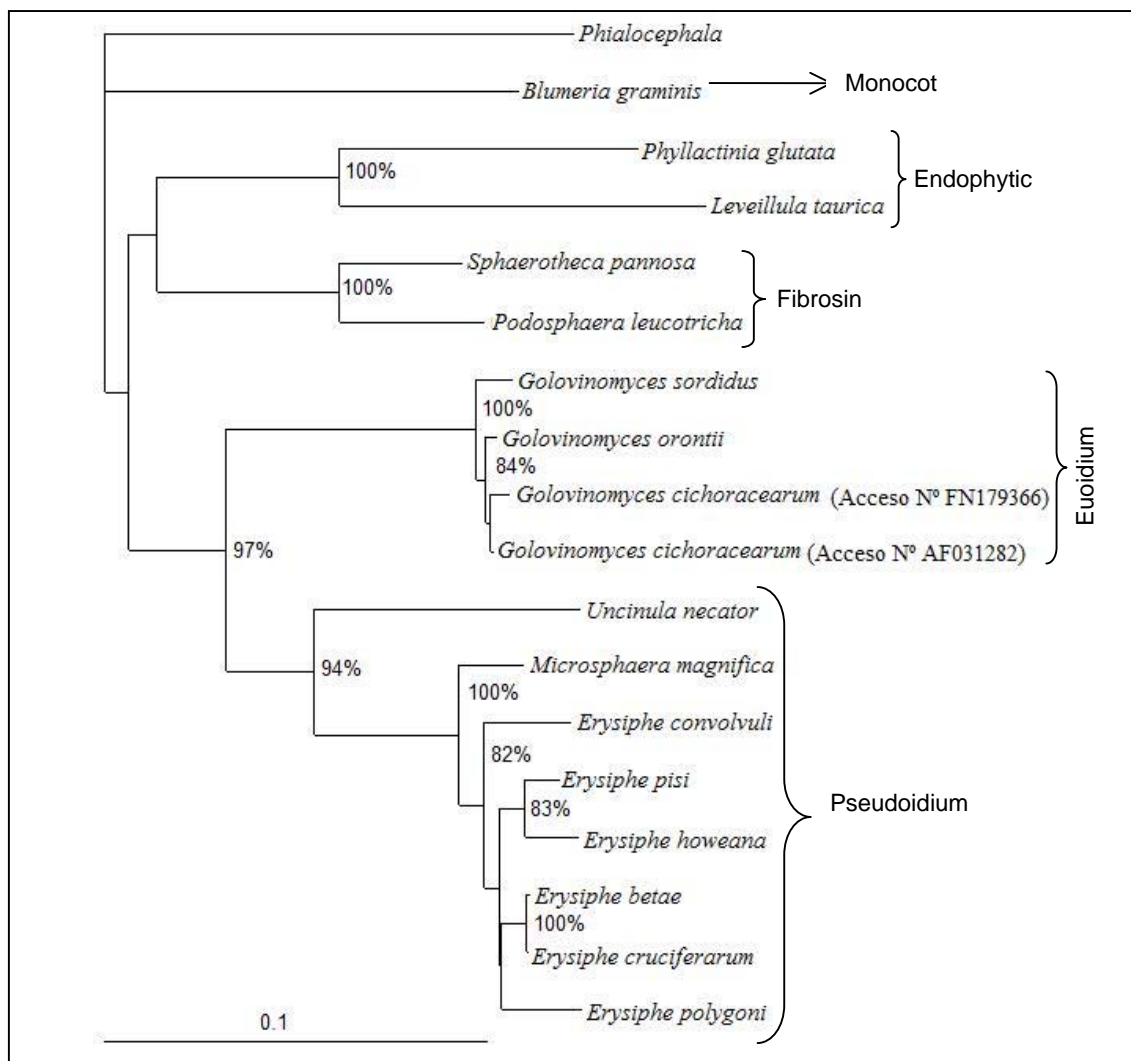


FIGURA 6 Árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining de secuencias de la región ITS del rADN de 17 especies la familia Erysiphaceae, incluyendo la secuencia obtenida del aislamiento en achicoria (N° Acceso FN179366). Los porcentajes al lado de las ramificaciones representan la proporción de bootstraps de 1000 repeticiones.

En el árbol también se observa el grupo monofilético que compone el linaje Fibrosin; llamado así porque los hongos de este género presentan conidias con cuerpos fibrosos (SAENZ y TAYLOR, 1999) e incluye las secciones *Podosphaera* y *Sphaerotheca*, con

un 100% valor bootstrap; ambas especies parasitan plantas de la familia Rosaceae. Este grupo tiene un ancestro común con el linaje Endophytic, el cual se caracteriza por desarrollar micelio completa o parcialmente al interior del hospedero y formar conidias que carecen de cuerpos fibrosos (MORI *et al.*, 2000), en el árbol se forma un grupo monofilético que cuenta con un 100% valor bootstrap, compuesto por especies de hongos que parasitan algunas solanáceas y plantas leñosas.

