

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA



Facultad de Ciencias  
Maestría en Biología Aplicada

**Evaluación de marcadores moleculares en la identificación de especies de *Alternaria***

John Henry Rodríguez Roa

Tesis de Maestría

Evaluación de marcadores moleculares en la identificación de especies de *Alternaria*

John Henry Rodríguez Roa

Director:  
Pedro Jiménez Morales Ph.D.

Tesis de Maestría

Maestría en Biología Aplicada  
Facultad de Ciencias  
Universidad Militar Nueva Granada  
Bogotá, D. C. 2014

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Cajicá Mayo de 2014

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que aportaron al desarrollo de este trabajo, de manera particular a las siguientes:

Universidad Militar Nueva Granada.

Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, a sus profesores y funcionarios.

Grupo Integrado de Investigaciones en Química y Biología (InQuiBio).

Vicerrectoria de Investigaciones por financiar este trabajo a través del proyecto CIAS-940.

Doctor Pedro Jiménez por la dirección de este trabajo.

Iván Valdés por su colaboración durante cada etapa de esta investigación.

Doctora Martha Cárdenas por mostrarme el fascinante mundo de la bioinformática.

## Resumen

Las especies del género *Alternaria*, uno de los principales patógenos de plantas en el mundo, son difíciles de identificar debido a su plasticidad fenotípica. En este estudio se identificaron algunas de las especies de *Alternaria* presentes en la sabana de Bogotá usando un enfoque morfológico, además se evaluó el potencial de cuatro regiones genéticas como potenciales marcadores taxonómicos tipo BARCODE de *Alternaria*, el alérgeno mayor de *Alternaria* (*Alta a1*), el gen de la oxidasa alternativa (*AOX*), el gen de la citocromo oxidasa I (*COXI*) y la región del espaciador de transcrito interno (*ITS*). Se identificaron 14 especies de *Alternaria*, todas ellas pertenecientes a la sección de conidios pequeños, 10 de las cuales corresponden a la sección *alternata*. A partir de las descripciones morfológicas realizadas se presenta una clave taxonómica para las especies de *Alternaria* de la sabana de Bogotá. Ninguna de los cuatro marcadores evaluados presenta características de Barcode para las especies integradas al estudio, debido principalmente a la cercanía filogenética que existe entre ellas. A pesar de la posibilidad de separar los aislados obtenidos en morfoespecies a partir de las características difusas de sus conidios y de su patrón de conidiación, el sustento genético referido a la diversidad de las secuencias para estos cuatro marcadores es insuficiente para designar como especies a los aislados pertenecientes a la sección *alternata*. Se propone que los taxones dentro de la sección *alternata* sean considerados como variantes intraespecíficas dentro del género.

## Abstract

Species of the genus *Alternaria* one of the main pathogens of plants in the world are difficult to identify because of their phenotypic plasticity. In this study some of the *Alternaria* species present in the Bogotá plateau were identified using a morphological approach, also the potential of four gene regions as potential taxonomic markers like BARCODE of *Alternaria* was evaluated, the major allergen of *Alternaria* (*Alt a1*) the alternative oxidase gene (*AOX*), the cytochrome oxidase I gen (*COX-I*) and the region of the internal transcribed spacer (*ITS*). 14 *Alternaria* species were identified, all of them belonging to the small section of conidia, 10 of them correspond to the section *alternata*. From morphological descriptions made there is a taxonomic key to the *Alternaria* species of Bogotá plateau. None of the four markers evaluated has features Barcode to the species studied, mainly because of the phylogenetic proximity between them. Despite the possibility of separating the isolates obtained in morphospecies from the characteristics of their conidia and conidiation pattern, sustenance genetic diversity based on the sequences for these four markers is insufficient to designate as species belonging to the isolated *alternata* section. We proposed that taxa within the *alternata* section are considered as intraspecific variants within the genus.

## Tabla de contenido

1. LA TAXONOMIA DEL GÉNERO <i>ALTERNARIA</i> , RETOS Y PROBLEMAS.....	7
1.1.GENERALIDADES.....	7
1.2.CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>ALTERNARIA</i> .....	9
1.3.TAXONOMIA DEL GÉNERO <i>ALTERNARIA</i> .....	10
1.4.DNA BARCODING.....	15
1.5.OXIDASA ALTERNATIVA (AOX).....	18
1.6.CONCLUSIONES.....	19
1.7.BIBLIOGRAFIA.....	20
2. ESPECIES DE <i>ALTERNARIA</i> DE LA SABANA DE BOGOTÁ.....	29
2.1. RESUMEN.....	29
2.2. INTRODUCCIÓN.....	29
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Colección de aislados.....	31
Caracterización morfológica.....	32
Características de la colonia.....	32
Formación de cadenas de conidios.....	32
Características de los conidios.....	32
Descripción y claves taxonómicas.....	33
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Clave para la sección de conidios pequeños de <i>Alternaria</i> de la sabana de Bogotá...36	
Descripción de las especies encontradas.....	37
2.1.BIBLIOGRAFIA.....	48
3. EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> .....	51
RESUMEN.....	51
3.1.INTRODUCCIÓN.....	51
3.2.MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
Colección de especímenes.....	53
Extracción de ADN.....	53
Diseño y selección de primers.....	54
Amplificación y secuenciación.....	54
Análisis bioinformaticos.....	54
Análisis de distancias genéticas y “Barcode gap”.....	55
3.3.RESULTADOS.....	56
Alineamiento de secuencias.....	60
Análisis filogenéticos.....	62
Análisis de distancias genéticas y “Barcode gap”.....	66
Identidad de las secuencias.....	68
3.4.DISCUSIÓN.....	70
3.5.BIBLIOGRAFIA.....	75
3.6.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	81

## LA TAXONOMÍA DEL GÉNERO *ALTERNARIA*, RETOS Y PROBLEMAS

El género *Alternaria* posee amplia distribución geográfica y múltiples papelas ecológicas, entre los que se destaca su patogenicidad contra animales y plantas. Por otra parte, la taxonomía de este género es complicada, y desde su primera descripción, se han intentado diferentes aproximaciones para resolver esta situación, aproximaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares. En este trabajo se pretenden revisar los aspectos relevantes de la taxonomía de *Alternaria*, las razones por las cuales es complicada y las aproximaciones que se han intentado para establecer sin ambigüedades la descripción de las especies de este género tan importante.

### 1.1.GENERALIDADES

*Alternaria* es un género dictiospórico cuyos teleomorfos corresponden al género *Lewia* de la familia Pleosporaceae, orden Pleosporales, clase Euascomicetes del filo Ascomicota. El género fue establecido por Ness en 1816 usando *Alternaria tenuis* (actualmente *Alternaria alternata*) como tipo para su descripción (IndexFungorum 2008). Debido al desconocimiento de la fase sexual para la mayoría de sus especies, este género se clasificaba como un hongo mitosporico o Deuteromicetes (Thomma, 2003).

Las especies del género *Alternaria* presentan una amplia distribución en la naturaleza, y desempeñan un gran número de funciones en su interacción con otros organismos. Algunas especies aparecen como endófitas, y su estudio ha permitido determinar la presencia de varios metabolitos citotóxicos, que presentan potencialidad como biocontroladores de algunos patógenos y parásitos de plantas de cultivo (Aly et al. 2008; Lahlali y Hijri, 2010; Kaur et al. 2013). También pueden presentarse como saprófitos en sustratos orgánicos, y por la producción de compuestos biológicamente activos alteran alimentos y forrajes por deterioro (Pitt y Hocking, 1997). Posiblemente su papel más estudiado es como parásitos de plantas, ya que un gran número de sus especies actúan como patógenos altamente destructivos, confiriéndole al género impacto económico (Mamgain et al, 2013). Sin embargo, la distinción entre su comportamiento parásito y saprófito todavía no es clara, ya que algunas especies ocupan una posición intermedia y cambian de un habito a otro cuando enfrentan hospederos debilitados (Rotem, 1994).

Las especies fitopatógenas son responsables de muchas de las enfermedades comunes en plantas agrónomicamente importantes en el mundo (Agrios, 2004). Afectan hojas, tallos, flores y frutos de plantas anuales, especialmente vegetales y ornamentales, pero también son capaces de atacar partes de árboles como los cítricos y manzanos (Agrios, 2004), mientras que otras son más conocidas como patógenos de postcosecha (Thomma, 2003). La base de datos de hongos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) muestra alrededor de 4000 asociaciones entre especies de *Alternaria* y hospederos vegetales (Farr et al., 2013), muchas de las cuales están asociadas con enfermedades de importancia comercial (Mamgain et al., 2013). Algunas de las enfermedades más comunes causadas por *Alternaria* incluyen el tizón temprano de la papa y el tomate, la mancha foliar del frijol, tabaco y geranio, la roya de zanahoria, clavel, crisantemo y zinnia, la mancha foliar de las crucíferas, la mancha púrpura de cebollas, la mancha foliar y de frutos en calabacín y manzana, así como la pudrición central de las manzanas y la

putrefacción de limones y naranjas (Agrios, 2004). Solo una especie, *Alternaria alternata*, se ha reportado como responsable de infectar más de 100 especies de plantas (Simmons, 1992, 2007). La patogenicidad del género se ha asociado a dos características principales. En primera instancia, a la producción de melanina, especialmente en los conidios. Este pigmento oscuro de alto peso molecular, actúa como una armadura protegiendo al hongo contra el estrés ambiental en condiciones desfavorables como temperaturas extremas, radiación UV y contra compuestos secretados por antagonistas microbianos, lo que le permite longevidad (Rotem, 1994). La melanina, además de jugar un papel importante en el desarrollo conidial (Kawamura et al., 1999), posee una función en la virulencia del patógeno, y se ha determinado que aislados deficientes de melanina pierden su capacidad de causar enfermedad en el campo (Frye et al., 1984).

El segundo factor es la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de ellos tóxicos. Se ha reportado el efecto de estas toxinas sobre aves y mamíferos, incluyendo al hombre, y son notables los efectos directos sobre plantas (Andersen et al., 2001). Se estima la existencia de más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para plantas (fitotoxinas), producidos por especies de *Alternaria*, (Ostry, 2008; Barkai-Golan et al., 2008), los cuales desempeñan un papel importante en la patogénesis de plantas. Estos metabolitos han sido convencionalmente agrupados en clases estructurales de la siguiente manera: dibenzopirenos, ácidos tetramicos, quinonas, péptidos, y lactonas misceláneas. Sin embargo, únicamente siete toxinas pertenecientes a tres clases estructurales diferentes son conocidas como posibles contaminantes de alimentos, con un potencial riesgo toxicológico. Estas son, ácido tenuazonico (TA), un ácido tetramico derivado, alternariol (AOH), alternariol momoetileter (AME), y altenueno (ALT), que son derivados de dibenzopirenos, y las alterotoxinas I, II, y III, derivadas de perilenos (Bottalico y Logrieco, 1998).

Las toxinas de *Alternaria* spp. se clasifican en dos grupos: toxinas no específicas de hospedero y toxinas específicas de hospedero. Las primeras, como Brefaldina A, dehidrocurvularina, ácido tenuazonico y tentoxina, afectan una gran variedad de especies vegetales. Aún cuando la mayoría de estas toxinas han sido identificadas, solo se conoce la acción precisa de unas pocas (Thomma, 2003). Las toxinas del segundo grupo son indispensables para el desarrollo de unas pocas enfermedades destructivas en un estrecho rango de hospederos. Son por lo menos 12 las toxinas específicas de hospedero que se han identificado en especies de *Alternaria* patógenas de plantas, muchas de las cuales parecen ser variantes dentro de *A. alternata*, razón por la cual se ha propuesto que los taxones que posean cada una de estas toxinas sean considerados como patotipos de esta especie (Thomma, 2003). El gen encargado de la producción de las toxinas puede ser removido sin afectar el crecimiento del hongo, pero afectando completamente su patogenicidad (Johnson et al., 2001; Hatta et al., 2006).

La exposición a toxinas de las especies de *Alternaria*, principalmente a las no específicas de hospedero, se ha asociado con efectos adversos para la salud humana y animal, razón por la cual su estudio ha recibido una creciente atención, tanto en programas de investigación, como en estudios de evaluación de riesgo (Ostry, 2008). En estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado la capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica y citotóxica del AOH, AME, ATX o TeA. Por el contrario, no existen datos relevantes sobre la genotoxicidad y carcinogenicidad en estudios *in vivo* (Pavón, 2012). La incidencia de *Alternaria* spp. en infecciones humanas no es muy elevada, porque allá de algunos de casos feohifomicosis, solo ocurre en casos de personas

inmunodeficientes. Sin embargo, *Alternaria* es uno de los principales géneros fúngicos causantes de alergias (D'Amato, 1997), y dentro de él, *A. alternata* es la principal especie productora de alérgenos (Barkai-Golan et al., 2008).

## 1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *ALTERNARIA*

El género *Alternaria*, desde sus primeras descripciones, ha sido asociado a una serie de características morfológicas, y principalmente a características de sus estructuras reproductivas asexuales, conidióforos y los conidios. Sin embargo, frecuentemente al cultivar especímenes suelen exhibir caracteres representativos de diferentes especies, tales como estructura colonial efusa, coloración oscura, gris, olivácea o negra, la aparición ocasional de anillos concéntricos más oscuros, o el crecimiento parcialmente inmerso de su micelio en el medio son algunas de ellas (Woudenberg et al., 2013).

Los conidios son grandes, multicelulares, subesferoides hasta elipsoides cuando inmaduros, y más largos cuando maduros, pero en todos los casos más amplios en la base, haciendo estrechos hacia el ápice, hasta convertirse en una punta cónica, elongada o filamentosa en algunas especies (Simmons, 2007). Presentan septos transversales y longitudinales (conidios dictiospóricos), lo que distingue al género de otros hifomicetes dematiáceos, como *Embellisia*, con los cuales comparte la producción de pigmentos oscuros. Los septos suelen ser gruesos, oscuros y rígidos y puede formarse una estructura alveolar entre ellos. Las paredes pueden ser lisas o variadamente ornamentadas (Simmons, 2007; Woudenberg et al, 2013).

