

Biológicas

T.D

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA 556

Facultat de CC. Biològiques

Biológicas



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 13349

DATA 5-5-99

SIGNATURA
T.D 556

Nº LIBRE: j20979101

30 cm.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
REGISTRE GENERAL
ENTRADA

26 FEB. 1999

N.º 25801

HORA 10.531

OFICINA AUXILIAR NÚM. 14

Caracterización y diagnóstico molecular de las cepas de
Colletotrichum patógenas de plantas de fresa

Pedro Vicente Martínez Culebras
Tesis Doctoral
Valencia, 1999

UMI Number: U607688

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607688

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346



COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)
SPANISH TYPE CULTURE COLLECTION (CECT)

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Edificio de Investigación
Campus de Burjasot

46100 BURJASOT (Valencia)
(Spain)

Tel. Nacional 96-386 46 12
Internacional 34-6 386 46 12
Fax Nacional 96-398 31 87
Internacional 34-6 398 31 87
E-mail: CECT@UV.ES

La Dra. Amparo Querol Simón, Colaborador científico del CSIC, Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, y la Dra. María Dolores García López, Profesora titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, hacen constar:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado Pedro Vicente Martínez Culebras en la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T)

Burjasot, Febrero 1999

Fd.o. Dra. Amparo Querol Simón

Fdo. Dra. María Dolores García López

	Índice
INTRODUCCIÓN	1
1. El género <i>Colletotrichum</i>	1
1.1. Posición taxonómica	1
1.2. Taxonomía del género	3
1.3. Criterios clásicos usados en identificación	4
1.4. Métodos moleculares usados en identificación	6
1.4.1. Electroforesis de cromosomas	6
1.4.2. Polimorfismo en secuencias del DNA	7
1.4.3. Análisis del DNA mitocondrial	7
1.4.4. Secuencias del DNA ribosomal	8
1.4.5. Polimorfismos mediante técnicas de PCR	10
2. Las plantas de fresa	12
2.1. El cultivo de la fresa	12
2.2. Antracnosis	14
2.3. Especies de <i>Colletotrichum</i> en plantas de fresa	17
2.4. Diagnóstico de <i>Colletotrichum</i> en plantas de fresa	19
OBJETIVOS DEL TRABAJO	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Microorganismos	21
1.1. Hongos filamentosos	21
1.2. Bacterias	21
2. Material vegetal	24
3. Plásmidos	24
4 Medios de cultivo	25
5. Técnicas de cultivo y mantenimiento de microorganismos	26
5.1. Hongos filamentosos	26
5.1.1. Condiciones de crecimiento	26
5.1.2. Mantenimiento y conservación de las cepas	26
5.2. Bacterias	26
6. Soluciones y tampones	27

Índice	
7. Productos	28
8. Oligonucleótidos sintéticos	28
9. Diseño de oligonucleótidos	28
10. Aislamiento de DNA	29
10.1. Hongos filamentosos	29
10.2. Bacterias	30
10.3. Plantas de fresa	30
11. Digestiones con enzimas	30
12. Electroforesis de DNA	30
13. Purificación de fragmentos de DNA	30
14. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	30
15. Amplificación por RAPDs	31
15.1. Técnicas de trabajo	31
16. Clonación	32
16.1. Ligación	32
16.2. Transformación	32
17. Secuenciación	32
17.1. Procedimiento	32
17.2. Programas utilizados	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
1. Restricción del DNA ribosomal	35
1.1.1. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4	35
1.1.2. Digestión de los productos amplificados.	36
1.1.3. Discusión	40
2. Caracterización de las cepas de <i>Colletotrichum</i> mediante RAPDs.	43
2.1. Reacciones de RAPDs-PCR	43

2.2. Análisis de los patrones de RAPDs	44
2.2.1. <i>C. acutatum</i>	45
2.2.2. <i>C. fragariae</i> y <i>G. cingulata</i>	50
2.3. Discusión	52
3. Subdivisión de las cepas en grupos moleculares.	55
3.1. Resultados y grupos resultantes.	55
3.1.1. <i>C. acutatum</i> .	55
3.1.2. <i>C. fragariae</i> y <i>C. gloeosporioides</i> .	59
3.1.3. <i>Cepas control</i> .	57
3.2. Comparación morfológica y fisiológica.	60
3.3. Discusión	61
4. Secuenciación de las cepas de <i>Colletotrichum</i>.	65
4.1. Selección de cepas para secuenciar	66
4.2. Secuencias y alineamientos.	67
4.3. Descripción de las secuencias.	67
4.3.1. Posiciones variables e informativas	68
4.3.2. Composición nucleotídica de las secuencias.	68
4.4. Tasas de evolución.	68
4.4.1. Estimaciones de tasas de sustitución nucleotídica y patrones de divergencia	68
4.5. Relaciones filogenéticas y árboles obtenidos	70
4.6. Discusión	73
4.6.1. <i>C. acutatum</i>	74
4.6.2. <i>C. fragariae</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	76
5. Detección y diagnóstico del patógeno de cuarentena <i>C. acutatum</i>.	79
5.1. Diseño de oligonucleótidos específicos.	80
5.2. Amplificación por PCR a partir de DNA de micelio	80
5.3. Amplificación por PCR a partir de DNA de material vegetal	81
5.4. Discusión	84
6. Detección y diagnóstico del patógeno <i>C. fragariae</i>.	87
6.1. Clonación y secuenciación de un fragmento diferencial de <i>C. fragariae</i> obtenido por RAPDs.	87
6.2. Diseño de oligonucleótidos específicos.	89
6.3. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos FRA1 y FRA2.	89
6.4. Discusión	92

Índice

CONCLUSIONES

95

BIBLIOGRAFÍA

97

Introducción

1. El género *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* incluye un grupo de hongos fitopatógenos responsables de una enfermedad que se conoce con el nombre de antracnosis. Presentan una distribución geográfica amplia y causan importantes pérdidas económicas en un gran número de plantas como cereales, leguminosas, cultivos herbáceos, plantas hortícolas y árboles frutales. Los principales síntomas son la presencia de manchas de diferentes tamaños y de colores oscuros. Los efectos de la enfermedad se pueden manifestar en diferentes partes de la planta y en cualquiera de las fases de su desarrollo. La antracnosis de los frutos puede producir la caída y pudrición de éstos y es bastante frecuente encontrar sus efectos después de la cosecha, debido a infecciones latentes o quiescentes, muy características en *Colletotrichum*.

Además de la importancia como hongo fitopatógeno, *Colletotrichum* también destaca como organismo modelo en estudios de procesos de infección y de mecanismos de resistencia. Es quizás junto con *Phytophthora* uno de los géneros de hongos fitopatógenos más estudiados.

1.1. Posición taxonómica

Taxonómicamente, el género *Colletotrichum* agrupa una serie de hongos que normalmente se reproducen de forma asexual, y que se encuentran dentro del grupo artificial de los Coelomycetes (Sutton, 1980).

En una clasificación general de los hongos, Ainsworth (1973) propone agrupar los hongos asexuales, o de forma más común hongos imperfectos, en la subdivisión Deuteromycotina, a su vez organizada en cuatro clases, los Blastomycetes, Hyphomycetes, Agonomycetes y Coelomycetes (Figura 1). El nombre de Coelomycetes fue introducido por Grove en 1919 para agrupar varios géneros de hongos que presentaban una gran diversidad en sus fructificaciones, y este concepto fue extendido más tarde por el mismo Grove (1935,1937), para aquellos Deuteromycetes en los cuales los conidios se producen dentro de una cavidad que puede estar formada por el hongo, por el huésped, o por una combinación de ambos. El grupo artificial de los Coelomycetes se divide a su vez en dos órdenes, dependiendo si forman picnidios o acérvulos como cuerpos fructíferos. El orden de los Sphaeropsidales incluye a los géneros que forman picnidios, y el orden de los Melanconiales a los que presentan acérvulos como cuerpos fructíferos. Es aquí donde se sitúa el género *Colletotrichum*.

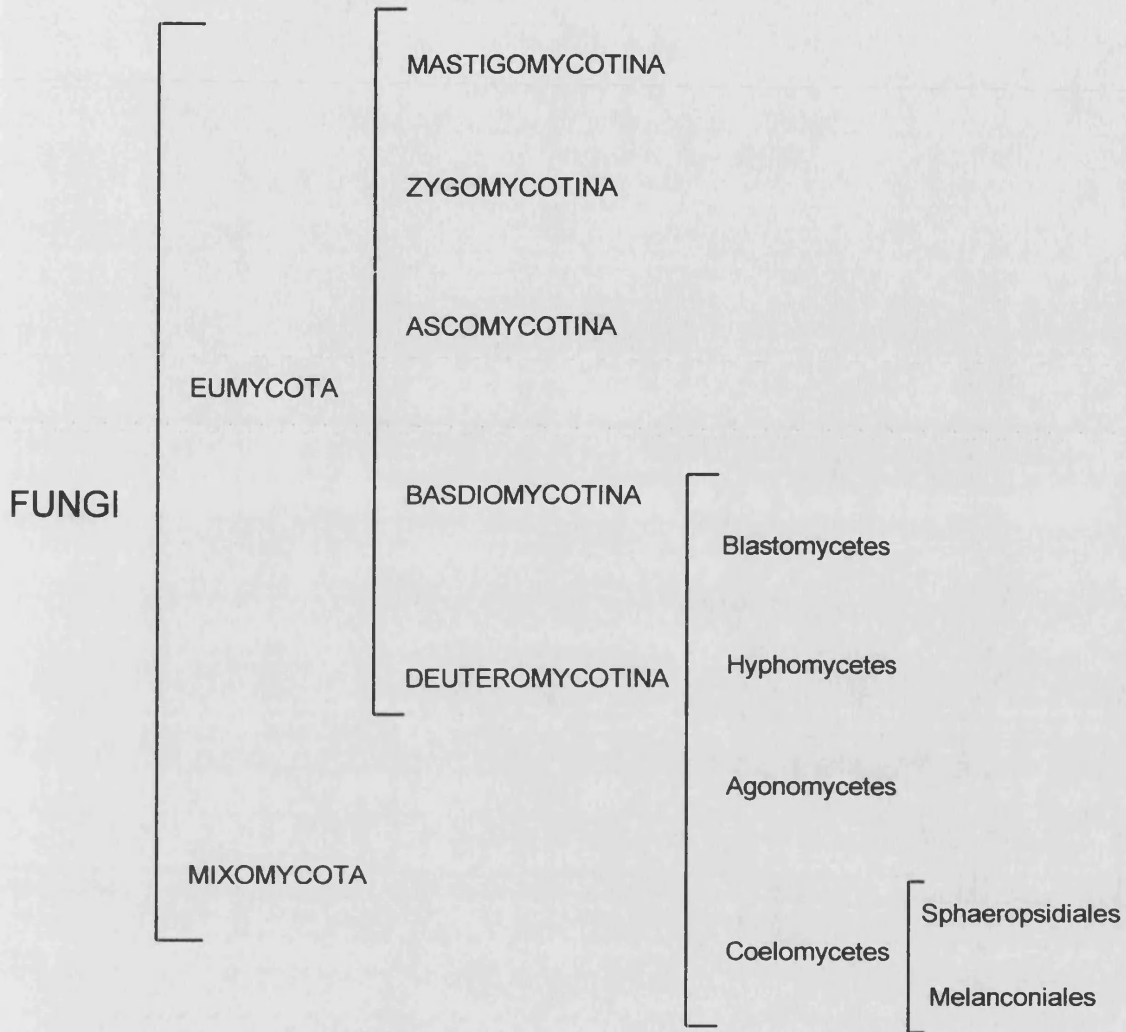


Figura 1. Clasificación simplificada del reino de los hongos basada en Ainsworth, (1973), con ligeras modificaciones. Los grupos terminados en mycota, mycotina y mycetes se refieren a las Divisiones, Subdivisiones y Clases respectivamente.

Solamente un pequeño número de Deuteromycetes han sido relacionados con su estado sexual o perfecto, y en el caso de los Coelomycetes siempre han sido relacionados con Ascomycetes. El anamorfo *Colletotrichum* se ha correlacionado en un gran número de ocasiones con el teleomorfo *Glomerella*, un ascomyceto de la clase Euascomycetes que se caracteriza por producir sus ascas en cuerpos fructíferos.

1.2. Taxonomía del género

El género *Colletotrichum* fue creado por Corda en 1837 al describir *C. lineola* Corda. (*C. dematium*) sobre tallos de umbelíferas en Alemania. Fué incluido por Penz y Saccardo en 1984 dentro del orden de los Melanconiales, y así ha sido reconocido desde entonces. Al igual que ocurre en la mayoría de los hongos fitopatógenos, el principal problema en la clasificación del género *Colletotrichum* es de origen histórico. Durante el siglo pasado y principios de éste, cuando se realizaba el aislamiento de un hongo en un nuevo substrato se interpretaba como una especie nueva, y era formalmente descrita como tal. Esta herencia masiva de nombres y su inadecuado conocimiento ha provocado frecuentes cambios en la nomenclatura.

A lo largo de la historia taxonómica de *Colletotrichum* se han conocido hasta 17 nombres genéricos. La mayoría de estos géneros contienen pocas especies, pero en *Vermicularia* y *Gloeosporium* se han descrito cientos y la transferencia de estas al género *Colletotrichum* supone uno de los grandes avances en la taxonomía del género. El primer intento de reducir el número de taxones aceptados lo realizó von Arx (1957), quien basándose en criterios morfológicos redujo a once especies el número de taxones aceptados. Aproximadamente 600 sinónimos fueron citados para *C. gloeosporioides*, 86 para *C. dematium*, 33 para *C. graminicola*, 18 para *C. crassipes* y 15 para *C. atramentarium*. Von Arx optó por un concepto amplio de especie y realizó una revolucionaria contracción que ha sido la base para posteriores trabajos. A pesar de la extraordinaria labor de von Arx al reducir considerablemente los cientos de especies descritas hasta entonces, en su trabajo se encuentran algunos errores y muchos de los sinónimos propuestos por von Arx han resultado ser distintos y aclarados posteriormente.

Actualmente no existe unanimidad entre los distintos autores a la hora de elaborar una lista de taxones aceptados, y tal como parece indicar la historia del género *Colletotrichum*, todavía quedan por resolver muchos conceptos importantes para aclarar la compleja taxonomía del género. Por este motivo, el listado de 39 taxones aceptados elaborado por Sutton (1992), no debe ser considerado como autoritario y definitivo.

El estado perfecto del género *Colletotrichum* fue identificado por primera vez por Atkinson (1882), y más tarde confirmado por Stoneman (1898), que lo denominó como *Gnomoniopsis cingulata*, sin embargo, *Gnomoniopsis* había sido usado anteriormente para otros hongos. El género *Glomerella* fue introducido por von Schrenk y Spaulding en

1903 para acomodar los teleomorfos de *Gloeosporium* y *Colletotrichum*, que hasta entonces habían estado incluidos incorrectamente dentro de *Gnomoniopsis*.

Cuando consideramos el estado sexual o perfecto de hongos que normalmente se presentan en su estado imperfecto, nos encontramos con un problema de nomenclatura. De forma general, el procedimiento correcto sería usar el nombre del estado perfecto, sin embargo, las muchas incertidumbres que se dan en la taxonomía del género *Colletotrichum* se extienden también al género *Glomerella*. Por tanto, parece que no tiene mucho sentido usar el nombre de un estado perfecto infrecuente, para unos hongos que son mucho más conocidos por su estado imperfecto.

1.3. Criterios clásicos usados en identificación

Las especies del género *Colletotrichum* han sido tradicionalmente identificadas en función de criterios taxonómicos clásicos como forma y tamaño de conidios y apresorios, formación de ascas, presencia de setae, morfología y color de las colonias y velocidad de crecimiento (Figura 2). Los aislamientos de *Colletotrichum* presentan una gran variabilidad fenotípica, dando lugar a valores intermedios en estos caracteres morfológicos y de cultivo, que hacen difícil su identificación.

La forma y tamaño de los conidios es uno de los datos morfológicos más usados, y aunque éste pueda ser útil como criterio para diferenciar algunas especies, en otras muchas no puede ser determinante, más teniendo en cuenta que en ocasiones las cepas de *Colletotrichum* pueden producir conidios secundarios que proceden de las esporas primarias, y éstos son generalmente más pequeños y variables en su morfología. Por otro lado, la presencia de ascas en el laboratorio es muy variable en las cepas de *Colletotrichum* y muchas cepas pierden la capacidad de producirlas después de varias resiembras, por tanto, éste tampoco puede adoptarse como un criterio válido para la diferenciación.

A las limitaciones de los caracteres taxonómicos clásicos se suman los problemas en la denominación de las especies, debido a la costumbre de designar los nombres de las distintas especies atendiendo casi exclusivamente al tipo de huésped donde fue aislado por primera vez. Este es el caso del nombre *C. fragariae* que fue nombrado así cuando Brooks (1931) lo aisló de plantas del género *Fragaria*, y que posteriormente fue incluido como sinónimo de *C. gloeosporioides* por von Arx (1957a), aunque en 1981 el mismo von Arx vuelve a mantener las dos especies como distintas.

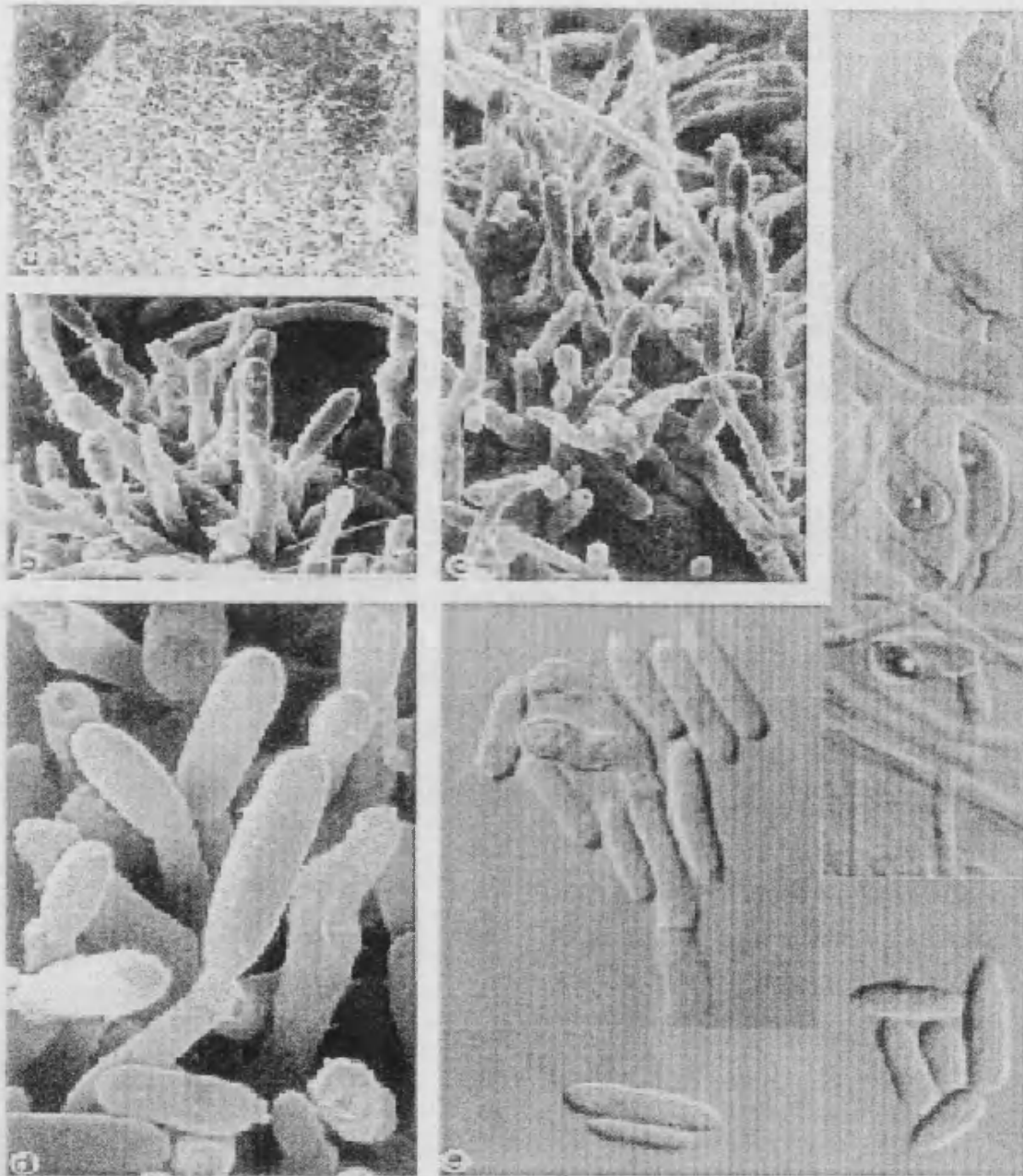


Figura 2. *Colletotrichum gloeosporioides*, CBS 465.83. a. conidioma; b-d. conidióforos; e. apresorios y conidios. a.x 95; b.x 2000; c.x 1800; d.x 5000; e.x 1600.

Es complicado racionalizar el comportamiento de estos hongos en los cultivos de laboratorio, con el que presentan en los substratos naturales de los cuales fueron aislados, especialmente en aquellos taxones como *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. acutatum* y *C. graminicola*, de los que se conoce que infectan un amplio rango de especies, géneros y familias de plantas. Esta situación ha llevado al establecimiento de conceptos de especie muy amplios y a que, en función del criterio considerado como más importante por el investigador, un aislamiento particular pueda ser englobado en una u otra especie (Sutton, 1992).

Aunque los criterios taxonómicos clásicos sigan siendo la base para la separación entre especies, en la actualidad se han incorporado nuevas técnicas que nos permiten disponer de un mayor número de caracteres, que pueden ser utilizadas en la identificación de estos hongos.

1.4. Métodos moleculares usados en identificación

Las técnicas moleculares en general, y sobre todo las basadas en ácidos nucleicos, han aportado nuevas herramientas para resolver los problemas de la taxonomía clásica (Kohn, 1992., Metzemberg, 1991). El gran número de técnicas desarrolladas y el avance experimentado mediante ellas, especialmente sobre aquellos niveles taxonómicos inferiores al de especie, merecen ser descritas en un apartado especial.

1.4.1. Electroforesis de cromosomas

La separación de las moléculas de DNA que superan en tamaño el poro de los geles de agarosa convencionales, se realiza mediante una variante electroforética llamada electroforesis en campo pulsante. Se trata de un electrodo de geometría compleja que permite la aplicación alterna de varios campos eléctricos transversos. De esta manera, las moléculas de DNA se ven forzadas a cambiar continuamente su dirección de migración sin quedar retenidas en el entramado del gel de agarosa. Mediante esta técnica se han podido estudiar los perfiles electroforéticos de moléculas grandes, tales como cromosomas.

Aunque este polimorfismo puede considerarse menos frecuente que las sustituciones nucleotídicas, o las inserciones o deleciones de unos pocos nucleótidos, el análisis de cariotipos se ha revelado como una técnica que puede diferenciar entre

distintas especies y cepas de *Colletotrichum* (Masel *et al.*, 1990, 1993a 1993b, 1993c 1996; Manners, 1992; He *et al.*, 1995).

1.4.2. Polimorfismo en secuencias del DNA

Sobre el genoma de un organismo se pueden producir mutaciones, que si bien no tienen una repercusión fenotípica detectable, pueden dar lugar a la eliminación o creación de algún punto de corte para las muchas endonucleasas de restricción existentes. Estas variaciones pueden detectarse mediante la digestión y posterior hibridación con sondas de DNA. Mediante el empleo de diferentes sondas del DNA ribosomal se ha podido encontrar variabilidad entre las cepas de *C. gloeosporioides* (Braithwaite y Manners, 1990; Lyanage *et al.*, 1992, Sreenivasaprasad *et al.*, 1993; Alahakoon *et al.*, 1994) y correlacionar las cepas de *C. gloeosporioides* con los distintos huéspedes a los que afectaban (Hodson *et al.*, 1993).

El uso de algunas otras sondas de secuencias conservadas y repetidas también ha permitido encontrar variabilidad en *Colletotrichum*. El elemento GcpR1 es una secuencia dispersa en el genoma altamente conservada, y su diferente localización lleva a que por restricción y posterior hibridación se resuelvan especies específicas con patrones de 10 a 25 bandas (Rodríguez y Yoder, 1991). Mediante sondas que se corresponden con secuencias de las regiones variables de los minisatélites humanos se puede distinguir dos tipos de *C. gloeosporioides* que causan antracnosis en *Stylosanthes* spp., un forraje que se cultiva en Australia (Braithwaite *et al.*, 1989). Finalmente, mediante la utilización de una sonda del gen que codifica para una cutinasa se puede distinguir dos poblaciones distintas de *C. gloeosporioides* (Lyanage *et al.*, 1993).

1.4.3. Análisis del DNA mitocondrial

Se ha estudiado el genoma del DNA mitocondrial de distintas especies de *Colletotrichum*, y se ha encontrado variabilidad tanto en tamaño como en composición. El tamaño del genoma mitocondrial oscila entre las 50 Kb de *C. graminicola* a las 300 Kb de *C. lindemuthianum*. Se ha analizado el DNA mitocondrial de distintas especies de *Colletotrichum* y se ha comprobado que los patrones obtenidos con el enzima *Hae* III son muy conservados entre la misma especie, pero muy diferentes entre especies (Freeman *et al.*, 1993; Sreenivasaprasad *et al.*, 1992).

1.4.4. Secuencias del DNA ribosomal

El DNA ribosómico de eucariotas está formado por varios cientos de copias repetidas en tandem, de una unidad de transcripción más varios espacios adyacentes no transcritos (Figura 3). El número de copias puede variar según el organismo, desde una única copia como ocurre en *Tetrahynema*, a varios miles como es el caso de algunos cereales (Hillis y Dixon, 1991). Dentro de la unidad transcripcional se encuentran los genes que codifican para los RNAs 18 S, 5,8 y 28 S más dos espacios transcritos internos que separan estos genes, denominados ITS1 e ITS2. Los espacios adyacentes a la unidad transcripcional contienen dos zonas espaciadoras. La primera de ellas es el espaciador transcrito externo (ETS), que está localizado "upstream" del gen 18 S y contiene señales de parada de la transcripción. La segunda es un espaciador intergénico no transcrito llamado NTS, y se encuentra separando cada una de las copias de la unidad de transcripción.

Una de las razones por las que el rDNA es una molécula especialmente útil en estudios taxonómicos y filogenéticos, es la desigual evolución que presentan las diferentes regiones que lo componen, o dicho de otra forma, la sustitución nucleotídica presenta ritmos diferentes en las distintas regiones. De esta manera, se puede seleccionar entre regiones conservadas o regiones variables dependiendo del interés de cada caso particular.

La elección de la región de estudio es quizás el paso más crítico, si la región es demasiado conservada las secuencias serán muy similares, y si la región elegida es muy variable, las secuencias serán muy distintas, lo que puede causar algunos problemas con el alineamiento. Así, la subunidad pequeña (18 S) es la que presenta una tasa de evolución mas baja y sería útil para el estudio de organismos muy divergentes. La subunidad grande (28 S) muestra mayor variabilidad que la subunidad pequeña. El gen 5,8 S de eucariotas es similar en variabilidad a la correspondiente región de la subunidad grande de procariotas. Por último, las zonas espaciadoras son las más variables y son de utilidad para el estudio de organismos relativamente cercanos. Así, la variación que se encuentra en estas regiones se ha usado para identificar tanto especies como cepas.

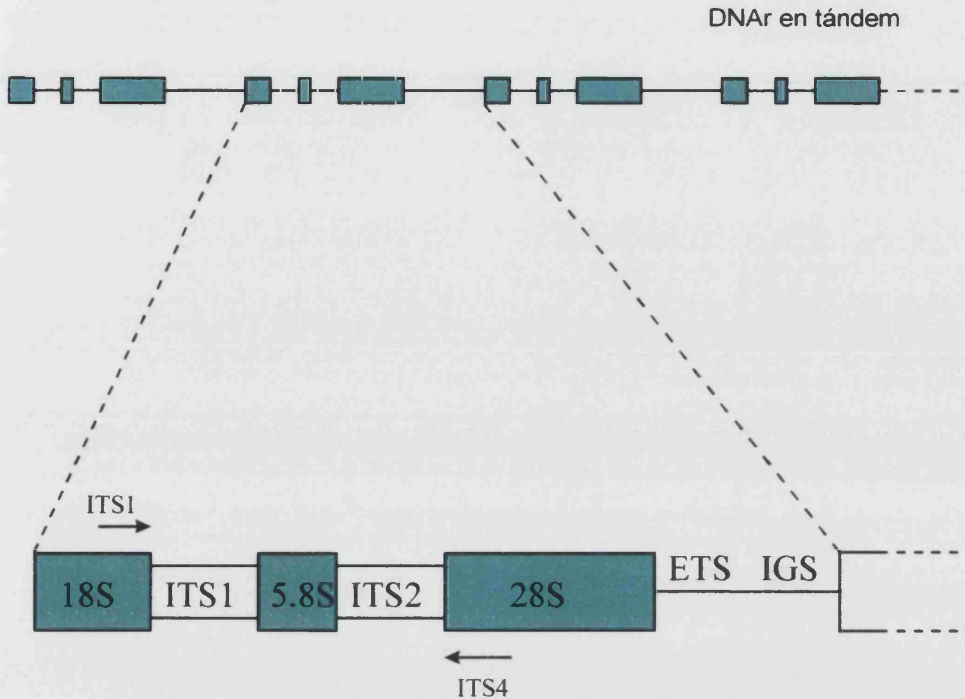


Figura 3. Las unidades de transcripción del rDNA se encuentran típicamente organizadas en tándem. El diagrama muestra las regiones codificantes para los genes de rRNA 18S, 5.8S y 28S, así como los tres tipos de espaciadores: El espaciador transcrito externo (ETS), el espaciador transcrito interno (ITS) y el espaciador intergénico IGS. Del mismo modo se muestran los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, utilizados para amplificar por PCR una de las regiones más estudiadas del rDNA.

Entre las regiones espaciadoras más utilizadas se encuentran las regiones intergénicas ITS1 e ITS2, siendo de gran utilidad para detectar variabilidad en especies de hongos filamentosos que se encuentran próximos en la filogenia (Lee y Taylor, 1992; Carbone y Kohn, 1993; Curren *et al.*, 1994). Además, la amplificación por PCR de estas regiones se facilita no sólo por encontrarse presente en múltiples copias, sino también por la proximidad de las regiones conservadas, a partir de las cuales se pueden diseñar los oligonucleótidos necesarios. De este modo, tomando como base secuencias conservadas de los genes 18 S y 28 S respectivamente, White *et al.*, (1990) desarrollaron una pareja de oligonucleótidos denominados ITS1 e ITS4 para amplificar por PCR estas regiones más el gen que codifica para el RNA 5.8S.

El análisis de secuencias del rDNA ha sido utilizado en varios trabajos para determinar las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Colletotrichum*. El estudio de un amplio grupo de especies que podrían representar al género *Colletotrichum* dió como resultado dos grupos principales (Sherriff *et al.*, 1994). El

primero incluyó las especies *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* y *C. trifoli* y fue distinto al segundo, donde se encontraron el resto de especies. Recientemente, el análisis de las secuencias intergénicas ITS1 e ITS2 de 18 especies distintas permitió la agrupación de estas en 6 grupos filogenéticos (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996a). En el análisis de estas 18 especies se observaron resultados diferentes. Por un lado, se encontraron divergencias intraespecíficas en especies como *C. acutatum*, mientras que por otro, no apareció apenas divergencia entre especies como *C. kahawae*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. Finalmente, también se ha observado variabilidad en las cepas de *C. acutatum* mediante el análisis de secuencias del gen que codifica para el RNA 18S (Jonston y Jones 1997). El análisis de secuencias de estos trabajos muestra que existe gran homología entre las especies de *Colletotrichum*, aunque pueden encontrarse varias regiones donde la divergencia es alta, las cuales pueden utilizarse para la delimitación e identificación de las especies del género. De esta forma, mediante la comparación de las secuencias del RDNA se pueden identificar correctamente las especies de *Colletotrichum*, así como reclasificar aquellas cepas que han sido anteriormente descritas por la taxonomía clásica como especies distintas (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994; Sherriff *et al.*, 1995).

Por otra parte, el análisis de restricción del RDNA ofrece menos información que las secuencias completas, pero puede ser de gran utilidad en la identificación de muchos hongos filamentosos. Se trata de una técnica sencilla, rápida y reproducible que puede servir como un buen método de identificación tal y como se ha demostrado en el caso de levaduras (Guillamon *et al.*, 1998; Belloch *et al.*, 1998; Esteve *et al.*, 1998) y en hongos filamentosos (Edel *et al.*, 1996; Sequerra *et al.*, 1997; Rohel *et al.*, 1997). En *Colletotrichum* se ha empleado para confirmar la identificación de *C. nymphaeae* y *C. nupharicola*, y el análisis de restricción de las regiones ITS junto con la caracterización morfológica ha llevado a la proposición de una nueva especie (Johnson *et al.*, 1997).