El grupo monofilético que incluye más taxones en el árbol corresponde al linaje Pseudoidium. Este clado tiene un ancestro común con el linaje al cual pertenece la especie determinada en este estudio, la relación tiene un soporte bootstrap de 97%. El linaje Pseudoidium incluye especies de la sección *Erysiphe*, los cuales parasitan leguminosas. En cambio, hongos del género *Microsphaera* y *Uncinula* están asociados a hospederos de tipo arbustos y arbóreos.

El linaje Monocot presenta un ancestro distinto al de las otras especies incluidas en este análisis. Forma parte de este linaje *B. graminis*, que parasita plantas de la clase Monocotiledóneas, especialmente cereales (MORI *et al.*, 2000).

Las relaciones evolutivas y los grupos monofiléticos que se formaron en este árbol coinciden con las tribus que han sido establecidas en la revisión reciente de la familia Erysiphaceae de HIROSE *et al.* (2005) y HEFFER *et al.* (2006).

4.7 Relaciones filogenéticas del género *Alternaria*.

En el árbol filogenético (Figura 7) se aprecia que la especie determinada se encuentra muy cercana a *A. alternata*, relación que cuenta con un soporte de 99% valor bootstrap. Esta especie forma un grupo monofilético con *A. arborescens* y *A. tenuísima*; relación que a su vez tiene un soporte bootstrap de 100%. Las especies de este grupo monofilético originan a su vez, grupos de especies que se caracterizan por presentar conidias formadas por esporas pequeñas pero muy variables morfológicamente, cuyos grupos han sido establecidos según el tipo de esporulación (ROBERTS *et al.*, 2000).

Las especies *A. solani*, *A. porri*, *A. dauci* y *A. cichorii*, forman otro grupo monofilético, que cuenta con un soporte de 100% valor bootstrap. Estas especies se caracterizan por presentar conidias grandes con la célula apical alargada y una prolongación o pico filamentoso (SIMMONS, 1997). Respecto a esta característica, CHOW y WU (2002) determinaron la relación evolutiva que presentan las especies de *Alternaria* de cuello filamentoso comparado con otras especies. Ellos propusieron que la prolongación en las conidias es un rasgo de adaptación morfológica evolutiva para la dispersión y sobrevivencia de estos hongos.

Las especies *A. infectoria* y *A. triticina* forman un grupo monofilético, relación que cuenta con un 100% valor bootstrap; ambas especies se desarrollan en un hábitat similar, principalmente hojas y granos de cereales (ANDERSEN *et al.*, 2002). Si bien, los hongos del género *Alternaria* no son parásitos obligados, esta relación sugiere que también se presenta cierto tipo de co-especialización hospedero-parásito porque este grupo afecta a plantas de la clase monocotiledóneas y tiene un ancestro diferente al de las demás especies incluidas en este análisis.