El origen de los conidios se inicia con una protrusión del protoplasto a través de poros en la pared celular del conidióforo (Thomma, 2003). En el inicio del desarrollo conidial el ápice del conidióforo se engruesa y se deteriora ligeramente. Esta acción es favorecida por la aparición de una estructura transparente en forma de anillo. En la cavidad central de este anillo se forma un poro por la disolución de la pared celular. Luego, el citoplasma, cubierto solo con la membrana plasmática, es empujado a través del poro gracias a la presión de turgencia que provee una vacuola que aparece en la célula conidiógena. Posteriormente se deposita la pared celular en torno al conidio recién formado y un núcleo migra dentro del conidio (Honda et al., 1987, Honda et al., 1990). La melanina que está presente en los conidios es concentrada en la región exterior de la pared celular primaria, la cual es derivada de la pared original del conidio en desarrollo, y en los septos, que delimitan las células individuales del conidio multicelular. Después de que las células han sido delimitadas por septos, las paredes celulares secundarias son depositadas (Campbell, 1969).

Los conidios se presentan en cadenas acropétalas, que son producidas simpodialmente a partir de conidióforos simples, algunas veces ramificados, cortos o elongados, macronematosos, de color café y septados (Simmons, 2007; Woudenberg et al, 2013). Los conidios pueden aparecer solitarios, o en cadenas (blastocatenadas), que pueden alcanzar hasta 25 conidios, lineales o ramificadas, con conidióforos secundarios algunas veces conspicuos, dispuestos o no sobre ejes de esporulación erectos (Simmons, 2007), sin embargo se ha evidenciado la producción de estructuras de esporulación complejas y pleomórficas (Taralova et al., 2011).

### 1.3.TAXONOMÍA DEL GÉNERO *ALTERNARIA*

Históricamente la clasificación de las especies del género *Alternaria*, y la de otros géneros muy relacionados, se ha basado en sus características morfológicas, particularmente las de sus conidios (Rotem, 1994; Simmons, 2007). La forma, septación, tamaño y tipo de pico de los conidios, han sido criterios básicos para la separación de taxones (Joly, 1964; Ellis, 1971; Ellis, 1976; Simmons, 1997).

De la misma manera, las particularidades de las cadenas de conidios se han utilizado para este fin, Neergard (1945) propuso tres grupos de especies, referidos a la longitud de las cadenas de conidios, *Longicatenado* (10 o más conidios), *Brevicatenado* (aproximadamente 5 conidios), y *Noncadenado* (conidios simples). Simmons (1993), por su parte, propuso seis grupos de especies, tipificados por una especie representativa, que se diferencian por la longitud de las cadenas de conidios y el tipo de ramificación que éstas presentan.

Actualmente se aceptan dos grupos de especies dentro del género (especies de conidios grandes y de conidios pequeños) (Simmons, 2007). Para taxones de conidios grandes, la naturaleza del desarrollo apical de los conidios es el carácter inicial destacado, mientras que para los de conidios pequeños, la relación de los conidióforos y conidios en el desarrollo del patrón de conidiación es el carácter fundamental (Simmons, 2007).

Sin embargo, el uso de caracteres morfológicos para clasificación de especies de *Alternaria* resulta inconveniente pues esas especies presentan gran plasticidad morfológica, la cual depende de las condiciones de aislamiento, substrato, temperatura, luz, humedad, etc (Groves y Skolko 1944; Misaghi et al, 1978; Simmons, 1992; Rotem, 1994; Andrew et al, 2009). Además, dentro de un aislamiento existe un considerable rango de variación de los conidios, en cuanto al tamaño, la forma, el patrón de septación, el color, y la ornamentación, que depende de la edad del conidio (Simmons, 1992). Este no es un fenómeno exclusivo del género *Alternaria*, ocurre en los grupos en los cuales la taxonomía está enteramente basada en caracteres morfológicos *in vitro*, especialmente los tradicionalmente denominados hifomicetes como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Seifert y Rossman, 2010).

Muchos estudios establecen la posibilidad de separar con facilidad los dos grupos principales de especies de *Alternaria* (conidios grandes y conidios pequeños) y, dentro del grupo de conidios grandes, separar las especies utilizando criterios morfológicos o siguiendo enfoques filogenéticos (Pryor y Gilbertson, 2000; Chou y Wu, 2002; Pryor y Bigelow, 2003). Sin embargo, lograr esta separación de manera clara para las especies pertenecientes al grupo de conidios pequeños es difícil, lo que ha llevado al desarrollo de diferentes criterios para aclarar las posiciones taxonómicas de estos grupos (Sun y Zhang, 2008).

El grupo alternata, con *A. alternata* como especie arquetípica, agrupa muchas especies de importancia agronómica (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. Citri* y *A. longipes*) (Chou y Wu, 2002; Hong et al., 2005). Este grupo se caracteriza por presentar sus conidios en cadenas, y representa el grupo con mayor dificultad para la identificación de especies dentro de la sección de conidios pequeños, por lo que es probable que gran parte de las especies designadas como tal, estén incorrectamente identificadas (Rotem, 1994; Andersen et al., 2001).

Groves y Skolko (1944), estudiando la variabilidad de formas presentes en *Alternaria*, particularmente en *A. alternata*, concluyeron que las variaciones morfológicas eran una característica típica de la especie, por ello no es justificable asignar especímenes similares a *A. alternata* a especies diferentes. A pesar de esto, Rotem (1994) en su revisión de literatura encontró 70 especies que fueron citadas en una publicación y no fueron citadas nunca más, además menciona la existencia de al menos 11 especies oscuras dentro del grupo *alternata*. Por su parte, Andrew et al., (2009) mencionan que debido a la plasticidad, en cuanto a sus caracteres morfológicos, no es posible la diferenciación reproductible de varias morfoespecies. Estas situaciones ya habían conducido a que se sugiriera que muchos de los taxones de hospederos específicos, como *A. mali* o *A. gaisen*, fueran referidos como patotipos de *A. alternata* (Rotem, 1994). Actualmente *A. alternata* hace parte de la sección *Alternata*, que comprende por lo menos 60 especies, cuya diferenciación está determinada por la variación molecular, más que por la morfológica (Woudenberg et al, 2013).

En contraposición, Simmons (2007), expone la posibilidad de realizar la identificación taxonómica del género apelando al manejo cuidadoso de las condiciones de cultivo. Para él, y otros autores, la principal fuente de error para conseguir una identificación taxonómica correcta, fundamentada en aspectos morfológicos, dentro de todos los grupos de *Alternaria*, es el manejo equivocado de variables que afectan el crecimiento *in vitro* (Roberts y Simmons, 1993; Simmons, 1999; Roberts et al., 2000). Por esta razón los autores exponen como de vital importancia, estandarizar estas variables y los protocolos de medición de las mismas. Dentro de los factores que mayor variabilidad aportan a los caracteres taxonómicos de *Alternaria* se encuentra el sustrato donde crece el hongo (Rotem, 1994). Adicionalmente, el manejo de la temperatura y los regímenes de luz son esenciales, y ha sido fundamental en la descripción de nuevas especies (Simmons, 1992).

Cuando *Alternaria* crece en cultivos ricos en nutrientes, medios no estandarizados, en la oscuridad, bajo condiciones ambientales no controladas, la formación de micelio aéreo en exceso previene el desarrollo de los patrones de esporulación tridimensionales característicos (Andersen et al., 2001). Además, el uso de montajes húmedos altera la evidencia de los patrones de esporulación por rompimiento de las cadenas de conidios. Esto ha llevado a que algunos autores usen solamente la dimensión de los conidios en la identificación de las especies, porque es el único carácter obvio disponible, agravando aún más el error (Andersen et al., 2001).

Para Zhang (2003), una identificación morfológica razonable de las especies de *Alternaria* debe depender de una combinación de las características de conidios a partir de muestras naturales, cultivos en medios artificiales y sus patrones de esporulación tridimensionales. El problema de la taxonomía morfológica ha sido analizado para otros grupos del género, Lantigua et. al. (2008), refiriéndose a las especies que no forman cadenas, plantean la existencia de dos posiciones, una micológica y una fitopatológica. Según la primera, una visión extremadamente detallista, son cruciales la medición y el establecimiento de los parámetros exactos de las condiciones de crecimiento a la que se someten los aislados, donde cualquier variación implica rasgos fenotípicos diferentes y por lo tanto determinaciones erradas de las especies. Esta visión tiene como principales exponentes a Simmons y Roberts y colaboradores. Del otro lado, existe una posición más fitopatológica, como la de Rotem (1994), que ve como innecesario complicar la taxonomía con detalles mínimos, que al fin diferirán debido al carácter extremadamente variable

entre especies relacionadas. Rotem (1966), no logró encontrar diferencias en el comportamiento patogénico de aislados de *A. solani* f. sp. *porri* obtenidos de tomate y papa al inocularlos en varias solanáceas.

Parece estar claro que el solo uso de caracteres morfológicos no es adecuado, ni suficiente, para una identificación robusta dentro del grupo *alternata*, a pesar del seguimiento estricto de las variables que determinan los cambios fenotípicos (Andrew et al., 2009). Tampoco lo es para otros grupos muy cercanos entre sí, como la sección noncatenateae (Lantigua et al. 2008). Esta situación en la taxonomía del género, hace necesario apelar a otro tipo de evidencias que aporten claridad sobre las especies que integran estos grupos.

Una opción alternativa al problema de identificación de *Alternaria*, es la caracterización de los metabolitos secundarios producidos por sus especies y su uso como marcadores quimiotaxonómicos. Diferentes especies de *Alternaria* producen diferentes metabolitos secundarios o combinaciones de metabolitos, que pueden ser detectados a través de métodos cromatográficos, mecanismo que se ha utilizado para distinguir entre especies morfológicamente similares (Ostry, 2008).

Este último criterio ha resultado útil para lograr diferenciar aislados de *Alternaria* de conidios pequeños, y han sido clasificados como productores de toxinas específicas de hospedero. De manera general, se han clasificado los productores de toxinas específicas como patotipos de *A. alternata* y se les ha asignado un nombre como tales, dependiendo de las toxinas específicas para hospedero que son capaces de producir (Nishimura, 1980; Otani y Kohmoto, 1992; Scheffer, 1992; Johnson et al 2001, Hatta 2002; Masunaka et al., 2005).

Esta herramienta también se ha utilizado exitosamente para distinguir especies del grupo *A. alternata* de especies del grupo *A. infectoria*. Mientras que la primera produce alternariol y alternariol monoetileter, la segunda solo produce una toxina de identidad desconocida (Andersen y Thrane, 1996). Otro ejemplo de la utilidad del uso de metabolitos resultó al combinarla con análisis fisiológicos, lo cual permitió separar aislados de *A. alternata*, *A. longipes* y *A. gaisen* (Andersen et al., 2001), apoyando de esta manera el establecimiento de *A. gaisen* y *A. longipes* como especies, abandonando así el uso de estas dos como patotipos de *A. alternata* de pera y tabaco. También permitió separar los grupos de especies *A. infectoria*, *A. arborescens* y *A. tenuissima*, los cuales poseen solo unos pocos metabolitos en común (Andersen et al., 2002). La variación en la cantidad de ciertas toxinas, como el altenueno, permiten distinguir entre especies distantes morfológicamente como son *A. citri*, *A. porri*, *A. radicina*, y *A. tomato* (Bilgrami et al., 1994)

Por otra parte, diferentes métodos moleculares han servido como complemento en la diferenciación de especies del género *Alternaria*. Los resultados obtenidos a través de estos mecanismos son variables, pero muchos de ellos, han permitido aclarar la posición taxonómica, y las relaciones evolutivas entre algunas especies (Andersen et al., 2002). El uso de herramientas moleculares para hacer taxonomía presenta una enorme ventaja sobre las caracterizaciones morfológicas y es que la estructura del ADN permanece estable con las etapas fisiológicas, y su composición no depende de las condiciones de cultivo. Por otra parte, el ADN tiene regiones con

diferentes grados de variabilidad que permiten la identificación de la especie o de otros grupos taxonómicos (Pavón, 2010).

Se han desarrollado análisis genéticos utilizando polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción RFLP en ADN ribosomal (rDNA), enfocados en el problema de la existencia de grupos de *Alternaria* específicos de hospedero, y en la variabilidad genética de las especies, especialmente de *A. alternata* (Nishimura, 1980; Adachi et al., 1993; Kusaba y Tsuge, 1994; Aradhya et al., 2001). Los resultados de estos estudios apoyan la hipótesis de que las especies de *Alternaria* productoras de toxinas específicas de hospedero deben ser caracterizadas como patotipos de *A. alternata*, que corresponden a variantes intraespecíficas especializadas en patogenicidad, dependiendo de las toxinas específicas que producen.

Usando perfiles de PCR de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) y varios pares de *primers*, ha sido posible analizar el ADN genómico y obtener distintos patrones de fragmentos, que se han utilizado para medir el grado de relación entre especies (Cooke et al., 1998; Sharma y Tewari, 1998; Morris et al., 2000; Roberts et al., 2000). Con este análisis fue posible separar aislados de *Alternaria* provenientes de *Pyrus bretschneideri* en cuatro grupos que corresponden a los establecidos de acuerdo a sus características morfológicas (Sun y Zhang, 2008). También se consiguió separar poblaciones de *A. solani* y *A. alternata*, e incluso distinguir entre grupos de *A. solani* que atacan tomate de los que atacan papa, sugiriendo la posibilidad de especialización patogénica (Weir et al., 1998).