1.4.5. Polimorfismos mediante técnicas de PCR

El desarrollo de algunas variantes en la técnica de PCR básica permite obtener un polimorfismo de fragmentos de DNA sin necesidad de utilizar enzimas de restricción. La técnica de RAPDs-PCR (Random Amplified Polymorphism DNA) (Williams, *et al.*, 1990), se caracteriza porque en lugar de utilizar dos oligonucleótidos de secuencia previamente determinada, se emplea solamente uno, el cual se caracteriza por su corta longitud (10 pb) y su secuencia arbitraria. La reacción de RAPDs-PCR también es

característica por la baja temperatura de anillamiento utilizada. Los apareamientos entre el oligonucleótido y el DNA, estarán determinados por la corta y arbitraria secuencia de éste , y favorecidos por la baja temperatura empleada, iniciándose así la amplificación de diversos fragmentos de DNA distribuidos a lo largo de todo el genoma. El resultado es un patrón de productos amplificados de diferente peso molecular que puede ser característico de la especie o bien de las diferentes cepas o aislamientos de una misma especie.

Los RAPDs permiten detectar una gran variabilidad y pueden utilizarse para identificar formas especiales, variedades, razas o biotipos dentro de una misma especie. En *Colletotrichum* han sido empleados para caracterizar la variabilidad de las cepas de *C. graminicola* que producen antracnosis en sorgo (Guthrie *et al.*, 1992), para establecer relaciones entre diferentes patógenos de *C. gloeosporioides* y orígenes geográficos (Mills *et al.*, 1992, Sreenivasaprasad *et al.*, 1992) o para la caracterización de las cepas de *C. gloeosporioides* que infectan aguacate y almendras (Freeman *et al.*, 1996) donde se puede distinguir entre los aislados que infectan a cada uno de los huéspedes.

Una técnica muy parecida es la denominada ap-PCR (Amplified Polimorphism), que se diferencia de la anterior en que el oligonucleótido utilizado es de mayor longitud y de una secuencia no arbitraria. Esta técnica ha sido utilizada para identificar y caracterizar cepas de *Colletotrichum* que afectan a las plantas de fresa, y ha permitido diferenciar entre las especies *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, las cuales resulta difícil de distinguir mediante la metodología clásica (Freeman y Rodriguez., 1995; Freeman y Katan., 1997). La misma técnica también permite diferenciar entre cepas de *C. gloeosporioides* que infectan las plantas de almendro y que tienen distinto origen geográfico (Freeman *et al.*, 1996).

2. Las plantas de fresa

2.1. El cultivo de la fresa

La producción mundial de fresas es aproximadamente de dos millones de toneladas al año. En España dicha cifra alcanza 185.000 t/año, lo que viene a representar cerca de un 10% del total mundial. La producción se centra en su mayor parte en la provincia de Huelva, donde la superficie dedicada a este cultivo ronda las 7.000 Ha. Menor importancia, pese a su mayor tradición, tienen los cultivos de la Comunidad Valenciana y otros dispersos por el país.

Los climas cálidos de algunas zonas de España, como por ejemplo Andalucía y las regiones mediterráneas, son la clave para el desarrollo del cultivo de la fresa en nuestro país. Para el sistema de plantación otoñal, apto en zonas cálidas con un invierno templado, se recomienda que la plantación nodriza se encuentre situada en lugares altos, con el fin primordial que en la época en que se produce el arrancado, los estolones hayan estado durante un cierto tiempo sometidos a bajas temperaturas. De esta forma, los plantones procedentes de viveros primarios se desarrollan durante el verano en los viveros que se encuentran en la comunidad de Castilla- León y una vez terminado éste, durante el mes de Septiembre u Octubre, se arrancan las plántulas, se almacenan en bolsas a 10°C y se transportan hasta la provincia de Huelva, donde son plantadas (Figura 4). La alternancia en el cultivo de dos regiones con climas diferentes permite a España poder introducir en el mercado europeo fresas en el mes de Enero, casi medio año de antelación a las fresas que se producen en otros países del centro y norte de Europa.

A pesar de ser un cultivo puntero, encarado a la producción temprana para la exportación y pese a contar en su haber con técnicas agrícolas muy avanzadas como producción de plantas de vivero, plásticos, sistemas de riego, variedades y tratamientos fitosanitarios entre otros, se sigue dependiendo de la tecnología norteamericana de donde se importan los cultivares procedentes de los viveros originales o primarios.

Una gran parte del total de las enfermedades que afectan a los fresales son producidas por hongos. La antracnosis es una importante micosis de los fresales que está causada por cepas de *Colletotrichum* que pertenecen a tres especies distintas: *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La identificación de estos hongos es complicada debido a la ambigüedad de los criterios utilizados para separar dichas especies. En un estudio realizado por el laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla, durante el periodo 1989-



Figura 4. Cultivos de fresa en la finca El Cebollar, Huelva.

1995, de muestras procedentes de plantaciones para producción de frutos, *Colletotrichum sp.* aparece como netamente dominante con respecto a hongos como *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca* y *Micosphaerella* (Tello *et al.*, 1996). Este dato no quiere decir que *Colletotrichum* se presente en más ocasiones que los otros hongos, sino que éstos últimos no son motivo de consulta dado su fácil reconocimiento por técnicos y agricultores, en cambio *Colletotrichum* es algo poco conocido que requiere una identificación por expertos.

Las importantes pérdidas económicas que se pueden derivar de la antracnosis, la dificultad en la identificación del agente causal y el hecho de ser una enfermedad recogida por la Unión Europea como indeseable para los estados miembros, son motivos para su estudio.

2.2. Antracnosis

El término “antracnosis” (del griego “anthrax”, carbón y “nosos”, enfermedad) fue empleado por primera vez por Fabre y Dunal en 1852 para describir una enfermedad de la vid que llevaba consigo un ennegrecimiento de los tejidos.

Como características generales de la enfermedad se puede indicar la producción de pequeñas manchas de mayor o menor tamaño y de colores oscuros, su progresión por reinvasiones continuadas más que por extensión superficial de los focos, el agua es necesaria para la diseminación y el ataque del patógeno, la reacción del huésped a la antracnosis provoca una reacción necrótica típica y finalmente, las antracnosis suelen permanecer durante bastante tiempo en un estado poco activo, dispersándose ante la senescencia del huésped.

En la actualidad existe la tendencia a tener menos en cuenta la sintomatología y más el agente causal, designando como antracnosis las enfermedades causadas por hongos melanconiales pertenecientes principalmente al género *Colletotrichum*, que producen lesiones necróticas de bordes bien definidos sobre tallo, hojas o frutos y que, excepto en los casos de ataque a plántulas, suelen ir asociados a la senescencia del huésped. Las antracnosis que produce el género *Colletotrichum* o *Glomerella* son bastante comunes y destructivas sobre numerosas plantas de cultivo y de ornato, y su distribución geográfica es en la mayoría de los casos bastante amplia, siendo especialmente severas las antracnosis de los trópicos y subtrópicos. El género *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) produce la antracnosis de la azalá, del algodón (*G. gossypii*), de la judía (*G. lindemuthianum*), de la sandía (*C. lagenarium*), del tomate (*C. phomoides*), del pimiento (*G. cingulata*), la mancha de la cebolla (*C. circinans*), la podredumbre amarga de la manzana, del arándano y la podredumbre madura de la vid.

Un huésped particularmente susceptible de *Colletotrichum* es la planta de fresa (*Fragaria*), donde la infección por algunas de sus especies produce marchitamiento, podredumbre y la ya conocida antracnosis (Figura 4). Se puede decir que la antracnosis en las plantas de fresa tiene una distribución mundial, presentándose en todos aquellos lugares donde se cultiva la fresa (Jones *et al.*, 1977; Mena *et al.*, 1974; Carvalho y Cardoso, 1964; Martínez y del Rio Mora, 1975; Singh., 1974).

La primera referencia acerca de una antracnosis en plantas de fresa es la de Kicks en 1867, quien describe *Gloeosporium fragariae* como un hongo que produce manchas



Figura 5. Fruto de fresa infectado con *Colletotrichum acutatum*, donde se pueden observar los síntomas típicos de la antracnosis.

rojas, aunque posteriormente se nombró a este organismo como *Marssonina fragariae*. Más tarde, Brooks, (1931) describe una antracnosis del fresón llamándole al organismo causal *Colletotrichum fragariae*, y considera dicha antracnosis como una enfermedad que se encuentra principalmente en estolones de las plantas de fresa, aunque ocasionalmente puede atacar a peciolos de plantas jóvenes. Posteriormente, el mismo autor señaló que este patógeno también producía podredumbre del rizoma y marchitamiento de plantas jóvenes en periodos de alta temperatura y humedad (Brooks, 1935), y ésto fue confirmado por Horn y Carver (1962y 1963). Los frutos maduros también pueden ser afectados por el mismo patógeno (Howard, 1972). Anteriormente se había relacionado una podredumbre similar con un patógeno distinto, nombrado por Simmonds (1965), como *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Más tarde, Howard y Albrechts, (1983,1984) indican que aunque la mayoría de los aislamientos obtenidos de frutos con antracnosis se identifican como *C. fragariae*, un pequeño porcentaje son identificados como *Colletotrichum gloeosporioides*, y las lesiones que producen ambos patógenos no se pueden diferenciar. En España se describe un aislamiento de la provincia de Málaga en 1980 y en la identificación se concluye que se trata de una cepa

de *C. gloeosporioides* (García Jiménez *et al.*, 1983). Las últimas investigaciones demuestran que *C. acutatum* también puede afectar a otras partes de las plantas, como son la corona y el rizoma (Smith y Black, 1990; Howard *et al.*, 1992).

La infección comienza cuando las esporas de *Colletotrichum* entran en contacto con la planta, momento en el que se forman los tubos de germinación, que generalmente terminan en apresorios (estructura especializada que le sirve como órgano de penetración) y mediante los cuales se introducen en el huésped. La penetración a través de la cutícula se produce bien mediante la secreción de enzimas (cutinasas), que la disuelven (Dickman *et al.*, 1982), bien mediante fuerzas mecánicas de tipo osmótico (Mercer *et al.*, 1971) o por la combinación de ambas (Bailey y Jeger, 1992). La penetración de la cutícula es seguida por un crecimiento subcuticular que, como se ha demostrado en algunas especies de *Colletotrichum* que infectan frutos tropicales y subtropicales, es interrumpido dando lugar a infecciones latentes (Prusky, y Plumbley, 1992). Esta interrupción ha sido atribuida a cambios fisiológicos, que incluyen la síntesis y degradación de sustancias antifúngicas en el tejido, en respuesta al patógeno. En otros *Colletotrichum spp.* del mismo grupo, las infecciones latentes están asociadas con estados quiescentes del apresorio tras su formación (Prusky, y Plumbley, 1992).

La diseminación de la enfermedad puede verse favorecida por la dispersión de las esporas por el agua de lluvia o riego (Yang *et al.*, 1990), y también por el viento (Mass, 1984). También se ha descrito que *Colletotrichum* puede persistir en plantas infectadas, desechos de plantas y plantas parásitas como hibernante. Horn y Carver, (1968) demuestran que *C. fragariae* es capaz de pasar el invierno en la corona de la planta de fresa, y de ésta forma puede servir como fuente de inóculo para los siguientes cultivos. Este es el motivo por el que los fresones de segundo año de cultivo son mucho más susceptibles a la antracnosis que los del primero. Por último, debido a que el hongo puede parasitar el rizoma de la planta (Howard *et al.*, 1992), las plantas de vivero pueden infectarse y ser portadoras asintomáticas, manifestándose posteriormente la enfermedad.

Las medidas de control incluyen prácticas culturales, desinfecciones de suelo, el empleo de cultivares resistentes, el uso de fungicidas, y la vigilancia de la sanidad del material procedente de viveros. Como prácticas culturales se ha recomendado evitar las plantaciones densas y el riego por aspersión. Entre los agentes desinfectantes más usados está el bromuro de metilo, con muy buenos resultados como fumigante de suelo. Sin embargo, el bromuro de metilo tiene una situación delicada en cuanto a su uso, su

capacidad para deteriorar la capa de ozono, ha motivado la creación de un comité de las Naciones Unidas para buscar alternativas ante una próxima prohibición del gas letal para usos agrícolas, prohibición que se podría hacer efectiva a partir del año 2010. El uso de fungicidas también ha sido una práctica habitualmente empleada. El benomilo se recomendó para el control de la antracnosis (Howard, 1972), aunque después dejó de hacerse debido al desarrollo de cepas resistentes. También se han usado otros fungicidas como el captol (Bryan y Milloland, 1980) y mezclas de diclofluanid y captanbenomilo, ésta última con cierto éxito (Cheah y Soteros, 1984). A pesar de las innegables ventajas de los modernos fungicidas, es patente su incapacidad para proporcionar un método de lucha duradero. En la actualidad, debido a que no existe ningún fungicida que ofrezca resultados aceptables y también debido al impacto medioambiental que ocasiona el uso masivo de éstos, los planteamientos de unas medidas de control para este tipo de enfermedad, pasan necesariamente por una estricta sanidad del material vegetal procedente de los viveros. En este sentido, las tendencias actuales en los métodos de control se dirigen hacia la caracterización y mejor conocimiento de los agentes causales, y el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y seguros, que nos permitan poder detectar el hongo patógeno y erradicar las plantas infectadas.

2.3. Especies de *Colletotrichum* en plantas de fresa

Actualmente, se considera que las cepas de *Colletotrichum* con actividad patógena sobre la planta de fresa pertenecen a las especies *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*.

Colletotrichum fragariae es un patógeno específico de plantas de fresa y no se conocen aislamientos en ningún otro huésped. Se ha identificado como el agente responsable de la mayoría de los casos de antracnosis ocurridos en USA hasta 1983, fecha en la que una epidemia de antracnosis se relacionó con *C. acutatum* (Smith y Black, 1986). Las cepas de *C. fragariae* no presentan diferencias morfológicas y culturales claras, que permitan distinguirlas del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides* (anamorfo de *Glomerella cingulata*). Algunos autores piensan que las cepas conocidas como *C. fragariae* no pueden considerarse como una especie, y son en realidad, una variedad especialmente virulenta de *C. gloeosporioides*. Esta dificultad para distinguir *C. fragariae* del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*, ha llevado a la situación en la que el nombre de *C. fragariae* es asignado a un patógeno

que causa antracnosis en plantas de fresa en USA, y del cual no puede aislarse el estado sexual o perfecto (Howard y Albregts, 1984).

Colletotrichum gloeosporioides es la fase asexual del teleomorfo *Glomerella cingulata*, y se trata de un grupo heterogéneo de hongos patógenos que pueden atacar a una gran variedad de huéspedes, habiéndose aislado en más de 1000 especies diferentes de plantas. La delimitación de la especie no está clara y el nombre de *C. gloeosporioides* se aplica para la mayoría de las especies de *Colletotrichum* que presentan conidios cilíndricos (Sutton, 1992). La diferenciación entre *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* se ha hecho en base a la presencia del teleomorfo *Glomerella* en el primero, y la ausencia en el segundo. Por otro lado, también se han diferenciado los dos taxones atendiendo a la morfología de los conidios (Gunnell y Gubler, 1992). Ni uno ni otro parecen criterios muy fiables y la dificultad para diferenciar los dos tipos de cepas es un hecho evidente.

Colletotrichum acutatum fue descrito en plantas de fresa en Australia por Simmonds (1965, 1968) y su importancia como patógeno fue rápidamente reconocida, siendo posteriormente identificado en un gran número de plantas. Se distingue fácilmente de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* mediante características morfológicas y culturales, principalmente en base a la morfología de los conidios (Dyko y Mordue, 1979) y el crecimiento a 28 °C (Smith y Black, 1990). Durante las décadas de 1980 y 1990, muchos patólogos Norteamericanos reconocieron el incremento de la importancia de *C. acutatum* como agente causal de la antracnosis en plantas de fresa (Eastburn y Gubler, 1990; Wilson *et al.*, 1990). No está claro si el cambio de concederle más importancia a *C. acutatum* que a *C. fragariae* es el resultado de una reciente introducción del patógeno, o por el contrario, *C. acutatum* estaba ya presente, pero sin reconocer. En Europa, la antracnosis de las plantas de fresa no se ha considerado como una enfermedad significativa hasta hace poco, pero *C. acutatum* ha sido implicado como el agente causal en la mayoría de los casos (Cook y Popple, 1984; Harris *et al.*, 1992). En la actualidad se piensa que *C. acutatum* es un patógeno de amplio espectro que se encuentra ampliamente distribuido, conociéndose la existencia de algunas cepas en Australia y Nueva Zelanda que también pueden ser patógenas en plantas de fresa, y por tanto pueden presentar una amenaza a la producción de fresas en Europa mediante su importación.

La delimitación de las especies de *Colletotrichum* responsables de la antracnosis en las plantas de fresa es incierta, como lo es la de la mayoría de las especies del género y es necesaria una correcta clasificación de éste grupo de hongos.

2.4. Diagnóstico de *Colletotrichum* en plantas de fresa

Además de la importancia en el esclarecimiento y delimitación de las especies de *Colletotrichum* patógenas de plantas de fresa, la detección y el correcto diagnóstico de estos patógenos es en la actualidad un requisito indispensable, tanto para el control de la antracnosis en los cultivos de fresa, como para la vigilancia de la sanidad del material vegetal que se transporta desde unas zonas a otras. La prevención de la antracnosis, detectándola en sus primeros estados, la detección de infecciones latentes en el campo, infecciones post-cosecha durante el transporte de los frutos y la certificación de material vegetal libre de patógenos, son asuntos de verdadera importancia que pueden verse facilitados con la rápida detección de los hongos en el material vegetal. Estas razones justifican la necesidad de poner a punto nuevos métodos de identificación y detección, que nos permitan una gran rapidez, mayor sensibilidad y más fiabilidad en el diagnóstico.

Un asunto particularmente importante es la posible introducción de estos patógenos desde zonas endémicas, hacia otras que no lo son. Esta situación obliga a disponer de unas medidas adecuadas para prevenir su entrada a través del material vegetal infectado, y así lo entienden las autoridades responsables en la Unión Europea. De esta forma, una de las especies anteriormente descritas, *C. acutatum* es reconocida por la UE (EC Diciembre 77/93) como una de las especies de hongos fitopatógenos objeto de cuarentena y la regulación impuesta por la EC obliga al control de cualquier transporte de material vegetal.

El material vegetal transportado consiste principalmente en plantones que proceden de viveros primarios, normalmente asintomáticos, y donde la antracnosis no puede ser diagnosticada de forma visual. Se ha comprobado que *C. acutatum* puede afectar al rizoma de la planta (Howard *et al.*, 1992), lo que lleva consigo el peligro de que las plantas de vivero puedan infectarse y ser portadoras asintomáticas, manifestándose posteriormente la enfermedad en el terreno de asiento. Las plantas pueden albergar al hongo en estado latente en la base de los peciolo y para la detección de éste se debe realizar un aislamiento previo, para el cual es necesario sumergir el material vegetal en una solución de "paraquat", una sustancia herbicida que tiene un efecto estimulante de la esporulación. Esta técnica de aislamiento del hongo puede tener interés en determinadas ocasiones, pero no tanto en cuestiones relacionadas con los periodos de cuarentena, donde el tiempo es un factor limitante. El aislamiento del patógeno con esta técnica lleva entre 1 y 2 semanas, y durante este tiempo el material vegetal debe permanecer retenido en cámaras, donde se deteriora y

pierde su vigor, con las graves consecuencias que se derivan de esta situación para el comercio.

Con el objeto de acortar este periodo de cuarentena se han venido desarrollando distintos métodos de diagnóstico más sensibles y más rápidos. Se han puesto a punto métodos para la detección de *C. acutatum* basados en anticuerpos monoclonales (Barker *et al.*, 1994, Cook *et al.*, 1995., Barker, 1996., Hughes *et al.*, 1997). Éstos, mejoran la sensibilidad de los métodos tradicionales, pero sólo son efectivos cuando las esporas del hongo ya se han producido, por lo que difícilmente se puede usar para la detección de infecciones latentes, donde el hongo se encuentra en estado miceliar. Además, el tiempo requerido para realizar la detección no es menor de una semana. También se ha desarrollado un método de detección de *C. acutatum* basado en PCR (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996b), aunque éste solamente fue probado en un grupo muy reducido de cepas y ha dado lugar a reacciones cruzadas con otras especies de *Colletotrichum* (Buddie *et al.*, 1998b).

La detección de *C. fragariae* es así mismo importante, debido principalmente a que es un patógeno exclusivo de plantas de fresa y al gran número de casos de antracnosis que se han atribuido a este patógeno en Norte América. En Europa no se han encontrado casos referidos a este patógeno, y esta situación obliga a prestar una especial atención en la prevención de la introducción de cepas de *C. fragariae* desde zonas endémicas como pueda ser Estados Unidos. La falta de métodos de identificación y detección de este patógeno, debido fundamentalmente a la dificultad para diferenciarlo del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*, es un motivo más para plantearse el desarrollo de métodos de identificación y diagnóstico de *C. fragariae*.

Del mismo modo, la importancia del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*, debida al gran número de plantas en las que se puede encontrar, ha llevado a que desde hace tiempo se fijase la atención en él, habiéndose desarrollado métodos para su detección (Mills *et al.*, 1992).

Objetivos

La necesidad de disponer de unas medidas adecuadas para controlar y prevenir la entrada de estos patógenos a lo largo del territorio de la Unión Europea exige el desarrollo de métodos rápidos de diagnóstico que nos permitan detectar y diagnosticar las cepas de *Colletotrichum* en la planta de fresa. De este modo, se facilitaría el transporte de material vegetal a lo largo de la UE bajo las normas de cuarentena, se erradicaría el material vegetal infectado y se dispondrían de las garantías necesarias para impedir la introducción de nuevos patógenos procedentes de fuera de la UE. Para poder desarrollar estos métodos de detección y diagnóstico es necesario previamente realizar un profundo estudio de caracterización de la población de cepas de *Colletotrichum* patógenas en plantas de fresa, mediante el cual se puedan llegar a establecer delimitaciones a las diferentes categorías taxonómicas.

Con estos antecedentes nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1. Caracterización molecular de una colección de cepas de *Colletotrichum* patógenas de plantas de fresa.**
 - 1.1. Análisis de restricción del ADN ribosomal.
 - 1.2. Caracterización intraespecífica de las cepas mediante el empleo de RAPD-PCR.
- 2. Análisis filogenético mediante la secuenciación de la región que comprende las zonas intergénicas ITS1 e ITS2 y el gen que codifica para el ARN 5,8 S.**
- 3. Desarrollo de métodos de identificación rápidos, sensibles y altamente específicos que nos permitan aplicarlos en la detección y diagnóstico de este grupo de patógenos en el material vegetal.**
 - 2.1. Desarrollo de un método de identificación y detección por PCR del patógeno de cuarentena *C. acutatum*.
 - 2.2. Desarrollo de un método de identificación y detección por PCR del patógeno *C. fragariae*.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos utilizados

1.1. Hongos filamentosos

A lo largo del presente trabajo se han utilizado 74 cepas pertenecientes a cuatro especies distintas: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Glomerella cingulata*. y *Glomerella miyabeana* Todas estas cepas fueron aisladas de plantas de fresa con síntomas de antracnosis. También se han utilizado 2 cepas de la especie *Colletotrichum coccodes* aisladas en plantas de fresa, y 4 cepas de *Colletotrichum* no aisladas en plantas de fresa, pertenecientes a las especies *C. kahawae*, *C. crassipes*, *C. falcatum* y *C. gloeosporioides*. Estas 6 últimas cepas han sido utilizadas como controles en éste trabajo. Además, se han utilizado 7 cepas representantes de otros géneros de hongos distintos de *Colletotrichum*, pero también patógenos de plantas de fresa, con la idea de valorar la especificidad de los métodos de identificación y diagnóstico por PCR.

Todas las cepas de *Colletotrichum* usadas en este trabajo fueron proporcionadas por el International Mycological Institute (IMI), Egham, UK. En la tabla 1 se detalla el origen geográfico del aislamiento, así como la designación de estas cepas tanto en el International Mycological Institute (IMI) como en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Para cada una de las cepas se obtuvieron tres cultivos monospóricos A, B y C, con la intención de confirmar que todos los aislados recibidos crecían adecuadamente y sin contaminaciones, así como para detectar posibles variaciones fenotípicas entre la misma cepa.

Las cepas de los hongos pertenecientes a géneros diferentes a *Colletotrichum* han sido proporcionadas por el Ministry of Agriculture Fisheries and Food Central Science Laboratory (MAFF). En la tabla 2 se detalla la designación de estas cepas.

1.2. Bacterias

La cepa *Escherichia coli* DH5 α (supE44, Δ lacU169 [ϕ 80 lacZ Δ M15, hsdR17, recA1, andA1, gyrA96, thi-1]) se empleó en los experimentos de transformación dada la alta eficiencia de transformación de sus células competentes (Hanahan, 1983). Posee una delección del gen *LacZ* susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación portadores de dicho gen. Esta complementación se pone de manifiesto mediante el color azul en la colonia, originado por la acción de la β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*) sobre el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-

indoil- β -D-galactósido), que permite la sección por color de colonias portadoras de plásmidos con capacidad de α - complementación de dicho gen. El crecimiento de colonias con falta de color indica la presencia en éstas, de plásmidos recombinantes que han incorporado fragmentos de DNA, interrumpiendo el gen *lacZ*.

TABLA 1. Referencia de cepas de *Colletotrichum* y origen geográfico.

Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	Origen aislamiento
<i>Colletotrichum sp.</i>	21013	301119	Kenia	<i>Fragaria vesca</i>
	21027	364856	España	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
<i>C. acutatum</i>	21000	345026	España	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21001	345028	Colombia	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21002	345035	Francia	<i>Fragaria vesca</i>
	21009	345033	Australia	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21011	360086	Japón	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21012	299103	UK?	<i>Fragaria vesca</i>
	21014	311744	USA ?	<i>Fragaria sp.</i> , corona
	21018	324993	USA	<i>Fragaria sp.</i>
	21019	324994	USA	<i>Fragaria sp.</i>
	21020	345027	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21021	345031	Italia	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21022	345032	Italia	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21023	345577	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21028	367466	Holanda	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21029	367467	UK	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21030	367468	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21032	324992	USA	<i>Fragaria sp.</i>
	21033	324995	USA	<i>Fragaria sp.</i>
	21034	345029	Costa Rica	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21035	345034	Australia	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21037	345574	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21038	345575	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21039	345578	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21040	345583	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21043	346326	Australia	<i>Fragaria sp.</i> , fruto
	21055	348487	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21056	348489	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21057	348493	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
21058	348496	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona	
21059	348500	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona	
21060	348502	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona	
21061	351247	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>	
21062	351255	UK	<i>Fragaria x ananassa</i>	
21063	351253	UK	<i>Fragaria x ananassa</i>	
21065	351587	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>	
21072	348494	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona	
21075	345030	Costa Rica	<i>Fragaria x ananassa</i>	
21076	345053	Francia, Burdeos	<i>Fragaria x ananassa</i>	
21077	345576	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto	
21078	348499	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona	
21079	348501	Francia	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona	
21080	351254	Costa Rica	<i>Fragaria x ananassa</i>	

TABLA 1. Continuación.

Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	Origen aislamiento
<i>C. coccodes</i>	21008	363581	UK ?	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21067	363582	UK ?	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
<i>C. crassipes</i>	21069	309371	Holanda	<i>Oncidium</i> sp.
<i>C. gloeosporioides</i>	21073	356878	Italia	<i>Citrus</i> sp., hoja
<i>C. kahawae</i>	21068	301220	Kenia	<i>Coffea</i> sp., fruto
<i>C. falcatum</i>	21070	347765	Bangladesh	<i>Saccharum</i> sp.
<i>C. fragariae</i>	21003	345047	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21010	345049	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21025	348163	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21026	348168	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21036	345050	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21042	346325		<i>Fragaria</i> sp.
	21044	348152	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , peciolo
	21045	348153	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , peciolo
	21046	348159	USA Lousiana	<i>Fragaria</i> sp.
	21047	348160	USA Lousiana	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21048	348167	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21049	368472	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21050	348174	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21051	348175	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21052	348177	USA Missisipi	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21053	348178	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
	21054	348182	USA	<i>Fragaria x ananassa</i> , corona
<i>G. cingulata</i>	21004	345051	Canada	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21005	345052	USA	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21007	360928	Suiza	<i>Fragaria x ananassa</i> ,fruto
	21015	324984	USA	<i>Fragaria</i> sp.
	21016	324985	USA	<i>Fragaria</i> sp.
	21031	324989	USA	<i>Fragaria</i> sp.
	21064	351257	Canada	<i>Fragaria x ananassa</i>
	21017	324988	USA	<i>Fragaria</i> sp.
21074	324983	USA	<i>Fragaria</i> sp.	
<i>G. miyabeana</i>	21006	345581	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21024	345580	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , fruto
	21006	345585	Nueva Zelanda	<i>Fragaria x ananassa</i> , peciolo

Tabla 2. Referencia de hongos no *Colletotrichum* patógenos de plantas de fresa.

Especie	CECT	Designación
<i>Alternaria alternata</i>	21090	cc 482
<i>Botrytis cinerea</i>	21089	cc 1106
<i>Gliocladium roseum</i>	21087	cc 845
<i>Lambertella comimanic</i>	21088	cc 677
<i>Phytophthora captorum</i>	21091	ex 814/415
<i>Phytophthora fragariae</i> var <i>fragariae</i>	21093	cc 931
<i>Zythia fragariae</i>	21092	cc 669

2. Material vegetal

Para la detección del DNA fúngico en el material vegetal se utilizaron plántulas de fresa asintomáticas de las variedades Pájaro, Chandler y Camarosa, las cuales fueron inoculadas (1 millón de esporas/ml) con cepas de *Colletotrichum* representantes de los grupos moleculares establecidos (Buddie *et al.*, 1998a)

3. Plásmidos

El plásmido pBluescript II SK+ (Stratagene, USA) se utilizó como vector de clonación para la cepa *E. coli* DH5 α , el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección (Figura 6)

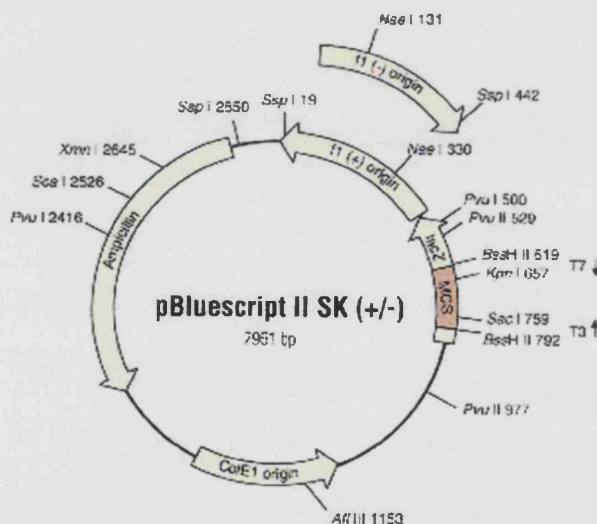


Figura 6. Los plásmidos pBlueScript (I/II) KS/SK (+/-) son vectores derivados de pUC19 que poseen un tamaño de 2958 pb (I) y 2961 pb (II), e incluyen un fragmento del gen *lacZ* que permite complementar la mutación existente en este gen en cepas como *E. coli* DH5 α . La existencia de un sitio de clonación múltiple con sitios de restricción para 21 enzimas facilita la clonación de insertos, manifestada por la interrupción de la actividad β -galactosidasa. La designación KS indica que el "polylinquer" está orientado de forma que la transcripción del gen *lacZ* se efectúa desde el corte *Kpn* I al *Sac* I, mientras que la designación SK indica la orientación opuesta. La presencia del gen *ampR* confiere resistencia al antibiótico ampicilina permitiendo seleccionar aquellas cepas que hayan incorporado el vector.

4. Medios de cultivo

LB. Medio completo de Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L
pH 7 (ajustado con Na OH)	

Cuando se requirió usar el medio de cultivo sólido, se le agregó agar al 2 %.

PDA. (Agar patata glucosa)

Infusión de patatas	300 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
pH 7 (ajustado con Na OH)	

Medio Líquido de *Colletotrichum*.

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O (sol 1%)	1 ml
Cu SO ₄ 5H ₂ O (sol 5%)	1ml
Agua destilada	1 L
pH 7 (ajustado con Na OH).	

Todos los medios empleados se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

5. Técnicas de cultivo y mantenimiento de microorganismos

5.1. Hongos filamentosos

5.1.1. Condiciones de Crecimiento

Para conseguir una buena esporulación, las cepas se crecieron en medio sólido PDA durante varios días a 26°C. Una suspensión de esporas se incubó en medio líquido con agitación orbital a 200 rpm durante 20-24 horas a 26°C con el objetivo de conseguir un micelio joven para la extracción de DNA.

5.1.2. Mantenimiento y conservación de las cepas

El mantenimiento y la conservación se lleva a cabo de diferentes formas:

- a) Para el trabajo diario en el laboratorio, las cepas se mantienen por resiembras periódicas en tubos de agar patata glucosa. Los cultivos bien esporulados se almacenan a 4°C por periodos inferiores a 6 meses, al cabo de los cuales se obtienen nuevas resiembras.
- b) Para la conservación a largo plazo, se prepararon suspensiones en agua estéril de pequeños trozos del cultivo del hongo en agar patata glucosa. Estas suspensiones se almacenaron a 18° C y mantuvieron su viabilidad y estabilidad genética durante más de un año. Del mismo modo se han conservado suspensiones similares y suspensiones de esporas en glicerol al 10 % y almacenadas a -80 °C. De esta manera la viabilidad y estabilidad se prolonga más allá de los 3 ó 4 años.
- c) Para la conservación indefinida de las cepas se liofilizaron suspensiones de esporas en leche descremada al 10 %.