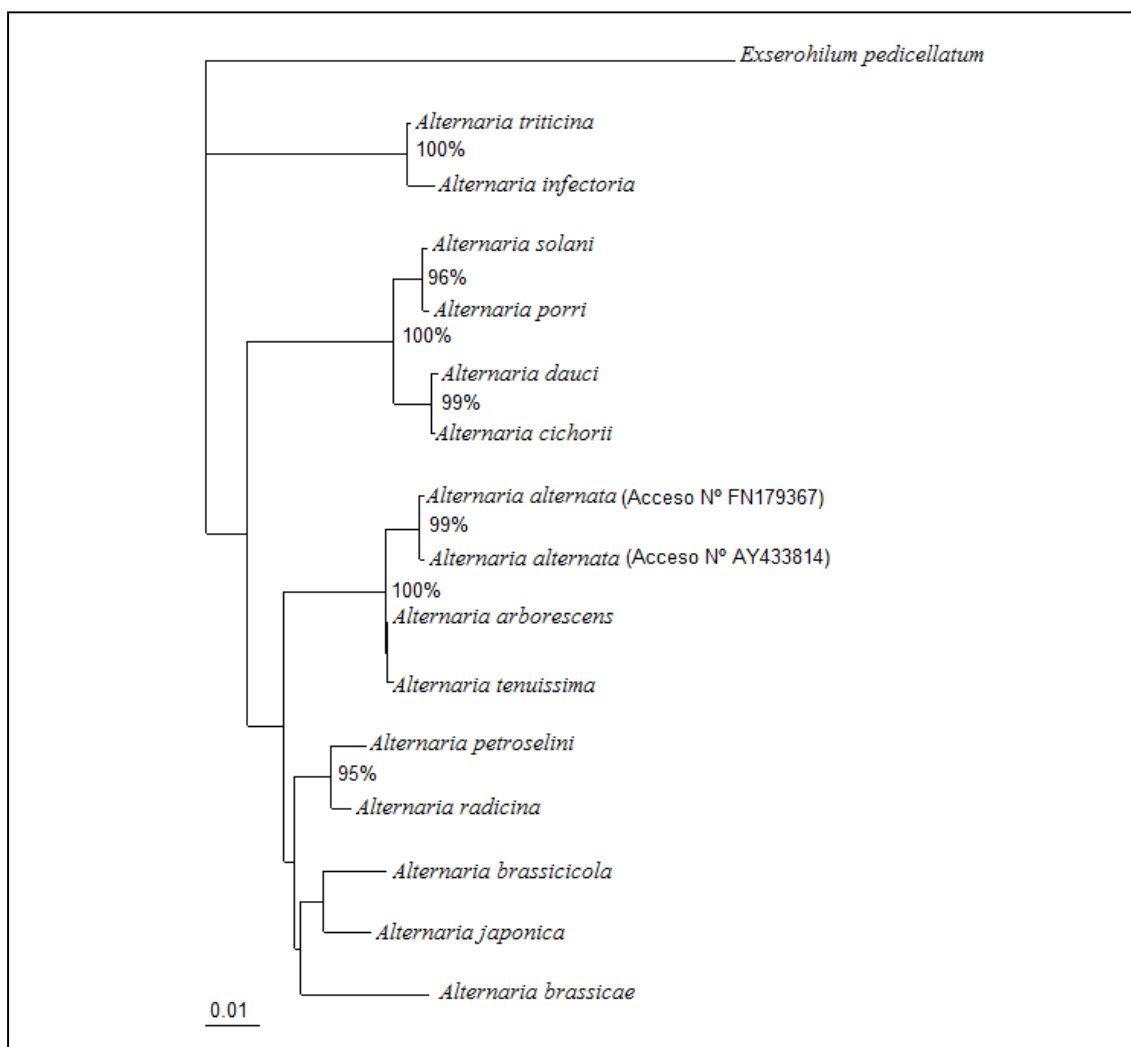


FIGURA 7 Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-Joining con secuencias de la región ITS del rADN de 15 especies del género *Alternaria* que incluye la secuencia obtenida del cultivo de achicoria (N° de acceso FN179367). Los porcentajes al lado de las ramificaciones representan la proporción de bootstraps de 1000 repeticiones.

4.8 Importancia de las especies patógenas determinadas.

Las plantas de achicoria de donde se extrajo el material biológico para este estudio se encontraban con una fuerte presión de oídio cubriendo la superficie de las hojas prácticamente en todos los sectores muestreados, a diferencia de los síntomas de *Alternaria* que se encontraban localizados en el cultivo y con distinto nivel de infección (Anexo 1A y 1B).

En el caso de oídio, la literatura disponible señala que la mayoría de las especies de la familia Erysiphaceae muestran una estricta especificidad de hospederos, por lo que una especie puede infectar sólo una estrecha gama de plantas (HIROSE *et al.*, 2005).

El patógeno *G. cichoracearum* ha sido detectado en plantas de la familia Asteraceae, incluyendo achicoria, en varios estudios realizados en el mundo (LEBEDA y BUCZKOWSKI, 1986; ADAM *et al.*, 1999; SAENZ y TAYLOR, 1999; MATSUDA y TAKAMATSU, 2003; TRDAN *et al.*, 2004 e HIROSE *et al.*, 2005). Este análisis molecular confirma que en Chile se encuentra la misma especie patógena del género *Golovinomyces* afectando el cultivo de achicoria.

A diferencia de *Golovinomyces* que es un parásito obligado; el patógeno que provoca alternariosis en achicoria es un hongo cosmopolita. Si bien SIMMONS (1997); KOIKE (1998); BAIS y RAVISHANKAR (2001) y LIMA *et al.* (2003) señalan que la sintomatología que caracteriza a *Alternaria* observada en achicoria es causada por *A. cichorii*, los análisis realizados en este estudio permitieron descartar a este patógeno como agente causal de alternariosis en las muestras de achicoria colectadas en la zona de cultivo. *A. cichorii* está presente en Chile, asociado a endivia (*Cichorium endivia* L., Asteraceae) y ha sido identificada en semilleros de la zona central por el Departamento de Protección Agrícola del Servicio Agrícola y Ganadero. Sería interesante estudiar las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de esta especie ya que posiblemente esa información explique por qué el cultivo de achicoria en Chile es afectado por *A. alternata* a diferencia de lo que ocurre en otros lugares del mundo. Al respecto, la mayoría de la información disponible referente a los requerimientos de temperatura y radiación de distintas especies del género *Alternaria* proviene de pruebas relacionadas con la formación de esporas en un cultivo *in vitro* (VAKALOUNAKIS y CHRISTIAS, 1986) y no bajo las condiciones que se presentan en el ambiente natural.

La correcta identificación de las especies patógenas que se pueden presentar en algún momento en el cultivo, tiene un impacto directo en el manejo de éste ya que permite optimizar el control de los agentes que pueden causar enfermedades y por consiguiente reducir el rendimiento. La optimización, implica el conocimiento de factores como ciclo de la enfermedad, tasa de crecimiento del patógeno, momento en que ocurre la esporulación, número de esporas producidas y condiciones óptimas para la germinación y crecimiento de las esporas. Esto, complementado con el monitoreo constante e incluso el diseño de modelos predictivos para controlar las enfermedades de manera eficaz y reduciendo los costos relacionados con la aplicación de productos químicos.