Roberts et al. (2000), apoyando la idea de que no solamente es posible diferenciar estas especies por caracteres morfológicos, sino también usando métodos moleculares, lograron diferenciar 260 aislados de *Alternaria*, usando RAPD, bajo condiciones estándar de crecimiento, en grupos que correspondían a los definidos por sus características morfológicas (Simmons y Roberts 1993). Para estos autores los trabajos de Nishimura (1980); Kusaba y Tsuge (1995) y otros, carecen de validez, pues según ellos, se fundamentan exclusivamente en algunos caracteres morfológicos, como la medición de los conidios, y en una fracción muy pequeña del genoma. Simmons (1999) y Roberts et al. (2000) señalaron la necesidad de evaluar más regiones del genoma con el fin de identificar adecuadamente la posición taxonómica de las especies de *Alternaria*, especialmente en la que se presenta mayor dificultad, concretamente las de conidios pequeños.

Pryor y Gilbertson (2002), usando un enfoque polifásico, en el que incluyeron caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares (RAPD), analizaron las relaciones entre tres especies muy relacionadas, patógenas de umbelíferas: *A. radicina*, *A. carotiincultae* y *A. petroselini*. Determinaron diferencias entre *A. petroselini* y las otras dos especies, pero no entre éstas, sugiriendo por lo tanto que *A. radicina* y *A. carotiincultae* son conespecíficas y deben ser consideradas como sinónimos.

La secuencia del ADN ribosomal que incluye las regiones *ITS-1* (*Internal transcribed spacer*), *5,8S* e *ITS-2* ha sido usada con frecuencia en taxonomía y filogenia. Esta región ha sido identificada como la región *Barcode* de hongos (Schoch et al, 2012) ya que además de presentar un buen *Barcode gap* (alto grado de variación interespecífica y baja variación intraespecífica), es de fácil amplificación por su gran número de repeticiones. Para el caso de la taxonomía de *Alternaria* se ha convertido en herramienta fundamental para estudiar la posición taxonómica de

los diferentes grupos de especies dentro del género y las relaciones con géneros cercanos. Otras secuencias, como las del alérgeno principal (*Alt a1*), poligalacturonasa (*gdp*), subunidad pequeña mitocondrial (*mtSSU*), también han sido usadas de manera frecuente en la resolución de las relaciones entre especies de *Alternaria*, muchas veces combinadas con *ITS* (Pryor y Gilbertson, 2000; Pryor y Bigelow, 2003; Peever et al, 2004; Hong et al, 2005; Pavón et al, 2010).

Algunos estudios moleculares basados en estas secuencias, han permitido confirmar varios de los grupos propuestos por Simmons a partir de sus características morfológicas como linajes monofiléticos (Pryor y Gilbertson, 2000; Pryor y Bigelow, 2003; Hong et al., 2005). Sin embargo persiste la necesidad de determinar si los diferentes grupos que aparecen dentro de estos grupos de especies representan verdaderas especies o corresponden a variedades patogénicas o patotipos de las mismas (Andrew et al., 2009) lo que cada vez parece más evidente.

Varios de los estudios que han empleado estas secuencias para establecer relaciones filogenéticas entre grupos de *Alternaria*, demuestran que son insuficientes para resolver claramente la relación entre grupos de especies y especies cercanamente relacionadas, especialmente entre los taxones de conidios pequeñas (Kusaba y Tsuge, 1995; Pryor y Gilbertson, 2000; Chou y Wu, 2002; Pryor y Michailides, 2002; Kang et al., 2002; Pryor y Bigelow, 2003; Hong et al., 2005). Peever et al. (2004) empleando secuencias adicionales, concretamente las de la subunidad grande mitocondrial (*mtLSU*), beta tubulina ( $\beta$ -*tubulina*), endopoligalacturonasa (*endoPG*), y dos regiones anónimas del genoma (*OPA1-3* y *OPA2-1*), para resolver las relaciones filogenéticas entre especies de *Alternaria* aisladas de cítricos, encontraron que la mayor parte de ellas poseen una variación insuficiente entre los aislados, especialmente los de conidios pequeños, algunos como *mtLSU* permiten separar especies de conidios grandes del grupo de conidios pequeñas, pero no se pudieron separar especies dentro de este último grupo.

Los esfuerzos recientes se concentran en establecer filogenias más exactas a través del análisis combinado de un gran número de secuencias. Por ejemplo, Park et al., (2008) emplearon las secuencias de la actina (*ACT*), quitin sintasa (*CHS*), factor de elongación de la traducción (*EF-1a*), *ITS*, *mtSSU*,  $\beta$ -*tubulina*, *Alt a1*, *gdp*, además de análisis de RAPD y secuencias de repetición simple (ISSR), para establecer las relaciones filogenéticas entre dos especies muy cercanas, morfológica y patogénicamente, *A. radicina* y *A. carotiincultae*. Los autores pudieron determinar, que las secuencias ribosomales (*ITS* y *mtSSU*) y algunos genes codificantes de proteínas (*ACT* y *CHS*) no permiten establecer variaciones entre las especies, sin embargo *EF-1a*,  $\beta$ -*tubulina*, así como el análisis RAPD y e ISSR si lo hacen.

El problema de la ambigüedad filogenética de muchos de los grupos de *Alternaria* sobrepasa los límites de este género. Estudios en los que se analizan las relaciones filogenéticas entre *Alternaria* y géneros cercanos, *Ulocladium*, *Embellisia* y *Nimbya*, entre otros, usando estos mismos marcadores moleculares han demostrado una clara discrepancia entre las distinciones que se logran a partir de las características morfológicas y los datos moleculares (Chou y Wu, 2002; de Hoog y Horre, 2002; Pryor y Bigelow, 2003; Pryor y Gilbertson, 2000). Se han propuesto dos alternativas para enfrentar esta dificultad, la primera consiste en mantener los géneros existentes, solo después de una revisión de cada uno de ellos, lo que conllevaría a su reorganización; la segunda, más radical, es fusionar cuatro géneros (*Alternaria*, *Embellisia*, *Nimbya* y *Ulocladium*) en uno solo: *Alternaria* (Pryor y Bigelow, 2003).

La existencia de varios géneros no monofiléticos asociados a *Alternaria*, lo que convierte a este grupo en un complejo, y la incapacidad de establecer relaciones entre los grupos de especies y los caracteres morfológicos de éstas, han llevado al establecimiento de un enfoque integrador que apoya la segunda alternativa de Pryor y Bigelow (2003) (Lawrence et al, 2013; Woundenberg et al, 2013). Sin embargo, estudios moleculares y morfológicas de varios grupos, han permitido el establecimiento de nuevos géneros y un reordenamiento de las relaciones filogenéticas dentro del complejo (Inderbitzin et al, 2006; Pryor et al, 2009; Runa et al, 2009; Wang et al, 2011; Lawrence et al. 2012; Lawrence et al, 2013; Woundenberg et al, 2013)

La última revisión del género se realizó usando un enfoque filogenético molecular, a través del análisis de diez genes codificantes de proteínas de 175 especies de *Alternaria* y nueve de géneros relacionados. A partir de este estudio se ha establecido a *Alternaria* como un complejo que integra varios géneros. El estudio permitió agrupar los aislados en ocho grupos de especies (junto con *Ulocladium*), los cuales se proponen como secciones. Mientras que los linajes de *Alternaria* con teleomorfos conocidos (grupo *infectoria*) fueron agrupados en un clado diferente al que no se le dio estatus de sección (Lawrence et. al., 2013).

Los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos más recientes sumados al ordenamiento propuesto por Lawrence et. al., (2013) y a la comparación de seis regiones génicas: *18S nrDNA*, *28S nrDNA*, *ITS*, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa (*RPB2*) y *TEF1a*, de 167 aislados de *Alternaria* y géneros cercanos, han permitido que Woudenberg et. al., (2013), redefinan el género *Alternaria*. En este trabajo se expone la existencia de un gran clado denominado *Alternaria*, que a su vez está dividido en 24 clados internos que son tratados como secciones del género, 16 más de las propuestas por Lawrence et. al., (2013). Igualmente, se propone una sinonimia de *Alternaria* con los géneros *Allewia*, *Brachycladium*, *Chalastospora*, *Chmelia*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Lewia*, *Nimbya*, *Sinomyces*, *Teretispora*, *Ulocladium*, *Undifilum* y *Ybotromyces*.

Está claro entonces que es posible realizar una separación entre los grandes grupos del complejo *Alternaria* a través de métodos moleculares, lo que ha permitido incluso el reordenamiento de varios géneros. Sin embargo, no es suficiente para aclarar las relaciones taxonómicas que existen dentro de cada uno de las secciones que hacen parte del complejo, como las que se establecen entre las especies de conidios pequeñas que forman cadenas. Se hace evidente entonces, la necesidad de apelar a técnicas más efectivas para la identificación de especies dentro del género *Alternaria* y de géneros tan problemáticos como este, en los que la identificación correcta escapa incluso de la mano de los expertos, quienes aún no llegan a un acuerdo sobre la posición taxonómica de muchos de los grupos de especies.

#### **1.4.DNA BARCODING**

El DNA Barcoding es una herramienta actualmente disponible para los taxónomos, que tiene como objetivo, proveer un método eficiente para la identificación de organismos a nivel de especie. Se basa en la premisa de que una secuencia corta estandarizada de ADN (DNA Barcode) puede distinguir individuos de una especie, porque las variaciones genéticas entre especies son mayores que dentro de las especies (el llamado *Barcode gap*) (Hajibabaei et al., 2007). Este

método fue propuesto inicialmente por P. D. N. Hebert de la Universidad de Guelph en Ontario Canadá (Hebert et al, 2003). En la práctica, la secuencia de ADN puede ser generada de una pequeña muestra de tejido de un organismo no identificado, esta secuencia es comparada con una librería de secuencias de referencia provenientes de especies conocidas. Una coincidencia entre la secuencia del organismo desconocido y la secuencia de referencia puede proveer una rápida y reproducible identificación (Kress et al., 2007).

La selección de un locus para Barcode es complicada por la compensación que se establece entre la necesidad de una aplicación universal y una tasa máxima de divergencia de la secuencia entre especies. Según lo expresa Kress et al. (2007), la aplicación universal de la técnica incluye la amplificación por PCR y secuenciación de *primers*, así como la presencia ubicua del locus en el grupo de organismos. Jian Min y Hckey (2007) analizaron un conjunto de secuencias mitocondriales y monitorearon el efecto de reducir la longitud de las secuencias en la utilidad de los datos para la identificación de especies y para la reconstrucción filogenética, concluyendo que las secuencias estándar cortas (600 pares de bases) no son convenientes para inferir relaciones filogenéticas exactas, pero son suficientes para realizar identificación de especies entre hongos.

Para varios organismos, principalmente para muchos grupos animales se ha establecido que una región de entre 600 y 800 pares de bases del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa I (*CoxI*) provee las características de universalidad y variabilidad. Hebert et al. (2003) establecieron dos ventajas para el uso de *CoxI*. Primero, los *primers* universales para este gen son muy robustos, permitiendo recuperar el extremo 5' de los más representativos, si no de todos los filos animales, y segundo, que *CoxI* parece poseer un rango de señal filogenética mayor que cualquier otro gen mitocondrial.

Los límites taxonómicos del Barcoding de *CoxI* en animales aun no son enteramente conocidos, pero se ha probado como herramienta exitosa para discriminar entre especies en muchos grupos analizados. Para 260 especies de aves de Norteamérica se presentó especificidad cercana al 97% (Hebert et al., 2004a), 95% para 121 especies de mamíferos (Hajibabaei, 2007), peces con 99,5% de discriminación entre casi 500 especies (Ward et al. 2005; Ward y Holmes, 2007), artrópodos (Hebert et al., 2004b; Hajibabaei, 2006; Smith et al., 2005) y moluscos (Chen et al. 2010; Dai et al. 2012), entre otros. Además el DNA Barcoding usando este marcador, está siendo establecido para otros grupos de organismos que incluyen protistas y macroalgas (Saunders, 2005; Robba et al. 2006).

El uso del marcador *CoxI* no es útil en todos los casos, tal como lo han demostrado Witwoth et al., (2007) para el reconocimiento de moscas del género *Protocalliphora*. Kress y Erickson, (2007) para plantas, quienes además soportan la afirmación de Cho et al., (1998) respecto a la baja tasa mutacional de *CoxI* y otros genes mitocondriales y a su rápido cambio estructural dentro del genoma de este grupo de organismos. Lin et al. (2009) demuestran lo mismo para dinoflagelados, y proponen como alternativa el gen de la citocromo b (*cob*); Vences (2005) para el caso de los anfibios en el que determina la insuficiencia de este gen para resolver solo las especies y por lo tanto expone la posibilidad de usar un conjunto de genes con este fin. Afirma que los principales problemas de *CoxI* para este grupo de organismos son el gran número de sitios de unión de los *primers* y el solapamiento de los valores de divergencia intra e interespecíficos.

Para el caso de los hongos se han obtenido resultados bastante ambiguos con respecto a la utilidad de *CoxI* como marcador tipo Barcode. Este gen puede ser efectivo en el reconocimiento de especies de *Penicillium* (Seifert et al. 2007), de la misma manera que lo es para la identificación molecular de especies de *Leohumicola* (Nguyen y Seifert, 2008). Sin embargo al probar el mismo marcador en *Fusarium* se ha revelado un número significativo de multicopias del gen, además de la presencia de intrones, lo que determina un gran problema en el diseño de *primers* (Gilmore et al., 2009). Paralelamente se ha evidenciado que no existe la variación de secuencia suficiente como para discriminar entre especies del género (Galvez, 2009).

Santamaría et al. (2009) evaluaron 11 genes codificantes de proteínas y dos ribosomales pertenecientes a hongos ascomicetes: subunidad 6 de la ATP sintasa (*ATP6*), *CoxI*, *CoxII*, *CoxIII*, citocromo b (*CytB*), subunidades de la deshidrogenasa (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *ND6*), *SSU* y *LSU* rDNA, intentando determinar su tamaño y la presencia de intrones para su uso como marcadores tipo Barcode. Concluyeron que dentro de estas secuencias, con excepción de *ND6*, la cual proponen como buen candidato a Barcode, es frecuente la presencia de intrones lo que dificulta su uso.