5.2. Bacterias

E.coli DH5 α se creció a 37 °C en medio LB. Los cultivos en medio líquido se incubaron con agitación orbital a 200 rpm. Las cepas se conservaron a -80° C con glicerol a una concentración final del 16% (v/v).

6. Soluciones y tampones

Acetato potásico

A 60 ml de AcK 5 M se añaden 11.5 ml de ácido acético glacial y se ajusta el pH a 4,8. (Sambrook *et al.*, 1989)

Cloroformo-alcohol isoamílico (CIA):

Se utiliza a unas proporciones de v/v 24: 1

Fenol -cloroformo-isoamílico:

Se utiliza a unas proporciones de v/v 25:24:1

Solución de lisis para el aislamiento de DNA de hongos

Tris-HCl pH 7.2	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	3%
2-mercaptoetanol	1%

GET

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH 8	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

NS:NaOH 0.2M; SDS 1% (p/v)

Tampón TE:

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

7. Productos

Se utilizaron sales minerales de Panreac (España) y componentes de medios de cultivo de Pronadisa (España) y Oxoid (Reino Unido). Otros productos se adquirieron de Sigma (USA), Stratagene, Merck y Boehringer Mannheim (Alemania).

8. Oligonucleótidos sintéticos

Los nombres y secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados a lo largo de este trabajo aparecen reflejados en la tabla 3.

TABLA 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados durante este trabajo. (R= A+G)

*oligonucleótidos empleados en secuenciación., ♣ oligonucleótidos empleados en RAPDs., ♦ oligonucleótidos empleados en diagnóstico.

CÓDIGO	SECUENCIA
ITS1*	d5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4*	d5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC3'
T3*	d5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'
T7*	d5'-AATACGACTCACTATAG-3'
OPA2♣	d5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA10♣	d5'-GTGATCGCAG-3'
OPA11♣	d5'-CAATCGCCGT-3'
OPA18♣	d5'-AGGTGACCGT-3'
OPA20♣	d5'-GTTGCGATCC-3'
COL1♦	d5'-AACCCCTTTGTGAACRTACCTA-3'
COL2♦	d5'-TTACTACGCAAAGGAGGCT-3'
Acut I1♦	d5'-CCGGAGGAAACCAAACCTCTATTTAC-3'
FRA1♦	d5'-TTGATCGCAGGATTAGAAC-3'
FRA2♦	d5'-TCGCAGCTACAGTAGTCGTC-3'

9. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores se realizó con el programa de análisis OLIGO (National Biosciences, Plymouth, Minn) y se analizaron las siguientes características: El potencial para formar estructuras secundarias y dímeros, el contenido en C+G y la Tm de los primers. Además se hizo una búsqueda de secuencias conocidas homólogas en las bases de datos con el BLAST algorithm.

10. Aislamiento de DNA

10.1. Hongos filamentosos

La extracción de ácidos nucleicos de *Colletotrichum* se ha realizado siguiendo el protocolo de Rodríguez (1993), con ligeras modificaciones:

1. Se cultiva cada una de las cepas en agar patata glucosa durante 6-8 días hasta obtener una buena esporulación de los cultivos.
2. Se recogen las esporas y se pasan a través de un filtro de nylon de 30 μm de diámetro de poro para eliminar los restos de micelio arrastrados.
3. Se inoculan del orden de 10^5 - 10^6 conidios en 100 ml de medio líquido de *Colletotrichum* y se incuban en agitación orbital (150 rpm) a 28°C durante 20-24 horas.
4. El micelio se recoge sobre un filtro de nylon (200 μm de diámetro de poro) eliminando el líquido sobrante con la ayuda de papeles de filtro y se liofiliza.
5. El micelio liofilizado (60 mg) se tritura, obteniendo un rendimiento de la extracción que depende del grado de fragmentación conseguido.
6. Se añaden 500 μl de solución de lisis y se incuba en un baño a 65° C durante una hora.
7. Se añade igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (500 μl) y se centrifuga durante 15 min a 12000 rpm.
8. A la fase acuosa recogida se le añade AcK y NaCl a una concentración final de 2M y 1 M respectivamente, se deja en hielo durante 30 min y se centrifuga 10 min a 10000 rpm para precipitar restos de proteínas.
9. Se recoge el sobrenadante y se precipita con 0.54 volúmenes de isopropanol.
10. Si el rendimiento en DNA es alto, éste precipita en forma de ovillo y se puede extraer con una varilla de vidrio.
11. El ovillo recogido se resuspende en un nuevo tubo Eppendorf con 500 μl de agua, al que se le añade 3 μl de RNAasa y se deja 30 min a 37°C.
12. Se trata con CIA y se precipita con 2-3 volúmenes de etanol frío.
13. El DNA se lava con etanol 70% y se vuelve a centrifugar, después se elimina el etanol secando al vacío y se resuspende en 100 μl de tampón TE.

10.2. Bacterias

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se ha empleado el método descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

10.3. Plantas de fresa

La extracción de ácidos nucleicos de las plantas de fresa se realizó a partir de 1 gr de material vegetal asintomático preferentemente de la zona de la corona de la planta, y se llevó a cabo con el kit de extracción "Nucleon Phytopure" (Amersham) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor.

11. Digestiones con enzimas.

Todas las digestiones de muestras de DNA con enzimas de restricción (Boehringer Mannheim) se realizaron empleando los tampones y condiciones sugeridas por el proveedor.

12. Electroforesis del DNA

Todas las electroforesis se realizaron siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.*, (1989). Dependiendo de los casos se emplearon distintos marcadores de tamaños moleculares y distintos porcentajes de agarosa. Los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 100 µg/ml durante 15 min y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

13. Purificación de fragmentos de DNA

Para la purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa) se empleó el kit GeneClean II (Bio 101, la Jolla, CA), siguiendo las indicaciones del proveedor.

14. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf thermocycler 5330) empleando la DNA polimerasa de Boehringer Mannheim. En cada reacción se utilizó 1 U de enzima, dNTPs a una concentración final de 100 μM y los cebadores a una concentración de 0.2 μM , todo ello en el tampón de reacción suministrado por el proveedor.

Se emplearon distintos cebadores según los casos y la mezcla se cubrió con una gota de aceite mineral para evitar la evaporación.

La temperatura y los ciclos de amplificación, así como el cebador utilizado variaron para cada caso y éstos se detallan en los apartados correspondientes.

15. Amplificación por RAPDs

15.1. Técnicas de trabajo

Para el trabajo con la técnica de RAPDs es necesario tomar en cuenta algunas consideraciones:

1. La mayor dificultad que presenta la técnica es conseguir su reproducibilidad. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados es necesario estandarizar al máximo todos los factores que intervienen en la reacción de PCR, prestando especial atención a la cantidad de DNA de la muestra que se pone en la reacción. Para éste fin, las diluciones de DNA se valoraron por espectrometría a 260 nm con la intención de poner la misma cantidad de DNA por reacción (50 ng). Además se hicieron reacciones de RAPDs con tres cultivos monospóricos A, B y C, de cada una de las cepas.
2. Para obtener los mejores resultados es necesario disponer de un DNA lo menos fragmentado posible y para ello se debe evitar en la medida de lo posible la congelación y descongelación de las muestras.
3. Puesto que se utiliza como cebador un oligonucleótido de secuencia arbitraria y una baja temperatura de anillamiento, son frecuentes las contaminaciones. Para evitarlas se ponen controles negativos, en los cuales en lugar de DNA se pone agua, y se realiza todo el trabajo utilizando puntas con filtro para las micropipetas.

16. Clonación

16.1. Ligación

Para la ligación se empleó la metodología de la construcción de T-vectores (Marchuk *et al.*, 1990), que consiste en:

1. Digestión del plásmido con el enzima *Eco* RV, formador de extremos romos.
2. Incubación con *Taq* DNA polimerasa durante 2 horas a 70° C (1 unidad/ µg plásmido/20 µl de volumen) con 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ y 200µg/ml BSA en presencia de 2mM dTTP.
3. Fenolización y precipitación del vector.
4. La ligación del fragmento con el vector se llevó a cabo con ligasa T4 (Boehringer Mannheim) a 14° C durante 16-18 horas.

16.2. Transformación

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5α y su transformación se realizaron siguiendo el método de Hanahan (1983). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con ampicilina, a las que se le añadió 40 µg/ml de X-Gal al 2% (p/v) en dimetilformamida.

17. Secuenciación

17.1. Procedimiento

Los fragmentos de DNAr de las diferentes cepas se secuenciaron directamente utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (Tabla 3). El fragmento clonado en pBluescriptII SK+ se secuenció utilizando los cebadores T 3 y T 7 (Tabla 3). El proceso se realizó mediante el kit ABI PRISM™, que utiliza terminadores marcados y como enzima se utilizó la Amplitaq DNA Polimerasa. El trabajo se realizó en el secuenciador automático (ABI 373A DNA sequencer) del "Servicio de Secuenciación" de la Universidad de Valencia.

17.2. Programas utilizados

Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Para el análisis filogenético se usaron los métodos de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei., 1987), máxima parsimonia (MP) (Fitch, 1971) y máxima verosimilitud (ML) (Felsenstein, 1981). Para obtener los árboles mediante el método de vecino más próximo, la obtención de los datos estadísticos referentes a las secuencias, así como la matriz de distancias y la determinación de la fiabilidad de sus nodos por el procedimiento de remuestreo con reemplazamiento ("bootstrap") se utilizó el programa MEGA v 1.01 (Kumar *et al.*, 1993). Los árboles de MP y su test de remuestreo por reemplazamiento se hicieron con los programas DNAPARS y SEQBOOT respectivamente, los cuales se encuentran dentro del paquete de programas PHYLIP 3.5 para windows (Felsenstein, 1993). Finalmente el árbol de ML se obtuvo mediante el programa DNAML que de igual forma se encuentra en el paquete de programas PHYLIP 3.5 para windows (Felsenstein, 1993). Los árboles alternativos de MP se compararon por el test de máxima parsimonia propuesto por Templeton, (1983) y desarrollado por Felsenstein, (1985) y para el método de ML se utilizó el test de Kishino y Hasegawa., (1989). Estos test se realizaron con los programas DNAPARS y DNAML respectivamente.

Resultados y discusión

1. Restricción del DNA ribosomal

Como se describió en el apartado 1.4.4 de la introducción, el análisis del fragmento de DNA ribosomal amplificado con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 descritos por White et al, (1990), se está empleando para el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre organismos de diferente nivel taxonómico. Esto es debido a que en este mismo fragmento podemos encontrar dos tipos de regiones muy diferentes, una zona conservada, que se corresponde con el gen que codifica para el RNA 5.8S, y 2 regiones variables, que se corresponden con las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (Figura 3). Estas regiones intergénicas se caracterizan por ser secuencias no codificantes, y por acumular más mutaciones y evolucionar más rápidamente que sus vecinas las secuencias codificantes (Hillis et al., 1991)

El estudio de este fragmento de DNA también viene siendo de gran utilidad en la diferenciación de especies de diferentes hongos filamentosos. En *Sclerotinacea* (Carbone et al., 1993), así como en *Metharhizium* (Carrant et al., 1994), los niveles de divergencia entre especies son bajos, mientras que en *Phytophthora* (Lee y Taylor, 1992), se han podido usar para establecer diferencias entre distintas especies. También ha sido de gran utilidad en el género *Colletotrichum* (Sreenivasaprasad et al., 1996) y en *Fusarium sambucinum* (O'Donnell, K., 1992), donde se han encontrado diferencias por debajo del nivel de especie.

En una primera aproximación a la caracterización molecular de las cepas de *Colletotrichum* que infectan las plantas de fresa, abordamos el estudio del DNA ribosomal mediante la utilización del fragmento amplificado por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, y su posterior digestión con enzimas de restricción. En este estudio nos hemos fijado como objetivo principal evaluar la utilidad de la técnica para la identificación de cepas de *Colletotrichum*, es decir, determinar si los RFLPs del DNA pueden servir como marcadores moleculares característicos de especie u otros niveles taxonómicos, y pueden ser utilizados en las pruebas rutinarias de identificación de estos hongos.

1.1. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 ya descritos en el apartado de Materiales y Métodos (Tabla 3), para amplificar por PCR el DNA de las 74 cepas de *Colletotrichum* aisladas de plantas de fresa con síntomas de antracnosis y las 6 cepas

control de *Colletotrichum* (Tabla 1). Las condiciones de la reacción fueron 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 52°C y 1 min a 72°C con un paso final de 10 min a 72°C. El análisis electroforético de los productos de amplificación reveló la presencia de una única banda de aproximadamente 590 pb. El tamaño de esta banda fue igual en todas las cepas, excepto en la cepa control perteneciente a la especie *C. crassipes* (CECT 21069), que fue ligeramente más pequeña y se estimó en 580 pb.

1.2. Digestión de los productos amplificados.

Los fragmentos amplificados se digirieron con un total de 8 endonucleasas de restricción (*Alu* I, *Bam* II, *Hinf* I, *Msp* I, *Pvu* II, *Rsa* I, *Sau* 3A y *Scr*F I). El análisis electroforético de la digestión con cada uno de estos enzimas usados, dio como resultado distintos patrones de bandas dependiendo del enzima usado (Figura 7). Las enzimas que menor número de patrones mostraron fueron *Hinf* I y *Pvu* II, con dos patrones distintos, mientras que las enzimas *Msp* I y *Scr*F I fueron las que mayor variabilidad aportaron, dando como resultado 5 patrones diferentes. Estos patrones individuales se les ha denominado con las letras A, B, C, D y E y la combinación de éstos dio como resultado un total de 8 patrones compuestos o tipos diferentes (Tabla 4). De este modo, cada una de las 80 cepas analizadas en el presente trabajo fue asignada a un tipo (Tabla 5).

Las 74 cepas de *Colletotricum* aisladas de plantas de fresa con síntomas de antracnosis, originalmente descritas por la metodología clásica como *C. acutatum*, *C. fragariae*, *G. cingulata* y *G. miyabeana* se agruparon dentro de 4 tipos diferentes (I, II, III y IV). El tipo I es el más abundante, representado por 30 cepas procedentes de diversos orígenes geográficos. Este tipo se corresponde en su mayoría con cepas descritas como *C. acutatum*, aunque también lo presentaron las cepas CECT 21046, CECT 21047 y CECT 21052, que fueron descritas originalmente como *C. fragariae* y las cepas CECT 21013 y CECT 21027 originalmente descritas como *Colletotrichum* sp. El tipo II está representado por 22 cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *G. cingulata*, las cuales no se pudieron diferenciar con ninguno de los enzimas usados. El tipo III incluye 13 cepas aisladas de diferentes lugares de Europa, Australia y Nueva Zelanda pertenecientes a las especies *C. acutatum* y *G. miyabeana*. Finalmente, el tipo IV es un grupo minoritario e incluye 9 cepas procedentes de Francia y Nueva Zelanda, que se corresponden también con la especie *C. acutatum*.

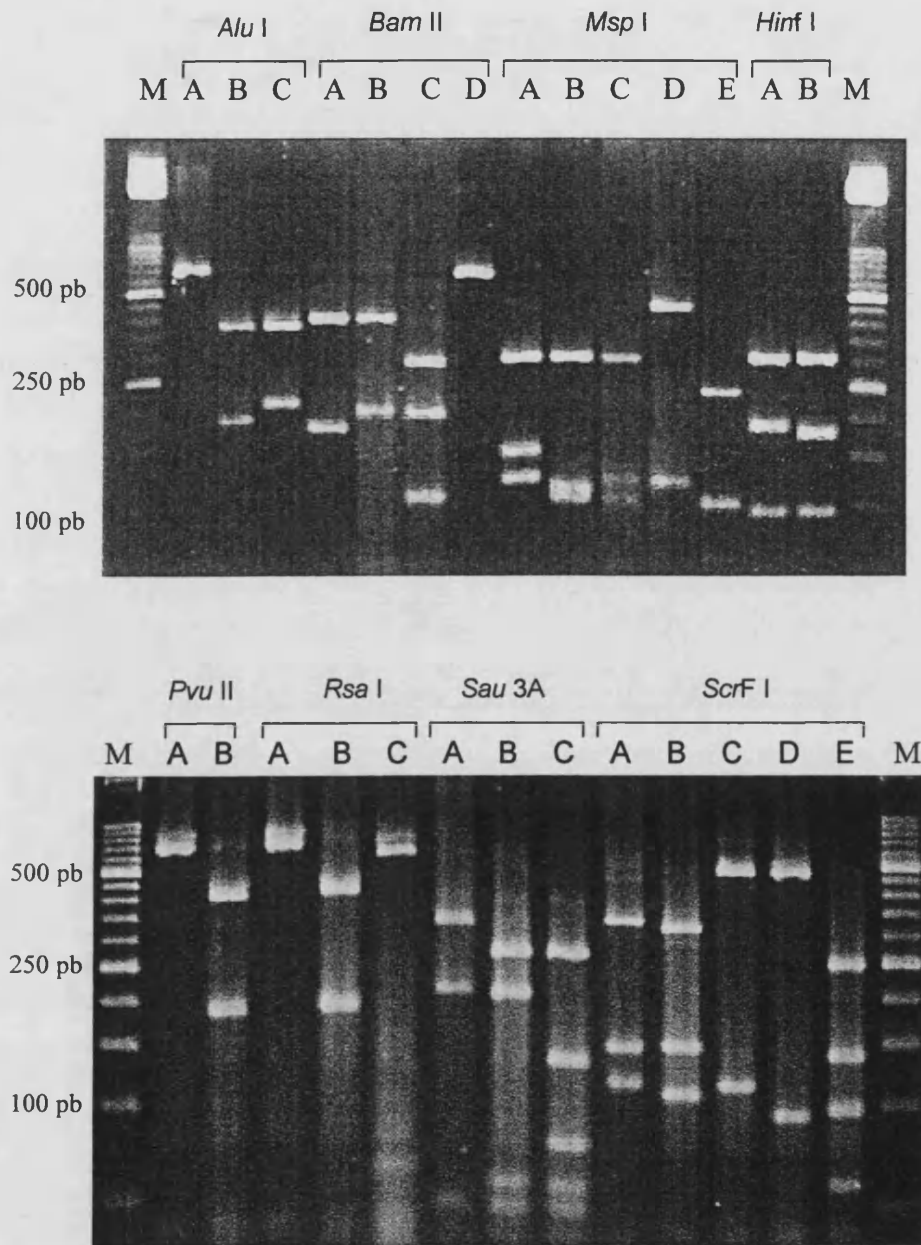


Figura 7. Patrones de restricción de los fragmentos amplificados que mostraron las cepas de *Colletotrichum*, mediante el empleo de los enzimas *Alu* I, *Bam* II, *Hinf* I *Msp* I, *Pvu* II, *Rsa* I, *Sau* 3A y *ScrF* I. La combinación de estos patrones individuales da lugar a patrones compuestos o tipos, los cuales se pueden observar en la tabla 4. Las líneas M se corresponden con el marcador de pesos moleculares XIII (Boehringer Mannheim).

TABLA 4. Patrones de restricción con cada uno de los enzimas empleados y patrones compuestos o tipos que muestran las cepas de *Colletotrichum* en este estudio.

Especies	Patrones de restricción							Tipos	
	<i>Alu</i> I	<i>Bam</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Pvu</i> II	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3A		<i>ScrF</i> I
<i>C.acutatum</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	I
<i>C. fragariae</i>	B	B	B	B	B	B	B	B	II
<i>G. cingulata</i>									
<i>C. acutatum</i>	A	A	B	C	A	A	B	A	III
<i>C. acutatum</i>	A	A	B	C	A	C	B	A	IV
<i>C. coccodes</i>	C	B	A	D	A	A	A	C	V
<i>C. kahawae</i>	C	B	B	B	A	B	B	B	VI
<i>C. gloeosporioides</i>									
<i>C. crassipes</i>	A	C	A	D	A	A	A	D	VII
<i>C. falcatum</i>	A	D	B	E	A	A	C	E	VIII

Respecto a las 6 cepas utilizadas como control en el trabajo, éstas dieron un total de 4 tipos distintos (V, VI, VII y VIII) y se corresponden con las especies *C. coccodes* (V), *C. kahawae* (VI), *C. crassipes* (VII), *C. falcatum* (VIII) y la cepa tipo de *C.gloeosporioides* (VI) (Tabla 5). Como indican los distintos tipos encontrados, todas las cepas control se diferenciaron de las cepas aisladas de plantas de fresa con síntomas de antracnosis, y a su vez fueron diferentes entre si. Excepciones fueron las cepas de *C. kahawae* y *C. gloeosporioides* que no se pudieron diferenciar, y ambas presentaron el tipo VI.

Finalmente, es interesante destacar que el tamaño de los productos digeridos con los enzimas, *ScrF* I y *Pvu* II podría usarse como un método rápido para identificar las especies de *Colletotrichum* que producen antracnosis en plantas de fresa (Tabla 6). Por un lado, mediante el empleo del enzima *ScrF* I encontramos un patrón característico de la especie *C. acutatum*. La digestiones con este enzima dan los mismos resultados para los 3 tipos de la especie, 3 fragmentos de 330, 140 y 120 pb respectivamente. Por otra lado, aunque no se pudieron diferenciar las especies *C. fragariae* y *G. cingulata* (anamorfo *C. gloeosporioides*) con ninguno de los enzimas usados, mediante la digestión con el enzima *Pvu* II se obtienen dos productos de 400 y 190 pb, que nos

permiten diferenciar este par de especies del resto de especies de *Colletotrichum*, incluida la cepa tipo de *C. gloeosporioides* CECT 21073 que fue aislada de cítricos.

TABLA 5. Patrones compuestos o tipos de las cepas de *Colletotrichum* analizadas. Los diferentes tipos se han nombrado siguiendo la numeración llevada a cabo por Buddie *et al.*, (1998a).

Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	Tipo
<i>Colletotrichum</i> sp.	21013	301119	Kenia	I
	21027	364856	España	I
<i>C. acutatum</i>	21000	345026	España	III
<i>C. acutatum</i>	21001	345028	Colombia	I
	21002	345035	Francia	III
	21009	345033	Australia	III
	21011	360086	Japón	I
	21012	299103	UK?	I
	21014	311744	USA ?	I
	21018	324993	USA	IV
	21019	324994	USA	I
	21020	345027	Francia	I
	21021	345031	Italia	I
	21022	345032	Italia	I
	21023	345577	Nueva Zelanda	IV
	21028	367466	Holanda	III
	21029	367467	UK	I
	21030	367468	USA	I
	21032	324992	USA	I
	21033	324995	USA	I
	21034	345029	Costa Rica	I
	21035	345034	Australia	III
	21037	345574	Nueva Zelanda	III
	21038	345575	Nueva Zelanda	IV
	21039	345578	Nueva Zelanda	IV
	21043	346326	Australia	III
	21055	348487	Francia	I
	21056	348489	Francia	IV
	21057	348493	Francia 33	I
	21058	348496	Francia	I
	21059	348500	Francia	I
	21060	348502	Francia	I
	21061	351247	USA	I
	21062	351255	UK	III
	21063	351253	UK	III
	21065	351587	USA	I
	21066	351589	Irlanda	III
	21072	348494	Francia	IV
	21075	345030	Costa Rica	I
	21076	345053	Francia	I
	21077	345576	Nueva Zelanda	IV
	21078	348499	Francia	IV
	21079	348501	Francia	I
	21080	351254	Costa Rica	I
<i>C. coccodes</i>	21008	363581	UK ?	V
	21067	363582	UK ?	V
<i>C. crassipes</i>	21069	309371	Holanda	VII
<i>C. falcatum</i>	21070	347765	Bangladesh	VIII

TABLA 5. Continuación.

<i>Especie</i>	CECT	IMI	Origen geográfico	Tipo
<i>C. fragariae</i>	21003	345047	USA	II
	21010	345049	USA	II
	21016	324985	USA	II
	21025	348163	USA	II
	21026	348168	USA	II
	21031	324989	USA	II
	21036	345050	USA	II
	21042	346325	USA	II
	21044	348152	USA	II
	21045	348153	USA	II
	21046	348159	USA Lousiana	I
	21047	348160	USA Lousiana	I
	21048	348167	USA	II
	21049	368472	USA	II
	21050	348174	USA	II
	21051	348175	USA	II
	21052	348177	USA Missisipi	I
	21053	348178	USA	II
	21054	348162	USA	II
	<i>C. gloeosporioides</i>	21073	356878	Italia
<i>C. kahawae</i>	21068	301220	Kenia	VI
<i>G. cingulata</i>	21007	360928	Suiza	I
	21004	345051	Canadá	II
	21005	345052	USA	II
	21015	324984	USA	II
	21017	324988	USA	II
	21064	351257	Canadá	II
	21074	324983	USA	II
	<i>G. miyabeana</i>	21006	345581	Nueva Zelanda
21024		345580	Nueva Zelanda	III
21041		345585	Nueva Zelanda	III

1.3. Discusión

Tradicionalmente, la identificación y caracterización de las especies de *Colletotrichum* ha estado basada en criterios taxonómicos clásicos como son las características morfológicas y de cultivo, especialmente el tamaño y forma de los conidios y la presencia o ausencia del estado perfecto o teleomorfo. De acuerdo con estas características, las cepas de *Colletotrichum* patógenas de plantas de fresa se agrupan en tres especies distintas: *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*). La identificación de las cepas de *Colletotrichum* mediante los estudios morfológicos clásicos es complicada en muchas ocasiones, debido fundamentalmente a la gran variabilidad fenotípica que presentan estos hongos, donde muchos de ellos poseen valores intermedios en sus caracteres morfológicos y de cultivo. En contraste, las técnicas moleculares proporcionan nuevos métodos alternativos que pueden ser utilizados para resolver los problemas de identificación de estos hongos.

TABLA 6. Tamaños moleculares aproximados de los amplificados y de los productos de digestión con los enzimas *ScrF I* y *Pvu II*.

Especies	Tamaño del amplificado	Fragmentos digeridos		Tipos
		<i>ScrF I</i>	<i>Pvu II</i>	
<i>C. acutatum</i>	590	330,140,120	590	I, III, IV
<i>C. fragariae</i> <i>G. cingulata</i>	590	310,140, 110	400, 190	II
<i>C. coccodes</i>		480, 110	590	V
<i>C. kahawae</i> <i>C. gloeosporioides</i>	590	310,140, 110	590	VI
<i>C. crassipes</i>	580	480, 90	580	VII
<i>C. falcatum</i>	590	250, 140, 100, 60	590	VIII

Este estudio nos ha permitido llevar a cabo la identificación de las cepas de *Colletotrichum* empleadas en este trabajo y su asignación a un total de 8 tipos distintos. La técnica presenta un nivel de resolución parecido a la separación clásica entre especies y nos permite diferenciar las especies de *Colletotrichum* que producen antracnosis en plantas de fresa de aquellas otras, que son patógenas de huéspedes distintos (cepas control).

Atendiendo exclusivamente a las cepas de *Colletotrichum* patógenas de plantas de fresa, observamos que mediante esta técnica podemos diferenciar las cepas de *C. acutatum* de las de *C. fragariae* y *G. cingulata*. La digestión con el enzima *ScrF I* nos permite obtener un patrón específico de la especie *C. acutatum*, es decir, los tres tipos de esta especie presentan el mismo patrón cuando cortamos con estos enzimas. Por el contrario no podemos diferenciar con ninguno de los enzimas usados entre las especies *C. fragariae* y *G. cingulata* (anamorfo *C. gloeosporioides*), presentando las dos especies el tipo II. Este resultado está de acuerdo con las dificultades de la taxonomía clásica para diferenciar las cepas de *C. fragariae* de las del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*. Sin embargo, mediante esta técnica si que podemos diferenciar las cepas de estas especies de la cepa CECT 21073, que se corresponde con la cepa tipo de *C. gloeosporioides* aislada de cítricos y que nosotros la hemos utilizado como control (tipo VI). Este dato nos podría estar indicando la presencia de un mismo grupo para las cepas originalmente descritas como *C. fragariae* y *G. cingulata*, distinto del patógeno de

amplio espectro *C. gloeosporioides* y del cual podríamos diferenciarlas mediante la digestión con la enzima *Pvu* II.

Este estudio también nos ha permitido reclasificar algunas cepas, así como, asignar otras cepas que permanecían sin identificar por los criterios taxonómicos clásicos a alguna de estas especies. Por una parte, hemos reclasificado las cepas CECT 21046, CECT 21047 y CECT 21052, originalmente descritas como *C. fragariae*, dentro de la especie *C. acutatum* (tipo I) y este hecho ha sido confirmado con el empleo de otras técnicas moleculares (Buddie *et al.*, 1998a). Lo mismo ocurre con las cepas pertenecientes a la especie *G. miyabeana*, que presentan el mismo tipo que algunas cepas de *C. acutatum* (tipo III)., estas cepas proceden de líneas reproductoras sexuales y de ahí el nombre de *Glomerella* (Jonston y Jones., 1997). Una posible implicación taxonómica de estos resultados podría ser la consideración de estas cepas como formas reproductoras sexuales de *C. acutatum*. Por otro lado, las cepas CECT 21013 y CECT 21027 descritas por la taxonomía clásica como *Colletotrichum* sp., y por tanto sin clasificar dentro de una especie determinada, han sido bien identificadas como *C. acutatum* (tipo I).

Por último, en cuanto a la aplicación práctica de este estudio y que ha constituido nuestro principal objetivo, pensamos que se podrían aplicar estos perfiles de restricción como marcadores moleculares en las pruebas de identificación rutinarias, y se podría adoptar esta técnica como criterio de identificación de estos hongos. Se trata de una técnica relativamente sencilla, rápida y totalmente reproducible, que nos permitiría identificar fácilmente los diferentes aislamientos.



2. Caracterización de las cepas de *Colletotrichum* mediante RAPDs

La técnica de RAPDs presenta un gran poder de resolución, permitiendo detectar una gran variabilidad que puede utilizarse para llevar a cabo una caracterización a nivel de cepas dentro de una misma especie. El empleo de esta técnica en cepas de diferentes especies de *Colletotrichum*, ha permitido detectar una gran variabilidad y ha sido utilizada para establecer relaciones entre patógenos y orígenes geográficos (Mills *et al.*, 1992a; Sreenivasaprasad *et al.*, 1992). Una técnica similar a la de RAPDs, la denominada ap-PCR, ha sido empleada para la caracterización de cepas de *Colletotrichum* patógenas de plantas de fresa (Freeman *et al.*, 1995; Katan *et al.*, 1997). Los resultados revelan una gran variabilidad y permiten diferenciar especies difíciles de identificar por la metodología clásica como son las especies *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*.

En el presente capítulo nos proponemos la utilización de los RAPDs con el objetivo de profundizar en la caracterización molecular de las cepas de *Colletotrichum* que incluye este trabajo, así como, evaluar el poder de resolución de la técnica para su empleo en la identificación.

2.1. Reacciones de RAPDs-PCR.

Inicialmente se realizó una selección de oligonucleótidos para determinar aquellos que proporcionaran un mayor número de productos de amplificación, y así obtener suficientes sitios informativos para subsecuentes análisis. Esta selección se realizó sobre los 20 oligonucleótidos que incluye el kit A (Operon technologies, Alameda CA, EE.UU), y de éstos se seleccionaron los oligonucleótidos OPA-2, 10, 11, 18 y 20 (Tabla 3 de Materiales y Métodos), que proporcionaron entre 5 y 15 productos de amplificación. Se realizaron reacciones de RAPDs utilizando DNA genómico de 3 cultivos monospóricos A, B y C de cada una de las 74 cepas de *Colletotrichum* aisladas en plantas de fresa, más las 6 cepas control. La reacción de RAPDs-PCR fue suplementada con $MgCl_2$ hasta una concentración final 3mM y las condiciones de la reacción fueron 45 ciclos de 30 s a 92°C, 30 s a 36°C y 30 s a 72°C con un paso final de 10 min a 72°C. El motivo de incluir 3 cultivos monospóricos de una misma cepa es debido a la cuestionada reproducibilidad de la reacción de RAPDs, donde existen muchas variables que pueden afectar en mayor o menor medida a los resultados. Sin

embargo, con una correcta normalización de éstas variables el problema puede ser minimizado. En numerosos trabajos de RAPDs, los ensayos son repetidos con el fin de obtener un elemento de reproducibilidad. En éste sentido, consideramos que el análisis de tres cultivos monospóricos por cada una de las cepas puede ser garantía suficiente. En la Figura 8 se muestran a modo de ejemplo los patrones de RAPDs obtenidos a partir de los 3 cultivos monospóricos A, B y C de 4 cepas diferentes, obteniéndose como resultado patrones idénticos para una misma cepa.