Las evaluaciones de variedades realizadas en Estados Unidos, permiten tener una idea de cual podría ser el rendimiento que se esperaría alcanzar en la producción de achicoria industrial. Sin bien, los rendimientos obtenidos en la zona productora de Chile en la temporada 2006-2007 fueron cercanos a esa referencia; es probable que las enfermedades consideradas en este estudio tengan alguna influencia en el rendimiento debido a que reducen el área fotosintética, por lo tanto la planta acumula menos reservas, disminuyendo el peso de las raíces ($t\ ha^{-1}$) y por consiguiente, la cantidad de inulina que se extrae de ellas.

Si bien, este estudio se enfocó en la determinación de especies, es importante mencionar que sería necesario complementar la información que se conoce con nuevos estudios para evaluar la susceptibilidad de las variedades que se cultivan en Chile y determinar cómo son afectados los niveles de incidencia de estas enfermedades por factores como la temperatura y ubicación geográfica.

5 CONCLUSIONES

- Las características morfológicas de oídio, como forma y tamaño de las conidias y conidióforos permitieron comprobar que se trataba del género *Golovinomyces*.
- Las características de las conidias de *Alternaria*, como forma, tamaño y número de células; confirmaron que se trataba de un patógeno perteneciente al grupo de especies de esporas pequeñas.
- Los resultados de este trabajo determinaron que el cultivo de achicoria (*C. intybus* L. var. *sativum* Biskoff) en el área de estudio es afectado por la especie *Golovinomyces* (sin. *Erysiphe*) *cichoracearum* (DC) V.P. Heluta, que causa la enfermedad conocida comúnmente como oídio y el patógeno *Alternaria alternata* (Fries) que provoca alternariosis.
- Las relaciones filogenéticas entre especies de la familia Erysiphaceae ubican a la especie determinada en este estudio dentro del linaje Euoidium, que incluye a los hongos del género *Golovinomyces* que parasitan plantas de la familia Asteraceae, a la cual pertenece la achicoria. Por tratarse de un parásito obligado con una estricta especificidad de hospederos, la especie identificada coincidió con determinaciones de otras regiones del mundo.
- Las relaciones evolutivas del género *Alternaria* incluyeron a la especie determinada en un grupo monofilético compuesto por especies de esporas pequeñas, se trata de un grupo distinto al que pertenece la especie que provoca alternariosis en achicoria en otras localidades.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ADAM, L.; ELLWOOD, S.; WILSON, I.; SAENZ, G.; XIAO, S.; OLIVER R.; TURNER, J. y SOMERVILL S. 1999. Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12: 1031-1043.
- AGRIOS, G. 1996. *Fitopatología*. 2ª ed. México. Limusa. 838 p.
- ANDERSEN, B.; KROGER, E. y ROBERTS, R. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological research*. 105 (3): 291-299.
- ANDERSEN, B.; KROGER, E. y ROBERTS, R. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological research*. 106 (2): 170-182.
- BAIS, H. y RAVISHANKAR, G. 2001. Review: *Cichorium intybus* L.: cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 467 - 484.
- BALCAZAR, B.; MARTINEZ, E. y GONZALEZ, M. 2003. Efecto de la administración oral de inulina sobre el perfil de lípidos y la sensibilidad a la insulina en individuos con obesidad y dislipidemia. *Revista médica de Chile*. 131 (6): 597-604.
- BRASILEIRO, B.; COIMBRA, M.; DE MORAIS, M. y DE OLIVEIRA, N. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on pcr markers. *Brazilian Journal of Microbiology*. (35): 205-210.
- BREMER, K.; ANDERBERG, A. y KARIS, P. 1994. *Asteraceae: Cladistic and Classification*. Timber. Portland. 752 p.
- BRUNS, T.; THOMAS, W. y TAYLOR J. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review Ecology Systematic*. 22: 525 - 564.
- CABEZAS, M.; RABERT, C.; BRAVO, S. y SHENE, C. 2002. Inulin and Sugar contents in *Helianthus tuberosus* and *Cichorium intybus* tubers: Effects of postharvest storage temperature. *Journal of Food Science*. 67 (8): 2860 -2865.
- CARRILLO, L. 2003. *Alternaria* en los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. pp: 81-85.
- ČERNÝ, I.; PAČUTA, V. y KOVÁR, M. 2008. Yield and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) In dependence on variety and foliar application of atonik and polybor 150. *Journal of Central European Agriculture*. 9 (3): 425-430.