Alternativamente se han examinado algunas secuencias del RNA ribosomal nuclear como posibles candidatos a DNA Barcode, ya que como se ha expuesto anteriormente, estas secuencias han sido usadas ampliamente en sistemática y reconocidas como herramientas útiles para resolver las relaciones filogenéticas de muchos géneros de hongos.

Robert et al., (2011) describieron dos métodos para buscar datos genómicos de los segmentos de DNA más eficientes para identificación y clasificación de hongos, el método del locus ideal (ILM) y el método del mejor par de *primers* (BPPM). Los autores encontraron varios *primers* con capacidad de proveer buena señal filogenética, y además encontraron que únicamente siete pares de *primers* cubrían 72 especies de las 74 estudiadas, siendo *ITS* la región más prometedora como Barcode.

Schoch et al. (2012) evaluaron la utilidad de diferentes secuencias entre ellas la subunidad pequeña (*SSU*), la subunidad grande (*LSU*) e *ITS*, llegando a la conclusión de que esta última debería ser propuesta como marcador universal para hongos. Sin embargo estos resultados contrastan con los de Santamaría (2009) quien determinó como inadecuado el uso de *SSU* y *LSU*, y con los de Seifert et al. (2007) en los que *18S* y *28S ITS* no pudieron diferenciar tantas especies como *CoxI*.

Varias secuencias codificantes de proteínas han sido también blanco de estudio en la búsqueda de alternativas para *CoxI* como marcador Barcode en hongos, obteniendo resultados variables. Seifert et al., (2007) encontraron la secuencia de la  $\beta$ -tubulina (*BenA*) menos efectiva que *ITS* y *CoxI* en esta función, mientras Robert et al., (2011) identificaron *EF-1  $\alpha$*  como una región de interés solo superada por *ITS*.

De acuerdo a las dificultadas relacionadas con la identificación de algunos grupos de hongos a través de mecanismos taxonómicos estándar, y a la poca claridad que aportan los métodos moleculares actuales, aún son necesarios análisis más profundos de regiones alternativas del

genoma que permitan la identificación de un Barcode ideal para los hongos (Robert et al. 2011; Lewis et al. 2011). Un candidato que debido a sus características, y resultados de estudios previos, genera grandes expectativas, es el gen de la oxidasa alternativa (*AOX*).

### 1.5.OXIDASA ALTERNATIVA (*AOX*)

La cadena respiratoria de las mitocondrias de gran parte de los organismos es similar a la encontrada en sistemas mamíferos en la que se encuentran cuatro complejos: complejo I (la NADH deshidrogenasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (complejo *bc<sub>1</sub>*), y el complejo IV (citocromo c oxidasa). Bajo ciertas condiciones muchos organismos contienen un segundo sistema mitocondrial de transporte de electrones en adición a la ruta normal mediada por citocromo. Esta oxidasa terminal hemo-independiente, denominada oxidasa alternativa (*AOX*), transporta electrones directamente de la ubiquinona al oxígeno y evita los complejos III y IV, dos sitios de formación de gradientes de protones.

Históricamente se ha considerado que bajo cualquier condición que inhiba o disminuya la actividad de la cadena de transporte de electrones se induce esta vía alternativa, y se ha indicado como un mecanismo particular frente a intoxicaciones con cianuro (Dumestre, 1997; Umbach y Siedow, 2000).

Se ha propuesto también que *AOX* juega un papel importante como mecanismo de defensa oxidativo (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Wagner y Moore, 1997). En las situaciones de estrés para las plantas se producen grandes aumentos en la concentración de NADH, lo que hace que la ubiquinona esté continuamente reducida. Cuando esto pasa, la ubiquinona tiende a ceder los electrones a moléculas de O<sub>2</sub> generando especies reactivas de oxígeno (ROS). En estas situaciones la existencia del desvío de electrones por medio de la oxidasa alternativa supone una solución eficaz para evitar la formación de ROS, ya que la oxidasa alternativa le quita los electrones a la ubiquinona y reduce el O<sub>2</sub> para formar agua. En los hongos, de manera similar, como ocurre en *Neurospora crassa* y *Hansenula anomala*, la oxidasa alternativa puede servir para proporcionar un grado de flexibilidad metabólica o proteger a las células de las ROS (Berthold. et al. 2000).

Recientemente se ha planteado la existencia de un vínculo evolutivo entre las diferentes oxidasas alternativas; se propone que la oxidasa alternativa ancestral funcionaba como una reductasa de oxígeno operativa en las etapas de transición entre la atmosfera anóxica y óxica (Gomes et al. 2001), lo que constituiría a su gen como una herramienta valiosa para la reconstrucción filogenética de algunos organismos.

Se conoce la existencia de *AOX* en los diferentes grupos de organismos; plantas superiores (Vanlerberghe y McIntosh 1997), protozoos (Chaudhuri *et al.*, 2006), levaduras (Veiga *et al.* 2003), bacterias (Stenmark y Nordlund, 2003; McDonald y Vanlerberghe, 2005), e incluso en algunos grupos animales (McDonald and Vanlerberghe, 2004). En el caso concreto de los hongos existen múltiples reportes de la enzima (Sakajo, et al., 1991; Li et al., 1996; Yukioka et al., 1998; Kirimura y Usami, 1999; Huh y Kang, 1999; Joseph-Horne *et al.*, 2000).

Jiménez et al. (2007) encontraron 228 secuencias de nucleótidos de hongos del gen de la oxidasa alternativa en una búsqueda en las bases de datos del *Centro Nacional para la Información Biotecnológica* (NCBI). En una búsqueda reciente (30 de noviembre de 2013), se han encontrado 364 secuencias, lo que denota un crecimiento progresivo del conocimiento del gen dentro del reino Fungi. Esta amplia distribución del gen *AOX* puede estar relacionada con la flexibilidad metabólica que ofrece, lo que permite que el organismo que posee esta vía alterna responda a una amplia gama de condiciones de desarrollo y ambientales (Berthold. et al. 2000).

La marcada ubicuidad del gen, asociada al mantenimiento de una similaridad de secuencia considerable entre diferentes grupos de organismos facilitaría el diseño de *primers* universales (Jiménez et al. 2007), llenando así uno de los requisitos indispensables para constituirse como marcador tipo Barcode. También se ha determinado la existencia de múltiples copias de este gen en varios hongos, como *Neurospora crassa*, *Chaetomiun globosum*, *Candida maltosa*, *Candida albicans* e *Yarrowia lopolytica* (Juszczuk y Rychter, 2003), lo que agilizaría su amplificación. Adicionalmente se ha determinado que no existen genes homólogos de él (Hattori et al., 2009), asegurando la especificidad del producto amplificado. Finalmente el análisis de secuencias *AOX in silico* ha permitido establecer que existe la suficiente divergencia entre las secuencia como para distinguir entre taxones (Jiménez et al. 2007).

La comprobación de estos supuestos ha sido posible para especies del género *Fusarium*. Gálvez (2009) determinó que una secuencia de 800 pares de bases del gen *AOX* es un buen candidato como marcador DNA Barcode para este género, por encima de *Cox1*. Sus resultados fueron consolidados posteriormente por Vera (2012).

Queda de esta manera abierta la posibilidad de analizar la utilidad de *AOX* como marcador taxonómico en otros grupos de hongos, como *Alternaria*, el que como ya se ha mostrado en esta revisión, representa uno de los grandes retos taxonómicos de la micología moderna. A pesar del reordenamiento taxonómico al que se ha visto sometido, a la integración de géneros, y a la aparición de algunos nuevos, aún persisten los conflictos sobre algunas especies del grupo *Alternaria*. Problemas como la verdadera denominación de algunos taxones, como patotipos o como especies, particularmente dentro de los grupos más complejos como los de conidios pequeños longicatenas.

## 1.6.CONCLUSIONES

La taxonomía del género *Alternaria*, uno de los más importantes fitopatógenos, ha sido enfrentada fundamentalmente desde una perspectiva morfológica. Recientemente se han empleado enfoques alternativos que se sustentan en características bioquímicas y moleculares de sus especies. Pero es a través de la conjugación de estas tres alternativas que se han obtenido resultados más significativos, especialmente en taxones que revisten dificultad. Los datos bioquímicos y moleculares respaldan la separación entre los grupos de conidios pequeños y grandes, obtenidos por medios morfológicos, de la misma manera que lo hacen para los taxones dentro del grupo de conidios grandes. Un enfoque polifásico de este tipo, fundamentado en una perspectiva filogenética, ha permitido un reordenamiento de *Alternaria*, que incluye varios géneros asociados. Sin embargo, aún existen dudas sobre las verdaderas relaciones taxonómicas que se establecen entre especies de conidios pequeños, especialmente las que forman cadenas. Se

hace evidente la necesidad de herramientas adicionales, dentro de cualquiera de las perspectivas, que contribuyan en la resolución de estos problemas. Algunas, de naturaleza morfológica, han sido propuestas recientemente (Taralova 2011), otras, moleculares, son propuestas aquí; como la búsqueda de marcadores taxonómicos que superen las dificultades que se han encontrado para ITS, considerado el marcador estándar de hongos, así como la búsqueda de herramientas más eficientes en la identificación de especies. El gen *AOX* presenta las características suficientes para ser considerado como un buen marcador tipo Barcode para *Alternaria*.

## 1.7.BIBLIOGRAFIA

Adachi Y., Watanabe H., Tanabe K., Doke N., Nishimura S. & Tsuge, T. (1993). Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Appl Environ Microb* 59:3197-3205.

Agrios G.N. (2004). *Plant Pathology*. Academic Press, New York, USA.

Aly A., Edrada-Ebel R., Indriani I., Wray V, Müller W., Totzke F., Zirrgiebel U., Schächtele C., Kubbutat M., Lin W., Proksch P., Ebel R. (2008). Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria sp.* and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J Nat Prod*. 6:972-80.

Andersen B., Thrane U. (1996). Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Can J Microbiol* 42:685-689.

Andersen B., Kroger E., Roberts R. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen*, and *A. longipes*. *Mycol Res* 105:291-299.

Andersen B., Kroger E., Roberts, R. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria*, and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol Res* 106:170-182.

Andrew M, Peever T, Pryor B. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*. 101(1):95-109.

Aradhya M, Chan H, Parfitt D. (2001). Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*. *Mycol Res* 105:300-306.

Barkai-Golan R. *Alternaria* mycotoxins. En: Barkai-Golan R, Nachman P (eds.). (2008). *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Academic Press, San Diego, CA, USA: 185-203.

Berthold D., Andersson A., Nordlund P. (2000). New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1460:241-254.

Bilgrami K., Ansari A., Sinha A., Shrivastava A., Sinha K. (1994). Mycotoxin production by some Indian *Alternaria* species. *Mycotoxin Res* 10(1):56-59.

- Bottalico A. y Logrieco A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha, K.K. and Bhatnagar, D. (Eds.) *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker, Inc, New York, USA: 65-108.
- Campbell, R. (1969). An electron microscope study of spore structure and development in *Alternaria brassicicola*. *J Gen Microbiol* 54: 381–392.
- Chaudhuri M., Ott R., Hill G. (2006). Trypanosoma alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol* 22(10):484-491.
- Chen J., Li Q., Kong L., Zheng X., Yu R. (2010). COI-based DNA Barcoding in Tapetinae Species (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) along the coast of China. *Zool Res* 2010, 31(4):345-352.
- Chou W., Wu W. (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of Wlament-beaked conidia. *Mycol Res* 106:164–169.
- Cooke D., Forster J, Jenkins P., Jones G., Lewis D. (1998). Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by use of RAPD-PCR. *Ann Appl Biol* 132:197-209.
- Dai L, Zheng X, Kong L, Li Q. (2012). DNA barcoding analysis of Coleoidea (Mollusca: Cephalopoda) from Chinese waters. *Mol Ecol Resour* 12(3):437-47.
- D’Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, Gioulekas D, Jaeger L, Jaeger S et al. (1997). Evaluation of the prevalence of prick skin test positively to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. *Allergy*. 52:711-716.
- de Hoog G., Horré R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in routine laboratory. *Mycoses* 45:259–276.
- Dumestre A., Chone T., Portal J., Gerard M., Berthelin J. (1997). Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. *Appl Environ Microbiol* 63:2729-2734.
- Ellis M. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, Surrey, England. 1-608
- Ellis M. (1976). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew. Surrey, England. 1-507
- Farr, D., Rossman, A. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Retrieved November 17, 2013, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Frye W., Yoder O., Apple, A. (1984). Influence of naturally occurring marker genes on the ability of *Cochliobolus heterostrophus* to induce field epidemics of southern corn leaf blight. *Phytopathol* 74:175–178.
- Gálvez. E. (2009). Evaluación de los genes *CoxI* y *Aox* como posibles marcadores de tipo “DNA Barcode” para identificación del género *Fusarium*. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá DC, Colombia.