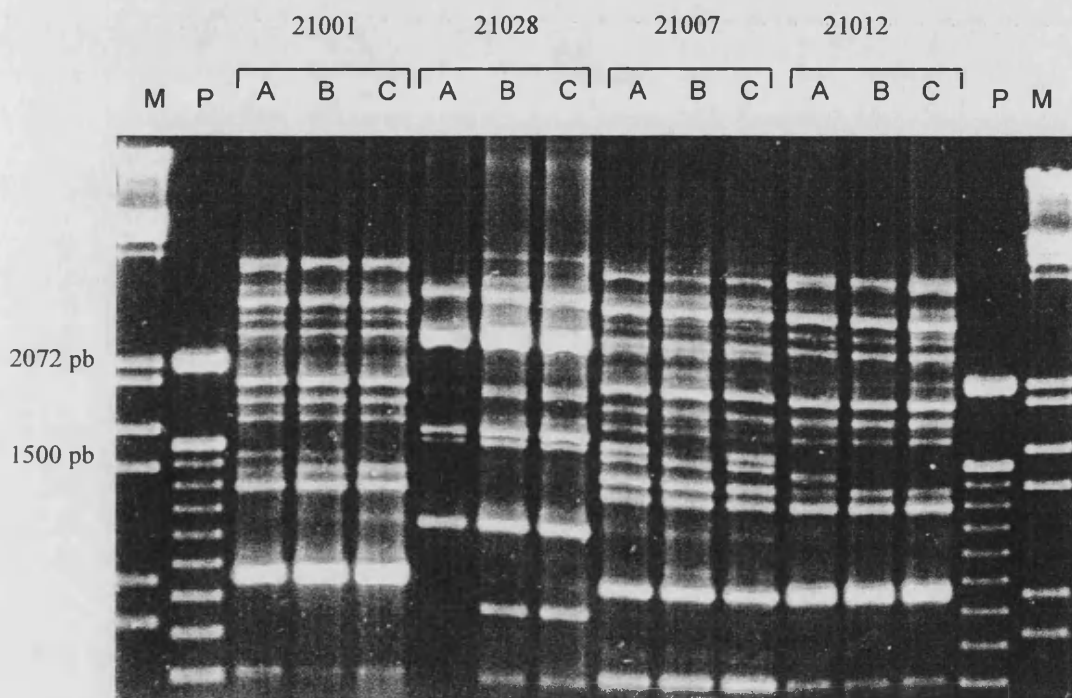


Figura 8. Ejemplo de los patrones de RAPDs de los cultivos monospóricos A, B y C de de cuatro cepas diferentes realizados con el OPA-20. Línea M, λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III. Línea P, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

2.2. Análisis de los patrones de RAPDs

Una vez comprobado el idéntico comportamiento de los 3 cultivos monospóricos de una misma cepa, se eligió el producto amplificado de uno de ellos como representante de la cepa y se compararon los patrones de RAPDs de todas las cepas estudiadas. La técnica presenta un gran poder de resolución, permitiéndonos distinguir las especies *C. fragariae* y *G. cingulata* (anamorfo *C. gloeosporioides*), cosa que no se podía hacer mediante la restricción del RDNA, y es capaz de detectar una gran

variabilidad por debajo del nivel de especie. Los resultados obtenidos con cada uno de los 5 oligonucleótidos usados fueron los mismos, obteniendo el mismo tipo de agrupaciones con cada uno de ellos. Se han encontrado un total de 24 patrones distintos, los cuales se distribuyen de manera diferente. El mayor número de patrones diferentes obtenidos se corresponden con la especie *C. acutatum*, especialmente con las cepas agrupadas en el capítulo anterior en los tipos III y IV. Las otras dos especies, *C. fragariae* y *G. cingulata* presentaron un total de 4 patrones distintos, 2 para cada una de ellas. Finalmente, cada una de las cepas control mostró un patrón diferente excepto las dos cepas de *C. coccodes* que presentaron el mismo. La asignación de las cepas a un patrón de RAPDs determinado se muestra en la Tabla 7.

2.1.1. *Colletotrichum acutatum*

Las reacciones de RAPDs de las 52 cepas identificadas en el capítulo anterior como *C. acutatum* dieron como resultado 15 patrones distintos. A pesar de esta gran variabilidad, nosotros hemos dividido las 52 cepas en 2 grupos muy diferentes.

El primero representa un grupo mayoritario en el que no encontramos variabilidad a pesar de la gran diversidad en orígenes geográficos, denominado grupo no variable. Este grupo incluye 29 cepas que presentan el patrón 1, donde se encuentran todos los aislamientos de *C. acutatum* realizados en USA con la excepción de la cepa CECT 21018, que presentó el patrón 10. También forman parte de este grupo un gran número de cepas procedentes de distintos orígenes geográficos. Tal y como se puede observar en la figura 9, las cepas que forman parte de este grupo presentan perfiles de RAPDs muy similares. Un dato a destacar en las cepas de este grupo, es la correlación existente entre los RAPDs y la restricción del rDNA, observando que todas las cepas asignadas al tipo I en el capítulo anterior también presentaron el patrón 1 de RAPDs, con la excepción de la cepa aislada en Japón CECT 21011, la cual tiene un patrón de RAPDs diferente y único (Patrón 2).

En contraste con el grupo anterior, el segundo grupo mostró un gran número de patrones diferentes y lo denominamos grupo variable. Éste grupo variable se corresponde con las cepas que presentaban los tipos III y IV de rDNA, donde principalmente se encuentran cepas aisladas de 2 orígenes geográficos distintos, por un lado los aislados europeos y por otro los de Australia y Nueva Zelanda. La variabilidad de estas cepas también se ha puesto de manifiesto mediante la caracterización isoenzimática, pudiendo correlacionar ambas técnicas (Buddie *et al.*, 1998a). En la figura 10 se muestra los patrones de RAPDs de éstas cepas, donde se puede observar

TABLA 7. Patrones de RAPDs de las cepas de *Colletotrichum* analizadas. En la tabla también se incluye el tipo de rDNA al que pertenecen. *Cepas de *C. acutatum* representantes de cada uno de los grupos, con las cuales se ha realizado el análisis estadístico.

Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	Tipo	RAPDs
<i>C. acutatum</i>	21001*	345028	Colombia	I	1
	21012	299103	UK?	I	1
	21013	301119	Kenia	I	1
	21014	311744	USA ?	I	1
	21019	324994	USA	I	1
	21020	345027	Francia	I	1
	21021	345031	Italia	I	1
	21022	345032	Italia	I	1
	21027	364856	España	I	1
	21029	367467	UK	I	1
	21030	367468	USA	I	1
	21032	324992	USA	I	1
	21033	324995	USA	I	1
	21034	345029	Costa Rica	I	1
	21055	348487	Francia	I	1
	21057	348493	Francia 33	I	1
	21058	348496	Francia	I	1
	21059	348500	Francia	I	1
	21060	348502	Francia	I	1
	21061	351247	USA	I	1
	21065	351587	USA	I	1
	21075	345030	Costa Rica	I	1
	21076	345053	Francia	I	1
	21079	348501	Francia	I	1
	21080	351254	Costa Rica	I	1
	21046	348159	USA Lousiana	I	1
	21047	348160	USA Lousiana	I	1
	21052	348177	USA Missisipi	I	1
	21007	360928	Suiza	I	1
	21011*	360086	Japón	I	2
	21000*	345026	España	III	3
	21002	345035	Francia	III	3
	21028	367466	Holanda	III	3
	21063	351253	UK	III	3
	21066	351589	Irlanda	III	3
	21009*	345033	Australia	III	4
	21037	345574	Nueva Zelanda	III	4
	21035*	345034	Australia	III	5
	21043*	346326	Australia	III	6
	21062*	351255	UK	III	7
	21006*	345581	Nueva Zelanda	III	8
	21024	345580	Nueva Zelanda	III	8
	21041*	345585	Nueva Zelanda	III	9

TABLA 7. Continuación.

Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	Tipo	RAPDs
<i>C. acutatum</i>	21018*	324993	USA	IV	10
	21023*	345577	Nueva Zelanda	IV	11
	21040	345583	Nueva Zelanda	IV	11
	21038*	345575	Nueva Zelanda	IV	12
	21039	345578	Nueva Zelanda	IV	12
	21056*	348489	Francia	IV	13
	21072	348494	Francia	IV	13
	21077*	345576	Nueva Zelanda	IV	14
	21078*	348499	Francia	IV	15
	<i>C. fragariae</i>	21003	345047	USA	II
21010		345049	USA	II	17
21016		324985	USA	II	17
21025		348163	USA	II	17
21026		348168	USA	II	17
21031		324989	USA	II	17
21036		345050	USA	II	17
21042		346325		II	17
21044		348152	USA	II	17
21045		348153	USA	II	17
21048		348167	USA	II	17
21049		368472	USA	II	17
21050		348174	USA	II	17
21051		348175	USA	II	17
21053		348178	USA	II	17
21054		348182	USA	II	17
<i>G. cingulata</i>	21004	345051	Canadá	II	18
	21005	345052	USA	II	18
	21015	324984	USA	II	18
	21064	351257	Canadá	II	18
	21017	324988	USA	II	19
	21074	324983	USA	II	19
<i>C. coccodes</i>	21008	363581	UK ?	V	20
	21067	363582	UK ?	V	20
<i>C. kahawae</i>	21068	301220	Kenia	VI	21
<i>C. gloeosporioides</i>	21073	356878	Italia	VI	22
<i>C. crassipes</i>	21069	309371	Holanda	VII	23
<i>C. falcatum</i>	21070	347765	Bangladesh	VIII	24

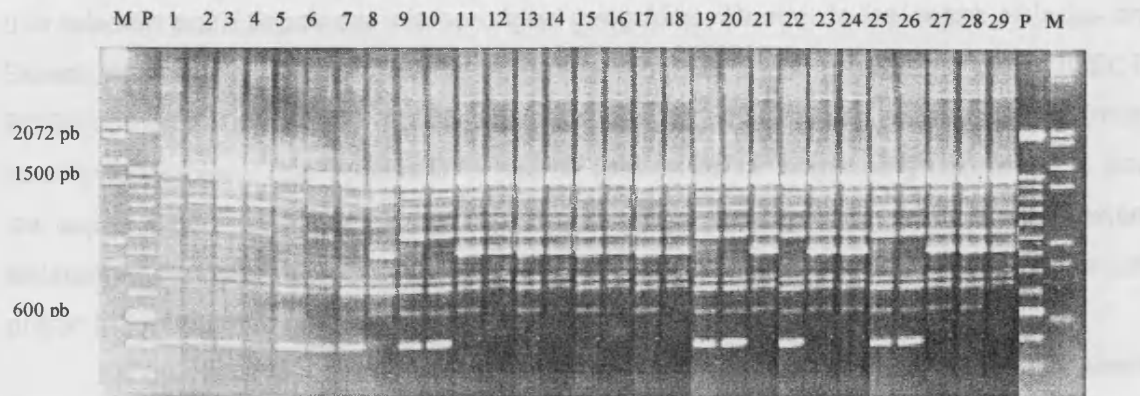


Figura 9. Patrones de bandas de RAPDs realizados con el OPA11 a partir de las cepas de *C. acutatum* pertenecientes al grupo no variable. Carriles 1 al 29 se corresponden con las cepas que presentan el patrón 1 en el orden llevado en la tabla Tabla 7. Línea M, λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III. Línea P, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

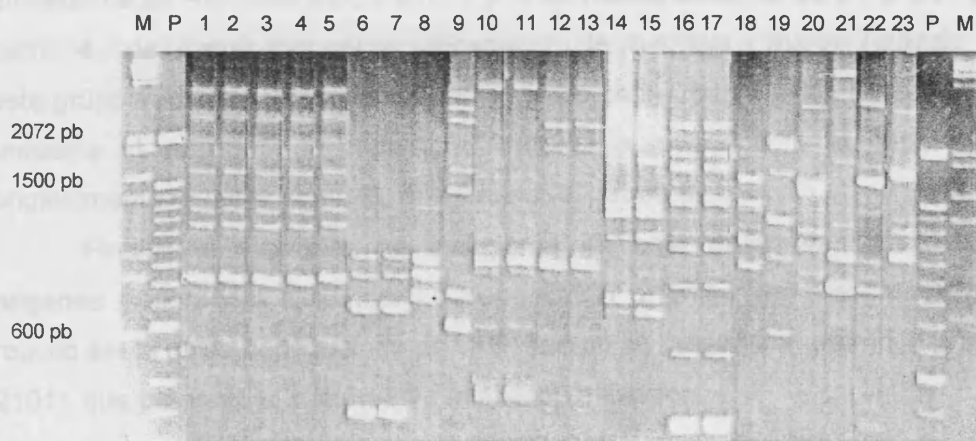


Figura 10. Patrones de bandas de RAPDs realizados con el OPA11 a partir de las cepas de *C. acutatum* pertenecientes al grupo variable. Carriles 1 al 9 pertenecen a las cepas de origen europeo y carriles del 10 al 21 con las cepas aisladas en Australia y Nueva Zelanda. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5 se corresponden con las cepas CECT 2100, CECT 21002, CECT 21028, CECT 21063 y CECT 21066, que presentaron el patrón 3, carriles 6 y 7 con las cepas CECT 21056 y CECT 21072 (patrón 13), carriles 8 y 9 con las cepas CECT 21062 (patrón 7) y CECT 21078 (patrón 15) respectivamente. Dentro de las cepas aisladas en Australia y Nueva Zelanda, los carriles 10 y 11 se corresponden con las cepas CECT 21023 y CECT 21040 (patrón 11), carriles 12 y 13 con las cepas CECT 21038 y CECT 21039 (patrón 12), carriles 14 y 15 con las cepas CECT 21006 y CECT 21024 (patrón 8), carriles 16 y 17 con las cepas CECT 21009 y CECT 21037 (patrón 4), carril 18, cepa CECT 21035 (patrón 5), carril 19, cepa CECT 21041 (patrón 9), carril 20, cepa CECT 21043 (patrón 6) y carril 21 con la cepa CECT 21077 (patrón 14). Finalmente, el carril 22 se corresponde con la cepa 21018 (patrón 10), que resultó ser la única cepa aislada en USA que no se incluyó en el grupo variable, y el carril 23 se corresponde con la cepa CECT 21011 (patrón 2), aislada de Japón. Línea M, λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III. Línea P, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

una relación entre cepas del mismo origen geográfico. Dentro de las cepas aisladas en Europa podemos encontrar distintos agrupamientos. Un primer grupo de 5 cepas (CECT 21000, CECT 21002, CECT 21028, CECT 21063 y CECT 21066), aisladas de distintos países de Europa y que presentan el patrón (patrón 3), un segundo grupo formado por las cepas CECT 21056 y CECT 21072 que presentan el patrón 13 y ambas están aisladas en Francia. Por último las cepas CECT 21062 y CECT 21078 que presentan un patrón independiente cada una de ellas, patrones 7 y 15 respectivamente.

En cuanto a las cepas procedentes de Australia y Nueva Zelanda se observó todavía una mayor diversidad que en las procedentes de Europa. Podemos encontrar algunos pares de cepas que comparten el mismo patrón. Las cepas CECT 21023 y CECT 21040 presentan el patrón 11, las cepas CECT 21038 y CECT 21039 presentan el patrón 12, las dos cepas de *Glomerella miyabeana* procedentes de Nueva Zelanda CECT 21006 y CECT 21024 comparten el patrón 8 y la pareja formada por la cepa procedente de Australia CECT 21037 y la de Nueva Zelanda CECT 21009 presentan el patrón 4. Las últimas tres cepas procedentes de Australia y Nueva Zelanda incluidas en este grupo variable mostraron un patrón único cada una de ellas. La cepa CECT 21035 presenta el patrón 5, la cepa CECT 21043 el patrón 6, y la cepa CECT 21041, originalmente descrita como *G. miyabeana*, el patrón 9.

Finalmente, también se incluyeron en este grupo variable dos cepas con orígenes geográficos distintos. La cepa CECT 21018, que presentó el patrón 10 y resultó ser la única cepa aislada en USA que no se presenta el patrón 1, y la cepa CECT 21011 que presentó el patrón 2 y fue aislada en Japón.

Debido a la gran variabilidad observada en las cepas de *C. acutatum* decidimos llevar a cabo un análisis agrupamientos de similitud teniendo en cuenta el número de bandas compartidas. Para ello se compararon los 15 patrones distintos y se hizo una matriz en base a la presencia o ausencia de bandas de RAPDs con los 5 oligonucleótidos usados. Los datos de dicha matriz se analizaron aplicando un método numérico, en el cual se utilizó el coeficiente de Dice y a partir de los cuales se obtuvo un dendrograma. Para facilitar el trabajo, en el análisis solamente se incluyó una cepa representante de cada uno de los patrones distintos, las cuales se indicadas con un asterisco en la tabla 7. Dicho dendrograma puede ser dividido en tres agrupamientos principales (Figura 11). En el primero de los agrupamientos se encuentra el grupo mayoritario e invariable (patrón 1), representado por la cepa 21001, y cercana a ella se sitúan las cepas europeas que presentan el patrón 3 (CECT 21000), más la cepa aislada de Japón CECT 21011. Cabe destacar que en el dendrograma se relaciona ésta última

cepa con las del grupo mayoritario (patrón1), lo que está de acuerdo con el patrón de rDNA compartido. Más alejadas se encuentran las cepas que presentaron el patrón 11 (CECT 21023) y el 5 (CECT 21035), las cuales proceden de Nueva Zelanda y Australia respectivamente. Otro grupo está constituido únicamente por las cepas europeas CECT 21062 (patrón 7) y CECT 21078 (patrón 15), aisladas de UK y Francia respectivamente y que mostraron un patrón único cada una de ellas. El tercer y último grupo está formado por el resto de cepas de *C. acutatum* y las cepas originalmente descritas como *G. miyabeana*, y en él se pueden observar distintos subgrupos. En el primero de ellos aparecen las 2 cepas de *G. miyabeana* que presentaron el patrón 8 (CECT 21006) y las 2 cepas que presentaron el patrón 12 (CECT 21038), cuya característica en común es que en ambas se han encontrado estructuras reproductoras sexuales y que todas ellas proceden de Nueva Zelanda. Un segundo subgrupo formado por las cepas que presentaron el patrón 4 (CECT 21009) y el patrón 13 (CECT 21056), y son cepas aisladas de Australia, Nueva Zelanda y Francia respectivamente. El tercer subgrupo está formado por la cepa CECT 21018 (patrón 10), más la cepa originalmente descrita como *G. miyabeana* CECT 21041 (patrón 16), en la cual también se había observado estructuras reproductoras sexuales. La cepa CECT 21018 podría haberse derivado de esta cepa con reproducción sexual, y éste sería el motivo por el cual esta cepa de *C. acutatum* es el único aislamiento realizado en USA que mostró un patrón distinto a las cepas del grupo mayoritario. El último subgrupo está formado por las cepas CECT 21043 (patrón 6) y CECT 21077 (patrón 14), que están aisladas de Australia y Nueva Zelanda respectivamente.

2.1.2. *Colletotrichum fragariae* y *Glomerella cingulata*

En este apartado analizamos las cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *G. cingulata*, especies difíciles de diferenciar por la taxonomía clásica y que presentaron el mismo tipo de rDNA, tal y como hemos discutido en el capítulo 1 de Resultados y Discusión. Los resultados obtenidos demuestran que se puede diferenciar entre las cepas de las dos especies e incluso entre cepas de la misma especie. En la tabla 7 se puede observar que las 22 cepas pertenecientes a estas dos especies presentaron 4 patrones de RAPDs distintos (patrones 16, 17, 18 y 19). El patrón 17 se corresponde con un grupo mayoritario de cepas pertenecientes a la especie *C. fragariae* que han sido aisladas de USA. El patrón 16 se corresponde únicamente con la cepa de *C. fragariae* CECT 21003, también aislada de USA y que resultó ser la única cepa de

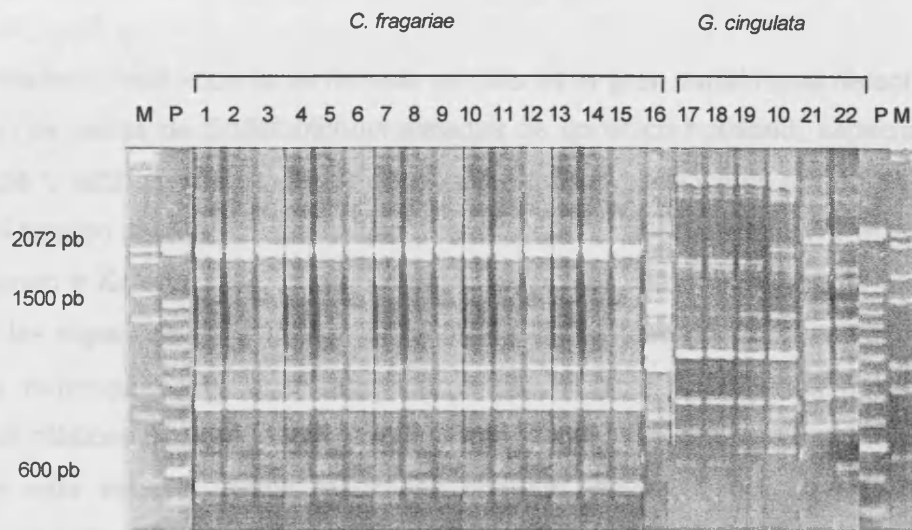


Figura 12. Patrones de bandas de RAPDs realizados con el OPA11 a partir de las cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *G. cingulata*. Carriles 1 al 15 se corresponden con las cepas de *C. fragariae* que presentaron el patrón 17 según el orden llevado en la tabla Tabla 7. Carril 16, se corresponde con la cepa de *C. fragariae* CECT 21003 que presentó el patrón 16. Carriles 17 al 20, se corresponden con las cepas de la especie *G. cingulata* CECT 21004, CECT 21005, CECT 21015 y CECT 21064 respectivamente y que presentaron el patrón 18. Carriles 21 y 22 se corresponden con las cepas de la especie *G. cingulata* CECT 21017 y CECT 21074 y ambas presentaron el patrón 19. Línea M, λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III. Línea P, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

La variabilidad de las cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *C. fragariae* esta especie que presentó un patrón distinto al mayoritario. Ésta última cepa había sido estudiada previamente mediante el análisis de DNA mitocondrial y RAPDs, mostrando de igual modo resultados distintos (Sreenivasaprasad *et al.*, 1992). El patrón 18 lo presentaron un grupo de cuatro cepas de la especie *G. cingulata* y que han sido aisladas de USA y Canadá. Finalmente, el patrón 19 lo presentaron las dos cepas restantes de la especie *G. cingulata* y que habían sido aisladas de USA

2.3. Discusión

El resultado más importante de este estudio es la gran variabilidad detectada en la población de cepas de *Colletotrichum* aisladas de un único huésped, especialmente en la especie *C. acutatum*. Resultados parecidos han sido observados por otros autores mediante el empleo de diferentes técnicas (Freeman *et al.*, 1993, Freeman y Rodríguez., 1995, Freeman y Katan., 1997, Sreenivasaprasad *et al.*, 1992). Esta gran variabilidad indica que las cepas de *C. acutatum* aisladas en las plantas de fresa constituyen un grupo muy heterogéneo, y que éstas cepas previamente clasificadas por criterios taxonómicos clásicos como *C. acutatum*, que podrían ser designadas como variedades o razas de esta especie. Estos resultados podrían apoyar el reconocimiento de la especie *C. acutatum* como un agregado de cepas con múltiples razas, similar al ya reconocido para *C. gloeosporioides*.

El estudio también os ha permitido diferenciar entre las cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, no diferenciadas mediante la restricción del DNA ribosomal en el capítulo anterior. Mediante otras técnicas moleculares como el empleo de isoenzimas, ap-PCR y RFLPs del DNA mitocondrial también se ha podido distinguir entre estas especies. (Bonde *et al.*, 1991, Freeman *et al.*, 1993, Freeman *et al.*, 1995). Comparando los RAPDs con estas técnicas, se podría decir que los RAPDs presentan mayor poder de resolución dada la mayor variabilidad encontrada.

La variabilidad de las cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, es menor que la observada para las cepas de la especie *C. acutatum*, resultados que coinciden con los datos obtenidos por anteriores autores (Freeman *et al.*, 1993, Freeman y Rodríguez., 1995, Sreenivasaprasad *et al.*, 1992). No obstante, es necesario indicar que el número de cepas analizadas de estas dos especies es menor que las analizadas de *C. acutatum*, además su procedencia geográfica es menos diversa. Todas las cepas de *C. fragariae* proceden de USA y las de *G. cingulata* de USA y Canada.

En cuanto al empleo de la técnica para la identificación de cepas, se puede decir que los RAPDs se han mostrado como buenos marcadores moleculares con un gran poder de resolución, detectando una gran variabilidad por debajo del nivel de especie. Por este motivo los RAPDs pueden servir para la identificación de formas especiales, variedades o razas con implicaciones en patología, así como para llevar a cabo estudios ecológicos o estudios de genética de poblaciones. Además, la pequeña

cantidad de DNA requerida y la rapidez de los ensayos permite analizar muchas muestras y por tanto analizar poblaciones muy extensas. Por último, los RAPDs se podrían utilizar para el diseño de oligonucleótidos específicos que se pudiesen utilizar en pruebas de diagnóstico (Pooler *et al.*, 1995).

Sobre las especies de *Ooencyrtus* que producen atracción en plantas de frasa (Bonda *et al.*, 1991; Srinivasaprasad *et al.*, 1992, 1994 y 1996; Freeman *et al.*, 1993, 1995; Freeman y Kabat, 1997; Brown *et al.*, 1995). Los estudios moleculares revelan una gran variabilidad, sobre todo a nivel subespecífico y nos encontramos ante la necesidad de plantear posibles clasificaciones, pero la delimitación de especies y la definición de grupos y categorías atendiendo exclusivamente a datos moleculares, puede ser una tarea compleja, en la que resulta conveniente definir una metodología apropiada para relacionar los grupos definidos por datos moleculares con los taxones clásicos.

En este capítulo, abordamos la subdivisión de las cepas de *Ooencyrtus* que producen atracción en las plantas de frasa en diferentes grupos, a partir de datos moleculares procedentes de distintos métodos. Este dato es comparado con estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Trabajos a cabo en otros laboratorios que han formado parte del proyecto europeo que tiene por título "The development of diagnostic methods for the detection of *Ooencyrtus* species pathogenic to strawberry plants in Europe", y del cual forma parte el presente trabajo.

3.1. Resultados y grupos resultantes.

Los datos obtenidos en los dos capítulos anteriores mediante el análisis de restricción del rDNA y el empleo de los RAPDs, junto con los resultados del análisis del DNA mitocondrial y de un estudio isoenzimático realizados en el IMI (International Mycological Institute), revelan la existencia de dos principales agregados de cepas centrados en las especies *C. aculeatorum* y *C. glaucopomidae* respectivamente. La gran variabilidad encontrada dentro de cada uno de estos dos agregados nos lleva a una posterior subdivisión en diferentes grupos (Tabla 8).

3.1.1. *C. aculeatorum*.

Se han estudiado 52 cepas que la taxonomía clásica incluye bajo el nombre de *C. aculeatorum* (colonias pálsicas, de lento crecimiento y con conidios subglobales), entendiendo tres tipos distintos de cepas mediante los RFLPs del rDNA (tipos I, II y IV) y 2 patrones principales mediante el análisis del mtDNA (patrones 1 y 3), aunque el patrón 1 presenta 2 variantes menores (1a y 1b), que se diferencian únicamente en una banda. Sorprende

3. Subdivisión de las cepas en grupos moleculares

En los últimos años, la aplicación de las técnicas moleculares a dado lugar a un gran número de estudios de caracterización sobre las especies de *Colletotrichum* que producen antracnosis en plantas de fresa (Bonde *et al.*, 1991; Sreenivasaprasad *et al.*, 1992, 1994 y 1996; Freeman *et al.*, 1993, 1995; Freeman y Katan, 1997; Brown *et al.*, 1996). Los estudios moleculares revelan una gran variabilidad, sobre todo a nivel subespecífico y nos encontramos ante la necesidad de plantear posibles clasificaciones, pero la delimitación de especies y la definición de grupos y categorías, atendiendo exclusivamente a datos moleculares, puede ser una tarea compleja, en la que resulta conveniente definir una metodología apropiada para relacionar los grupos definidos por datos moleculares con los taxones clásicos.

En este capítulo, abordamos la subdivisión de las cepas de *Colletotrichum* que producen antracnosis en las plantas de fresa en diferentes grupos, a partir de datos moleculares procedentes de distintas técnicas. Estos datos son comparados con estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, llevados a cabo en otros laboratorios que han tomado parte del proyecto europeo que tiene por título "The development of diagnostic methods for the detection of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry plants in Europe", y del cual forma parte el presente trabajo.

3.1. Resultados y grupos resultantes.

Los datos obtenidos en los dos capítulos anteriores mediante el análisis de restricción del rDNA y el empleo de los RAPDs, junto con los resultantes del análisis del DNA mitocondrial y de un estudio isoenzimático realizados en el IMI (International Mycological Institute), revelan la existencia de dos principales agregados de cepas, centrados en las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* respectivamente. La gran variabilidad encontrada dentro de cada uno de estos dos agregados nos lleva a una posterior subdivisión en diferentes grupos (Tabla 8).

3.1.1. *C. acutatum*.

Se han estudiado 52 cepas que la taxonomía clásica incluye bajo el nombre de *C. acutatum* (colonias pálidas, de lento crecimiento y con conidios puntiformes), encontrando tres tipos distintos de cepas mediante los RFLPs del rDNA (tipos I, III y IV) y 2 patrones principales mediante el análisis del mtDNA (patrones 1 y 3), aunque el patrón 1 presenta 2 variantes menores (1a y 1b), que se diferencian únicamente en una banda. Sorprende

por tanto, que se detecta menos variabilidad con el mtDNA que con el rDNA, teniendo en cuenta que el genoma mitocondrial tiene tasas de evolución más altas. No obstante, es necesario indicar que para la restricción del rDNA se han empleado hasta 8 enzimas diferentes, mientras que para la restricción del MtDNA solamente se ha empleado un único enzima. Mediante los marcadores RAPDs se manifiesta una gran variabilidad, encontrando hasta 15 patrones diferentes. De la misma forma, el análisis isoenzimático realizado en un estudio paralelo en el IMI, también revela una gran variabilidad. Se han dividido estas 52 cepas de *C. acutatum* en dos grupos principales denominados ACUT I y ACUT II coincidiendo básicamente con los grupos que hemos llamado grupo invariable y grupo variable mediante el análisis de RAPDs en el capítulo anterior.

Grupo ACUT I

Se trata de un grupo mayoritario de cepas, en las que llama la atención la uniformidad molecular que presentan con todos los marcadores moleculares utilizados. Todas estas cepas fueron similares para el rDNA (tipo I), mtDNA (patrón 1), RAPDs (patrón 1) e isoenzimas (patrón1). No obstante, debido a pequeñas diferencias en algunos patrones, como los del mtDNA, diferenciamos varios subgrupos dentro de este grupo ACUT I. De esta forma, las dos variantes menores del mtDNA (patrones 1a y 1b) dan lugar a los grupos ACUT Ib y ACUT Ic respectivamente. En este último grupo sólo se encuentra la cepa CECT 21012, que presenta todos los patrones del grupo mayoritario, excepto para el mtDNA, que presenta la variante menor 1b. Por último también se ha incluido en este grupo ACUT I la cepa procedente de Japón (Matsmo y Ota., 1992). Su inclusión en este grupo es debido sobre todo a la presencia del tipo I del análisis de rDNA, pues el resto de patrones obtenidos con las otras técnicas son distintos y únicos para esta cepa. En atención a esto, se ha definido el grupo ACUT Id, formado por esta cepa únicamente. La explicación de la variabilidad de ésta cepa en todos los patrones moleculares excepto en el rDNA, podría ser debido a un cambio de huésped hacia los cultivos de fresa.

Grupo ACUT II

Este grupo está formado por el resto de cepas de *C. acutatum* y se corresponde con el grupo variable que definíamos en el capítulo anterior con los marcadores RAPDs y una característica del grupo sería la reproducción sexual de alguna de sus cepas. En este grupo variable consideramos oportuno hacer una segunda división en dos subgrupos, que vienen determinados por los distintos patrones de restricción del RDNA que presentan.

ACUT IIa. Se trata de un grupo de cepas muy variable en el que sólo permanece constante en todo el grupo el patrón para el rDNA (tipo III). Además presenta 2 tipos de mtDNA (patrones 1, 3 y la variante menor 1a), 7 tipos de patrones diferentes de RAPDs (3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) y un gran número de patrones únicos e independientes para los isoenzimas propionil esterasas y acetil esterasas. En este grupo se encuentran las cepas originalmente descritas como *Glomerella miyabeana* que proceden de líneas monospóricas que producen ascas (Jonston y Jones., 1997).

TABLA 8. Subdivisión en grupos moleculares de las cepas de *Colletotrichum*, donde rib es el grupo de ribosomal, mt el grupo de mitocondrial, Rap el grupo de RAPDs, PE propionil esterasas y AE acetil esterasas. U hace referencia a un único patrón para esa cepa y ND significa ausencia de datos.