- CHENNA, R.; SUGAWARA¹, H.; KOIKE¹, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T.; HIGGINS D., y THOMPSON, J. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31 (13): 3497-3500.
- CHOU, H. y WU, W. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*. 106 (2): 164-169.
- DO AMARAL, A.; REIS, M.; DA SILVA, F. 2007. O programa BLAST: Guia prático de utilização. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Recursos Genéticos y Biotecnología. Documentos 224. 24 p.
- FALACY, S. 2003. Detection of *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*) with polymerase chain reaction and species-specific primers. Thesis master of science in plant pathology (On line). Washington. Washington State University, Department of Plant Pathology. 37 p. <https://research.wsulibs.wsu.edu:8443/dspace/bitstream/2376/130/1/j_falacy_112603.pdf> (3 abr. 2007)
- FÉLIX, R.; APODACA, M.; MARTÍNEZ, M. y ESPINOSA, S. 2005 *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castagne) U. Brawn y N. Shishkoff en Cucurbitáceas en el Norte de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23 (2): 162-68.
- FELSENSTEIN, J. 1985. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution*. 39(4) 783-791.
- FERNÁNDEZ, J. 2005. Incidencia y caracterización: morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico. Tesis maestro en ciencias en protección de cultivos Universidad de Puerto Rico. 167 p.
- FRESE, L.; DAMBROTH, M. y BRAMM, A. 1991. Breeding potential of root chicory (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*). *Plant Breeding*. 106 (2): 107-113.
- GARDES, M. y BRUNS, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.
- GOMES, E.; KASUYA, M.; BARROS, E.; BORGES, A. y ARAUJO E. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (4): 477-483.
- HAWKSWORTH, D.; KIRK, P.; SUTTON, B. y PEGLER, D. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8^a ed. Oxon, UK. CAB International. 616 p.
- HEFFER, V.; JOHNSON K.; POWELSON M. y SHISHKOFF N. 2006. Identification of Powdery Mildew Fungi anno 2006. The Plant Health Instructor. (On line) <<http://www.apsnet.org/education/LabExercises/PowderyMildew/Top.html>> (22 oct. 2008).
- HIGGINS, D. y SHARP, P. 1988. CLUSTAL: a Package for Performing Multiple Sequence Alignment in a microcomputer. *Gene*. 73: 237-244.
- HIRATA, T. y TAKAMATSU, S. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience*. (37): 238-288.

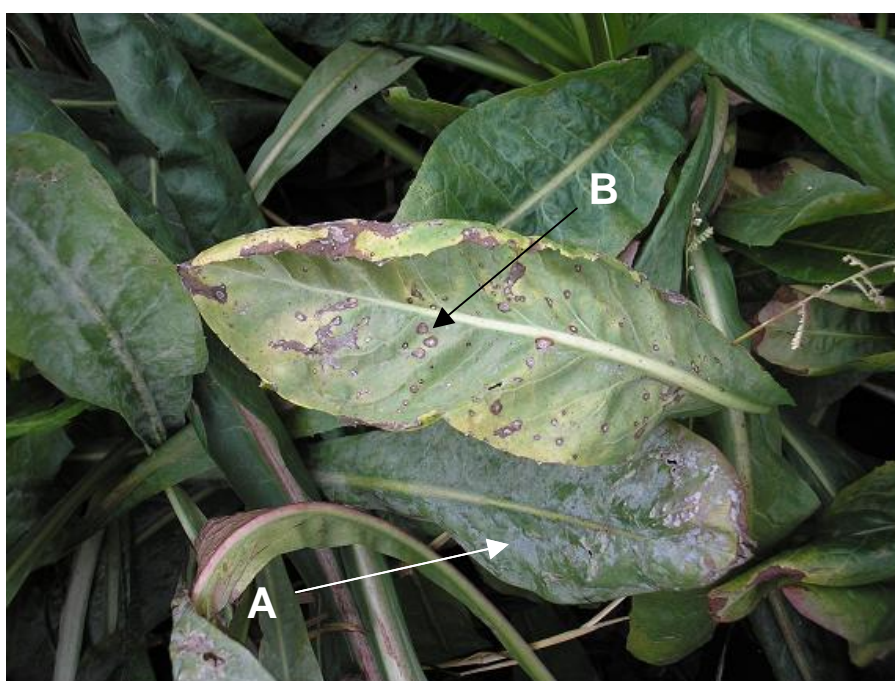
- HIROSE, S.; TANDA, S.; KISS, L.; GRIGALIUNAITE, B.; HAVRYLENKO, M. y TAKAMATSU, S. 2005 .Molecular phylogeny and evolution of the maple powdery mildew (*Sawadaea*, Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Mycological research*. 109 (8): 912-922.
- HYNDMAN D. y MITSUHASHI M. 2003. PCR primer design **In** Bartlett, J. y Stirling, D (eds). *Methods in molecular biology: PCR Protocols*. Humana Press 2^a ed. Totowa, New Jersey. (226) 531 p.
- JAPON, DNA DATA BANK OF JAPAN (DDBJ). 1986. (On line). <<http://www.ddbj.nig.ac.jp>> (22 ago. 2007)
- KANG, J.; CROUS, P. y PEEVER, T. 2002. Characterization of *Alternaria* species groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*. 106 (5): 561-569.
- KIERS, A.; MES, T.; VAN DER MEIJDEN, R. y BACHMANN, K. 1999 Morphologically defined *Cichorium* (Asteraceae) species reflect lineages based on chloroplast and nuclear (ITS) DNA data. *Systematic Botany*. 24 (4): 645-659.
- KOIKE, S. 1998. Leaf spot of radicchio caused by *Alternaria cichorii* in California. *Plant Disease*. 82 (4): 448.
- KOHN, L. 1992. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia*. 84 (2) 139-153.
- KOLMODIN, L. y BIRCH, D. 2002. Polymerase chain reaction basic principles and routine practice **In** Chen, B. y Janes H. (eds). *Methods in molecular biology: PCR Cloning protocols*. 2^a ed. Humana Press. Totowa, New Jersey. (192) 433p.
- KONSTANTINOVA, P.; BONANTS, P.; GENT-PELZER, M., y ZOUWEN, P. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. In carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological research*. 106 (1): 23-33.
- KRARUP, C. y MOREIRA, I. 1998. Hortalizas de estación fría, Biología diversidad cultural. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. pp 63-69.
- LEBEDA, A. y BUCZKOWSKI, J. 1986. Occurrence of *Erysiphe cichoracearum* perithecia on wild lactuca species. *Journal of Phytopathology*. 115 (1): 21-28.
- LIMA, M.; REIS A. y LOPES C. 2003. Patogenicidade de *Alternaria cichorii* sobre espécies da Família Asteraceae no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 682-685.
- MARTIN, K. y RYGIEWICZ, P. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *Biomed Central Microbiology*. 5 (28): 1-11.
- MATSUDA, S. y TAKAMATSU, S. 2003. Evolution of host-parasite relationships of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 27 (2): 314-327.
- Mc DEVITT, M. y PETERS, B. 2005. Weight management supported by tasty inulin-based products. *AgroFOOD industry. Hi-tech*. 16 (5): 1-2.