- Gilmore S., Gräfenhan T., Louis-Seize G., Seifert K. (2009). Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Mol Ecol Resour* 9 (Suppl. 1):90–98.
- Gomes C., Le Gall J., Xavier A., Teixeira M. (2001). Could a diiron-containing fluor-helix bundle protein have been a primitive oxygen reductase?. *Chem Biochem* 7:583-587.
- Groves J., Skolko A. (1944). Notes on seed-borne fungi. II. *Alternaria*. *Can J Res* 22(5):217-234
- Hajibabaei M., Singer G., Clare E., Hebert P. (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biol* 5:24.
- Hajibabaei M., Janzen D., Burns J., Hallwachs W., Hebert P. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *P Natl Acad Sci USA* 103(4):968-971.
- Hatta R., Shinjo A., Ruswandi S., Kitani K., Yamamoto M., Akimitsu K., Tsuge T. (2006). DNA transposon fossils present on the conditionally dispensable chromosome controlling AF-toxin biosynthesis and pathogenicity of *Alternaria alternata*. *J Gen Plant Pathol* 72 (4); 210-219
- Hatta R., Ito K., Hosaki Y., Tanaka T., Tanaka A., Yamamoto M., Akimitsu K., Tsuge T. (2002). A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternate*. *Genetics* 161:59-70.
- Hattori T., Kino K. and Kirimura K. (2009). Regulation of alternative oxidase at the transcription stage in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid production. *Curr Microbiol* 58:321-325.
- Hebert P., Stoeckle M., Zemplak T., Francis C. (2004a). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. 2(10):E312
- Hebert P., Penton E., Burns J., Janzen D., Hallwachs W. (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *P Natl Acad Sci USA*. 101:14812–14817.
- Hebert, P. et al. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:313–321.
- Honda Y., Sota K., Nozu M. (1987). An ultrastructural study of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. *Bull Fac Agr* 21: 141–154.
- Honda, Y., Nanba, N. and Nozu, M. (1990). A further study on ultrastructural aspects of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. *Bull Fac Agr* 24: 39–46.
- Hong S., Cramer R., Lawrence C., Pryor, B. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fun Genet Biol*, 42:119-129

Huh W., Kang S. (1999). Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *Bacteriol.* 181:4098–4102.

Inderbitzin P, Shoemaker R, O'Neill N, Turgeon B, Berbee M. (2006). Systematics and mating systems of two fungal pathogens of *opium poppy*: the heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and a homothallic species with a *Brachycladium papaveris* asexual state. *Can J Botany* 84:1304–1326

Index Fungorum (2008). Revisado Enero de 2013. Disponible en <http://www.indexfungorum.org>

Jia Min X., Hickey D. (2007). Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol Notes* 7:365-373

Jiménez P., Franco-Lara L., Restrepo S. (2007). Proyecto código de barras en Colombia: una posible estrategia para la identificación de hongos fitopatógenos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas Universidad Militar Nueva Granada.* 3:25-39.

Johnson L., Johnson R., Akamatsu H., Salamiah A., Otani H., Kohmoto K., Kodama M. (2001). Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from *Alternaria alternata* Apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Curr Genet* 40:65-72.

Joseph-Horne T., Babij J., Wood P., Hollomon D., Sessions R. (2000). New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Letters* 481:141-146.

Joly P, (1964). Le Genre *Alternaria*. Encyclopédie Mycologique, Paul Lechevalier, éditeur. Paris. 1-250.

Juszczuk IM, Rychter AM. (2003). Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol.* 50:1257-1271.

Kang J., Crous P., Mchau G., Serdani M., Song S. (2002). Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycol Res.* 106:1151–1162.

Kaur H., Singh B., Kaur A., Kaur S. (2013). Antifeedent and toxic activity of endophytic *Alternaria alternata* against tobacco caterpillar *Spodoptera litura*. *J Pest Sci* 86 (3):43-550

Kawamura C., Tsujimoto T., Tsuge T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 12: 59–63.

Kirimura K., Yoda M., Usami S. (1999). Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. *Curr Genet* 34:472–477.

Kress W., Erickson D. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnHpsbA Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508.

Kusaba M., Tsuge T. (1994). Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce hosts-specific toxins. *App Environ Microbiol* 60:3055-3062.

Kusaba M., Tsuge T. (1995). Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr Genet* 28:491-498

Lahlali R., Hijri M. (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *Microbiol Lett* 311 (2):152-159.

Lantigua P., Martinez C., Pons-Kühnemann J., Pérez M. (2008). Grupos intraespecíficos de *Alternaria solani* de tomate y papa. *Fitopatol Venez* 21:44-50

Lawrence D, Park M, Pryor B. (2012). *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycol Prog* 11: 799–815.

Lawrence D., Gannibal P., Peever T., Pryor B. (2013). The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105(3):530-46.

Lewis C., Bilkhu S., Robert V., Eberhardt U., Szöke S., Seifert K., Lévesque A. (2011). Identification of Fungal DNA Barcode Targets and PCR Primers Based on Pfam Protein Families and Taxonomic Hierarchy. *The Open Applied Informatics Journal*. 5 (Suppl 1-M5):30-44.

Li Q., Ritzel R., McLean L., et al. (1996). Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics* 142:129–140.

Lin S., Zhang H., Hou Y., Zhuang Y., Miranda L. (2009). High-Level Diversity of Dinoflagellates in the Natural Environment, Revealed by Assessment of Mitochondrial cox1 and cob Genes for Dinoflagellate DNA Barcoding. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(5):1279-1290

Mamgain A., Roychowdhury R., Tah J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Res Biol* 1:01-09.

Masunaka A., Otani K., Peever T., Timmer L., Tsuge T., Yamamoto M., Yamamoto H., Akimitsu K. (2005). An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogen to both tangerine and rough lemon and produces two host selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathol* 95:241-247.

McDonald A., Vanlerberghe G. (2005). Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the Sargasso sea. *Gene*. 349:15-24.

McDonald A., Vanlerberghe G. (2004). Branched mitochondrial electron transport in the animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB Life*. 56(6):333-341.

- Misaghi I., Grogan R., Duniway J., Kimble K. (1978). Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternate*. *Phytopathology*. 68:29-34.
- Morris P., Connolly M., St Clair D. (2000). Genetic diversity of *Alternaria alternate* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycol Res*. 104(3):286-292.
- Neergaard P, (1945). Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press, Copenhagen, Denmark. 1-560
- Nguyen H., Seifert K. (2008). Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia*. 21:57:69
- Nishimura S. (1980). Host-specific toxins from *Alternaria alternate*: problem and prospects. *Pr. Jpn. Acad. Ser. B* 56:362-366
- Ostry V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotox J* 1: 175-188.
- Otani H., Kohmoto K. (1992). Host-Specific Toxins of *Alternaria* Species. In: Topics in Secondary Metabolism., 3, *Alternaria* - Biology, Plant Diseases and Metabolites (J. Chelkowski, A. Visconti, Eds.), ELSEIVIER, Amsterdam - London - New York - Tokyo, 123-156.
- Park M., Romanoski, C., Pryor, B. (2008). A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiinculatae*. *Mycologia* 100:511-527.
- Pavón M. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutr Hosp*, 27(6):1772-1781
- Pavón M., García T., Martín R. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control*. 21.
- Peever T., Su G., Carpenter-Boggs L., Timmer L. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia* 96:119–134.
- Pitt, J., Hocking, A. (1997). Fungi and food spoilage. London: *Blackie Academic and Professional*
- Pryor B., Michailides T., (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathol*. 92:406–16.
- Pryor B., Gilbertson L. (2002). Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiinculatae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. *Mycologia* 94(1):49-61.

- Pryor B., Gilbertson R. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104: 1312–1321.
- Pryor B., Bigelow D. (2003). Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium*, and *Stemphylium*. *Mycologia* 95: 1139–1152.
- Pryor B, Creamer R, Shoemaker R, McLain-Romero J, Hambleton S. (2009). *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. *Botany* 87: 178–194.
- Robert V., Szöke S., Eberhardt U., Cardinali G., Meyer W., Seifert K., Lévesque A., Lewis C. (2011). The quest for a general a reliable fungal DNA Barcode. *The Open App Informat J.* 5 (Suppl 1-M6):45-61.
- Roberts R., Reymond S., Andersen B. (2000). RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of smallspored *Alternaria* species and species groups. *Mycol Res* 104:151-160.
- Robba L., Russell S., Barker G., Brodie J. ( 2006). Assessing the use of the Mitochondrial *Cox1* marker for use in DNA Barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am J Bot* 93(8): 1101–1108.
- Rotem J. (1966). Variability in *Alternaria porri* f. *sp. solani*. *Israel Journal of Botany* 15:48-57.
- Rotem J. (1994) The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. St Paul, MN, USA: APS press.
- Runa F, Park M, Pryor B. (2009). *Ulocladium* systematics revisited: phylogeny and taxonomic status. *Mycological Progress* 8: 35–47.
- Sakajo S., Minagawa N., Komiyama T., Yoshimoto A. (1991). Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *Biochim Biophys Acta.* 1090:102–108.
- Santamaria M., Vicario S., Pappadà G., Scioscia C., Scazzocchio C., Saccone C. (2009). Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria. *BMC Bioinformatics.* 10(Suppl 6):S15.
- Saunders G. (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360:1879–1888.
- Scheffeer R. (1992). Ecological and evolutionary roles of toxins from *Alternaria* species. En: Chelkowski J, Visconti A, eds. *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites.* New York: Elsevier Science Publishers. p 101-122

Schoch C., Seifert K., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.m, Levesque C., Chen W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109 (16):6241-6246

Seifert K., Rossman A. (2010). How to describe a new fungal species. *IMA Fungus* 1:109–116

Seifert K., Samson R., Dewaard J., Houbraken J., Lavesque C., Moncalvo J., Louis-Seize G., Hebert P. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:3901-3906

Sharma T., Tewari J. (1998). RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenetic to crucifers. *Mycol Res*, 102(7):807-814.

Simmons E. (1992) *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites (Chelkowski, J. and Visconti, A., eds), pp. 1–35. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Simmons, E. (1993). *Alternaria* themes and variations (63-72), *Mycotaxon* 48:91-107.

Simmons E., Roberts, R. (1993). *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 48:109-140

Simmons E. (1997). *Alternaria* Themes and Variations (151-223). *Mycotaxon* 65.

Simmons E. (1999). *Alternaria* Themes and Variations (236-243). Host specific toxins producers. *Mycotaxon* 70:325-369

Simmons E. (2007) *Alternaria*. An Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

Smith M., Fisher B., Hebert P. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1462:1825-34.

Stenmark P., Nordlund P. (2003). A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Letters*. 552:189-192.

Sun, Zhang. (2008). Morphological and molecular characterization of *Alternaria* isolates on fruits of *Pyrus bretschneideri* Rehd. “Ya Li”. *Mycosystema*. 27(1): 105-117.

Taralova E., Schlecht J., Barnard K., Pryor B. (2011). Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal Biol* 115: 1163 -1 173.

Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol* 4( 4 ): 225–236.

- Umbach A., Siedow J. (2000). The cyanide-resistant alternative oxidase from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crasse* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arc Biochem Biophysics*. 3178(2):234-235.
- Vanlerberghe G., McIntosh L. (1997). Alternative oxidase: From Gen to Function. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol*. 48:703:734.
- Veiga A., Arrabaça J., Loureiro-Dias M. (2003). Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *J Appl Microbiol*. 95:364-371.
- Vences M., Thomas M., Bonett R. and Vieites D. (2005). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1859-1868.
- Vera S. (2012). Evaluación de marcadores tipo “Barcode” como estrategia para la identificación de especies del género *Fusarium*. Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biología Aplicada. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá DC, Colombia
- Wagner A., Moore A. (1997). Structure and function of the plant Alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defence mechanism. *Bioscience Reports*. 17(3):319-333.
- Wang Y, Geng Y, Ma J, Wang Q, Zhang X-G (2011). *Sinomyces*: a new genus of anamorphic *Pleosporaceae*. *Fungal Biol* 115: 188–195.
- Ward R., Holmes B. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (COX1) in fishes. *Mol Ecol Notes* 7:899–907.
- Ward R., Zemlak T., Innes B., Last P., Hebert P. (2005). DNA barcoding Australia’s fish species. *Phil. Trans R Soc B* 360:1847–1857.
- Weir T., Huff D., Christ B., Romaine C. (1998). RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* 90:813-821
- Whitworth T., Dawson R., Magalon H., Baudry E. (2007). DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc Biol Sci* 274:1731-1739.
- Woudenberg J., Groenewald J., Binder M., Crous P. (2013). *Alternaria* redefined. *Stud Mycol* 75:171-212
- Yukioka H., Inagaki S., Tanaka R., Katoh K., Miki N., Mizutani A., Masuko M. (1998). Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1442:161–169.
- Zhang T, (2003). *Alternaria, Flora Fungorum Sinicorum*, vol. 16, Beijing: Science Press

## 2. ESPECIES DE *ALTERNARIA* DE LA SABANA DE BOGOTÁ

### 2.1.RESUMEN

El género *Alternaria* contiene algunos de los patógenos de plantas más importantes en el mundo. En Colombia existen reportes para cultivos de importancia como solanáceas y cítricos. Sin embargo, frecuentemente los diagnósticos no incluyen la determinación de las especies. Este estudio se realizó con el fin de incrementar el conocimiento de la diversidad del género en Colombia. Muestras vegetales con lesiones propias del patógeno, de diferentes sitios de la sabana de Bogotá, fueron colectadas y después de ser esterilizadas, las muestras fueron cultivadas en PDA. La determinación taxonómica de los aislamientos se realizó de acuerdo a Simmons (2007). Se obtuvieron 50 aislados, de los cuales se identificaron 14 especies de *Alternaria*, en 16 hospederos, principalmente solanáceas y ornamentales. Todas las especies identificadas pertenecen a la sección de esporas pequeñas, siendo *A. alternata* la más frecuente. A pesar de la alta proporción de solanáceas dentro de los hospederos no se pudo determinar la presencia de *A. solani* (especie arquetípica dentro de la familia). Se realizó una caracterización morfométrica de los conidios, además de una descripción de las colonias y el patrón de esporulación, a través de los cuales se sustenta una clave taxonómica de las especies de *Alternaria* en la sabana de Bogotá, que se acompaña de descripciones originales e imágenes de referencia.