Grupo	Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	rib	mt	Rap	PE	AE
ACUT Ia	<i>C. acutatum</i>	21001	345028	Colombia	I	1	1	1	1
		21007	360928	Suiza	I	U	1	1	1
		21013	301119	Kenia	I	1	1	1	1
		21014	311744	USA ?	I	1	1	1	1
		21019	324994	USA	I	1	1	1	1
		21020	345027	Francia	I	1	1	1	1
		21021	345031	Italia	I	1	1	1	1
		21027	364856	España	I	1	1	1	1
		21032	324992	USA	I	1	1	1	1
		21033	324995	USA	I	1	1	1	1
		21034	345029	Costa Rica	I	1	1	1	1
		21046	348159	USA	I	1	1	1	1
		21047	348160	USA	I	1	1	1	1
		21052	348177	USA	I	1	1	1	1
		21057	348493	Francia	I	1	1	1	1
		21059	348500	Francia	I	1	1	1	1
		21076	345053	Francia	I	1	1	U	U
21079	348501	Francia	I	ND	1	ND	ND		
ACUT Ib	<i>C. acutatum</i>	21022	345032	Italia	I	1a	1	1	1
		21029	367467	UK	I	1a	1	1	1
		21030	367468	USA	I	1a	1	1	1
		21055	348487	Francia	I	1a	1	1	1
		21058	348496	Francia	I	1a	1	1	1
		21060	348502	Francia	I	1a	1	1	1
		21061	351247	USA	I	1a	1	1	1
		21065	351587	USA	I	1a	1	1	1
		21075	345030	Costa Rica	I	1a	1	1	1
		21080	351254	Costa Rica	I	1a	1	1	U
ACUT Ic	<i>C. acutatum</i>	21012	299103	UK?	I	1b	1	1	1
ACUT Id	<i>C. acutatum</i>	21011	360086	Japón	I	U	2	U	U

TABLA 8. (Continuación).

Grupo	Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	rib	mt	Rap	PE	AE
ACUT IIa	<i>C. acutatum</i>	21000	345026	España	III	3	3	U	U
		21002	345035	Francia	III	3	3	U	U
		21006	345581	N.Zelanda	III	1a	8	1	1
		21009	345033	Australia	III	1a	4	U	U
		21024	345580	N. Zelanda	III	ND	8	1	1
		21028	367466	Holanda	III	3	3	U	U
		21035	345034	Australia	III	1a	5	U	U
		21037	345574	N. Zelanda	III	1a	4	U	U
		21041	345585	N.Zelanda	III	ND	9	1	1
		21043	346326	Australia	III	1	6	U	U
		21062	351255	UK	III	3	7	U	U
		21063	351253	UK	III	ND	3	U	U
		21066	351589	Irlanda	III	3	3	U	U
ACUT IIb	<i>C. acutatum</i>	21018	324993	USA	IV	1b	10	1	1
		21023	345577	N.Zelanda	IV	3	11	4	U
		21038	345575	N.Zelanda	IV	3	12	4	U
		21039	345578	N. Zelanda	IV	U	12	4	U
		21040	345583	N.Zelanda	IV	3	11	4	U
		21056	348489	Francia	IV	3	13	U	U
		21072	348494	Francia	IV	3	13	7	U
		21077	345576	N.Zelanda	IV	ND	14	ND	ND
		21078	348499	Francia	IV	3	15	7	U
FRAG Ia	<i>C. fragariae</i>	21003	345047	USA	II	U	16	U	U
		21010	345049	USA	II	2	17	8	U
		21016	324985	USA	II	2	17	3	U
		21025	348163	USA	II	2	17	5	2
		21026	348168	USA	II	2	17	5	2
		21031	324989	USA	II	2	17	3	U
		21036	345050	USA	II	2	17	U	U
		21042	346325		II	2	17	8	U
		21044	348152	USA	II	2	17	8	U
		21045	348153	USA	II	2	17	8	U
		21048	348167	USA	II	2	17	5	2
		21049	368472	USA	II	2	17	5	2
		21050	348174	USA	II	2	17	5	2
		21051	348175	USA	II	2	17	5	2
		21053	348178	USA	II	2	17	5	2
		21054	348182	USA	II	2	17	5	2
FRAG Ib	<i>G. cingulata</i>	21004	345051	Canada	II	4	18	9	1
		21005	345052	USA	II	4	18	9	1
		21015	324984	USA	II	4	18	9	1
		21017	324988	USA	II	4	19	2	4
		21064	351257	Canada	II	4	18	ND	ND
		21074	324983	USA	II	4	19	2	4
Control	<i>C. coccodes</i>	21008	363581	UK ?	V	5	20	6	3
		21067	363582	UK ?	V	5	20	6	3
Control	<i>C. kahawae</i>	21068	301220	Kenia	VI	U	21	U	U
Control	<i>C. gloeosporo</i>	21073	356878	Italia	VI	U	22	U	U
Control	<i>C. crassipes</i>	21069	309371	Holanda	VII	U	23	U	U
Control	<i>C. falcatum</i>	21070	347765	Bangladesh	VIII	U	24	U	U

3.1.2. ACUT Iib. En este grupo solamente permanece constante el patrón de rDNA (tipo IV), y mediante el resto de marcadores utilizados se detecta una gran variabilidad en las cepas de este grupo. Encontramos 3 tipos de mtDNA, patrones 3, 1b y el patrón único que presenta la cepa CECT 21039. Además, encontramos 6 patrones distintos de RAPDs (10, 11, 12, 13, 14 y 15) y muchos patrones isoenzimáticos diferentes, especialmente mediante acetil esterasas, donde la mayoría de los patrones son únicos y distintos. También se debe destacar que la cepa CECT 21039 (IMI 345578) procede de una línea reproductora sexual. Esta cepa presentaba un patrón de mtDNA único y distinto, aunque comparte patrón de RAPDs con la cepa CECT 21038 (IMI 345575).

3.1.2. C. *fragariae* y C. *gloeosporioides*.

La conclusión obtenida mediante los estudios morfológicos sobre estas cepas es que las dos especies son indistinguibles, tanto en características morfológicas como de cultivo. Sin embargo, los marcadores moleculares nos han permitido diferenciar dos grupos dentro de estas cepas.

Grupo FRAG Ia

En este grupo se encuentran todas las cepas originalmente descritas como *C. fragariae* y los resultados demuestran una gran uniformidad molecular, presentando el mismo patrón de rDNA (tipo II), mtDNA (patrón 2) y de RAPDs (patrón 17). El análisis isoenzimático resulta ser el más variable con un gran número de patrones distintos, especialmente con acetil esterasas. Una excepción al grupo es la cepa CECT 21003 que presenta distinto patrón de mtDNA y RAPDs.

Grupo FRAG Ib

El grupo incluye las 6 cepas originalmente descritas como *G. cingulata*. No podemos diferenciarlas del grupo anterior mediante el patrón de rDNA, presentando ambos grupos el mismo patrón (tipo II), pero sí que podemos diferenciarlas mediante el mtDNA (patrón 4), RAPDs (patrón 18 y 19) e isoenzimas. Además, mediante los marcadores RAPDs encontramos dos tipos distintos, y esto se correlaciona con lo obtenido mediante el análisis isoenzimático, tanto con propionil esterasas como con acetil esterasas.

3.1.3. Cepas control

Las 2 cepas recibidas como *C. coccodes* y estudiadas en este trabajo presentaron los mismos patrones para todos los marcadores utilizados. También se diferenciaron del resto de cepas del trabajo con todas las técnicas utilizadas, de forma que parece que no existen motivos para dudar en su correcta identificación como cepas de *C. coccodes*. Aunque estas cepas fueron aisladas en plantas de fresa, se trata de una especie particularmente asociada a Solanaceas como patatas y tomates. Parece que el hongo tiene la capacidad de permanecer en el suelo durante algún tiempo, después que los cultivos hayan desaparecido, y aparecer más tarde en cultivos posteriores.

El resto de cepas control, las cuales pertenecen a especies distintas cada una de ellas, se diferencian con todas las técnicas moleculares por lo que no existen dudas de su correcta clasificación. Una excepción fue el mismo grupo de DNA ribosomal que presentan *C. kahawae* y *C. gloeosporioides*.

3.2. Comparación morfológica y fisiológica.

Como se ha indicado anteriormente, para la subdivisión en grupos de las cepas de *Colletotrichum* mediante datos moleculares es conveniente relacionar estos resultados con los obtenidos a partir de estudios clásicos. Un estudio morfológico paralelo realizado en la CBS (Centralbureau voor Schimmelcultures), en el que se han utilizado técnicas de análisis de imagen, pone de manifiesto que existen dos tipos de esporas distintas y que la clasificación realizada se ajusta a la tradicional (van der Aa, 1998). En primer lugar, el morfotipo de *C. acutatum* presenta conidios con los extremos en forma de punta, colonias pálidas y de lento crecimiento. En segundo lugar, el morfotipo que se ajusta a *C. gloeosporioides* presenta conidios cilíndricos con extremos redondeados, y las colonias son normalmente oscuras (melanizadas) y de crecimiento relativamente alto. Respecto a las cepas de *C. fragariae*, los resultados indican que no se pueden distinguir de las de *C. gloeosporioides* sensu estricto.

Por otro lado, los estudios fisiológicos y bioquímicos llevados a cabo en la Universidad de Salamanca también están de acuerdo con la división principal en los dos agregados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* que se obtienen mediante los métodos moleculares (García-Muñoz, 1997; García-Muñoz *et al.*, 1998). El dendrograma resultante de los datos fisiológicos muestra que los dos taxones forman dos ramas principales e inalterables por los métodos de análisis numérico. Este tipo de datos carecen de la precisión de los moleculares y no son indicados para realizar estudios taxonómicos

mediante ellos. Sin embargo, la integración de los resultados obtenidos con las técnicas moleculares y los obtenidos con la metodología clásica, es de gran importancia a la hora de mantener una referencia en el proceso de transición de la morfología a los ácidos nucleicos, e imprescindible para una correcta clasificación.

3.3. Discusión

Este estudio nos ha permitido la subdivisión de las cepas de *Colletotrichum* que producen antracnosis en las plantas de fresa en una serie de grupos ordenados jerárquicamente. Además, la división principal de las cepas en dos agregados centrados en las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se encuentra correlacionada tanto con los estudios morfológicos como con los fisiológicos y bioquímicos.

Una de las conclusiones más interesantes de este estudio es el establecimiento de diferentes niveles de resolución para cada una de las técnicas empleadas. Los RFLPs del rDNA delimitan los grupos mas amplios y el nivel de resolución es semejante a la separación clásica entre especies. Mediante los RFLPs del mtDNA obtenemos una separación media. Por último, mediante los patrones isoenzimáticos y de RAPDs conseguimos el mayor poder de resolución, llegando a nivel de cepas de la población. Además se encuentra una gran correlación entre los patrones obtenidos por RAPDs y los isoenzimáticos. Resultados similares se han obtenido en otros trabajos (Bruns *et al.*, 1991; Bridge *et al.*, 1993; Metzzenberg., 1991; Kohn., 1992; Bainbridge., 1994; Grondona *et al.*, 1997).

Como se puede ver, los niveles jerárquicos obtenidos dependen de la técnica empleada, aunque debemos de tener precauciones a la hora de designar diferentes categorías atendiendo exclusivamente a datos moleculares. El nivel de variación molecular no es constante en las cepas de *Colletotrichum* aisladas de diferentes plantas y depende mucho de la técnica empleada (Hodson *et al.*, 1993). En este trabajo resulta sorprendente, que el agregado que forman las cepas de *C. acutatum* presenta mayor variabilidad mediante RFLPs del rDNA que con RFLPs del mtDNA. De cualquier forma, también se han encontrado resultados parecidos en otros géneros de hongos filamentosos (Bridge *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1997).

El agregado de *C. acutatum*

Son bastantes los datos disponibles que indican que *C. acutatum* es un taxón bastante separado de *C. gloeosporioides* y con una gran variabilidad. En estudios anteriores sobre cepas de *C. acutatum* aisladas en diferentes huéspedes y en los que se incluyen algunas cepas aisladas de plantas de fresa se había observado variabilidad

molecular (Sreenivasaprasad *et al.*, 1992, 1994 y 1996; Freeman *et al.*, 1993, 1995; Freeman y Katan, 1997; Brown *et al.*, 1996). En este trabajo se ha puesto de manifiesto que se trata de un grupo de cepas muy heterogéneo, que debería llevar al reconocimiento de un agregado de similar status al ya reconocido para *C. gloeosporioides*.

Para explicar ésta gran variabilidad de la especie *C. acutatum* es necesario tener presente el contraste que presentan los dos grupos principales ACUTI y ACUT II, uno variable y otro invariable. Hasta ahora, nunca se había observado reproducción sexual en la especie *C. acutatum*, pero una excepción puede ser la cepa CECT 21039 procedente de Nueva Zelanda, en la que se observaron estructuras reproductoras, así mismo las cepas originalmente descritas como *G. miyabeana* y que nosotros las hemos reclasificado como *C. acutatum*, proceden también de líneas reproductoras sexuales. Es posible que exista un grupo de cepas de *C. acutatum* que procedan de una línea reproductora sexual difícil de observar, en el que se encontrarían algunas de éstas cepas pertenecientes al grupo variable ACUT II. De este modo, se puede pensar en un tipo de reproducción sexual para este grupo, pues la coincidencia entre su variabilidad y la presencia de ascosporas es demasiado clara para pensar en otras hipótesis. Por otra parte, debido a que la mayoría de las cepas de este grupo variable ACUT II, proceden de Australia y Nueva Zelanda, y como *C. acutatum* se describió originalmente en Australia (Simmonds *et al.*, 1965, 1968), se podría pensar que las cepas Europeas que aparecen incluidas en estos dos grupos ACUT IIa y ACUT IIb tienen también su origen en estos lugares.

Por el contrario, la falta de variación molecular dentro del grupo mayoritario ACUT I podría explicarse argumentando que este grupo puede haber evolucionado recientemente y podría haberse originado del grupo más variable y parcialmente sexual ACUT II. Sin entrar en aspectos evolutivos, la falta de variabilidad molecular del grupo ACUT I puede indicarnos que se trata de un mismo tipo de cepa, y dada su amplia distribución geográfica, esto puede significar que el grupo ACUT I puede ser resultante de la introducción del patógeno desde una única fuente y a través del material vegetal infectado. La introducción de *C. acutatum* en plantaciones de fresa en Israel desde USA, es una conclusión a la se llega mediante técnicas moleculares (Freeman y Katan., 1997). Si esta última hipótesis es verdadera, este hecho nos revela las importantes deficiencias que existen actualmente respecto al control del movimiento de material vegetal entre distintas zonas y que por tanto se debe hacer un gran esfuerzo en este tema. Además, un gran número de las cepas de este grupo proceden de Europa y Norte América, lo que podría indicar que este tipo fuese el causante de las virulentas antracnosis producidas por el patógeno *C. acutatum* en estas zonas. Desgraciadamente no disponemos de datos

referentes a los daños producidos en los cultivos de los que fueron aisladas. Así mismo, los datos de los test de patogenicidad realizados con estas cepas no han sido concluyentes (Romero *et al.*, 1997).

Finalmente, creemos que podría ser acertado reorganizar las cepas de estos dos grupos ACUT IIa y ACUT IIb en una entidad o en entidades independientes de las cepas de *C. acutatum* del grupo ACUT I. Tanto desde el punto de vista taxonómico como práctico, sería importante reconocer estas cepas como grupos subespecíficos. De cualquier forma, antes de dar este paso se debería comparar las cepas aisladas de fresa con las de otros huéspedes, especialmente con las aisladas de *Carica papaya*. Simmonds, (1965) estableció un rango de huéspedes para *C. acutatum* que incluyen papaya, fresa y tomate, y designó como cepa tipo la de *Carica* (Simmonds *et al.*, 1968). Una cepa adecuada para este estudio podría ser la cepa CBS 294.67, que no ha sido incluida en este trabajo (Anon *et al.*, 1987)

***C. fragariae* y *C. gloeosporioides*.**

Tradicionalmente *C. fragariae* se ha separado de *C. gloeosporioides* atendiendo a criterios clásicos, como la ausencia del teleomorfo *G. cingulata*, diferencias de forma y tamaño de los conidios y los test de patogenicidad (Gunnell y Gubler., 1992, 1978). Sin embargo, por medio de estos criterios clásicos no se ha podido diferenciar entre las cepas pertenecientes a estas dos especies (van der Aa, 1998). Mientras que algunas cepas de *C. fragariae* presentan conidios ligeramente afilados como estos autores describen, también ocurría lo mismo en cepas de *C. gloeosporioides* y además esto resulta muy común en otras cepas no aisladas de fresa. La presencia de estructuras reproductoras sexuales es también un criterio utilizado en la diferenciación de cepas de *Colletotrichum*, pero las cepas utilizadas en este estudio no lo presentaron. La producción de ascas en el laboratorio es muy variable en las cepas de *Colletotrichum* y muchas cepas pierden esta capacidad después de varias resiembras, por lo que la ausencia del estado perfecto o teleomorfo no puede ser un criterio válido para la diferenciación. Por otra parte, otros criterios válidos en diferenciación, como es el nivel de producción de esporas, han sido bastante inseguros (Howard y Albregts., 1983).

Con la llegada de las técnicas moleculares y su aplicación en la diferenciación e identificación de cepas fúngicas se ha podido diferenciar claramente entre ambas especies (Bonde *et al.*, 1991, Freeman *et al.*, 1993, Freeman *et al.*, 1995). En este trabajo se ha conseguido diferenciar las cepas originalmente descritas como *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* mediante la restricción del DNA mitocondrial, los marcadores RAPDs y los patrones isoenzimáticos, pero no se ha podido hacerlo mediante la restricción del RDNA, presentado ambas el mismo tipo (II). Este último dato estaría de acuerdo con la

semejanza morfológica y con las conclusiones a las que se llega mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas (García-Muñoz, 1997; García-Muñoz *et al.*, 1998). La integración de todos estos resultados en conjunto y el diferente tipo (II) que presentan estas cepas respecto la cepa tipo de *C. gloeosporioides* aislada de cítricos (CECT 21073), nos lleva a pensar que las cepas de *C. fragariae* y las cepas de *C. gloeosporioides* aisladas de plantas de fresa pertenecen a un mismo grupo, el cual sería diferente del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*.

El empleo de un gran número de técnicas moleculares diferentes confirma la menor variabilidad de estas cepas respecto a la especie *C. acutatum*, aunque como ya se dijo en el capítulo anterior el número de cepas analizadas es menor y su procedencia geográfica es menos diversa. Del mismo modo que ocurre en la especie *C. acutatum*, la mayor variabilidad del grupo FRAGIb, compuesto por las cepas originalmente descritas como *C. gloeosporioides* y por tanto con presencia de estructuras reproductoras, podría deberse a un tipo de reproducción sexual. Por el contrario la falta de variabilidad molecular del grupo FRAGIa, donde se encuentran las cepas originalmente descritas como *C. fragariae*, podría ser debida a un tipo reproducción asexual o clonal.

4. Secuenciación de las cepas de *Colletotrichum*

La caracterización molecular de los capítulos anteriores ha dado como resultado una gran variabilidad de las cepas de *Colletotrichum* estudiadas, la cual nos han llevado a la división de éstas en una serie de grupos ordenados jerárquicamente. Sin embargo, la verdadera categoría taxonómica de estos grupos es difícil de establecer.

Los estudios filogenéticos basados en secuencias del rDNA están teniendo un gran impacto en la taxonomía del género *Colletotrichum*, permitiendo determinar de forma más precisa las relaciones entre los distintos grupos principales y especies (Sherriff *et al.*, 1994; Sreenivasaprasad *et al.*, 1996a; Jonston y Jones 1997). Estas filogenias están realizadas desde un punto de vista muy general, incluyendo en los análisis un gran número de especies diferentes. Sherriff *et al.* (1994), usando secuencias del rDNA 28S y de las regiones ITS de un amplio grupo de especies del género, obtuvieron como resultado dos grupos principales. En el primer grupo se incluyó las especies *C. lindemutihanum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* y *C. trifoli*, que fue distinto del resto de especies analizadas que forman el segundo de los grupos. Cabe destacar las tres líneas diferentes que se observaron dentro de la especie *C. gloeosporioides*. Sreenivasaprasad *et al.* (1996), llevaron a cabo un análisis de 18 especies diferentes del género, basado principalmente en la región intergénica ITS2, que les permitieron agruparlas en 6 grupos filogenéticos distintos. En este último trabajo se incluyeron algunas cepas procedentes de plantas de fresa, obteniendo como resultado bastante divergencia entre las cepas de la especie *C. acutatum* y muy poca entre especies como *C. fragariae*, *C. kahawae* y *C. gloeosporioides*. Finalmente, mediante el análisis filogenético del gen que codifica para el RNA 28 S, también se ha encontrado divergencia entre las cepas de la especie *C. acutatum* aisladas de distintos huéspedes (Jonston y Jones., 1997).

Con el fin de profundizar en las relaciones entre los grupos moleculares definidos en el anterior capítulo, nos planteamos llevar a cabo un análisis filogenético mediante la secuenciación del fragmento de rDNA que incluye el gen que codifica para el RNA 5,8S y las dos regiones intergénicas ITS1 e ITS2, de todas aquellas cepas que presentaron variabilidad molecular.

4.1. Selección de cepas para secuenciar

La selección de cepas a secuenciar se llevó a cabo atendiendo a los patrones de RAPDs y de restricción del DNA mitocondrial con el enzima *Hae* III (Tabla 9). De todos aquellos grupos de cepas que presentaron patrones distintos con estos marcadores, se seleccionó una cepa como representante. Así, ACUT Ila y ACUT Iib son los grupos de los que mayor número de cepas se ha secuenciado debido a la gran variabilidad que mostraron, especialmente mediante los marcadores RAPDs. Por otra parte, con el fin de comprobar si las cepas que presentaron los mismos patrones moleculares tenían también la misma secuencia, de aquellos grupos más numerosos se secuenció más de una cepa, procurando que éstas tuviesen distintos orígenes geográficos.

TABLA 9. Referencia de las cepas de *Colletotrichum* seleccionadas para secuenciar.

Grupo*	Especie	CECT	IMI	Origen geográfico	RDNA	Hae III grupo	RAPDs grupo
ACUT Ia	<i>C. acutatum</i>	21007	360928	Suiza	I	U	1
		21020	345027	Francia	I	1	1
		21047	348160	USA	I	1	1
ACUT Ib		21065	351587	USA	I	1a	1
		21075	345030	Costa Rica	I	1a	1
ACUT Ic		21012*	299103	UK?	I	1b	1
ACUT Id		21011*	360086	Japón	I	U	2
ACUT Ila	<i>C. acutatum</i>	21000	345026	España	III	3	3
		21006	345581	N. Zelanda	III	1a	8
		21009*	345033	Australia	III	1a	4
		21028	367466	Holanda	III	3	3
	<i>C. miyabeana</i>	21035*	345034	Australia	III	1a	5
		21041*	345585	N. Zelanda	III	sin datos	9
		21043	346326	Australia	III	1	6
		21062	351255	UK	III	3	7
ACUT Iib	<i>C. acutatum</i>	21018	324993	USA	IV	1b	10
		21023	345577	N. Zelanda	IV	3	11
		21038	345575	N. Zelanda	IV	3	12
		21056	348489	Francia	IV	3	13
		21072	348494	Francia	IV	3	13
		21077	345576	N. Zelanda	IV	sin datos	14
		21078*	348499	Francia	IV	3	15
FRAG Ia	<i>C. fragariae</i>	21003*	345047	USA	II	?U	16
		21010	345049	USA	II	2	17
		21048*	348167	USA	II	2	17
FRAG Ib	<i>C. gloeosporioides</i>	21004	345051	Canada	II	4	18
		21005	345052	USA	II	4	18
		21074*	324983	USA	II	4	19
Control	<i>C. coccodes</i>	21008*	363581	UK ?	V	5	20
Control	<i>C. kahawae</i>	21068*	301220	Kenya	VI	U	21
Control	<i>C. gloeosporioides</i>	21073*	356878	Italia	VI	U	22
Control	<i>C. crsipipes</i>	21069*	309371	Holanda	VII	U	23
Control	<i>C. falcatum</i>	21070*	347765	Bangladesh	VIII	U	24

* Cepas con las que se ha realizado el análisis filogenético.

4.2 Secuencias y alineamientos

Atendiendo a los criterios de selección seguidos, se ha secuenciado un total de 33 cepas y su distribución por grupos moleculares es la siguiente: 7 cepas de *C. acutatum* grupo ACUT I, 8 de *C. acutatum* grupo ACUT IIa, donde se incluyen las cepas originalmente descritas como *G. miyabaena* CECT 21006 y CECT 21041, 7 de *C. acutatum* grupo ACUT IIb, 3 de *C. fragariae* grupo FRAG Ia, 3 de *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) grupo FRAG Ib y finalmente 5 cepas de *Colletotrichum* incluidas como control pertenecientes a las especies *C. coccodes*, *C. kahawae*, *C. gloeosporioides*, *C. crassipes* y *C. falcatum*. Para poder comparar con otras especies, se han incluido en el alineamiento diferentes secuencias de *Colletotrichum* obtenidas de las bases de datos (Gen Bank), que se corresponden con las especies siguientes: *C. coccodes* NFT, *C. trifoli* 164, *C. lagenarium* 73, *C. fragariae* 63-1, *C. gloeosporioides* 231, *C. gloeosporioides* 503, *C.*, *C. musae* 4Q. *C. fuscus* 120, *C. acutatum* 397 y *C. acutatum* N190. En la figura 13 se muestran los alineamientos de las secuencias de este trabajo, donde se puede comprobar que muchas de estas secuencias resultaron ser iguales, por este motivo, y con el fin de facilitar el trabajo, en el análisis solamente se incluye una secuencia representante de los grupos de secuencias que fueron iguales (cepas señaladas con un asterisco en la Tabla 9).

4.3. Descripción de las secuencias

Como ya se ha indicado en el apartado 16 de Materiales y Métodos se ha secuenciado el fragmento del DNA ribosomal que incluye las dos regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y el gen que codifica para el RNA 5,8S (Figura 3). La longitud de las secuencias es uniforme dentro de las especies y puede variar ligeramente entre especies distintas. Así, las secuencias tienen una longitud comprendida entre 491 y 476 pb. La región ITS1 comprende hasta el nucleótido 188, el gen que codifica para el RNA 5,8S comprende desde la posición 189 hasta la posición 346 y por último la región intergénica ITS2, que es más pequeña que la ITS1, comprende desde la posición 347 hasta la 501.

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de *Colletotrichum* donde se incluye las dos regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y el gen que codifica para el RNA 5.8S. El final de la región ITS1 (posición 167) y el principio de la ITS2 (posición 346) están indicados en la figura.

	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1 1111111111	1111111111
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
acu397	CTGAGTTAC-	CGCTCTATAA	CCCTTTGTGA	ACATACCTAA	C--CGTTGCT	TCGGCGGGCA	GGGGAAGCCT	CTCGCGGGCC	TCCCCTCCCG	GCGCCGGCCC	CCACCACGGG	GACGGGGCGC
acuN190C..T....G	GA.....	...-.C.G..	..GT.....	.G...A....
21020
21047
21007
21065
21075
21012
21011
21009C..G....
21035
21043
21000C..T....G	GA.....	...-.C.G..	..GT.....	.G...A....
21028C..T....G	GA.....	...-.C.G..	..GT.....	.G...A....
21062C..T....G	GA.....	...-.C.G..	..GT.....	.G...A....
21006C..G	A.....	...-.C.G..	..T.....	.G...A....
21041C..G	A.....	...-.C.G..	..T.....	-.A....
21018G....
21038G....
21023G....
21056G....
21072G....
21077G....
21078G....
21010TA.C..C	AACT.....T.	..TCCC.G.	G-----	-A.....	..CT.CCG..	..C.-G..C	.GGTC.....
21048TA.C..C	AACT.....T.	..TCCC.G.	G-----	-A.....	..CT.CCG..	..C.-G..C	.GGTC.....
21003TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.G.	G-----	-A.....	..CT.CCG..	..CG---.C	.GGTC.....
fra63-1TA.C..C	AACT.....T.	..TCCC.G.	G-----	-A.....	..CT.CCG..	..C---.C	.GGTC.....
glo503TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.G.	G-----	-A.....	..CT.CCG..	..CG---.C	.GGTC.....
21004TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.....	..CT.CCG..	T.CG---.C	.GGTC.....
21005TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.....	..CT.CCG..	T.CG---.C	.GGTC.....
21074TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.....	..CT.CCG..	T.CG---.C	.GGTC.....
glo231TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.....	..CT.CCG..	T.CG---.C	.GGTC.....
glo501TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.A.....	..CT.CCG..	..CG---.C	.GGTC.....
21008TGT...GA.C-.T...	T---.....	--...A....
cocNFTTGT...G	..CT...A.C-.T...	T---.....	--...A....
21068	GA.....C..T	AACT.....T.	..TCTC-G.	G-----	-A.....	..CT.CCG..	..CG---.C	.GGTC.....
21073TA.C..C	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.....	..CT.CCG..	T.CG---.C	.GGTC.....
21069-A.G	A.T.....GCC.TC	GC-----	-GGG.C...	..C...CT.A	.GCG-----	.GGC.TC...
21070TAAC..C.TTC	..CGC...	..C.G....-	-G...C..AT	..C.G.C...	T.C.----.G.C.AA...
musae4QTA.GC..T	AACT.....T.	..TCCC.G.	G-----	-A.....	..C..CCG..	..CG----.C	.CGTC.....
fuscl20TA.C..T	AACT.....T.	..TCTC.GC	G-----	-A.....	..CT.CCG..	T.CG---C.	.GGTC.....
trif164TA.C..GA.GTC.GC	G-----C...	..C-.C..T	G-----	--.....
lage73TAAGA.GTC.GC	G-----C...	..C-.C..T	G-----	--.....A....

Figura 13. Continuación

	3333333333	3333333333	3333333333	3333333334	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444
	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990			
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
acu397	CGCTTGGTTT	TGGGCC-CC	ACGGCACACG	TGGGCCCTTA	AAGGTAGTGG	CGGACCCTCC	CGGAGCCTCC	TTTGCCTAGT	AACTA-ACGT	CTCGCACTGG	GATTCGGAGG	GACTCTTGCC	GTAACACCCC	CAAATTTTTT			
acuN190CG..C.....T.....
21020
21047
21007
21065
21075
21012
21011C.....
21009G..C.....C..
21035C.....C.....
21043C.....C.....
21000CG..C.....T.....
21028CG..C.....T.....
21062CG..C.....T.....
21006CG..C.....T.....
21041CG..C.....T.....
21018CG..C.....T.....C..
21038CG..C.....T.....C..
21023CG..C.....T.....C..
21056CG..C.....T.....C..
21072CG..C.....T.....C..
21077CG..C.....T.....C..
21078CG..C.....T.....C..
21010	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21048	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21003	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
fra63-1	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
glo503	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21004	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21005	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21074	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
glo231	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
glo501	T.....G..T..A..TG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21008	T.....G..TTG..	A.....C..T.....C.....
cocNFT	T.....G..TTG..	A.....C..T.....C.....
21068	T.....G..TG..	A.....C..TT.....C.....C...CC
21073	T.....G..T..A..CG.T.	A.....C..TT.....C.....C...CC
21069	T.....G..T..TTG..	A.....CC..AC.....TT-T..C.....T..A..T.....C...CC
21070	G.....G..A..T..TCG..	A.....C..TC..C.....C.....C...C..
musae4Q	T.....G..T..A..T..	A.....C..TT.....C.....C...C..
fusc120	T.....G..T..A..CG.T.	A.....C..TT.....C.....C...C..
trif164CG..TT..TG..AC..G.....ATAC.ACC.....CC..C..C...C..C...C..C...C..
lage73CG..TT..TG..AC..G.....ATAC.ACC.....CC..C..C...C..C...C..C...C..

4.3.1. Posiciones variables e informativas.

De los 501 nucleótidos que presenta el alineamiento de las secuencias, se observan 101 sitios variables (20.15%), de los cuales 83 son informativos filogenéticamente (16,56%). Cuando estos cálculos se hacen con las distintas regiones por separado, los porcentajes cambian, ajustándose éstos a las dos tipos de regiones que presenta el fragmento de rDNA secuenciado, las regiones intergénicas que son más variables y la región codificante que es una zona conservada y que presenta un menor número de sustituciones. De los 189 nucleótidos que presenta la región intergénica ITS1, 60 son variables (31.74%) y de éstos 47 son informativos (22.75%). En la región ITS2 que contiene un total de 154 nucleótidos se encuentran 37 sitios variables (24.02%) y de éstos 33 son informativos (21.42%). Por último, el gen que codifica para el RNA 5.8S contiene un total de 158 nucleótidos de los cuales 4 son variables (2.53%) y 3 son informativos (1.89%).

4.3.2. Composición nucleotídica de las secuencias.

La composición nucleotídica de las secuencias de *Colletotrichum* está bastante compensada con un 54.2% de contenido promedio en C+G y 45.8% de A+T y sin aparecer diferencias significativas entre especies distintas. En la tabla 10 se presentan los resultados de la composición nucleotídica de todas las secuencias de *Colletotrichum* analizadas.