- MERCADO, D.; RENARD, M.; DUVEILLER, E. y MARAITE H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology*. 55: 485-493.
- MIZRACHI, I. 2007. GenBank: The Nucleotide Sequence Database. Part 1. The Databases. NCBI Handbook GenBank. (On line) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/handbook/ch1.pdf>> (03 mar. 2009)
- MORI, Y.; SATO, Y. y TAKAMATSU, S. 2000. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia*. 92 (1): 74-93.
- MORRISON, D. 2008. A review of phylogenetic trees made easy: A how-to manual, 3^a ed. *Systematic Biology*. 57 (4): 658-660.
- NINESS K. 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition*. 129 (7): 1402-1466.
- PINZÓN, A. 2006. Introducción a la Bioinformática, práctica 3: Creación de árboles filogenéticos. Guía elaborada por Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia y del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. 12 p.
- PRYOR, B. y BIGELOW, D. 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*. 95 (6): 1141-1154.
- PRYOR, B. y GILBERTSON, R. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*. 104 (11): 1312-1321.
- REINO UNIDO, EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (EMBL). 1980. (On line). <<http://www.ebi.ac.uk/embl>> (08 ago. 2007).
- ROBERTS, R.; RETMOND, S. y ANDERSEN, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*. 104 (2): 151-160.
- SAENZ, G. y TAYLOR, J. 1999. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*. 77: 150-168.
- SIMMONS, E. 1997. *Alternaria* themes and variations (151-223). *Mycotaxon*. 65: 1-91.
- SERDANI, M.; KANG, J.; ANDERSEN, B y CROUS, P. 2002 Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological research*. 106 (5): 561-569.
- THOMMA, B. 2003. Pathogen profile, *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4 (4): 225-236.
- TO-ANUM, C.; KOM-UN, S.; LIMKAISANG, S.; FANGFUK, W.; SATO, Y. y TAKAMATSU, S. 2005. A new subgenus, *Microidium*, of *Oidium* (*Erysiphaceae*) on *Phyllanthus* spp. *Mycosience*. 46 (1): 1-8.

- TRDAN, S.; VALIC N.; JERMAN, J.; BAN, D. y ZNIDARCIC, D. 2004. Efficacy of three natural chemicals to reduce the damage of *Erysiphe cichoracearum* on chicory in two meteorologically different growing seasons. *Journal of Phytopathology* 152: 567-574.
- TROCCHI, G. 1996. La achicoria azucarera una nueva planta industrial. *Chile Agrícola*. 61 (722): 18-21.
- UNITED STATES, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). 1988. (On line) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> (22 ago. 2007).
- VAKALOUNAKIS, D. y CHRISTIAS, C. 1986. Light quality, temperature and sporogenesis in *Alternaria cichorii*. *Transactions of the British Mycological Society*. 86 (2): 247-254.
- VAN STALLEN, N.; NOTEN, V.; NEEFS V. y DE PROFT, M. 2001. The phylogenetic relationship between different *Cichorium intybus* cultivars and cultivar groups, as revealed by RAPDs. *Plant Breeding*. 120: 425-428.
- VELÁSQUEZ, M. 2005. Producción de alimentos funcionales: Nace una Industria. Colegio de Ingenieros de Chile. *Revista Ingenieros*. 176: 12-14.
- VILLAGRA, M. 2001. Identificación del agente causal de escoba de bruja en murta (*Ugni molinae* Turcz.). Tesis de Licenciado en Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 95 p.
- WILSON, R.; SMITH, J. y YONTS, C. 2004. Chicory root yield and carbohydrate composition is influenced by cultivar selection, planting, and harvest date. *Crop Science*. 44: 748-752.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Signo de *Golovinomyces* (a) y síntoma de *Alternaria* (b) observados en hojas de achicoria en los predios muestreados.



ANEXO 2 Medición de tamaño y número de septos de conidias de *Alternaria*.