### 2.2.INTRODUCCIÓN

*Alternaria*, Nees, es un género de hongos, perteneciente al Filo Ascomycota. Sus especies se distribuyen globalmente, por lo que se considera un hongo cosmopolita. Se caracteriza además por presentar un gran número de roles ecológicos. Se ha discutido su papel como endófito (Aly et al., 2008; Lahlali y Hijri, 2010; Kaur et al., 2013), saprófito o parásito de plantas vivas (Pitt y Hocking, 1997). La base de datos de hongos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) presenta 4000 asociaciones de *Alternaria* con diferentes hospederos (Farr et al, 2013), convirtiéndose en uno de los géneros de hongos con más amplio rango de hospederos como patógeno de plantas (Andrew et al, 2009). Farr et al (1989), posicionan a *Alternaria* en el décimo lugar en términos del número total de hospederos de plantas. Solo una especie, *A. alternata* es responsable de infectar más de 100 especies vegetales (Simmons, 1992; Simmons, 2007).

Las especies de *Alternaria* se caracterizan por producir una variedad de compuestos tóxicos, que además de determinar la patogenicidad en plantas (Ostry, 2008; Barkai-Golan et al, 2008), se han asociado con efectos adversos para la salud humana y animal, razón por la cual su estudio ha recibido una creciente atención, tanto en programas de investigación, como en estudios de evaluación de riesgo (Ostry, 2008).

La determinación del número de especies que constituyen el género está aún en discusión. Las estimaciones más conservadoras proponen 44 especies (Rotem, 1994). Sin embargo, revisiones más recientes exponen un número mucho mayor. Simmons (2007) acepta y describe 276 especies en su manual de identificación, mientras que Kirk et al. (2008), en su diccionario de hongos, reportan 299 especies. Finalmente, la base de datos de nomenclatura de hongos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), arroja un total de 418 registros dentro del género (Cline et al, 2014).

La clasificación de las especies de *Alternaria* se sustenta en las características morfológicas, particularmente las que se relacionan con sus conidios; el tamaño, la forma, y la existencia y estructura de sus picos han sido caracteres fundamentales para separar especies (Joly 1964; Ellis 1971; Ellis 1976; Simmons 1997). Igualmente, el patrón de esporulación, o la estructura de las cadenas de conidios han sido empleados como una herramienta clave en la taxonomía del género. Neergard (1945) propone tres grupos de especies, referidos a la longitud de las cadenas de conidios, *Longicatenado* (diez o más conidios), *Brevicatenado* (aproximadamente cinco conidios), y *Noncadenado* (conidios simples), mientras que Simmons (1993), presenta seis grupos de especies, diferenciados por la longitud de las cadenas de conidios y el tipo de ramificación que éstas presentan.

Actualmente se distinguen dos grupos de especies dentro del género, que se separan por el tamaño de sus conidios. Para la sección de esporas grandes, la naturaleza del desarrollo apical de los conidios determina la diversidad de especies, mientras que para la sección de esporas pequeñas, es la relación de los conidióforos y conidios en el desarrollo del patrón de esporulación es la que sustenta la existencia de varios taxones (Simmons 2007).

La correcta identificación de algunas especies de *Alternaria* ofrece considerables dificultades debido a la alta variabilidad de los caracteres morfológicos de sus estructuras reproductivas (Xia y Zhang, 2008). Se estima que diversos factores tienen un efecto importante en la variabilidad de dichas características. Rotem (1994), menciona el sustrato donde el crece hongo, como el factor que mayor variabilidad aporta. Simmons (1992), adiciona la temperatura y los regímenes de luz dentro de estos factores, y menciona que el manejo estricto de estos parámetros ha sido fundamental en la descripción de nuevas especies. Cuando *Alternaria* crece en cultivos ricos en nutrientes, medios no estandarizados en la oscuridad bajo condiciones ambientales no controladas, la formación de micelio aéreo en exceso previene el desarrollo de los patrones de esporulación tridimensionales característicos (Andersen et al, 2001). Un factor adicional que conduce a errores en la identificación de especies, es el uso de montajes húmedos en la descripción de los patrones de esporulación, porque éstos alteran la estructura de las cadenas, dejando como único carácter disponible, la dimensión de los conidios, lo que agrava aún más el error (Andersen et al, 2001).

A través de características morfológicas es posible distinguir entre los dos grupos principales de *Alternaria*, de la misma manera que es posible hacerlo para las especies que integran el grupo de esporas grandes (Pryor y Gilbertson, 2000; Chou y Wu, 2002; Pryor y Bigelow, 2003). Sin embargo la distinción dentro del grupo de esporas chicas, especialmente las que forman cadenas, también denominada sección *alternata*, representa un reto taxonómico no resuelto (Sun y Zhang, 2008).

Un ejemplo concreto de estas dificultades es evidente en la posición de los investigadores con respecto a las especies que integran el grupo *alternata*. Rotem (1994), ha reportado la existencia de por lo menos 11 especies oscuras dentro del grupo, y expone que muchos de los taxones de hospederos específicos, como *A. mali* o *A. gaisen*, deben ser referidos como patotipos de *A. alternata*. Mientras que Andrew et al. (2009), argumentan que debido a la plasticidad morfológica que presenta el grupo, es imposible diferenciar morfoespecies dentro del grupo.

Sin embargo, Simmons (2007), expone la posibilidad de realizar la identificación taxonómica del género, incluyendo el grupo *alternata*, apelando al manejo cuidadoso de las condiciones de cultivo. Para él, y otros autores, la principal fuente de error para conseguir una identificación taxonómica correcta, fundamentada en aspectos morfológicos, dentro de todos los grupos de *Alternaria*, es el manejo equivocado de variables que afectan el crecimiento *in vitro* (Simmons y Roberts, 1993; Simmons, 1999; Roberts et al, 2000). Por esta razón los autores exponen como de vital importancia, estandarizar estas variables y los protocolos de medición de las mismas.

Actualmente la sección *alternata*, se trata como un complejo que incluye alrededor de 60 especies, cuya diferenciación taxonómica está determinada más por diferencias moleculares que morfológicas (Woudenberg et al, 2013).

Una precisa y correcta identificación de las especies dentro del género es necesaria, no solo debido al deseo de clasificarlas y controlarlas, sino también porque el nombre de las especies representa un conjunto de caracteres, por ejemplo, preferencias de crecimiento, patogenicidad o producción de micotoxinas, que nos permiten predecir su comportamiento (Andersen et al, 2001). Una identificación morfológica razonable de las especies de *Alternaria* debe depender de una combinación de las características de conidios a partir de muestras naturales, cultivos en medios artificiales y sus patrones de esporulación tridimensionales (Zhang, 2003).

El estudio de *Alternaria* en Colombia se ha restringido principalmente al impacto que el género tiene como patógeno, sobre cultivos específicos y de interés comercial, como algunas solanáceas (Zapata et al, 2002; Zubieta et al, 1974; Barreto et al, 2002), y cítricos (Castro et al, 2000). La base de datos de USDA reporta para Colombia *Alternaria brassicae* en *Brassica oleracea* var. *capitata*, *A. colombiana* en naranja tangelo (*Citrus ×paradisi-reticulata*), *A. obclavoidea* en *Passiflora* sp., *A. porri* en cebolla (*Allium cepa* y *A. porrum*), *A. solani* en pimentón (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicon*) y papa (*S. tuberosum* y *S. tuberosum* subsp. *andigenum*) y *A. tenuissima* en andropogon (*Andropogon gayanus*). Más allá de estos estudios, no existe una revisión concreta de las especies de *Alternaria* en alguna región de país, ni sobre la taxonomía del género.

Este estudio se plantea con el objetivo de aportar al conocimiento de la diversidad de especies dentro del género *Alternaria* en la sabana de Bogotá, apelando a un enfoque morfológico, además de intentar determinar qué variables morfológicas son fundamentales para diferenciar sus especies.

## **2.3.MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colección de aislados**

En Colombia existen pocos aislados de *Alternaria* mantenidos en colecciones, por lo cual se realizó una colecta en algunos municipios de la sabana de Bogotá. Un total de 50 aislados pertenecientes al género y algunos a géneros relacionados se obtuvieron de plantas que presentaban síntomas característicos (Agrios, 2005), en diferentes zonas de esta región. La identidad, el grupo al que corresponden de acuerdo al patrón de esporulación, el origen geográfico y el hospedero se registraron en la tabla 2.1.

Para el aislamiento, pequeñas piezas de tejido (comúnmente hoja) fueron removidas se removieron del borde de las lesiones y se esterilizaron con etanol al 70% por 30 segundos, seguido por hipoclorito al 1 % por 5 minutos, después de lo cual se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las muestras se dispusieron en cajas de Petri con Agar Papa-Dextrosa (PDA) e incubadas a 25 °C por 5 días. Para obtener cultivos monospóricos, se inocularon esporas en cajas de Petri con Agar Agua (AA), en líneas paralelas con la ayuda de un asa, se incubaron a 25 °C por una noche y se recuperó una spora por aislado. Esta spora se inoculó y creció en papel filtro estéril sobre PDA. Todos los aislados fueron almacenados de esta manera, además se mantienen como preparaciones liofilizadas en la colección de cultivos del laboratorio de fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada en Cajicá, Cundinamarca, Colombia.

### **Caracterización morfológica**

Pequeñas secciones de papel filtro con el inóculo de cada uno de los aislados, se dispusieron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro, con Agar Papa Zanahoria (PCA) y Agar V8 (Simmons 2007). Con el fin de inducir la formación de los patrones de esporulación característicos, las cajas se incubaron en un ciclo alternante luz/oscuridad de 12/12 horas, a 25 °C, por 7 días (Simmons, 2007).

### **Características de la colonia**

El diámetro de las colonias se midió después de 7 días de inoculado el medio. Además se tuvieron en cuenta otras características frecuentes de las colonias del género durante su descripción, como la aparición de anillos concéntricos y el crecimiento parcialmente sumergido del micelio en el medio.

### **Formación de cadenas de conidios**

Se evaluó la estructura tridimensional de la cadena de conidios a través de su observación con estereoscopio con una magnificación de 50X, y microscopio de luz con magnificación 40X, 100X y 400X. El patrón de esporulación típico de cada uno de los aislados se fotografió con cámara digital, y se asignó a cada uno de los grupos descritos por Simmons (2007) (Tabla 2.1).

### **Características de los conidios**

Los conidios de cada uno de los aislados se montaron en láminas portaobjetos usando cinta adhesiva. Se seleccionaron 500 conidios maduros de cada uno de los aislados y se midió su longitud, ancho, relación largo-ancho y el número de septos transversales y longitudinales. Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ) y la desviación (s) y el rango (R) de los valores obtenidos (Tabla 2.2). Además, se tuvieron en cuenta otras características morfológicas de los conidios para su descripción, como la forma del pico y la ornamentación de sus paredes. Las características de los conidios se registraron fotográficamente a 4000X y 1000X de magnificación.

## Descripción y claves taxonómicas

Las características de las colonias, del patrón de esporulación y de los conidios, de cada una de las especies encontradas en el estudio, se condensaron en descripciones cortas, acompañadas de fotografías de las características microscópicas. De la misma manera, se presenta una clave taxonómica para la identificación de especies de esporas pequeñas en la Sabana de Bogotá.

## 2.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una colección de 43 aislados de *Alternaria* y siete de géneros asociados, fue obtenida de 13 zonas de la sabana de Bogotá. Con base en sus características morfológicas y en las descripciones realizadas por Simmons 2007, se pudo establecer que los aislados corresponden a 14 especies, pertenecientes en todos los casos a la sección de esporas pequeñas. Las especies pueden distribuirse en seis grupos (designados con una letra de acuerdo a las claves de Simmons (2007)). El grupo G fue el más abundante e incluye 22 aislados y siete especies, seguido por el grupo J con catorce aislados y dos especies, y el grupo K con dos aislados y dos especies. Todos los demás grupos están representados por una única especie.

Tabla 2.1. Origen de los aislados usados en el estudio

Id. Aislado	Especie	Host	Lugar	Grupo*
25	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Alstroemeria sp.</i>	Funza	G
26	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Gerbera sp.</i>	Funza	G
27	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Dahlia sp.</i>	Funza	G
9	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Alstroemeria sp.</i>	Bogotá (Suba)	G
18	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Alstroemeria sp.</i>	Bojacá	G
10	<i>A. alternata</i>	<i>Mangifera indica</i>	Chía	J
24	<i>A. alternata</i>	<i>Alstroemeria sp.</i>	Cajicá	J
31,32,33,34	<i>A. alternata</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Bogotá (Suba)	J
37	<i>A. alternata</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Mosquera	J
16	<i>A. astragali</i>	<i>Prumnopitys sp.</i>	Bogotá (JBJCM**)	G
28,29	<i>A. brassicicola</i>	<i>Brassica olearacea</i>	Madrid	J
41, 43, 44	<i>A. brassicicola</i>	<i>Brassica sp.</i>	Cajicá	J
47, 48	<i>A. brassicicola</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Cota	J
39, 40	<i>A. broccoli-italicae</i>	<i>B. olearacea</i>	Funza	G
42	<i>A. broccoli-italicae</i>	<i>Brassica sp.</i>	Cajicá	G
15	<i>A. colombiana</i>	<i>Physalis peruviana</i>	Facatativá	G
11	<i>A. daucicaulis</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	Zipaquirá	K

14	<i>A. gaisen</i>	<i>P. peruviana</i>	Cajicá	G
23	<i>A. gaisen</i>	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Cajicá	G
6	<i>A. gaisen</i>	Orchidaceae	Chía	G
2	<i>A. geophila</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	Mosquera	F
30	<i>A. geophila</i>	<i>P. peruviana</i>	Bogotá (Guaymaral)	F
13	<i>A. godetiae</i>	<i>P. peruviana</i>	Cajicá	G
35	<i>A. pellucida</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Bogotá (Suba)	G
8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g	<i>A. pellucida</i>	<i>Z. aethiopica</i>	Facatativá	G
12	<i>A. radicina</i>	<i>C. quinoa</i>	Zipaquirá	A1
36	<i>A. tenuissima</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Bogotá (Suba)	H
7	<i>A. tenuissima</i>	Orchidaceae	Chía	H
38	<i>A. infectoria</i>	<i>C. sativum</i>	Mosquera	K
19, 20, 21, 22	<i>Curvularia sp.</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Cajicá	
1	<i>Embellisia sp.</i>	<i>S. lycopersicum</i>	El Rosal	
17	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Cota	
5	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Cucurbitaceae	Chía	

\* Agrupación por patrón de esporulación de acuerdo a Simmons (2007).