4.4. Tasas de evolución.

4.4.1. Estimaciones de tasas de sustitución nucleotídica y patrones de divergencia

La corrección de las distancias nucleotídicas depende del modelo de evolución asumido para determinar cual es el más apropiado. Los criterios para la elección de un método de estimación adecuado propuestos por Kumar *et al.* (1993) dependen principalmente de lo divergentes que puedan ser las secuencias, de la razón de transiciones/transversiones y de la composición nucleotídica. Así, se recomienda utilizar el modelo de Jukes-Cantor (Jukes-Cantor, 1969), que asume igual probabilidad de cambio para cada uno de los nucleótidos, cuando la estimación de distancias es de $0.05 < d < 0.3$ y el sesgo transicional no es muy alto ($R < 2$). En la tabla 11 se muestran las distancias de Jukes-Cantor, donde se puede observar que estas distancias oscilan entre

TABLA 11. Matriz de distancias de Jukes-Cantor entre todos los pares de secuencias de *Colletotrichum*. En el primer grupo se encuentran las secuencias pertenecientes a *C. acutatum* y en el segundo grupo las cepas de *C. fragariae* y *G. cingulata*. Intercalado entre las cepas de ambos grupos se encuentran secuencias pertenecientes a estas especies recogidas de la base de datos (Gen Bank). En el último grupo se encuentran las cepas de *C. coccodes*, las cuatro cepas control y otras secuencias que pertenecen a especies distintas recogidas de la base de datos. En la hemimatriz superior se representan las estimas de distancias y en la hemimatriz inferior los errores estándar de las mismas (valores obtenidos mediante el programa MEGA).

OTUs	acut397	acutN190	21012	21011	21009	21035	21043	21062	21041	21078	21048	21003	frag63-1	glo503	21074	glo231	glo501	21008	cocNFT	21068	21073	21069	21070	msae4Q	fusc120	trif164	ls	
acut397		0.031	0.002	0.004	0.012	0.006	0.006	0.033	0.027	0.014	0.112	0.113	0.110	0.113	0.115	0.115	0.122	0.051	0.056	0.108	0.118	0.126	0.106	0.103	0.115	0.100	0.	
acutN190	0.008		0.033	0.036	0.027	0.033	0.034	0.002	0.010	0.029	0.101	0.098	0.098	0.103	0.106	0.106	0.108	0.063	0.067	0.094	0.101	0.126	0.106	0.101	0.099	0.103	0.	
21012	0.002	0.008		0.002	0.010	0.004	0.004	0.031	0.025	0.012	0.115	0.115	0.112	0.115	0.118	0.118	0.125	0.049	0.058	0.110	0.120	0.124	0.109	0.106	0.118	0.103	0.	
21011	0.003	0.009	0.002		0.012	0.002	0.002	0.033	0.027	0.014	0.113	0.113	0.110	0.113	0.115	0.115	0.123	0.051	0.060	0.108	0.118	0.124	0.111	0.103	0.116	0.100	0.	
21009	0.005	0.008	0.005	0.005		0.010	0.010	0.025	0.021	0.010	0.108	0.108	0.105	0.113	0.115	0.115	0.113	0.054	0.062	0.103	0.113	0.124	0.106	0.106	0.111	0.103	0.	
21035	0.004	0.008	0.003	0.002	0.005		0.000	0.031	0.025	0.012	0.110	0.110	0.108	0.110	0.113	0.113	0.120	0.054	0.062	0.106	0.115	0.126	0.109	0.101	0.113	0.098	0.	
21043	0.004	0.008	0.003	0.002	0.005	0.000		0.031	0.025	0.012	0.110	0.111	0.108	0.111	0.113	0.113	0.121	0.054	0.063	0.106	0.116	0.127	0.109	0.101	0.113	0.098	0.	
21062	0.008	0.002	0.008	0.008	0.007	0.008	0.008		0.008	0.027	0.103	0.101	0.101	0.106	0.108	0.108	0.110	0.060	0.069	0.096	0.103	0.124	0.109	0.103	0.101	0.105	0.	
21041	0.008	0.005	0.007	0.008	0.007	0.007	0.007	0.004		0.021	0.108	0.106	0.105	0.110	0.113	0.113	0.115	0.056	0.065	0.101	0.108	0.126	0.111	0.106	0.106	0.105	0.	
21078	0.005	0.008	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.008	0.007		0.117	0.118	0.115	0.118	0.120	0.120	0.122	0.056	0.065	0.113	0.120	0.126	0.109	0.115	0.118	0.105	0.	
21048	0.016	0.015	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016	0.017		0.006	0.002	0.010	0.013	0.013	0.015	0.092	0.087	0.019	0.010	0.085	0.110	0.019	0.019	0.122	0.	
21003	0.016	0.015	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016	0.017	0.004		0.006	0.004	0.006	0.006	0.008	0.088	0.083	0.013	0.008	0.087	0.113	0.017	0.013	0.120	0.	
frag63-1	0.016	0.015	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016	0.016	0.002	0.004		0.010	0.013	0.013	0.015	0.090	0.085	0.019	0.010	0.085	0.110	0.019	0.019	0.122	0.	
glo503	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.005	0.003	0.005		0.006	0.006	0.013	0.088	0.083	0.017	0.013	0.087	0.113	0.021	0.017	0.120	0.	
21074	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.005	0.004	0.005	0.004		0.000	0.010	0.083	0.078	0.019	0.006	0.085	0.110	0.023	0.010	0.115	0.	
glo231	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.005	0.004	0.005	0.004	0.000		0.010	0.083	0.078	0.019	0.006	0.085	0.110	0.023	0.010	0.115	0.	
glo501	0.017	0.016	0.017	0.017	0.016	0.017	0.017	0.016	0.017	0.017	0.006	0.004	0.006	0.005	0.005	0.005		0.095	0.090	0.021	0.013	0.089	0.122	0.025	0.017	0.125	0.	
21008	0.011	0.012	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.012	0.011	0.011	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015		0.008	0.083	0.088	0.089	0.086	0.093	0.086	0.108	0.	
cocNFT	0.011	0.012	0.011	0.011	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.014	0.004		0.078	0.083	0.091	0.082	0.088	0.081	0.105	0.	
21068	0.016	0.015	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.015	0.016	0.006	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.014	0.013		0.021	0.090	0.118	0.030	0.025	0.125	0.	
21073	0.017	0.015	0.017	0.017	0.016	0.017	0.017	0.016	0.016	0.017	0.005	0.004	0.005	0.005	0.004	0.004	0.005	0.014	0.014	0.007		0.087	0.110	0.023	0.008	0.120	0.	
21069	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014		0.123	0.094	0.092	0.138	0.	
21070	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.014	0.014	0.017	0.016	0.017		0.113	0.108	0.130	0.	
msae4Q	0.016	0.015	0.016	0.016	0.016	0.015	0.015	0.016	0.016	0.017	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007	0.007	0.015	0.014	0.008	0.007	0.015	0.016		0.019	0.127	0.	
fusc120	0.017	0.015	0.017	0.017	0.016	0.016	0.016	0.015	0.016	0.017	0.006	0.005	0.006	0.006	0.005	0.005	0.006	0.014	0.014	0.007	0.004	0.015	0.016	0.006		0.117	0.	
trif164	0.015	0.016	0.016	0.015	0.016	0.015	0.015	0.016	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.016	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.018	0.018	0.017		0.
lage73	0.015	0.016	0.016	0.015	0.016	0.015	0.015	0.016	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.016	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.018	0.018	0.017	0.004	

Tabla 10. Composición nucleotídica y longitud de las secuencias de *Colletotrichum*

secuencia	CECT	IMI	A%	T%	C%	G%	Longitud pb
<i>acu397</i>			22.8	22.6	29.5	25.1	491
<i>acuN190</i>			22.4	22.7	29.0	25.9	490
<i>C. acutatum</i>	21012	299103	22.8	22.8	29.3	25.1	491
	21011	360086	22.7	22.9	29.4	25.1	490
	21009	345033	22.7	22.2	29.6	25.5	490
	21035	345034	22.7	22.7	29.6	25.1	490
	21043	346326	22.7	22.7	29.4	25.2	489
	21062	351255	22.4	22.9	28.8	25.9	490
	21041	345585	22.7	22.7	29.2	25.5	490
	21078	348499	22.2	22.6	29.7	25.5	491
<i>C. fragariae</i>	21048	348167	21.9	24.4	29.0	24.6	483
	21003	345047	22.0	24.9	28.4	24.7	482
<i>fra63-1</i>			21.9	24.4	29.2	24.4	483
<i>glo503</i>			21.9	25.1	28.2	24.8	483
<i>C. gloeosporioides</i>	21004	345051	22.0	25.1	28.2	24.7	482
	21005	345052	22.0	25.1	28.2	24.7	482
	21074	324983	22.0	25.1	28.2	24.7	482
<i>glo231</i>			21.9	25.1	28.4	24.6	483
<i>glo501</i>			22.2	24.2	28.8	24.8	483
<i>C. coccodes</i>	21008	363581	22.4	25.1	27.5	25.1	483
<i>cocNFT</i>			22.1	24.8	27.9	25.2	484
<i>C. kahawae</i>	21068	301220	22.0	24.5	28.5	24.9	481
<i>C. gloeosporioides</i>	21073	356878	22.0	24.5	28.0	24.7	482
<i>C. crasipes</i>	21069	309371	22.5	24.8	27.7	25.0	476
<i>C. falcatum</i>	21070	347765	21.8	23.2	30.0	25.1	487
<i>musae4Q</i>			22.0	24.5	28.9	24.5	481
<i>fusc120</i>			22.0	24.9	28.5	24.5	481
<i>trif164i</i>			22.4	22.2	31.2	24.3	474
<i>lage73</i>			22.9	22.3	30.5	24.2	475
<i>media</i>			22.3	23.5	29.1	25.1	

0.0020 y 0.1056, y siempre son menores de 0.3, y la razón entre transiciones y transversiones presenta valores entre 0.5 y 5.02, con un valor medio aproximado de 1 (Tabla 12).

Por último, de la comparación de las secuencias se puede determinar los patrones de sustitución nucleotídica en la evolución del rDNA en las especies de *Colletotrichum*. La tabla 12 recoge las relaciones entre transiciones y transversiones entre los pares de secuencias, donde se puede observar que los mayores valores de la relación transiciones/transversiones se dan en secuencias poco divergentes como por ejemplo entre las cepas de *C. acutatum* CECT 21012, representante del grupo mayoritario, y la cepa CECT 21009 o entre las cepas CECT 21041 y *acu397*, con valores ambas, de 4.003. De igual manera, en las cepas poco divergentes de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* ocurre lo mismo, y así encontramos valores de 5.02 entre las cepas de *C. fragariae* CECT 21048 y las cepas de *G. cingulata* CECT 21074. A medida que aumenta la divergencia, las transversiones enmascaran las transiciones llegando a superarlas.

4.5. Relaciones filogenéticas y árboles obtenidos

De forma general se puede decir que existen tres grandes tipos de reconstrucciones filogenéticas. La primera de ellas es la basada en distancias, la segunda es la basada en caracteres, entre la que destaca los métodos de parsimonia, y por último, la aproximación a la inferencia filogenética basada en métodos estadísticos, donde predominan los métodos de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981; Saitou., 1990).

En nuestro análisis filogenético hemos realizado las tres aproximaciones anteriores a partir de la misma fuente de resultados, obteniendo como resultado árboles filogenéticos muy parecidos. Por este motivo decidimos llevar a cabo el análisis únicamente con los métodos basados en distancias.

Para llevar a cabo el análisis filogenético mediante estos métodos, es necesario realizar un paso previo en el que se deben transformar los datos en distancias. Como se ha dicho anteriormente, las distancias se han estimado mediante el modelo de Jukes-Cantor y a partir de aquí se ha realizado un árbol mediante el método del vecino más próximo (Neighbor-Joining), el cual utiliza un algoritmo de construcción de árboles sin asumir tasas constantes (Figura 15). Para comprobar la fiabilidad del árbol, se realizó un procedimiento de remuestreo por el método de "bootstrap"(Felsenstein, 1985), donde se realizaron 1000 remuestreos para que los resultados fueran estadísticamente fiables. Los valores obtenidos se señalan en los nodos del árbol.

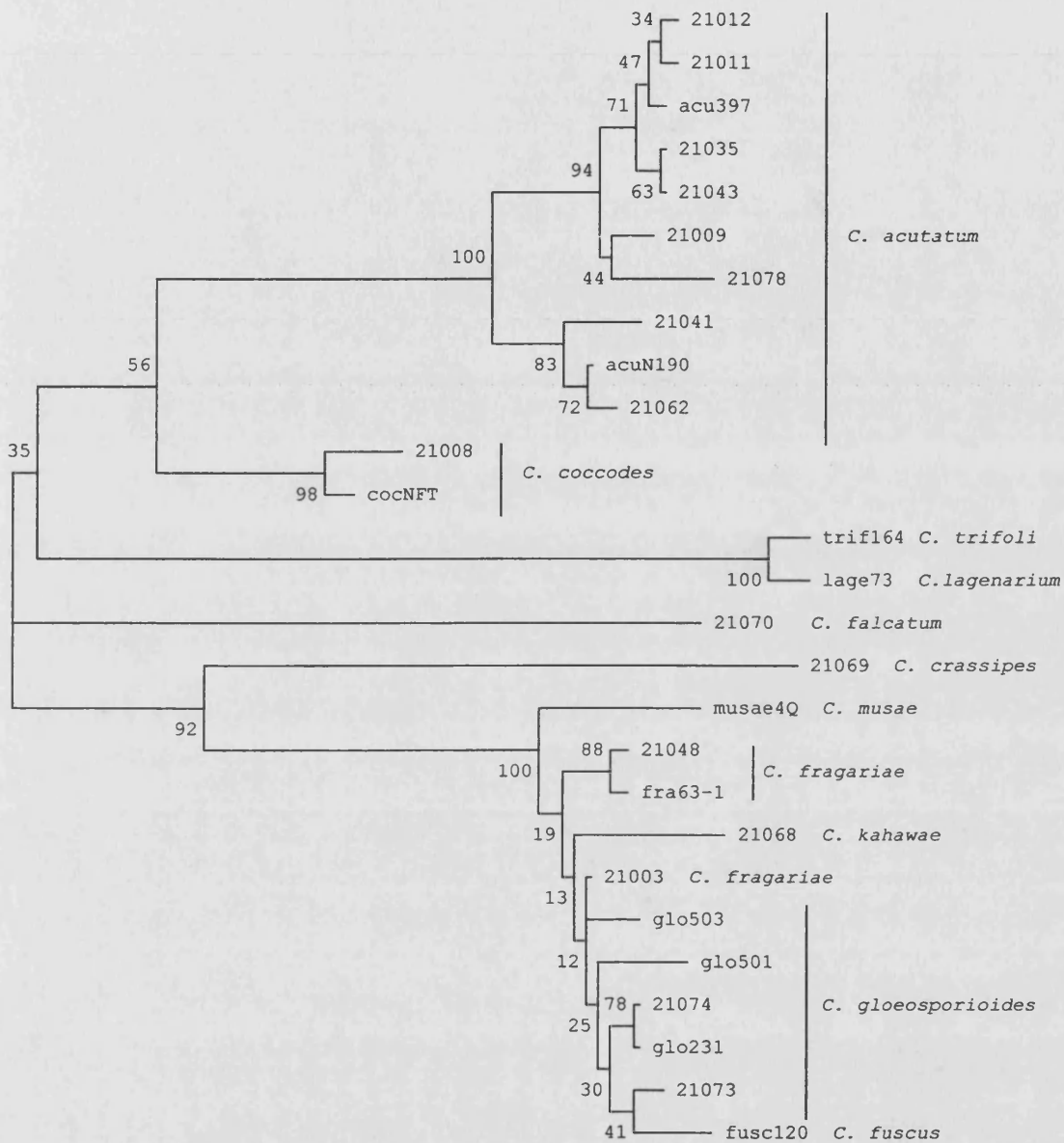


Figura 15. Arbol filogenético sin raíz obtenido mediante el análisis según el método del vecino más próximo (neighbor joining method), utilizando el modelo de Jukes-Cantor como modelo para estimar las distancias. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que aparece la agrupación determinada al realizar el análisis por remuestreo de 1000 réplicas según el modelo de "bootstrap". En el árbol se incluyen las secuencias pertenecientes a las cepas utilizadas como control, así como las secuencias de otras especies de *Colletotrichum* obtenidas de la base de datos. De las secuencias que resultaron ser iguales, sólo se incluye una como representante.

Del árbol obtenido mediante el método del vecino más próximo se pueden establecer las siguientes agrupaciones:

- a) De forma general encontramos dos grandes grupos, por una parte todas las secuencias que pertenecen a la especie *C. acutatum* y por otra las secuencias de las especies *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) y *C. fragariae*, que aparecen muy cercanas.
- b) Dentro de las cepas de *C. acutatum* encontramos dos agrupaciones principales:
1. En este grupo determinado por un valor de bootstrap de 94 %, encontramos hasta 3 subgrupos distintos. En primer lugar un subgrupo que presenta un valor de bootstrap del 47% donde se encuentran todas las cepas pertenecientes a los grupos ACUT Ia, ACUT Ib y ACUT Ic, secuencias que resultaron ser todas iguales y están representadas en el árbol por la cepa CECT 21012, la cepa CECT 21011 representante del grupo ACUT Id y la cepa de referencia *C. acutatum* 397. Un segundo subgrupo con un valor de bootstrap del 63% formado por las cepas CECT 21035 y CECT 21043 pertenecientes al grupo ACUT IIa. El tercer subgrupo presenta un valor de bootstrap del 44 % y estaría formado por la cepa CECT 21009 perteneciente al grupo ACUT IIa y la cepa CECT 21078, que representa al grupo ACU IIb, donde las 7 cepas secuenciadas fueron iguales.
 2. El segundo grupo está determinado por un valor bootstrap de 83 %, y en él aparecen 3 secuencias distintas pertenecientes al grupo ACUT IIa. En primer lugar tenemos una agrupación con un valor de bootstrap del 72 %, donde se encuentran las cepas CECT 21062 y la cepa referencia acuN1190. Muy cercana a estas dos cepas se encuentra la cepa CECT 21041, representante de las cepas originalmente descritas como *Glomerella miyabaena*.
- c) Respecto a las secuencias pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*), se puede decir que en general los niveles de significación no son lo suficientemente grandes como para separar claramente de las especies *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*. Se puede considerar que todas estas cepas forman un único grupo junto con las cepas de referencia *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*. A pesar de esto, se pueden observar algunas pequeñas diferencias:



1. Las cepas de *C. fragariae* del grupo FRAG la representada por la cepa CECT 21048 forman un grupo junto con la cepa de referencia *C. fragariae* 63-1. En cambio la única cepa de *C. fragariae* CECT 21003 que presentaba un patrón de RAPDs distinto aparece mas cerca de la cepa de referencia *C. gloeosporioides* 503.
 2. Las cepas de *C. gloeosporioides* del grupo FRAG Ib, representadas por la cepa CECT 21074, resultaron ser secuencias iguales a la cepa de referencia *C. gloeosporioides* 231, la cual también había sido aislada de fresa.
- d) La cepa de *C. coccodes* IMI 343581 aparece junto a la cepa de referencia *C. coccodes* NFT.
- e) De las cepas utilizadas como control se puede decir por una parte que , *C. crassipes* (CECT 21069) y *C. falcatum* (CECT 210070) están muy alejadas y aparecen cada una por un lado, en cambio las cepas *C. kahawae* (CECT 21068), *C. gloeosporioides* (CECT 21073) se encuentran muy cercanas a las cepas *C. fragariae* y *G. cingulata*. En el caso de la cepa CECT 21073 vemos que se empareja con la secuencia de *C. fuscus*, aunque con un nivel de significación bastante bajo (41 %).
- f) La secuencia de *C. musae* se encuentra cercana a las de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*.
- g) Por último, las secuencias de *C. trifoli* y *C. lagenarium* aparecen en un grupo claro con un valor de bootstrap del 100 %.

4.6. Discusión

Como venimos diciendo a lo largo de esta memoria, la taxonomía clásica agrupa las cepas de *Colletotrichum* que producen antracnosis en las plantas de fresa dentro de las especies *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, si bien, debido a la dificultad para diferenciar las cepas de *C. fragariae* de las de *C. gloeosporioides*, existen dudas en el reconocimiento de la "especie" *C. fragariae*.

El análisis filogenético y los árboles obtenidos a partir de la secuenciación del fragmento rDNA que incluye las dos regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y el gen que codifica para el RNA 5,8S pone de manifiesto resultados que no están de acuerdo con

las especies tradicionales. Por el contrario, los agrupamientos obtenidos mediante el análisis filogenético si que se correlacionan con la división en grupos moleculares resultante de la integración de diferentes técnicas (Buddie *et al.*, 1998a). Excepciones fueron las secuencias correspondientes con las cepas CECT 21035 y CECT 21043 pertenecientes al grupo ACUT Ila, y que en el árbol se encuentran más cercanas a las cepas del grupo ACUT I. Del mismo modo, la cepa CECT 21009 perteneciente también al grupo ACUT Ila podría estar más cercana al grupo ACUT IIb. Estos cambios pueden ser explicados teniendo en cuenta que el establecimiento de los grupos moleculares se llevo a cabo mediante los datos obtenidos de restricción del rDNA, el cual se realizó en base a los puntos de corte de las 8 enzimas empleadas. En cambio el análisis filogenético está realizado teniendo en cuenta la información completa de las secuencias.

El análisis filogenético también confirma la divergencia entre dos grupos principales de cepas, que estarían formados por las cepas pertenecientes a la especie *C. acutatum* por una parte, y las cepas de *C. fragariae* más las de *C. gloeosporioides* por otra. En el primero, el formado por las cepas pertenecientes a la especie *C. acutatum* encontramos una gran divergencia, lo que indica la gran variabilidad de *C. acutatum* y el carácter polifiletico de la especie. Por otro lado, no encontramos grandes divergencias entre las cepas originalmente descritas como *C. fragariae* y *G. cingulata* (anamorfo *C. gloeosporioides*), a pesar de tratarse de cepas pertenecientes a dos especies distintas según los criterios taxonómicos clásicos.

4.6.1. *Colletotrichum acutatum*

Uno de los resultados más interesantes de este análisis es la gran divergencia detectada entre las cepas de *C. acutatum*. En el presente trabajo hemos analizado hasta 22 cepas de *C. acutatum* representantes de los diferentes grupos moleculares establecidos en el capítulo anterior. Los resultados muestran que las cepas de *C. acutatum* presentan mayor divergencia entre ellas mismas, que los encontrados entre otras cepas que pertenecen a especies distintas. Resultados parecidos fueron obtenidos por Srenivasaprasad *et al.* (1996), donde se muestra a *C. acutatum* como una de las especies del género que mayor variabilidad presenta. Por ejemplo, la divergencia entre las cepas de *C. acutatum* CECT 21012 y CECT 21011, que pertenecen al grupo ACUT I y la cepa CECT 21062, perteneciente al grupo ACUT Ila es de 3.1%, mientras que las divergencias entre las cepas de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* están entre 0.4 y 0.8

%. Del mismo modo, la divergencia entre estas últimas y *C. kahawae* es de 1.3%, con *C. musae* es de 1.7% y con *C. fuscus* de 1.3%. Por último las divergencias entre *C. trifoli* y *C. lagenarium* son de 0.6%.

Aunque la taxonomía clásica mantiene *C. acutatum* como una única especie, los datos de divergencias encontrados en este trabajo sugieren una interpretación distinta. Atendiendo a los valores de divergencia observados en el análisis filogenético entre las cepas pertenecientes a los diferentes grupos moleculares establecidos, se podría pensar en al menos dos grupos taxonómicos distintos de la especie *C. acutatum*. El patógeno podría estar compuesto por 2 o 3 poblaciones distintas, y por tanto el potencial de infección de cada una de estas podría ser diferente.

El primero de ellos estaría formado básicamente por las cepas del grupo mayoritario ACUT I, el cual presentó una gran uniformidad molecular con los diferentes marcadores usados (Buddie *et al*, 1998). El análisis confirma el carácter monofilético de este grupo mayoritario, del cual hemos secuenciado 6 cepas de diferentes orígenes geográficos y no se ha encontrado divergencia alguna. Además, en este primer grupo se podría incluir una pequeña parte del grupo ACUT IIa (tipo III) representado por las cepas CECT 21009, 21035, CECT y 21043, todas ellas aisladas de Australia y Nueva Zelanda y las cepas del grupo ACUT IIb, del cual hemos secuenciado 7 cepas distintas representadas por la cepa CECT 21078. La proximidad filogenética de estos diferentes tipos de cepas con valores de bootstrap del 71% estaría de acuerdo con la hipótesis hecha en el capítulo anterior. Ésta es, que el grupo mayoritario ACUT I, en el que faltaba variación molecular, podría haber evolucionado recientemente y podría haberse originado del grupo más variable y parcialmente sexual ACUT II.

En el segundo grupo estaría formado por el resto de cepas del grupo ACUT IIa y en él se encuentran cepas de orígenes geográficos distintos. Por un lado, la cepa CECT 21041, representante de las cepas originalmente descritas como *G. miyabaena* y procedentes de Nueva Zelanda. Por otro lado, la cepa de CECT 21062, representante de un grupo de cepas de origen europeo (CECT 21000 y CECT 21002, CECT 21028, CECT 21063 y CECT 21066). La proximidad filogenética entre estas cepas con orígenes geográficos distintos y el hecho que *C. acutatum* se describiese por primera vez en plantas de fresa en Australia (Simonds, 1965, 1968) puede ser una indicación de que las cepas europeas de este grupo podrían haberse derivado de las primeras, procedentes de Nueva Zelanda. Si esto es así, mediante el análisis filogenético se podría demostrar la introducción de estos patógenos desde unas regiones a otras.

4.6.2. *C. fragariae*- *C. gloeosporioides*

La dificultad para diferenciar las cepas de *C. fragariae* de las de *C. gloeosporioides* mediante los criterios taxonómicos clásicos ha llevado a una controversia en torno a la "especie" *C. fragariae* y a considerar a las cepas pertenecientes a esta especie como una variedad del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides* (Howard y Albregts., 1983; Mass y Howard., 1985; Smith *et al.*, 1990). Los estudios moleculares pueden resolver los problemas de la taxonomía clásica y son capaces de diferenciar las cepas de ambas especies, aunque por sí solos no deben tener implicaciones taxonómicas (Bonde *et al.*, 1991; Srenivasaprasad *et al.*, 1992; Freman *et al.*, 1993). En contraste, los estudios filogenéticos basados en análisis de secuencias, mucho más fiables a la hora de inferir conclusiones de tipo taxonómico, muestran muy poca divergencia entre ambas especies y consideran que las cepas de *C. fragariae* deben ser incluidas dentro del amplio concepto de especie definido para *C. gloeosporioides* (Srenivasaprasad *et al.*, 1992; 1996).

Los resultados obtenidos en los capítulos anteriores del presente trabajo, nos llevaron a plantearnos el reconocimiento de un grupo común para las cepas de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* aisladas de planta de fresa, y que sería distinto al patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*. Esto era así, debido fundamentalmente al diferente patrón de restricción del rDNA que presentaron ambos tipos de cepas, respecto a la cepa tipo de *C. gloeosporioides* (CECT 21073).

En el presente trabajo, hemos secuenciado un total de 6 cepas, 3 de ellas pertenecen al grupo FRAG Ia y 3 al grupo FRAG Ib, originalmente descritas como *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* respectivamente (Tabla 8). Los resultados de este análisis muestran muy poca divergencia entre todas las secuencias pertenecientes a estas dos especies, incluidas las secuencias de *C. fragariae* y de *C. gloeosporioides* obtenidas de las bases de datos y la cepa tipo de *C. gloeosporioides* CECT 21073, y se correlacionan con lo obtenido en anteriores filogenias (Srenivasaprasad *et al.*, 1992; 1996). De acuerdo con estos resultados, creemos que las cepas descritas por la taxonomía clásica como *C. fragariae* no divergen lo suficiente con respecto a las de *C. gloeosporioides*, como para separarlas en dos taxones distintos, y podrían ser incluidas dentro del agregado de especies reconocido para *C. gloeosporioides*.

Por otra parte, aunque las divergencias entre este grupo de cepas son pequeñas y de escaso valor significativo, se pueden establecer algunas agrupaciones de interés. Así tenemos, que la cepa de *C. fragariae* CECT 21048, representante del grupo mayoritario

FRAG Ia, se empareja con la cepa de referencia fra63-1, una cepa de *C. fragariae* y por tanto también aislada de plantas de fresa. Por otro lado, la cepa CECT 21074, representante de las cepas de *C. gloeosporioides* que forman el grupo FRAG Ib y que resultaron ser iguales en secuencia, se agrupó con la cepa de referencia glo231, la cual también fue aislada de fresa. Estos datos nos pueden indicar, que aunque las divergencias entre este grupo de cepas, formado por cepas pertenecientes a las especies *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, son demasiado pequeñas como para poder separar diferentes taxones, si que se observa mayor concordancia entre las cepas que fueron aisladas de plantas de fresa, que entre éstas y las aisladas de otros huéspedes. Por este motivo, pensamos que las cepas de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* que tienen en común producir antracnosis en plantas de fresa, podrían organizarse como un grupo subespecífico dentro del grupo de especies reconocido para *C. gloeosporioides*, que estaría de acuerdo los grupos FRAG Ia y FRAG Ib establecidos por la caracterización molecular llevada a cabo en los capítulos anteriores.

4.6.3. Otras especies de *Colletotrichum*

Aunque el objetivo principal del trabajo es resolver las relaciones filogenéticas de las cepas pertenecientes a las especies productoras de antracnosis en las plantas de fresa, se pensó también comparar estas cepas con otras que perteneciesen a especies distintas. Así, en la lista de cepas seleccionadas para secuenciar se incluyeron tanto una cepa de *C. coccodes* como el resto de cepas consideradas como control y que pertenecen a las especies *C. kahawae*, *C. crassipes* y *C. falcatum* respectivamente. Con el mismo fin se incluyen las secuencias obtenidas de las base de datos pertenecientes a las especies *C. musae* (musae4Q), *C. fuscum* (fus120), *C. cocodes* (cocNFT), *C. trifoli* (trif164) y *C. lagenarium* (lage73).

Tanto la cepa de *C. coccodes* CECT 21008 que se emparejó con la cepa de referencia cocNFT, como las cepas de *C. crassipes* CECT 21069 y *C. falcatum* CECT 21070 se resuelven perfectamente en el árbol filogenético. Por el contrario la cepa de *C. kahawae* CECT 21068 y las secuencias de *C. fuscum* (fus120) y *C. musae* (musae4Q) presentan valores de divergencia muy bajos (0.6-2.1) respecto a las cepas de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. Mediante los RFLPs del rDNA no pudimos diferenciar entre la cepa de *C. kahawae* y la cepa tipo de *C. gloeosporioides* y ambas cepas presentaban el tipo VI. En cambio si que se diferenciaban de las cepas de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* (tipo II). En el análisis filogenético vemos que ocurre exactamente lo

contrario, las divergencias entre ambas cepas son pequeñas (2.1), pero aún lo son más entre *C. kahawae* y las cepas de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* (0.5-0.7). Este es otro ejemplo de como el análisis filogenético basado en la secuencia completa puede cambiar los resultados parciales obtenidos mediante RFLPs. Del mismo modo que ocurre con *C. fragariae*, pensamos que *C. fuscum* y *C. kahawae* y *C. musae* podrían ser incluidos dentro del amplio concepto de especie de *C. gloeosporioides*. Resultados parecidos se observaron en anteriores trabajos (Srenivasaprasad *et al.*, 1996). Finalmente, las secuencias de *C. trifoli* y *C. lagenarium* no presentan apenas divergencia (0.6), aunque si que se separan del complejo de cepas de *C. fragariae*- *C. gloeosporioides*. Sutton (1992), basándose en criterios morfológicos, opta por un concepto amplio de especie en el género *Colletotrichum*, y esto ocurre especialmente en aquellas especies que se encuentran en un gran número de plantas, como es el caso de *C. gloeosporioides*. En este trabajo, se pone de manifiesto que los estudios filogenéticos basados en el análisis de secuencias del rDNA pueden contribuir en gran medida a la reorganización de las especies dentro del género *Colletotrichum*.

El análisis de las secuencias de rDNA realizado en el capítulo anterior, nos ha permitido el diseño de oligonucleótidos que muestran cierta especificidad. El objetivo es poder utilizarlos en un experimento de PCR para detectar en muestras de material vegetal tanto el patógeno de cuarentena *C. acutatum* como el resto de especies del género.