Nº conidia	Largo μm	Ancho μm	Septos trans.	Septos long.	Nº conidia	Largo μm	Ancho μm	Septos trans.	Septos long.
1	30,0	12,5	4	2	51	17,5	10,0	1	0
2	22,5	10,0	4	2	52	25,0	10,0	5	2
3	35,0	12,5	4	2	53	35,0	10,0	6	2
4	37,5	10,0	4	2	54	17,5	10,0	2	0
5	22,5	10,0	4	2	55	20,0	10,0	3	1
6	17,5	10,0	2	1	56	20,0	10,0	1	2
7	25,0	12,5	4	2	57	37,5	10,0	4	2
8	12,5	10,0	1	0	58	13,8	10,0	1	0
9	20,0	10,0	4	1	59	35,0	12,5	5	2
10	35,0	12,5	4	2	60	17,5	10,0	3	1
11	32,5	10,0	5	2	61	22,5	10,0	5	2
12	20,0	10,0	2	1	62	42,5	10,0	6	2
13	17,5	12,5	1	2	63	32,5	12,5	5	3
14	22,5	10,0	3	0	64	30,0	10,0	4	0
15	15,0	10,0	3	0	65	30,0	10,0	4	1
16	25,0	10,0	5	2	66	20,0	10,0	2	1
17	35,0	12,5	5	2	67	30,0	12,5	4	3
18	26,3	10,0	5	2	68	27,5	12,5	5	2
19	22,5	10,0	3	2	69	35,0	10,0	6	2
20	22,5	10,0	4	2	70	20,0	10,0	4	1
21	32,5	12,5	5	2	71	30,0	10,0	6	2
22	32,5	12,5	5	3	72	22,5	10,0	4	3
23	20,0	10,0	4	2	73	10,0	7,5	1	0
24	15,0	10,0	1	1	74	26,3	10,0	5	2
25	30,0	7,5	5	0	75	32,5	12,5	5	3
26	25,0	12,5	3	3	76	25,0	10,0	5	2
27	22,5	10,0	4	3	77	22,5	10,0	4	3
28	15,0	10,0	1	1	78	30,0	12,5	3	3
29	30,0	10,0	6	2	79	30,0	12,5	4	3
30	25,0	12,5	3	3	80	12,5	10,0	1	0
31	30,0	12,5	4	3	81	30,0	12,5	4	1
32	27,5	11,3	4	2	82	35,0	10,0	6	2
33	20,0	10,0	4	1	83	25,0	10,0	5	2
34	25,0	10,0	4	3	84	15,0	10,0	1	1
35	27,5	12,5	5	2	85	27,5	12,5	5	2
36	37,5	10,0	6	0	86	25,0	12,5	3	3
37	25,0	12,5	4	2	87	30,0	12,5	4	3
38	40,0	10,0	7	1	88	20,0	10,0	2	1
39	30,0	12,5	3	2	89	22,5	10,0	4	3
40	30,0	12,5	2	1	90	30,0	12,5	4	2
41	10,0	7,5	1	0	91	25,0	12,5	3	3
42	25,0	10,0	6	3	92	15,0	10,0	1	1
43	30,0	12,5	4	2	93	27,5	12,5	5	2
44	22,5	10,0	5	2	94	22,5	10,0	3	0
45	27,5	11,3	4	2	95	10,0	7,5	1	0
46	27,5	12,5	5	2	96	32,5	12,5	5	3
47	12,5	12,5	2	1	97	22,5	10,0	4	2
48	30,0	12,5	4	3	98	42,5	10,0	6	2
49	22,5	7,5	2	1	99	12,5	10,0	1	0
50	27,5	10,0	4	2	100	25,0	10,0	4	3

ANEXO 3 Medición del tamaño de conidias y conidióforos de *Golovinomyces*.