\*\* Jardín Botánico José Celestino Mutis

Tabla 2.2. Variación morfológica de los conidios de los aislados obtenidos en el estudio

Id. Aislado	Promedio Área (µm)	Promedio longituditud (µm)	Rango longituditud (µm)	Desviación longituditud	Promedio ancho (µm)	Rango ancho (µm)	Desviación ancho	Relación l/w	Especie
25	202,5	22,8	14-63,1	6,27	11,4	6,6-17,4	2,1	2,0	<i>A. alstroemeriae</i>
9	226,9	26,8	12,4-67,3	7,23	11,3	7,3-15,5	1,6	2,4	<i>A. alstroemeriae</i>
26	229,6	29,6	13,2-78,0	7,48	10,5	7,0-14,9	1,6	2,8	<i>A. alstroemeriae</i>
27	232,6	24,8	9,6-65,8	8,60	12,0	7,7-29,0	2,1	2,1	<i>A. alstroemeriae</i>
18	219,7	24,4	13,1-37,8	5,66	11,5	8,2-15,3	1,5	2,1	<i>A. alstroemeriae</i>
32	209,8	23,9	11,9-49,5	5,42	11,5	7,3-19,4	2,5	2,1	<i>A. alternata</i>
10	206,3	22,6	11,7-49,0	5,27	11,6	6,8-20,5	2,0	2,0	<i>A. alternata</i>
24	205,6	24,4	16,5-47,1	6,74	10,5	7,3-20,0	2,5	2,3	<i>A. alternata</i>
31	277,1	25,4	11,8-52,6	6,64	13,9	7,1-23,4	2,9	1,8	<i>A. alternata</i>
33	212,9	26,2	16,6-43,9	6,51	11,4	7,5-14,7	2,0	2,3	<i>A. alternata</i>
34	263,7	26,2	14,4-43,5	7,49	12,5	8,6-18,8	2,0	2,1	<i>A. alternata</i>

37	206,6	21,3	12,1-40,4	4,81	11,8	8,0-16,8	1,7	1,8	<i>A. alternata</i>
16	171,8	21,8	12,8-29,3	4,44	10,0	6,7-14,2	1,6	2,2	<i>A. astragali</i>
48	195,3	25,8	10,7-54,5	8,54	9,2	7,3-13,2	1,3	2,8	<i>A. brassicicola</i>
28	247,1	27,4	18,9-39,0	4,76	11,6	8,1-16,8	1,9	2,4	<i>A. brassicicola</i>
29	210,6	25,7	15,0-39,5	5,69	11,4	8,0-14,8	1,6	2,3	<i>A. brassicicola</i>
41	239,7	27,9	12,0-54,1	9,50	11,0	7,1-15,5	1,8	2,5	<i>A. brassicicola</i>
43	341,0	29,2	11,7-55,6	8,11	14,9	7,4-29,0	4,6	2,0	<i>A. brassicicola</i>
44	187,0	25,4	12,0-59,0	9,13	9,3	5,3-13,7	1,5	2,7	<i>A. brassicicola</i>
47	170,2	24,1	10,4-56,8	9,73	8,8	4,0-12,9	1,5	2,8	<i>A. brassicicola</i>
39	186,4	24,3	14,0-39,1	5,09	10,4	6,9-15,0	2,0	2,3	<i>A. broccoli-italicae</i>
40	215,2	23,8	15,5-31,6	4,54	11,4	7,3-15,1	1,7	2,1	<i>A. broccoli-italicae</i>
42	269,0	26,4	10,1-58,8	10,77	13,0	7,8-19,6	2,3	2,0	<i>A. broccoli-italicae</i>
15	150,5	22,2	10,4-23,8	2,89	8,0	5,1-10,8	1,3	2,8	<i>A. colombiana</i>
11	207,3	24,7	18,5-34,6	3,82	11,6	8,6-15,9	1,9	2,1	<i>A. daucicalis</i>
23	263,1	26,7	14,8-35,1	4,85	12,4	8,7-16,1	1,8	2,2	<i>A. gaisen</i>
6	253,5	25,9	16,8-37,8	4,30	12,3	7,9-14,7	1,6	2,1	<i>A. gaisen</i>
14	206,5	24,5	16,0-40,4	4,56	11,3	6,9-19,9	1,9	2,2	<i>A. gaisen</i>
30	260,5	26,7	14,6-43,3	5,33	12,7	8,0-17,6	2,3	2,1	<i>A. geophila</i>
13	209,4	23,4	9,8-32,6	4,68	9,2	5,2-11,2	1,5	2,5	<i>A. godetiae</i>
38	160,6	20,9	10,4-57,3	7,46	9,7	6,4-20,7	1,6	2,2	<i>A. infectoria</i>
35	254,9	26,7	12,8-47,9	7,26	12,1	7,1-18,1	2,3	2,2	<i>A. pellucida</i>
8b	209,7	24,2	13,5-46,7	7,38	10,9	7,2-15,3	1,7	2,2	<i>A. pellucida</i>
8c	168,9	19,2	11,2-36,5	4,96	11,1	7,5-15,9	1,7	1,7	<i>A. pellucida</i>
8d	225,9	23,5	11,9-38,3	5,41	12,2	8,2-16,2	1,7	1,9	<i>A. pellucida</i>
8f	201,7	22,0	12,7-31,1	5,03	11,4	8,0-16,4	2,1	1,9	<i>A. pellucida</i>
8g	227,6	23,0	12,6-37,7	5,37	12,5	8,3-16,5	2,1	1,8	<i>A. pellucida</i>
8 <sup>a</sup>	190,1	24,5	8,8-39,7	7,12	10,1	6,3-13,5	1,7	2,4	<i>A. pellucida</i>
8e	195,3	22,9	12,8-38,5	4,65	11,4	7,8-15,4	1,9	2,0	<i>A. pellucida</i>
12	222,7	25,1	15,4-42,9	5,55	11,4	7,8-21,1	2,2	2,2	<i>A. radicina</i>
36	157,5	19,2	11,5-31,5	3,58	11,4	7,9-14,3	1,3	1,7	<i>A. tenuissima</i>
7	240,1	24,8	14,6-40,0	7,12	12,1	8,0-16,3	2,5	2,0	<i>A. tenuissima</i>
219	123,4	18,7	9,4-29,3	5,42	8,2	6,9-10,4	1,0	2,3	<i>Curvularia sp.</i>
20	130,8	16,8	12,4-22,7	3,03	9,9	7,3-12,4	1,3	1,7	<i>Curvularia sp.</i>
21	128,5	15,8	10-3-25,18	4,53	8,3	7,0-11,3	1,2	1,9	<i>Curvularia sp.</i>
22	125,6	17,5	9,7-27-1	4,89	8,5	6,0-12,4	1,5	2,1	<i>Curvularia sp.</i>

2	252,7	31,9	18,0-45,2	9,06	10,4	8,3-13,4	1,7	3,1	<i>Embellisia sp.</i>
1	239,6	35,5	13,2-57,2	9,32	12,7	8,4-15,3	1,5	2,8	<i>Embellisia sp.</i>
5	167,3	17,0	11,4-27,0	2,76	12,4	8,1-16,7	1,8	1,4	<i>Ulocladium oudemansii</i>
7	196,2	18,1	10,4-33,7	3,50	13,7	8,3-17,2	1,8	1,3	<i>Ulocladium sp.</i>

### Clave para las especies de la sección de conidios pequeños de *Alternaria* de la Sabana de Bogotá

- 1a. Conidios en cadena lineales.....2
- 1b. Conidios en cadenas ramificadas.....8
- 1c. Conidios solitarios o en grupos o cadenas de no más de 3 conidios.....11
- 2a. Conidióforos secundarios conspicuos.....3
- 2b. Conidióforos secundarios ausentes o inconspicuos.....5
- 3a. Esporulación parcialmente sumergida en el medio. Conidios maduros, elipsoides a subcilíndricos, con una alta variabilidad en longitud, algunos alcanzan hasta 80 µm de largo.....*A. alstroemeriae*
- 3b. Esporulación aérea. Conidios maduros cortos (hasta 30 µm de largo), ovoides o elipsoides.....4
- 4a. Conidióforos secundarios largos (hasta 250 µm).....*A. astragali*
- 4b. Conidióforos secundarios cortos (hasta 50 µm).....*A. colombiana*
- 5a. Cadenas cortas (3-7 conidios).....6
- 5b. Cadenas largas (5-15 conidios), ocasionalmente una ramificación lateral corta .....*A. tenuissima*
- 6a. Conidios ovoides o ancho-elipsoides.....7
- 6b. Conidios apretado-ovoides o estrecho elipsoides 10-30 x 5-10 µm.....*A. godetiae*
- 7a. Hasta 8 conidios por cadena, 15-40 x 7-20 µm.....*A. gaisen*
- 7b. Hasta 12 conidios por cadena, 11-50 x 7-18 µm.....*A. pellucida*
- 8a. Conidióforos secundarios conspicuos.....9
- 8b. Conidióforos secundarios ausentes o inconspicuos.....10
- 9a. Cadenas de hasta 5 conidios, ovoides o elipsoides, homogéneos en longitud (18-34 µm).....*A. daucicaulis*
- 9b. Cadenas de hasta 10 conidios, apretado ovoides o estrecho-elipsoides, de longitud variable (10-57 µm).....*A. infectoria*
- 10a. Cadenas de hasta 7 conidios, ovoides 11-53 x 7-15 µm.....*A. alternata*
- 10b. Cadenas de hasta 12 conidios, ovoides o elipsoides 10-60 x 7-29 µm.....*A. brassicicola*
- 11a. Conidios solitarios, esferoides.....*A. radicina*
- 11b. Conidios solitarios o en cadenas de hasta 3 conidios, elipsoides.....*A. geophila*
- 11c. Conidios solitarios o en grupos de hasta 3 conidios, ovoides, elipsoides o subcilíndricos.....*A. broccoli-italicae*

## Descripción de las especies encontradas

*Alternaria alstroemeriae* E. G. Simmons & C. F. Hill

Conidios en cadenas cortas de 3-5 unidades, con ocasionales ramas laterales. Conidióforos secundarios conspicuos, en algunas ocasiones más largos que la longitud de un conidio. Conidios obclavados, ovoides o subcilíndricos, de 10- 80 x 8-15  $\mu\text{m}$ , con 2 a 7 segmentos transversales y 0 a 2 segmentos longitudinales. Algunos de los conidios presentan superficie rugosa y color marrón oscuro. Buena parte de la esporulación aparece sumergida en el sustrato (agar). Colonia de 40 mm de diámetro, de color marrón a verde oliváceo.



Figura 2.1. Patrón de esporulación y conidios en *A. Alstroemeriae*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria alternata* (Fries) Keissler, Beih.

Conidios en cadenas ramificadas, que se originan cerca del ápice del conidióforo primario. Conidióforos secundarios frecuentemente ausentes. Cadenas de 5 a 7 conidios elipsoides, obclavados u ovoides de 11-53 x 7-15  $\mu\text{m}$ , con 2-6 septos transversales y 0-3 septos longitudinales. Colonias oscuras verdes o grises, de 45 mm de diámetro, frecuentemente con varios anillos concéntricos.

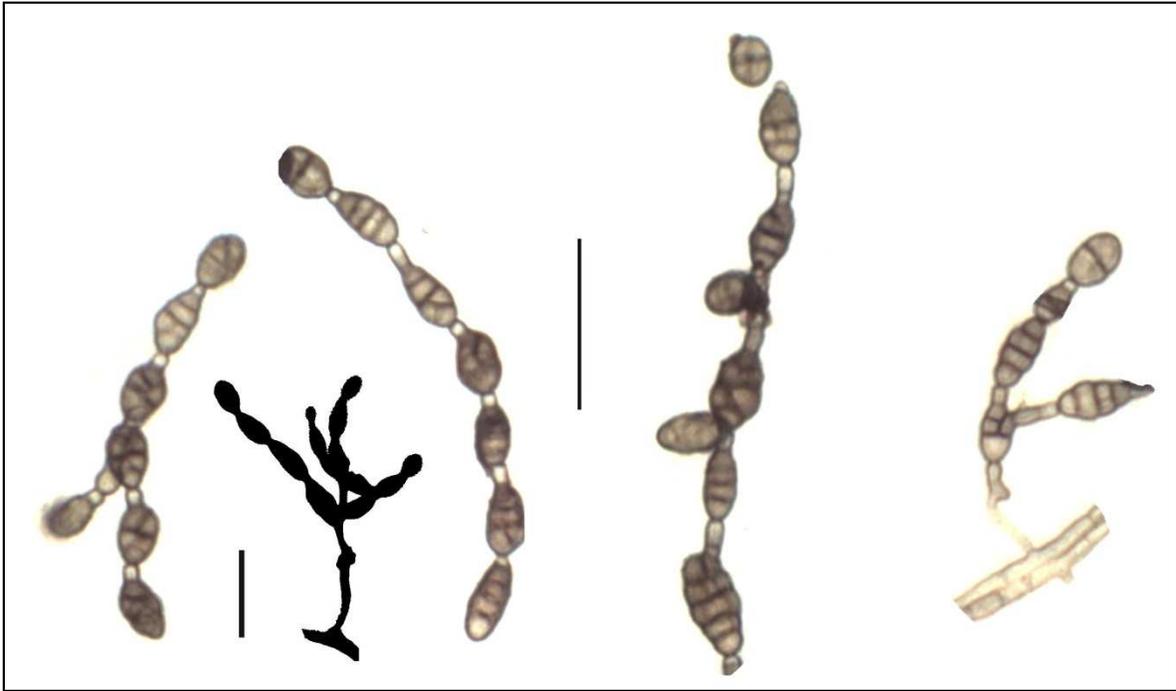


Figura 2.2. Patrón de esporulación y conidios en *A. alternata*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria astragali* Wangeline & E. G. Simmons

Conidióforos primarios largos y erectos que producen cadenas simples de conidios que generan conidióforos secundarios largos. Cadenas con 3-7 conidios. Ramificaciones ausentes. Conidios ovoides o comúnmente largo elipsoides, los conidios apicales aparecen casi esferoides. Conidios de 13-30 x 7-14  $\mu\text{m}$ , con 2-5 septos transversales, septos longitudinales, ocasionalmente uno. Colonias verde oliva a marrón oscuro, de 65 mm de diámetro.