5. Detección y diagnóstico del patógeno de cuarentena *C. acutatum*

Tal y como se indicó en la introducción de esta memoria, dentro del género *Colletotrichum* se encuentra un gran número de patógenos capaces de ocasionar cuantiosas pérdidas económicas en diferentes cultivos. De especial importancia son aquellos hongos objeto de cuarentena como es el caso de *C. acutatum*, para el cual la regulación impuesta por la U E (EC Diciembre 77/93) obliga a un estricto control. Durante el periodo de cuarentena el material vegetal debe permanecer retenido en cámaras, periodo en el cual, dicho material se va deteriorando y pierde su vigor, con las graves consecuencias que se derivan para el comercio. Esta situación nos lleva a plantearnos el desarrollo de nuevos métodos de detección y diagnóstico más rápidos de este patógeno.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación, diseño de oligonucleótidos y el manejo de bases de datos, han contribuido a que la detección de numerosos hongos fitopatógenos por PCR sea un método de diagnóstico ampliamente extendido en la actualidad. Cada año se describen secuencias de oligonucleótidos específicos para distintas especies y se simplifican los protocolos de utilización para la detección en el material vegetal, logrando niveles de sensibilidad y especificidad más altos, además de una gran rapidez. (Ersek *et al.*, 1994; Johanson y Jeger., 1992; Rollo *et al.*, 1990; Schesser *et al.*, 1991; Sreenivasaprasad *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1993). Ello resulta especialmente útil en el caso de hongos capaces de producir infecciones latentes, como es el caso de *C. acutatum*, las cuales resulta muy difícil de diagnosticar mediante los métodos tradicionales de aislamiento o mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Barker *et al.*, 1994, Cook *et al.*, 1995., Barker, 1996., Hughes *et al.*, 1997). La detección de *C. acutatum* por PCR ha sido llevada a cabo en un trabajo anterior (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996 b), pero el método fue probado en un grupo muy reducido de cepas y su especificidad no ha sido buena, debido a las reacciones cruzadas que produjo con otras especies como *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. kahawae* (Buddie *et al.*, 1998b)

El alineamiento de las secuencias del rDNA realizado en el capítulo anterior, nos ha permitido el diseño de oligonucleótidos que muestran distinta especificidad. El objetivo es poder utilizarlos en un experimento de PCR para detectar en muestras de material vegetal, tanto el patógeno de cuarentena *C. acutatum* como el resto de especies del género.

5.1. Diseño de oligonucleótidos específicos.

Tomando como base las secuencias del rDNA del capítulo anterior, diseñamos un total de 3 oligonucleótidos con distinto grado de especificidad mediante. El diseño de estos oligonucleótidos se ha llevado a cabo mediante el programa de análisis OLIGO (National Biosciences, Plymouth, Minn) según se indica en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Por un lado, con la idea de poder detectar cualquier especie del género *Colletotrichum*, hemos diseñado la pareja de oligonucleótidos Col 1 y Col 2, cuyas secuencias se encuentran presentes en todas las especies del género analizadas en capítulo anterior. Col 1 tiene un total de 20 nucleótidos, se encuentra situado en la región intergénica ITS1, en las posiciones 19 a 38 según el alineamiento realizado, y posee una degeneración en la posición 33. Col 2 tiene un longitud de 19 nucleótidos y se encuentra situado en la región intergénica ITS2, en las posiciones 442 a 424. Por otro lado, se ha diseñado el oligonucleótido Acut I1, cuya secuencia esta presente en todas las cepas secuenciadas de *C. acutatum*, pero no en las cepas pertenecientes a otras especies, y por tanto un oligonucleótido específico de la especie *C. acutatum*. Este oligonucleótido tiene una longitud de 24 nucleótidos y se encuentra situado en la región intergénica ITS1, en las posiciones 124 a 151. Las secuencias de estos oligonucleótidos así como su situación relativa se encuentran en la figura 18.

5.2. Amplificación por PCR a partir de DNA de micelio

Los oligonucleótidos anteriormente descritos Col 1, Col 2 y Acut I1 se utilizaron para amplificar por PCR el DNA de las 80 cepas de *Colletotrichum* incluidas en este trabajo. Con el fin de valorar la especificidad de los oligonucleótidos, también se llevaron a cabo reacciones de PCR con las cepas representantes de otros géneros distintos a *Colletotrichum* y también patógenas de plantas de fresa (Tabla 2 de Materiales y Métodos). La reacción de PCR constó de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C y 1 min a 72°C, con aproximadamente 50 ng de DNA fungico y en ella se incluyeron los 3 oligonucleótidos al mismo tiempo. El análisis electroforético de la reacción de PCR reveló la presencia de dos tipos de productos de distinto tamaño, tal y como se esperaba (Figura 19). En primer lugar, un fragmento de aproximadamente 432 pb, resultado de la amplificación de los oligonucleótidos Col 1 y Col 2 y presente en todas las especies de *Colletotrichum* que se han incluido en el trabajo, incluyendo las cepas control. En segundo lugar, un fragmento de 318 pb resultado de la amplificación de los oligonucleótidos Acut I1 y Col 2 y presente solamente en las 52 cepas asignadas a la

especie *C. acutatum*. En la figura 19 se muestra a modo de ejemplo la amplificación con dichos oligonucleótidos, de las cepas de *Colletotrichum* representantes de cada uno de los grupos moleculares establecidos (Buddie *et al.*, 1998a). Las cepas de otros géneros distintos de *Colletotrichum* también patógenas de fresa no dieron ninguno de los dos productos de amplificación, como se puede observar en el carril correspondiente a la cepa de *Alternaria alternata* CECT 21090, representante de este grupo de hongos.

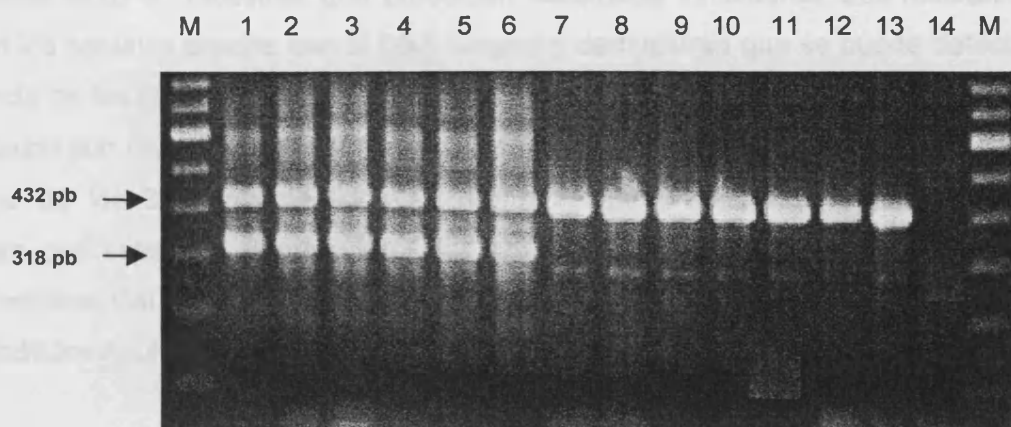


Figura 19. Productos amplificados obtenidos con los oligonucleótidos Col 1, Col 2 y Acut I1 a partir de DNA de micelio de las cepas de *Colletotrichum* representantes de los grupos moleculares establecidos. Carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se corresponden con cepas de *C. acutatum* pertenecientes a los grupos ACUT Ia, ACUT Ib, ACUT Ic, ACUT IIa y ACUT IIb respectivamente. Carriles 7 y 8 corresponden a las cepas de *C. fragariae* y *G. cingulata* de los grupos FRAG Ia y FRAG Ib respectivamente. Carriles 9, 10, 11, 12 y 13 se corresponden con las cepas control. Carril 14, *Alternaria alternata* CECT 21090. Carriles M, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

5.3. Amplificación por PCR a partir de DNA de material vegetal

En las extracciones de ácidos nucleicos a partir de plantas es frecuente la presencia de inhibidores, en su mayoría polifenoles, y que constituyen una de las principales causas de fracaso de la PCR (John, 1992). Con el fin de evitar estos problemas, en las extracciones de DNA a partir de las plantas de fresa se ha empleado kit de extracción de ácidos nucleicos indicado en el apartado de 1.3 de materiales y métodos, el cual permite bloquear o inactivar estas sustancias antes de que tenga lugar la reacción de amplificación. mediante el cual se obtiene DNA con la suficiente calidad para ser amplificado. Las extracciones se llevaron a cabo a partir de 1 g de material plantas de fresa asintomáticas, preferentemente de la zona de la corona, que habían

sido artificialmente infectadas con las cepas de *Colletotrichum* representantes de los distintos grupos moleculares (Buddie et al., 1998a). La inoculación se realizó por inmersión (1 millón esporas /ml) después de mantener la planta 48 en invernadero. Las reacciones de PCR se realizaron a partir de aproximadamente 50 ng de DNA de planta y las condiciones de la reacción de fueron iguales que en el caso de la amplificación con muestras de DNA fúngico, con la excepción de que la reacción se suplementó con 0.025 mg de seroalbumina bovina (BSA), que actúa estabilizando a la polimerasa y permite mayor rendimiento en muestras que presentan sustancias inhibidoras. Los resultados confirman los estudios previos con el DNA fúngico y demuestran que se puede detectar la presencia de las diferentes cepas de *C. acutatum* en el material vegetal. A diferencia de lo ocurrido con muestras de DNA fúngico, en la amplificación por PCR no fue posible el empleo de los 3 oligonucleótidos al mismo tiempo y se tuvieron que hacer 2 reacciones por separado (Figura 20). Por un lado, una primera reacción con los oligonucleótidos Col 1 y Col 2, y por otro lado, una segunda reacción con los oligonucleótidos Acut I1 y Col 2.

La sensibilidad del protocolo se PCR se midió usando una muestra de DNA de material vegetal sin infectar, a la cual se adicionó diluciones seriadas de una cantidad conocida de DNA fúngico purificado de la cepa. La concentración inicial de DNA fúngico se calculó tanto por espectrofotometría como por comparación de intensidades en una solución de bromuro de etidio. Una cantidad aproximada de 300 ng de DNA fúngico de la cepa de *C. acutatum* CECT 21020 se añadió en una muestra de DNA de planta y a partir de aquí se prepararon diluciones seriadas y se utilizaron para llevar a cabo las reacciones de PCR mediante el empleo de los oligonucleótidos Acut I1 y Col 2. Como se puede ver en la figura 21, la intensidad del producto amplificado decrece a medida que nos acercamos a diluciones más bajas, siendo la muestra correspondiente con la dilución 10^{-6} , la concentración más baja a la que se puede llegar a detectar la presencia de DNA fúngico. A partir de aquí, en las diluciones más bajas no se aplicó. Finalmente, mediante los cálculos realizados se estima que puede llegarse a detectar hasta 3 fg de DNA fúngico.

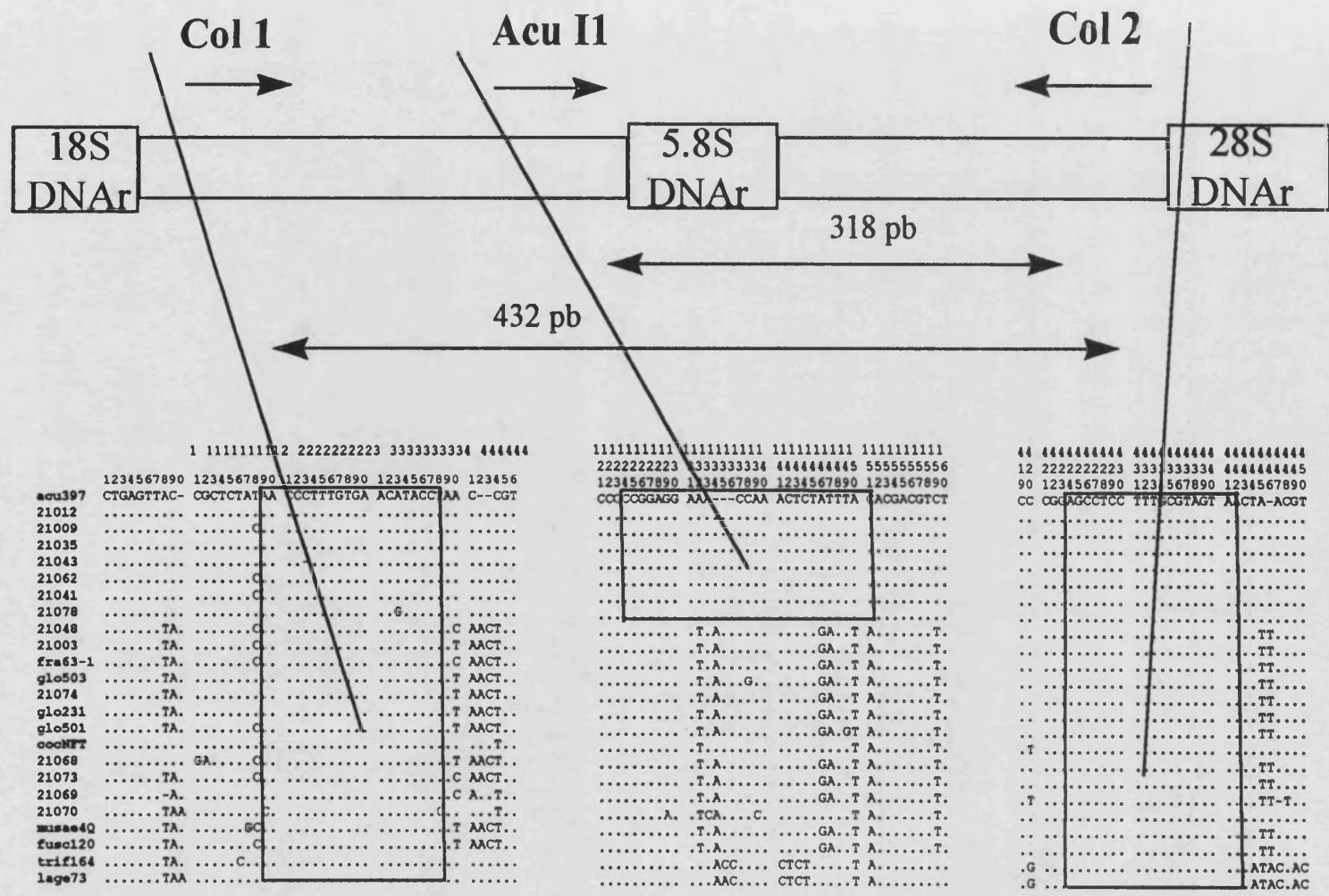


Figura 18. Secuencia de los oligonucleótidos Col 1, Col 2 y Acut I1, posición que ocupan en el DNA ribosomal y tamaños de los fragmentos amplificados.

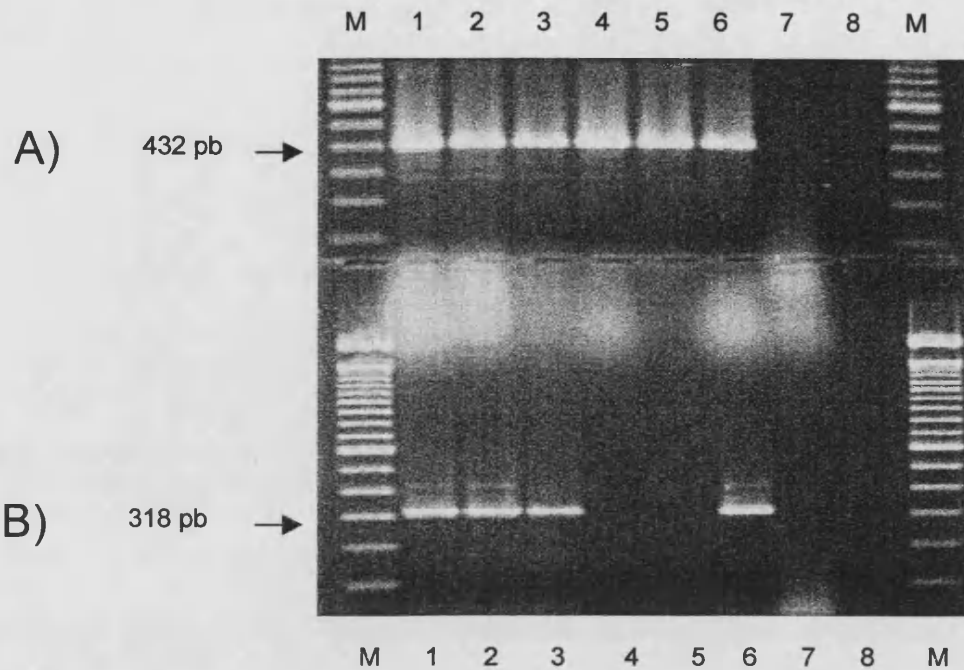


Figura 20. Productos amplificados obtenidos a partir de DNA de material vegetal artificialmente infectado con cepas de *Colletotrichum*. A) Amplificados obtenidos con los oligonucleótidos Col 1 y Col 2. B) Amplificados obtenidos con los oligonucleótidos Acut I1 y Col 2. Carriles 1, 2 y 3, plantas de fresa infectadas con las cepas de *C. acutatum* CECT 21012, CECT 21037 y CECT 21056 respectivamente. Carril 4 y 5 plantas de fresa infectadas con las cepa de *C. fragariae* CECT 21049 y *G. cingulata* CECT 21005 respectivamente. Carril 6, control positivo de DNA de micelio de la cepa CECT 21001. Carril 7, control negativo de planta de fresa sin infectar. Carril 8, control negativo con agua. Carriles M, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

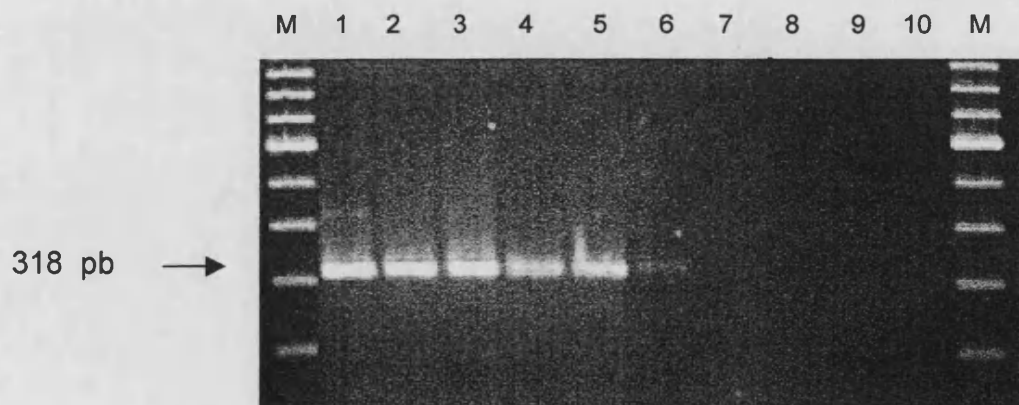


Figura 21. Sensibilidad del protocolo de PCR utilizando los oligonucleótidos Acut I1 y Col 2 para la detección de *C. acutatum* en muestras de material vegetal. Carriles del 1 al 10 se corresponden con diluciones de DNA del hongo desde 10^{-1} hasta 10^{-10} . Carriles M, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

5.4. Discusión

En este capítulo se ha desarrollado un protocolo de PCR capaz de identificar tanto el patógeno de cuarentena *C. acutatum*, como el resto de especies del género. El alineamiento de las secuencias de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 del rDNA nos ha permitido diseñar oligonucleótidos con distinta especificidad, que pueden ser utilizados para la identificación del patógeno de cuarentena *C. acutatum*, así como para la identificación de cualquier especie del género *Colletotrichum*. Comparando con el método de PCR desarrollado por Sreenivasaprasad *et al.*, (1996 b), en el cual los oligonucleótidos utilizados no eran específicos del patógeno *C. acutatum*, y daban lugar a reacciones cruzadas con otras especies como *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. kahawae* (Buddie *et al.*, 1998b), la especificidad de estos oligonucleótidos ha sido la que se esperaba y no se han dado productos de amplificación inespecíficos en ninguna de las muestras analizadas. En primer lugar el oligonucleótido Acut I1 ha sido específico de todas las cepas de *C. acutatum* analizadas en este trabajo y no ha dado producto de amplificación con el resto de especies de *Colletotrichum*, así como con las muestras representantes de otros géneros de hongos también patógenos de plantas de fresa. En segundo lugar los oligonucleótidos Col 1 y Col 2 son capaces de amplificar todas las especies de *Colletotrichum*, pero no amplifican las muestras del resto de géneros que también son patógenos de plantas de fresa.

En cuanto a la detección, ésta depende del protocolo de extracción de DNA que se haya utilizado, esto es así debido a la gran cantidad de inhibidores que se encuentran presentes en las muestras vegetales. Por este motivo era necesario poner a punto un protocolo de extracción de ácidos nucleicos que permitiese obtener DNA con la suficiente calidad para ser amplificado. El kit de extracción utilizado en este estudio (apartado 1.3 de Materiales y Métodos), permite obtener DNA de calidad suficiente para poder utilizarlo en la detección de estos patógenos en muestras de material vegetal y conseguir un nivel de sensibilidad bastante elevado, llegando a detectar femtogramos de DNA fúngico. Además de la gran sensibilidad y especificidad que se puede conseguir mediante este protocolo, la principal ventaja de la PCR sobre otras técnicas de diagnóstico es la rapidez de los ensayos. La extracción del DNA, la reacción de PCR y la detección mediante electroforesis en geles de agarosa puede hacerse en un día de trabajo, lo que supone un avance de entre 1 y 2 semanas frente al tiempo requerido para confirmar el diagnóstico por los métodos convencionales de aislamiento o por la detección mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Barker *et al.*, 1994,

Cook *et al.*, 1995., Barker, 1996., Hughes *et al.*, 1997). Todo ello favorece la utilización de este protocolo en el diagnóstico rutinario de un elevado número de muestras.

Por último, pensamos que el desarrollo de este protocolo de diagnóstico basado en la PCR puede tener una doble importancia práctica. En primer lugar, se puede aplicar para la detección del patógeno de cuarentena *C. acutatum*, disponiendo así de las garantías necesarias para impedir su introducción en el territorio de la UE. Además, mediante su correcto empleo se podrían reducir las pérdidas económicas producidas por la antracnosis en el sector de la fresa, facilitando el transporte de material vegetal a lo largo de la UE bajo las normas de cuarentena y ayudando a erradicar el material vegetal infectado. En segundo lugar, mediante este protocolo también es posible detectar cualquier especie del género *Colletotrichum*, lo cual tiene mucho interés si consideramos la gran cantidad de especies de este género y la importancia como patógenos de la mayoría de ellas.

La PCR de las cepas de *C. fragariae*. Sin embargo, en la caracterización de las cepas mediante RAPDs (Capítulo 2) se demuestra que se pueden detectar diferencias entre las cepas originalmente descritas como *C. fragariae* y *C. cingulata* y que posteriormente han sido asignadas a los grupos moleculares FRAG Ia y FRAG Ib respectivamente (Ruddle *et al.*, 1998a). En base a estos resultados previos, pensamos en utilizar una banda diferencial de RAPDs, obtener su secuencia y a partir de ella desarrollar oligonucleótidos específicos que puedan ser usados en experimentos de PCR, los cuales nos permitan detectar este patógeno en muestras de material vegetal.

4.1. Clonación y secuenciación de un fragmento diferencial de *C. fragariae* obtenido por RAPDs.

Con el fin de obtener la secuencia de un producto de RAPDs específico de las cepas de *C. fragariae*, nos propusimos un paso previo que consistió en clonar una banda diferencial de RAPDs que tuviese un tamaño mínimo para llevar a cabo su clonación en un vector plasmídico. De todas las reacciones de RAPDs realizadas con los 5 oligonucleótidos analizados en el capítulo 2, elegimos las llevadas a cabo con el OPA 10 por encontrarse distintas bandas diferenciales de menor tamaño. Los fragmentos resultantes de la reacción de RAPDs con el oligonucleótido OPA 10 se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2%, y posteriormente una banda diferencial de aproximadamente 580 pb, que es encontrada presente en todas las cepas de *C. fragariae* del grupo 17 de RAPDs pero no en las

6. Detección y diagnóstico del patógeno *C. fragariae*

Colletotrichum fragariae ha sido siempre aislado en plantas de fresa, y se ha identificado como el agente causal de la mayoría de los casos de antracnosis en USA. En Europa no se han descrito casos hasta ahora, lo que confirma que *C. fragariae* permanece como un patógeno endémico de Norte América y que por tanto, podría llegar a Europa u otros lugares a través de la introducción de material vegetal infectado. Esta situación junto con la falta de métodos para diferenciarlo del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) justifica la importancia del desarrollo de un método de identificación y detección de este patógeno.

En las secuencias del DNAr analizadas en esta memoria no se encuentran suficientes diferencias para poder diseñar oligonucleótidos específicos que nos permitan llevar a cabo la de detección por PCR de las cepas de *C. fragariae*. Sin embargo, en la caracterización de las cepas mediante RAPDs (Capítulo 2) se demuestra que se pueden detectar diferencias entre las cepas originalmente descritas como *C. fragariae* y *G. cingulata* y que posteriormente han sido asignadas a los grupos moleculares FRAG Ia y FRAG Ib respectivamente (Buddie *et al.*, 1998a). En base a estos resultados previos, pensamos en utilizar una banda diferencial de RAPDs, obtener su secuencia y a partir de ella desarrollar oligonucleótidos específicos que puedan ser usados en experimentos de PCR, los cuales nos permitan detectar este patógeno en muestras de material vegetal.

6.1. Clonación y secuenciación de un fragmento diferencial de *C. fragariae* obtenido por RAPDs.

Con el fin de obtener la secuencia de un producto de RAPDs específico de las cepas de *C. fragariae*, nos propusimos un paso previo que consistiría en clonar una banda diferencial de RAPDs que tuviese un tamaño idóneo para llevar a cabo su clonación en un vector plasmídico. De todas las reacciones de RAPDs realizadas con los 5 oligonucleótidos analizados en el capítulo 2, elegimos las llevadas a cabo con el OPA 10 por encontrarse distintas bandas diferenciales de menor tamaño. Los fragmentos resultantes de la reacción de RAPDs con el oligonucleótido OPA 10 se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 2%, y seguidamente una banda diferencial de aproximadamente 580 pb, que se encontraba presente en todas las cepas de *C. fragariae* del grupo 17 de RAPDs pero no en las

cepas de *G. cingulata* ni en ninguna de las otras especies de *Colletotrichum* analizadas, se cortó del gel y se purificó (Figura 22). Una vez que dicho fragmento purificado fue obtenido, se abordó su clonación en el vector plasmídico pBluescript II KS (+) como se describió en el apartado 16 de Materiales y Métodos. Después de llevar a cabo la transformación en células competentes de *E. coli* DH5 α se plaqueó el LB en presencia de X-Gal 40 μ g/ml, a fin de seleccionar las colonias que habían incorporado el plásmido recombinante por su color blanco. El análisis de dichas colonias mediante el método de las minipreparaciones nos permitió aislar plásmidos recombinantes con el inserto, y a continuación se comprobó que los insertos correspondían con el tamaño del fragmento diferencial de RAPDs mediante la restricción con los enzimas *Hind* III y *Eco* RI. Un plásmido que contenía un inserto de interés se amplificó y se purificó por lisis alcalina, y se denominó pBSCF1 (Figura 23).

Con el fin de comprobar que efectivamente el inserto que contenía el plásmido pBSC1 se correspondía con el fragmento diferencial de RAPDs, se llevó a cabo la secuenciación de dicho inserto como se describió en el apartado 17.1 de Materiales y Métodos. En la secuencia del inserto se comprobó, tal y como cabía esperar, que los extremos de ésta coincidían con la secuencia del oligonucleótido OPA 10 utilizado para la reacción de RAPDs (Figura 24). Posteriormente, la secuencia de dicho fragmento se comparó con las secuencias depositadas en las bases de datos con la idea de encontrar homología con alguna de ellas, no encontrando correspondencia con ninguna secuencia conocida.

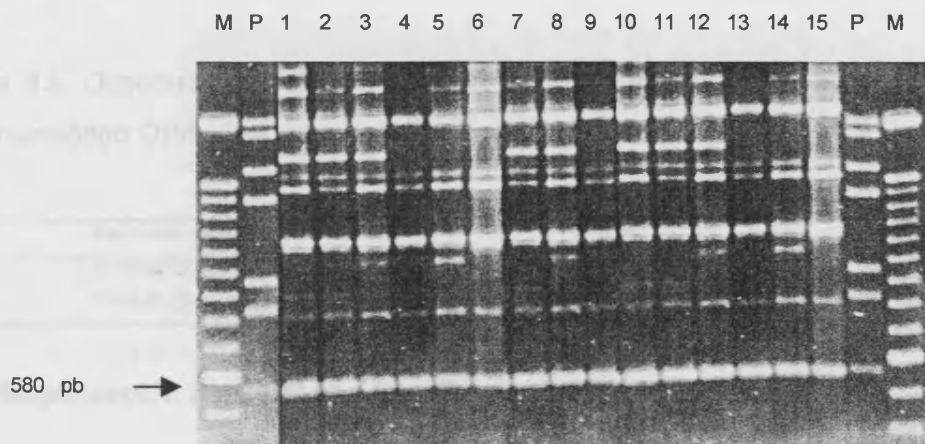


Figura 22. Patrones de bandas de RAPDs realizados con el OPA10 a partir de las cepas de *C. fragariae* pertenecientes al grupo FRAG Ia y que presentan el patrón 17 de RAPDs. Carriles del 1 al 15, todas las cepas de *C. fragariae* que presentan una banda diferencial de 580 pb. Línea M, λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III. Línea P, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

Figura 24. Secuencia del fragmento diferencial de RAPDs. La secuencia del oligonucleótido OPA10 se encuentra subrayada.

GATTGATCGCAGGATTAGAACGGGCATGACCCAAATCGAGAGAAAGTTTTCGGACTAGA
 TAAGGGGTTAAGTCTGCCCAATTCACGGCGGTAAGGGCCTTGCCCGCTAGTAAAATTA
 TCTCACCATCTTAGAATCATCTCATCCAGTGAAGCGATGCGGAGTCGCGCGTCCGAAAT
 CATCGTCAGGCAAGCCAGTCCCAACATTGGAACCTACCACATTTGCTTTACTCTTGTTG
 ATATACAGGTAAGTTTCCTTATTCACAAAGACCAGGAGAGTCCCGTAGCGATGACATCG
 ACTCCTTCTTTGGGGAAGAAATGAACAGTTCAACAAAAGCTCTCGCAGCCCCTTGCCAA
 ACTATCGTCATAATTCACATTGAAACGATCGGGTGACCCAGTATTATGTTTCAATAGC
 TAGAAATATGCTCCAGGAAAGATACTTAGAAGACCCTTAGAGCCACGCTCGGCACAAGC
 TAATACTGTGACGGTCTTCTCGTCGTAACCTTAGGTTAACGCCTGAGCGATTAGAGACG
 ACTACTGTAGCTGCGATCAC

6.2. Diseño de oligonucleótidos específicos

Tomando como base la secuencia de los extremos del fragmento anterior, coincidente con la secuencia del oligonucleótido OPA10, se diseñaron los oligonucleótidos FRA1 y FRA2, que se encuentran situados en los extremos 5' y 3' de dicho fragmento respectivamente. La estrategia seguida para la obtención de estos oligonucleótidos específicos fue la de incrementar la secuencia correspondiente al antiguo oligonucleótido de RAPDs por su extremo 3', con el objetivo de poder utilizarlos en una reacción de PCR en condiciones restrictivas. La secuencia y longitud de los oligonucleótidos FRA 1 y FRA 2 se encuentra indicada en la Tabla 13.

Tabla 13. Oligonucleotidos FRA 1 y FRA 2. La secuencia compartida con el oligonucleótido OPA10 se encuentra subrayada.

	Secuencia y longitud	Posición	Origen de referencia
FRA1	19-nt d5'-TTGATCGCAGGATTAGAAC-3'	Extre 5' del producto de RAPDs	<i>C.fragariae</i> CECT 21048
FRA2	20-nt d5'-TCGCAGCTACAGTAGTCGTC-3'	Extre 3' del producto de RAPD s.	<i>C.fragariae</i> CECT 21048

6.3. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos FRA1 y FRA2

Los oligonucleótidos obtenidos mediante el procedimiento anterior, FRA1 y FRA2, se utilizaron para amplificar por PCR el DNA de las 80 cepas de *Colletotrichum* que se incluyen en este trabajo, más las cepas representantes de otros géneros no *Colletotrichum*, y también patógenos de plantas de fresa (Tabla 2 de Materiales y

Métodos). La amplificación con dichos oligonucleótidos daría lugar a un producto de igual tamaño a la banda diferencial de RAPDs clonada y secuenciada, con la diferencia que para obtener el producto de RAPDs se empleó un oligonucleótido de 10 pb (OPA 10) y unas condiciones de PCR muy suaves, con una temperatura de anillamiento de 36°C, en cambio, la obtención de este mismo fragmento con los oligonucleótidos FRA 1 y FRA 2 se podría llevar a cabo en condiciones restrictivas, con una temperatura de anillamiento más elevada. De esta forma, las condiciones de la reacción de PCR consistieron en 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 56°C y 1 min a 72°C. El análisis electroforético de la amplificación reveló la presencia de una única banda de 600 pb, tal y como cabía esperar, tamaño que resultó ser idéntico al fragmento de RAPDs clonado y secuenciado. Este producto se encontró únicamente en las cepas de *C. fragariae* que presentan el fragmento diferencial de RAPDs y que pertenecen al grupo FRAG Ia. (Figura 25). Los resultados con el resto de muestras analizadas, incluidas las cepas de *G. cingulata* y la cepa de *C. fragariae* CECT 21003 que presentaron patrones de RAPDs distintos, fueron negativos y no se obtuvo ningún producto de amplificación.