Nº	Conidias		Conidióforo		Nº	Conidias		Conidióforo	
	Largo µm	Ancho µm	Largo µm	Ancho µm		Largo µm	Ancho µm	Largo µm	Ancho µm
1	32,5	17,5	96,3	12,5	51	30,0	17,5	66,3	12,5
2	30,0	17,5	105,0	12,5	52	45,0	17,5	97,5	12,5
3	27,5	12,5	80,0	10,0	53	32,5	20,0	63,8	12,5
4	25,0	12,5	42,5	12,5	54	25,0	17,5	122,5	11,3
5	30,0	15,0	100,0	10,0	55	30,0	17,5	107,5	12,5
6	32,5	15,0	100,0	10,0	56	27,5	17,5	47,5	10,0
7	27,5	17,5	40,0	7,5	57	27,5	17,5	63,8	12,5
8	32,5	15,0	47,5	12,5	58	30,0	17,5	137,5	10,0
9	27,5	17,5	62,5	12,5	59	28,8	20,0	110,0	12,5
10	32,5	18,8	80,0	10,0	60	32,5	15,0	110,0	10,0
11	27,5	15,0	95,0	12,5	61	30,0	17,5	115,0	10,0
12	27,5	15,0	32,5	10,0	62	30,0	20,0	145,0	11,3
13	27,5	15,0	67,5	12,5	63	22,5	17,5	66,3	10,0
14	27,5	15,0	70,0	15,0	64	30,0	17,5	37,5	10,0
15	22,5	12,5	100,0	12,5	65	27,5	20,0	103,8	12,5
16	15,0	12,5	80,0	12,5	66	30,0	17,5	112,5	12,5
17	12,5	10,0	81,3	10,0	67	27,5	20,0	90,0	12,5
18	35,0	17,5	100,0	12,5	68	30,0	17,5	102,5	10,0
19	25,0	15,0	132,5	12,5	69	30,0	17,5	135,0	12,5
20	35,0	17,5	122,5	12,5	70	32,5	17,5	130,0	10,0
21	27,5	15,0	122,5	11,3	71	25,0	20,0	92,5	10,0
22	27,5	12,5	87,5	12,5	72	30,0	17,5	82,5	10,0
23	20,0	17,5	102,5	12,5	73	27,5	12,5	82,5	10,0
24	30,0	17,5	100,0	12,5	74	30,0	17,5	85,0	12,5
25	35,0	12,5	103,8	12,5	75	30,0	17,5	85,0	12,5
26	31,3	17,5	37,5	12,5	76	27,5	15,0	100,0	12,5
27	22,5	20,0	90,0	12,5	77	27,5	17,5	82,5	11,3
28	37,5	15,0	66,3	10,0	78	30,0	17,5	42,5	10,0
29	32,5	22,5	105,0	15,0	79	27,5	20,0	87,5	12,5
30	32,5	17,5	50,0	12,5	80	27,5	17,5	87,5	10,0
31	32,5	17,5	92,5	12,5	81	20,0	17,5	82,5	11,3
32	30,0	17,5	100,0	12,5	82	27,5	12,5	82,5	10,0
33	30,0	17,5	97,5	12,5	83	30,0	20,0	105,0	12,5
34	30,0	20,0	105,0	12,5	84	25,0	15,0	132,5	12,5
35	30,0	17,5	103,8	11,3	85	32,5	15,0	110,0	12,5
36	27,5	20,0	50,0	12,5	86	28,8	20,0	110,0	15,0
37	27,5	17,5	71,3	10,0	87	27,5	17,5	72,5	12,5
38	27,5	17,5	72,5	12,5	88	27,5	12,5	80,0	12,5
39	27,5	17,5	82,5	12,5	89	45,0	17,5	97,5	10,0
40	30,0	15,0	95,0	12,5	90	30,0	20,0	135,0	12,5
41	25,0	17,5	50,0	12,5	91	25,0	17,5	50,0	12,5
42	30,0	20,0	135,0	12,5	92	27,5	20,0	100,0	12,5
43	30,0	17,5	85,0	15,0	93	30,0	17,5	107,5	12,5
44	30,0	20,0	55,0	12,5	94	30,0	17,5	85,0	12,5
45	27,5	20,0	110,0	12,5	95	25,0	15,0	132,5	12,5
46	30,0	17,5	42,5	15,0	96	30,0	20,0	55,0	12,5
47	27,5	17,5	80,0	12,5	97	27,5	20,0	95,0	12,5
48	27,5	20,0	95,0	12,5	98	32,5	15,0	110,0	11,3
49	26,3	20,0	107,5	11,3	99	30,0	17,5	137,5	12,5
50	16,3	15,0	90,0	12,5	100	25,0	17,5	132,5	10,0

ANEXO 5 Alineamiento de secuencias de los aislamientos del género *Alternaria*

```

Alt_1  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
Alt_2  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
Alt_3  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
Alt_4  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
Alt_5  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
Alt_7  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
Alt_6  GGAAGTAAAAAGTCGTAAACAAGGCTGATCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATG 60
*****

Alt_1  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
Alt_2  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
Alt_3  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
Alt_4  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
Alt_5  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
Alt_7  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
Alt_6  CTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGACTTGTGCTGCGCTCCGAAAACCAAGTAGGCCGGCT 120
*****

Alt_1  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
Alt_2  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
Alt_3  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
Alt_4  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
Alt_5  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
Alt_7  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
Alt_6  GCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAACCCAAAGCA 180
*****

Alt_1  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
Alt_2  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
Alt_3  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
Alt_4  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
Alt_5  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
Alt_7  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
Alt_6  AAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA 240
*****

Alt_1  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
Alt_2  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
Alt_3  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
Alt_4  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
Alt_5  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
Alt_7  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
Alt_6  ATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT 300
*****

Alt_1  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
Alt_2  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
Alt_3  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
Alt_4  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
Alt_5  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
Alt_7  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
Alt_6  TCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTGTAATTATT 360
*****

Alt_1  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
Alt_2  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
Alt_3  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
Alt_4  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
Alt_5  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
Alt_7  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
Alt_6  AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG 420
*****

Alt_1  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
Alt_2  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
Alt_3  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
Alt_4  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
Alt_5  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
Alt_7  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
Alt_6  AACCCACCAAGGAAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAGGGTGAATAATTACGCAAGGCTGT 480
*****

Alt_1  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
Alt_2  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
Alt_3  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
Alt_4  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
Alt_5  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
Alt_7  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
Alt_6  AACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTCCACC 540
*****

Alt_1  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
Alt_2  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
Alt_3  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
Alt_4  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
Alt_5  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
Alt_7  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
Alt_6  TACGGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC 568
*****

```