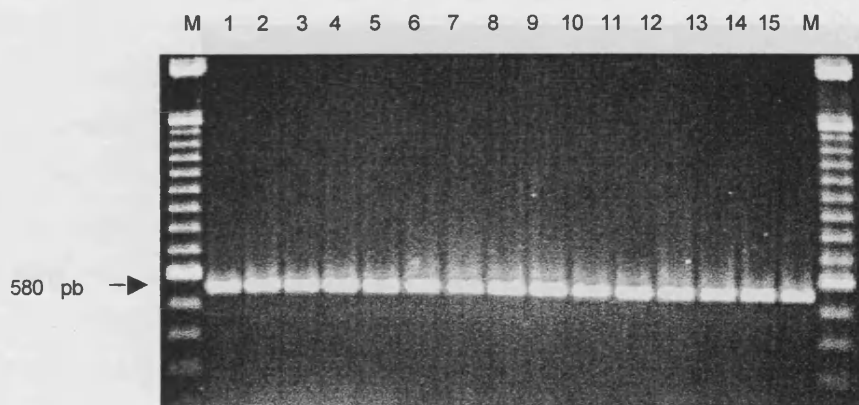


Figura 25. Productos amplificados obtenidos con los oligonucleótidos FRA 1 y FRA 2 a partir de DNA de micelio cepas de *C. fragariae*. Carriles del 1 al 15, todas las cepas de *C. fragariae* pertenecientes al grupo FRAG Ia y que presentaron la banda diferencial clonada y secuenciada. Carriles M, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

Los oligonucleótidos específicos FRA1 y FRA2 también se utilizaron para la amplificación de muestras de DNA procedente de plántulas de fresa, las cuales habían sido artificialmente infectadas con las cepas del grupo FRAG Ia. La reacción de PCR se realizó en las mismas condiciones anteriores, utilizando aproximadamente 50 ng de DNA de planta y suplementando con 0.25 mg de BSA. La amplificación con muestras de

DNA de material vegetal infectadas con las cepas CECT 21025 y CECT 21049 dio como resultado un producto de igual tamaño que en el caso de DNA fúngico, aunque con menor intensidad. En la reacción se incluyeron controles negativos de muestras sin DNA, muestras de DNA de plantas sin infectar, así como muestras de DNA de cepas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Figura 26). Los resultados confirman los estudios previos con DNA fúngico y demuestran que se puede detectar la presencia de este grupo de cepas en el material vegetal.

La sensibilidad del protocolo de PCR se testó usando muestras de DNA de material vegetal sin infectar, a las cuales se adicionó diluciones seriadas de una cantidad conocida de DNA purificado de la cepa de *C. fragariae* CECT 21050. La concentración inicial del DNA de esta cepa se calculó tanto por espectrofotometría como por comparación de intensidades de las bandas en bromuro de etidio. Los resultados obtenidos indican que se puede llegar a detectar hasta 300 ng de DNA fúngico (Figura 27).

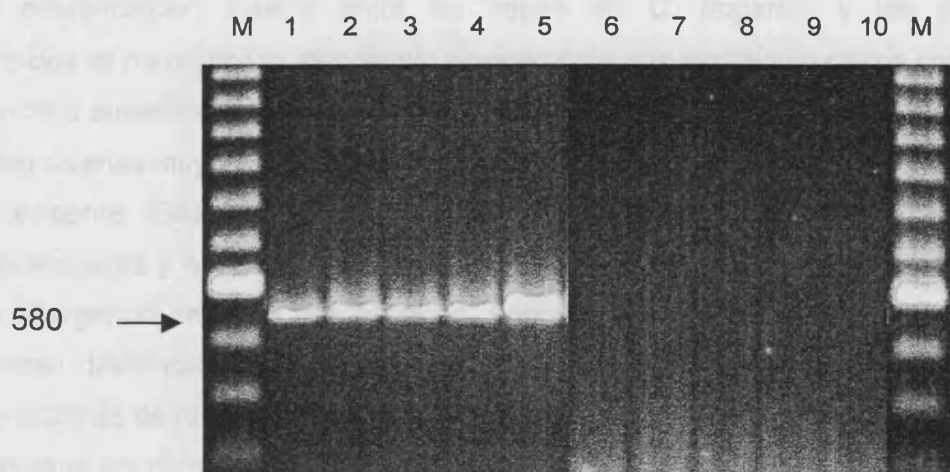


Figura 26. Productos amplificados con los oligonucleótidos FRA 1 y FRA 2 obtenidos a partir de DNA de material vegetal artificialmente infectado con cepas de *Colletotrichum*. Carriles 1, 2, 3 y 4, plantas de fresa infectadas con las cepas de *C. fragariae* CECT 21049, CECT 21025 y CECT 21050 respectivamente. Carril 5 control positivo de DNA de micelio de la cepa CECT 21048, donde se puede observar que la intensidad del producto amplificado es más grande. Carril 6 y 7, plantas de fresa infectadas con las cepa de *G. cingulata* CECT 21005 y CECT 21017 Carril 8, planta de fresa infectada con la cepa de *C. acutatum* CECT 21012. Carril 9, control negativo de planta de fresa sin infectar. Carril 10, control negativo con agua. Carriles M, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

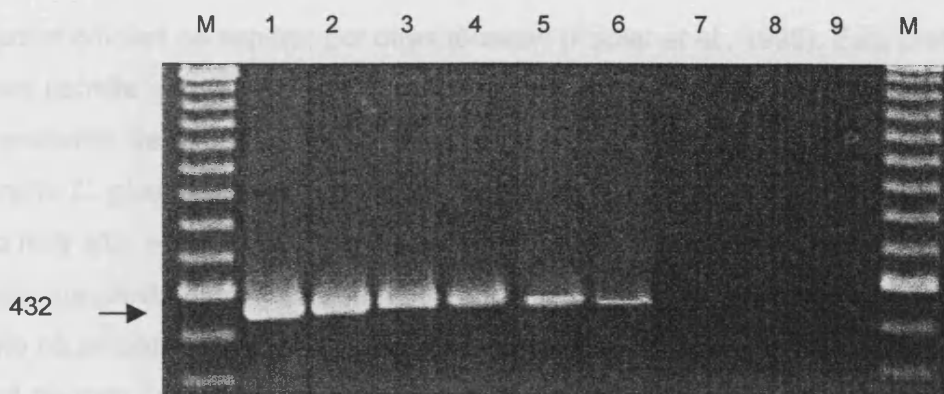


Figura 27. Sensibilidad del protocolo de PCR utilizando los oligonucleótidos FRA1 y FRA 2 para la detección de *C. fragariae* en muestras de material vegetal. Carriles del 1 al 9 se corresponden con diluciones de DNA del hongo desde 10^1 hasta 10^9 . Carriles M, marcador de pesos moleculares de 100 pb ladder.

6.4. Conclusiones

La diferenciación clásica entre las cepas de *C. fragariae* y las de *C. gloeosporioides* se ha realizado atendiendo básicamente a la morfología de los conidios y la presencia o ausencia del teleomorfo *Glomerella* (Gunnell y Gubler, 1992). Ni uno ni otro parecen criterios muy fiables y la dificultad para diferenciar ambos tipos de cepas es un hecho evidente. Esta dificultad ha seguido existiendo con el empleo de algunas técnicas moleculares y el análisis filogenético realizado en el capítulo anterior muestra muy poca divergencia entre las dos especies. Además, en las secuencias del DNA no se encuentran diferencias que nos permitan identificar ambas especies mediante el empleo de enzimas de restricción o mediante el diseño oligonucleótidos específicos para PCR. Solamente las técnicas más sensibles como la restricción del DNA mitocondrial y RAPDs (capítulo 3) ó las técnicas de ap-PCR (Freeman y Rodriguez, 1995; Freeman y Katan., 1997) permiten diferenciar los dos especies, pero su empleo en la detección del patógeno en las muestras de material vegetal resulta complicado. La pequeña cantidad de DNA fúngico que se encuentra presente en las muestras del material vegetal impide usar la restricción del DNA mitocondrial. Del mismo modo, los oligonucleótidos inespecíficos que normalmente se usan en las técnicas de RAPDs o ap-PCR también darían como resultado amplificaciones con el DNA de la planta, lo que complicaría la detección de del patógeno.

El desarrollo de oligonucleótidos específicos a partir de productos diferenciales de RAPDs constituye un método alternativo, que puede ser utilizado para diferenciar

organismos difíciles de separar por otras técnicas (Pooler *et al.*, 1995). Este protocolo de PCR nos permite diferenciar de manera rápida y sencilla, mediante la presencia de un único producto de amplificación, las cepas de *C. fragariae* de las de *G. cingulata* (teleomorfo *C. gloeosporioides*). La especificidad de los oligonucleótidos FRA 1 y FRA 2 ha sido muy alta, encontrando dicho producto de amplificación en todas las cepas de *C. fragariae* que previamente habían presentado el fragmento diferencial de RAPDs. Por el contrario no se obtuvo producto de amplificación en el resto de muestras analizadas, lo que nos permite concluir que estos oligonucleótidos son específicos de este grupo de cepas.

Por otra parte, y lo que es más importante, mediante este protocolo de PCR también podemos detectar la presencia de este grupo de hongos en el material vegetal. Como cualquier protocolo de PCR, su sensibilidad es bastante alta, llegando al nivel de femtogramos de DNA, aunque en este caso es sensiblemente inferior a la alcanzada en la detección del patógeno de cuarentena *C. acutatum*. Esto se puede explicar si consideramos que los oligonucleótidos específicos de *C. acutatum* están diseñados a partir de secuencias del DNAr, y estas secuencias se encuentran repetidas en el genoma varios cientos de veces. Por el contrario las secuencias a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos específicos FRA 1 y FRA 2, posiblemente sean de copia única.

En cuanto a la utilidad práctica de este protocolo, la detección de este patógeno en el material vegetal supone un paso importante en la ayuda a prevenir de la introducción de las cepas de *C. fragariae* en Europa, desde zonas endémicas como pueda ser Estados Unidos. El método también se podría utilizar para comprobar si este patógeno es exclusivo de las plantas de fresa, o por el contrario está presente en otros huéspedes, pero sin reconocer.

Conclusiones

Conclusiones

1. El análisis de restricción del fragmento de DNA ribosomal nos ha permitido llevar a cabo la identificación de las cepas de *Colletotrichum* empleadas en este trabajo y su asignación a un total de 8 tipos distintos. La técnica presenta un nivel de resolución parecido a la separación clásica entre especies y nos permite diferenciar las especies de *Colletotrichum* que producen antracnosis en plantas de fresa de las cepas control. Mediante la digestión con el enzima *SacI* obtenemos un patrón específico de la especie *C. acutatum*, diferenciándola del resto de especies. Del mismo modo con el empleo de la enzima *PvuII* podemos diferenciar las cepas de *C. fragariae* y *G. cingulata* aisladas de plantas de fresa del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*.
2. Se ha llevado a cabo una caracterización mediante la técnica de RAPDs, mediante la que se ha detectado una gran variabilidad en la población de cepas de *Colletotrichum* patógenas de plantas de fresa, especialmente en la especie *C. acutatum*, donde se ha encontrado dos grupos muy diferentes, uno variable y otro no variable. La técnica presenta un gran poder de resolución llegando al nivel de cepas de la población, y nos ha permitido diferenciar entre las especies *C. fragariae* y *G. cingulata*, difíciles de diferenciar por la taxonomía clásica.
3. Se ha llevado a cabo una subdivisión de las cepas de *Colletotrichum* estudiadas en una serie de grupos ordenados jerárquicamente, en los cuales se puede observar el establecimiento de diferentes niveles resolución para cada una de las técnicas empleadas. La división principal de las cepas en dos agregados que se corresponden con las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se encuentra correlacionada tanto con estudios morfológicos como con estudios fisiológicos y bioquímicos. La especie *C. acutatum* ha sido dividida en dos grupos principales ACUT I y ACUT II, uno variable y otro invariable. La explicación de la gran variabilidad molecular encontrada en el grupo ACUT II puede ser debida a una reproducción sexual, dada la coincidencia entre su variabilidad y la presencia de ascosporas en cepas de este grupo.

4. Se ha secuenciado el fragmento de DNA ribosomal que incluye las secuencias intergénicas ITS1 e ITS4 y el gen que codifica para el RNA 5.8S de 33 cepas representantes de los grupos moleculares establecidos. El análisis filogenético llevado a cabo con las secuencias se correlaciona con la división principal en dos agredados de cepas centrados en las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* y con los grupos moleculares establecidos. La gran divergencia encontrada en la especie *C. acutatum*, nos permite dividirla en al menos dos entidades distintas que podrían tener rango de especie. Por el contrario, se ha encontrado muy poca divergencia entre las especies de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, lo que nos lleva a pensar que en realidad se trata de una sola especie. Debido a pequeñas diferencias entre las cepas de estas especies aisladas de plantas de fresa con respecto a las cepas de la especie *C. gloeosporioides* aisladas de otros huéspedes se podría reconocer a estas cepas como un grupo subespecífico dentro del patógeno de amplio espectro *C. gloeosporioides*.
5. Se ha puesto a punto un método de diagnóstico por PCR que resulta más eficaz en la detección del patógeno de cuarentena *C. acutatum* que los métodos empleados hasta el momento. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR son específicos de este patógeno y nos permiten diagnosticar el patógeno en muestras de material vegetal infectado. La técnica también es válida para el diagnóstico de infecciones latentes, muy características en *C. acutatum*, y podría ser aplicada en la selección de material vegetal libre de patógenos. La utilización de esta tecnología permite obtener resultados en un día de trabajo frente a la una o dos semanas necesarias requeridas por las técnicas convencionales, lo que facilita el transporte del material vegetal a lo largo de la UE bajo las normas de cuarentena.
6. Se ha clonado y secuenciado un producto amplificado de RAPDs específico de las cepas originalmente descritas como *C. fragariae*. A partir de esta secuencia se han diseñado los oligonucleótidos específicos FRA1 y FRA2 que nos permiten amplificar selectivamente las cepas de este grupo. Los resultados con plantas artificialmente infectas confirman los estudios previos con DNA fúngico y demuestran que se puede detectar la presencia de este patógeno en el material vegetal. La detección de este patógeno, exclusivo de zonas endémicas como USA, supone un paso importante para prevenir de la introducción de estas cepas en Europa y el método también podría utilizarse para comprobar si el patógeno es exclusivo de las plantas de fresa, o por el contrario está también presente en otros huéspedes pero sin reconocer.

Bibliografía

Bibliografía

- Anon.** (1987). *List of Cultures*. Edn 31, 420 pp. Baarn, Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Ainsworth, G.C.** (1973). Introduction and key to higher taxa. In: *The fungi: An Advanced treatise*, IV B. Ainsworth, G.C., Sparrow, F. K.m, Sussman. A. S. eds. Academic Press, New York. pp 1-7.
- Alahakoon, P. W., Brown, A. E., and Sreenivasaprasad, S.** (1994). Cross- infection potential of genetics groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 44:93-103.
- Arx, J.A. von** (1957a). Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Zeitschrift*. 29, 413-468.
- Arx, J.A. von and Müller, E.** (1981). Die amerosporen Gattungen der Pyrenomyceten. *Beitrage zur kryptogamenflora der Schweiz* 11, 1-434.
- Atkinson, G. F.** (1892). A new antracnose of the privet: *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Bull.* 4: 306-314.
- Bailey, J. A. and Jeger, M. J.** (1992). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, Wallingford (Reino Unido): CAB International.
- Barker, I., Brewer, G., Cook, R. T. A., Crossely, S and Freeman, S.** (1994). Strawberry blackspot disease (*Colletotrichum acutatum*). In: Schots, A., Dewey F.M., Oliver, R. eds. *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, detection and quantification*. Wallingford, U. K: C. A. B International, 179-82.
- Barker, I.** (1996). Serological Methods in crop protection. En: *Diagnostic in crop Production BCPC Symposium Proceedings: 65*, BCPC 13-22. Ed. Marshall G. British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, U.K.

Belloch, C., Barrio, E., García, M. D and Querol, A (1998). Phylogenetic Reconstruction of the Yeast Genus *Kluyveromyces*: Restriction Map Analysis of the 5.8S r RNA Gene and the Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 266-273.

Bonde, M.R., Petersen, G.L. and Maas, J.L. (1991). Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology* 81, 1523-1528.

Brainbridge, B. W. (1994). Modern approaches to the taxonomy of *Aspergillus*. En *The Genus Aspergillus: From taxonomy and genetics to industrial application* (eds. K. A. Powell, A. Renwick and Peberdy, J. F.). 291-301.

Braithwaite, K. S and Manners, J. M. (1989). Human hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphisms in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*: *Curr. Genet.* 16, 473-475.

Braithwaite, K. S; Irwing, J. A and Manners, J. M. (1990). Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. *Micol. Res.* 94 (8). 1129-1137.

Bridge, P.D., Willians, M.A.J., Prior, C and Paterson, R. R. M. (1993). Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. Flavoviride*. *Journal of General Microbiology* 139, 1163-1169.

Bridge, P.D., Prior, C., Sagbohan, J., Lomer, C.J., Carey, M. and Buddie, A. (1997). Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. *Biodiversity and Conservation* 6, 177-189.

Brown AE, Sreenivaprasad S, Timmer LW. (1996). Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from *Citrus* as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86, 523-527.

Brooks, A.N. (1931). Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. *N. sp.* *Phytopathology.* 21: 739-744.

- Brooks, A.N.** (1935). Anthracnose and wilt of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology*. 25: 973-974.
- Bruns, T.D., White, T.J. and Taylor, J.W.** (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22, 525-564.
- Bryan, R y Milloland, D. R.** (1984). Susceptibility of strawberry cultivars and related species to *Colletotrichum fragariae*. *Plant Disease* 65, 421-423.
- Buddie, A., Martinez-Culebras, P. V., Bridge, P. D., Cannon, P. F., Querol, A and Monte, E.** (1998a). Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Micol. Res.* Aceptado.
- Buddie, A.** (1998b). Final Report. In: The development of rapid diagnostic methods for the detection of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry plants in Europe. proyecto AIR3-CT94-1322. Bruselas Comisión de las Comunidades Europeas, Dirección General VI, 1-57.
- Carbone, L and Kohn, L.M.** (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the sclerotinacea. *Micologia*, 85, 415-427.
- Carvalho, C. T. de and Cardoso, C. O.** (1964). Noto sobre anthracnose dos estolones podridae to rizoma de moranquirois causado por *Colletotrichum fragariae* Brooks. *An escola Superior Agric. Luiz Queiroz* 21: 275-278.
- Cheah, L.H. y Soteros, J.J.** (1984). Control of Black fruit rot of strawberry. *Proceedings of the 37 th New Zealand Weed and Pest Control Conference*. 160-162.
- Cook, R.T.A. and Popple, S.C.** (1984). Strawberry black spot caused by *Colletotrichum* sp. (Abstract). *Agricultural Division Advisory Service Plant Pathology Technical Conference*, Harrogate, England.
- Cook, R. T. A., Barker, I., Brewer, G., Crossely, S., Freeman, S and Lane, C. R.** (1995). Detection of strawberry blackspot (*Colletotrichum acutatum*) with monoclonal antibodies. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 25, 57-63.



Corda, A. C. I. (1837b). *Icones Fungorum Hucusque Cognitorum* 1, 1-39, Nürnberg, Germany.

Currant, J., Driver, F., Ballard, J. W. O., and Milner, R. J. (1994). Phylogeny of *Metarhizium* analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.* 98, 547-552.

Denoyes, B. and Baudry, A. (1995). Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology* 85, 53-57.

Dickman, M. B., Patil, S.S., and kolattukudy, P.E. (1982). Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. *Physiological Plant Pathology*, 28, 333-347.

Dyko, B.J. and Mordue, J.E.M. (1979). *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* C.M.I. N°. 630.

Eastburn, D. M and Gubler, W. D. (1990). Strawberry anthracnose: detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. *Plant Disease* 74, 161-3.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N. and Alubouvette, C (1996). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Micol. Res* 101 (2) 179-187.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F and Querol, A. (1999). Identification of yeast by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Syst. Zool.* 34: 152-161.

Felsenstein, J. (1993). *PHYLIP: Phylogeny inference package, v.3.5c.* University of Washington, Seattle.

Fitch, W.M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.

Freeman, S., Pham, M., and Rodriguez, R, J. (1993). "Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses". *Experimental Mycology* 17, 309-322.

Freeman, S and R.J. Rodriguez. (1995). "Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR". *Mycolo. Res.* 99, 501-504.

Freeman, S., Katan, T., and shabi, E. (1996). "Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests." *Applied and Env. Micro.* 62, 1014-1020.

Freeman, S and Katan, T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87: 516-521.

García Jimenez, J., Cañizo, J. A del and Alfaro García, A. (1983). Una antracnosis del fresón en España. En *Jornadas sobre Patología Vegetal*, pp. 64-66. Madrid: INIA.

García-Muñoz, J. A. (1997). Caracterización fisiológica de cepas de *Colletotrichum* patógenas de fresa. Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.

García-Muñoz, J. A., Suárez, B., Grondona, I., Monte, E., Buddie, A. G., Bridge, P and Cannon, P. F. (1998). A physiological and biochemical approach to the systematics of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Journal of Pathology* (Enviado).

Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., mateos, P. F., bridge, P.D., Monte, E and García.acha, I. (1997). Physiological and Biochemical characterization to *Thichoderma harzianum*, a biological control agent of soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Enviromental Microbiology* (Aceptado).

Grove, W.B. (1935). *British stem and leaf fungi (Coelomycetes)*, I. Londres: Cambridge University Press.

Grove, W.B. (1937). British stem and leaf fungi (Coelomycetes), II. Londres: Cambridge University Press.

Guillamon, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J.F and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLPs analysis of the ribosomal ITS region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.

Gunnell, P.S and Gubler, W.D. (1992). Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* especies pathogenic to strawberry. *Micology* 84, 157-165.

Guthrie, P. A. I., Magill, C. W., Frederiksen, R. A and Odvody, G. N. (1992). Random Amplified Polymorphic DNA Markers: A System for identifying and differentiating Isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 82: 832-835.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Harris, D. (1992). A matter of good breeding. *The Grower* 5 March, 27-33.

He, C., Masel, A. M., Irwin, J., Kelemu, S and Manners, J. (1995). Distribution and relationship of chromosome-specific dispensable DNA sequences in diverse isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycol. Res.* 99, 1325-1333.

Hillis, D. M and Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The quarterly review of Bilology.* 66, 4. The University of Chicago.

Hodson, A., Mills, P.R. and Brown, A.E. (1993). Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Mycological Research* 97, 329-335.

Horn, N. L. and Carver, R. G. (1962). Anthracnose and podwdery mildew on strawberry plants in Lousiana. *Plant Dis. Rep.* 46: 591-592.

Horn, N. L. and Carver, R. G. (1963). A new crown rot of strawberry plants caused by *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology* 53: 768-770.

Horn, N. L. and Carver, R. G. (1968). Overwintering of *Colletotrichum fragariae* in strawberry crowns. *Phytopathology* 58: 540-541.

Howard, C.M. y Albrechts, E.E. (1983). Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *fragariae*). *Plant Disease* 67, 1144-1146.

Howard, C. M., and Albrechts, E.E. (1984). Anthracnose of strawberry fruit caused *Glomerella cingulata* in Florida. *Plant Disease* 68: 824-825.

Howard, C. M. (1972). A strawberry rot caused by *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology* 72: 994.

Howard, C. M., Mass, J. L., Chandler, C .K., and Albrechts, E. (1992). Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76: 976-981.

Hughes, K. J. D., Lane C. R and Cook, R. T. A . (1997). Development of rapid method for the detection and identification of *Colletotrichum acutatum*. *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens. Proceeding of the 4 th International Symposium of the European Foundation for Plant pathology, September 9-12, 1996, Bonn, germany.* Eds. dehne, H.W *et al.* academic publishers, Dordrecht.

Jones, R. K., Clayton, C. N. and Milholland. R. D. (1977). Strawberry diseases and control. N. C. State Univ. Plant pathol. Inf. Note 199.

Johnson, D. A., Carris, L. M and Rogers, J. D. (1997). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphae* and *C. nupharicola* sp. nov. on water-lilies (*Nymphaea* and *Nuphar*). *Micol. Res.* 101 (6): 641-649.

Johnston, R. P. (1997). Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruits- rots assessed using rDNA sequences. *Micologia*, 89 (3), 420-430.

Jukes, T. H., and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In Mammalian protein metabolism. Edited by H. N. Munro. Academic Press, New York. pp. 21-132.

Kishino, H., and Hasegawa, M. (1989). Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in *Hominoidea*. *J. Mol. Evol.* 29:170-179.

Kohn, Linda. M. (1992). Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Micología.* 84(2),139-153.

Kumar, S., Tamura, K and Nei, M. (1993). MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, v. 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.

Lee, S.L and Taylor, JW. (1992). Phylogeny of five fungus like protist species inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9: 636-653.

Leung, H., Nelson, R.J, and Leach, J.E. (1983). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv.Plant Pathol.* 10: 157-205.

Liyanage, H.D., McMillan, J.R and Corby kistler, H. (1992).Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Phytopathology*, 82: 1371-1376.

Liyanage, H.D., Köller, R. T; McMillan, J.R and Corby kistler, H. (1993). Variation in cutinase from two populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Phytopathology*, 83: 113-116.

MacLean D.J., Braithwaite, K.S., Manners, J.M, and Irwing, J.A.G. (1993). How do we identify and classify fungal pathogens in the era of DNA analysis. *Adv. Plant Pathol.* 10: 207-244.

Manners, J. M. (1992). Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Stylosanthes spp.* Pages 250-268 in : *Colletotrichum*, Biology, Pathology and control. J. A. Bailey and M. Jeger, eds. CAB international, Oxford, UK.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A and Collins, F. S. (1990). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research*. Vol 19, 5, 1154.

Martínez, A. J. and del Río Mora, A. O. (1975). Principales enfermedades de la fresa en el valle de Zamora. Mich. Institute. Nac. Invest. Agrie. Sag. Centro de investigaciones Agric: Bajío Folleto Mise. 27.22 pp.

Masel, A. M., Braithwaite, K., Irwin, J and Manners, J. (1990). Highly variable molecular Karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Curr. Genet.* **18**, 81-86.

Masel, A. M., Irwin, J and Manners, J. (1993a). DNA addition or deletion is associated with a major karyotype polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Gen. genet.* **237**, 73-80.

Masel, A. M., Irwin, J and Manners, J. (1993b). Mini-chromosomes of *Colletotrichum spp.* infecting several host especies in various countries. *Mycol. Res.* **26**, 852-856.

Masel, A. M., Struijk, N; McIntyre, C. L; Irwin, J and Manners, J. (1993c). A strain-specific cyclin homolog in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Gene.* **133**: 141-145.

Masel, A. Chaozu He, A; Poplawski, M; Irwin, J and Manners, J. (1996). Molecular evidence for Chromosome Transfer Between Biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol 9, **5**, 339-348.

Mass, J. L. (1978). Anthracnose of strawberry fruit in Maryland. *Plant Dis. rep* **62**: 488-492.

Mass, J. L. (1984). Compendium of strawberry Diseases. St. Paul (EEUU): The American Phytopathological Society.

Mass J. L., Howard C.M. (1985). Variation of several anthracnose fungi in virulence to strawberry and apple. *Plant Disease.* **69**: 164-166.

- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P.A., Bridge, P.D. and Riba, G. (1997).** Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research* 101, 159-164.
- Matsuo, K. and Ota, T. (1992).** Occurrence of anthracnose leaf blight of strawberry, a new fungal disease [in Japanese]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 544.
- Pooler, M. R and Harturg, J.S. (1995).** Specific PCR detection and Identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology*. 31, 377-381.
- Mena, A. J., de García. M. E. P., and Gonzalez, M.A. (1974).** Presencia de la antracnosis de la frutilla en la Republica Argentina. *Rev. Agron. Noroeste Argent.* 11: 307-312.
- Mercer, P. C., Wood, R.K.S., and Greenwood, A. D. (1971).** Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. En *ecology of Leaf Surface Microorganisms*. Eds. t.F. Preece and C. h. Dickinson. Londres: Academic Press, pp. 381-389.
- Metzenberg, R.L. (1991).** The impact of molecular biology on mycology. *Mycological Research* 95, 9-13.
- Mills, P. R. (1992a).** Molecular Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates Infecting Tropical Fruits. Pages 269-288 in : *Colletotrichum, Biology, Pathology and control*. J. A. Bailey and M. Jeger, eds. CAB international, Oxford, UK.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S and Brown, A. E. (1992b).** Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98, 137-144.
- Michelmore, R.W. and Hulbert, S.H. (1987).** Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 383-404.

O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) Curr. Genet. 22: 213-220.

Penz. and Saccardo, P. A. (1884). Atti r. Ist. Ven. Sci. Lett. Art. ser., 6, 2:640.

Prusky, D., Plumbley, R. A. (1992). Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. En: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey, J.A., Jager, M.J., eds. C. A. B. International, Wallingford, pp. 289- 307.

Rodriguez, R.J. and Yoder, O. C. (1991). A family of conserved repetitive DNA elements from the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* (teleomorph of *Colletotrichum gloeosporioides*). Experimental Mycology 15, 232-242.

Rodriguez, R.J. (1993). Polyphosphate present in DNA preparations from the filamentous fungal species of *Colletotrichum* inhibits restriction endonuclease and other enzymes. Analytical Biochemistry 209, 291-297.

Rohel, E., Couteaudier, Y., Papierok, B., Caelier, N and Deryver, C. A. (1997). Ribosomal internal transcribed spacer size variation correlated with RAPDs_PCR pattern polymorphisms in the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* and some closely related species. Micol. Res. 101 (5) 573-579.

Romero, F. (1996). Progress Report N° 2. In The development of rapid diagnostic methods for the detection of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry plants in Europe. Proyecto AIR3-CT94-1322. Bruselas Comisión de las Comunidades Europeas, Dirección General VI, 1-57.

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol Evol. 4: 406-425.

Saitou, N. (1990). Maximum likelihood methods. En: Molecular Evolution Computer analysis of proteins and nucleic acid sequences. Methods in Enzymology. 183, 584-598. editado por Doolittle, R. F. Academic Press, San Diego.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Schrenk, H. von and Spaulding, P.** (1903). the bitter-rot fungus. *Science*. 17, 750-751.
- Sequera, J., Marmeisse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A and Moiroud, A.** (1997). Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLPs analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Micol. Res.* 101 (4) 465-472.
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.-F., Brygoo, Y. and Bailey, J.A.** (1994). Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18, 121-138.
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., and Bailey, J.A.** (1995). rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. *Micol. Res.* 99 (4): 475-478.
- Simmonds, J.H.** (1965). A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 22, 437-459.
- Simmonds, J.H.** (1968). Type specimens of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 22, 437-459.
- Singh, S. J.** (1974). A ripe fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. *Indian Phytopathology*. 27: 433-434.
- Smith, B. J., and Black, L. L.** (1986). First report of *Colletotrichum acutatum* on strawberry in the United States. *Plant Disease* 70. 1074.
- Smith, B. J., and Black, L. L.** (1990). Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.

Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. and Mills, P.R. (1992). DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **41**, 265-281.

Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. and Mills, P.R. (1993). Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Micol. Res.* 97.(8). 995-1000.

Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R. and Brown, A.E. (1994). Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycological Research* **98**, 186-188.

Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., Meehan, B.M. and Brown, A.E. (1996a). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* **39**, 499-512.

Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E. and Mills, P.R. (1996b). PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* **45**, 650-655.

Stoneman, B. (1898). A comparative study of the development of some anthracnoses. *Botanical Gazette* 26, 69-120.

Sturgess, O. W. (1954). A strawberry ripe fruit rot. *Queensl. Agric. J.* 78: 269-270.

Sturgess, O. W. (1958). A ripe fruit rot of strawberry caused by *Gloeosporium*. *Queensl. L. Agric. Sci.* 14: 241-251.

Sutton, B.C. (1980). *The Coelomycetes*. Kew (Reino Unido) C. M. I.

Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Pages 1-26 En: *Colletotrichum*, Biology, Pathology and control. J. A. Bailey and M. Jeger, eds. CAB international, Oxford, UK.

Tello Marquina, J. C. (1984). Enfermedades del fresón. En enfermedades criptogámicas en hortalizas. Comunicaciones INIA. Serie: Protección vegetal., 22,301-315.

Templeton, A. R. (1983). Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage sites maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution*, 37: 221-224.

Thomson, J.D., Higgins, D. G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Van der Aa, H. A. (1998). Morphological characterization of 30 *Colletotrichum* strains by image analysis. Final Report. In: The development of rapid diagnostic methods for the detection of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry plants in Europe. proyecto AIR3-CT94-1322. Bruselas Comisión de las Comunidades Europeas, Dirección General VI, 1-57.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. En PCR protocols. A guide to methods and applications. Ed: M.A. innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T. J. White. Academic Press. San Diego. pp: 315-322.

Willians, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J, Rafalski, J.A., Tingery, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

Wilson, L. L., Madden, L.V., and Ellis, M. A. (1990). Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*. 80, 158-89.

Wright, W.R., Smith, M. A., Ramsey, G. B., and Beraña, Y. (1960). *Gloeosporium* rot of strawberry fruits *Plant Dis. Rep.* 44: 212-213.

Yang, X., Wilson, L.L., Madden, L.V. y Ellis, M.A. (1990). Rain splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* from infected strawberry fruit. *Phytopathology* 80, 590-595.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. Pedro Vicente Martínez Culebras
la calificación de Sobresaliente "cum laude"

Valencia, a 3 de Mayo de 1999

El Secretario,

El Presidente

Juan González

[Signature]