Figura 2.3. Patrón de esporulación y conidios en *A. astragali*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire

Conidióforos primarios cortos que originan cadenas ramificadas de entre 5 y 15 conidios. Conidióforos secundarios cortos o ausentes. Conidios ovoides a elipsoides de 10-60 x 7-29  $\mu\text{m}$ . Los conidios presentan entre 2 y 7 septos transversales y 0 a 2 septos longitudinales. Colonias de color verde oscuro en la zona central, verde oliva en la parte media (fuertemente esporulada), y con un halo blanco en el borde, donde solo aparecen hifas, de 45 mm de diámetro.



Figura 2.4. Patrón de esporulación y conidios en *A. brassicicola*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria broccoli-italicae* E. G. Simmons

Conidióforos primarios cortos, en algunas ocasiones más largos que los conidios y fuertemente retorcidos. Conidióforos secundarios ausentes. Conidios solitarios, en grupos de hasta 3 conidios. Conidios variados, esferoides a elipsoides los pequeños de 10-25 x 7-10  $\mu\text{m}$ , subcilíndricos los grandes 30-55 x 10-15  $\mu\text{m}$ , con el ápice redondeado. Septos longitudinales ausentes o 1 en los conidios grandes, entre 2 y 8 septos transversales, dependiendo del tamaño del conidio. Colonias verde oliva hasta casi negras, de 45 mm de diámetro.



Figura 2.5. Patrón de esporulación conidióforo y conidios en *A. broccoli italicae*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria colombiana* E. G. Simmons

Conidióforos primarios erectos, conspicuos, de los cuales se originan cadenas lineales de 3-5 conidios, separados por los picos largos filamentosos de los conidios. En algunas ocasiones se generan conidióforos secundarios sobre el conidio apical. Conidios generalmente apretado ovoides o elipsoides, de 10-24  $\mu\text{m}$  x 5-10  $\mu\text{m}$ , con entre 4 y 7 septos transversales y 1 o 2 septos longitudinales. Colonias de 70 mm de diámetro.

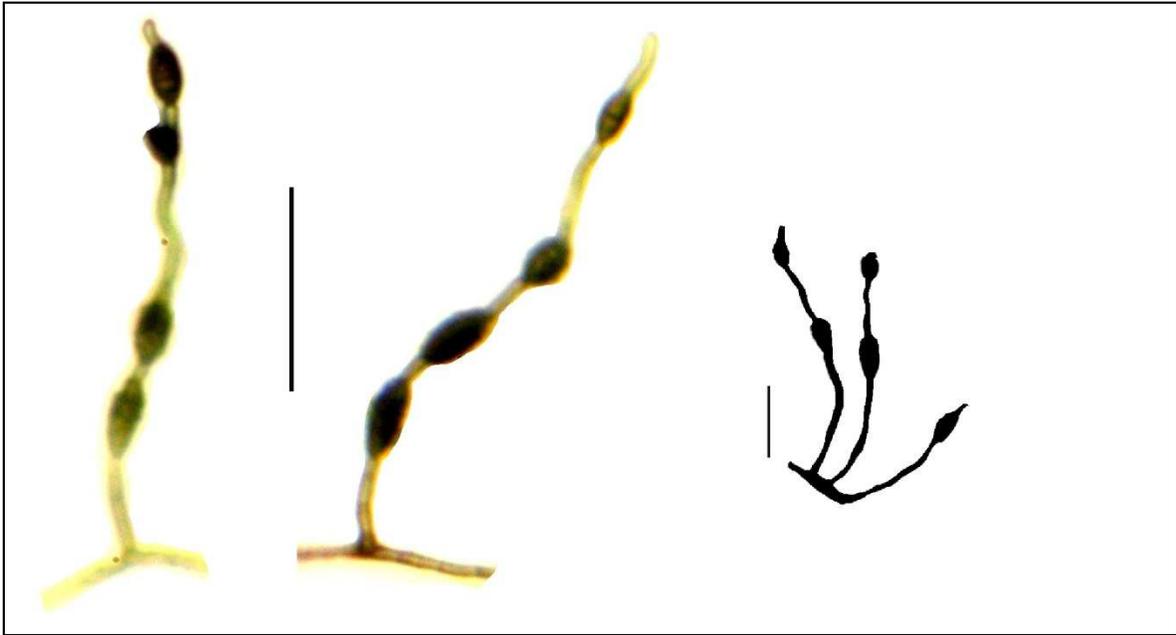


Figura 2.6. Patrón de esporulación y conidios en *A. colombiana*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria daucicaulis* E. G. Simmons

Conidióforos primarios cortos, erectos. Conidióforos secundarios conspicuos y determinantes en el patrón de esporulación. Pocas ramificaciones, pero siempre presentes. Cadenas de 3-5 conidios, frecuentemente elipsoides, algunas veces ovoides, con una célula apical hialina y roma. Conidios de 20-35 x 9-16  $\mu\text{m}$ , con 3-4 septos transversales y 0-2 septos longitudinales. Colonias de 55 mm de diámetro, con 3 anillos oscuros concéntricos bien marcados.



Figura 2.7. Patrón de esporulación en *A. daucicaulis*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria gaisen* Nagano

Conidióforos primarios cortos. Conidióforos secundarios ausentes, cadenas no ramificadas de 5-10 conidios, obclavados, ovoides, pero más frecuentemente ancho-elipsoides, carentes de pico. Conidios de 15-40 x 7-20  $\mu\text{m}$ , con 3-5 septos transversales y 0-3 septos longitudinales. Colonias de 60 mm de diámetro, con varios anillos oscuros concéntricos.

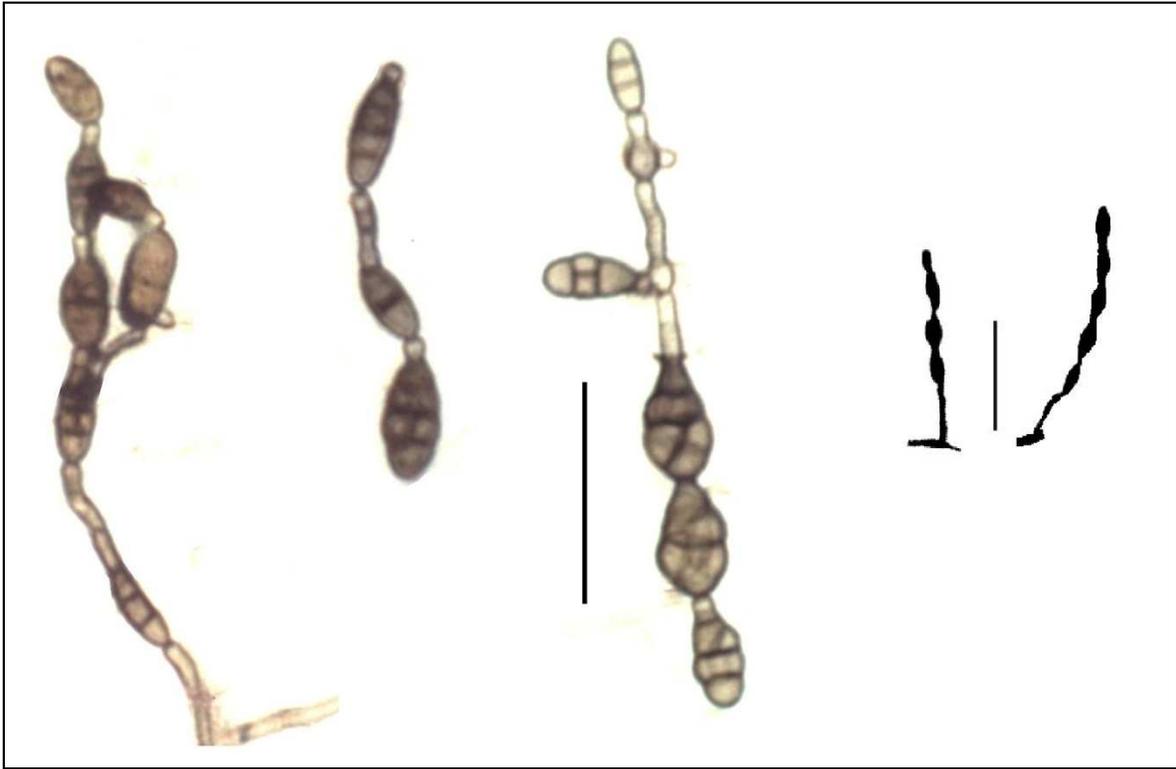


Figura 2.8. Patrón de esporulación y conidios en *A. gaisen*, Barra = 50  $\mu$ m

*Alternaria geophila* Daszewska, Bull

Conidióforos primarios cortos que soportan 1 conidio, o cadenas cortas de hasta 4 conidios. Ramificaciones cortas. Conidióforos secundarios ausentes. Conidios de 14-43 x 8-18  $\mu$ m, ovoides a elipsoides. Entre 2 y 6 septos transversales sin septos longitudinales, ocasionalmente 1. Colonias claras con una densa capa de micelio, con poca esporulación, algunos anillos un poco más oscuros, de 60 mm de diámetro.



Figura 2.9. Patrón de esporulación y conidios en *A. geophila*, Barra = 50  $\mu$ m

*Alternaria godetiae* (Neerg.) Neerg.

Conidióforos primarios conspicuos que producen cadenas de hasta 6 conidios, no ramificadas. Conidios de 10-30 x 5-10  $\mu\text{m}$ , elipsoides o estrecho-ovoides. Conidios con 3-7 septos transversales y sin septos longitudinales, ocasionalmente 1 o 2. Conidióforos secundarios ausentes. Colonias de 60 mm de diámetro, con varios anillos concéntricos bien definidos.

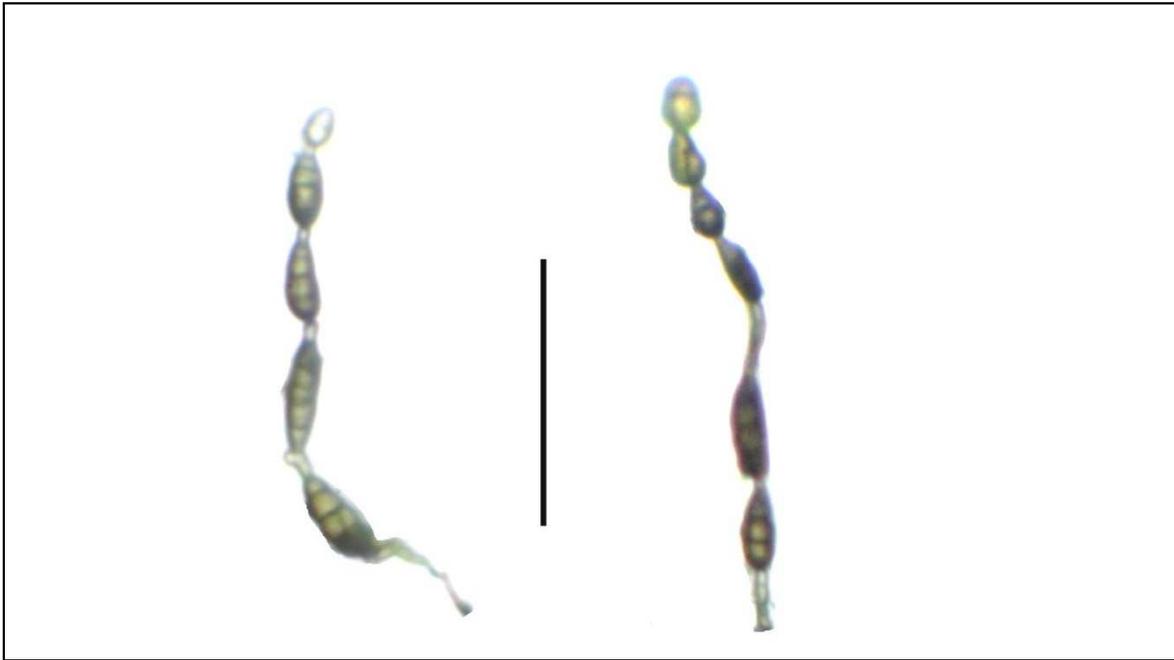


Figura 2.10. Patrón de esporulación y conidios en *A. godetiae*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria infectoria* E. G. Simmons

Conidióforos primarios conspicuos, frecuentemente más largos que la longitud de un conidio, dan origen a 1 o 2 conidios que forman cadenas lineales de hasta diez unidades, frecuentemente más cortas y ramificadas. Conidióforos secundarios ocasionalmente presentes y de variada longitud. Conidios alargados, apretado-ovoides o estrecho-elipsoides, de 10-57 x 6-20  $\mu\text{m}$ . Dependiendo del tamaño del conidio aparecen entre 3 y 8 septos transversales y 0 a 3 septos longitudinales. Colonias de 55 mm de diámetro con una densa capa de micelio, la esporulación es pobre y se concentra en dos anillos concéntricos más oscuros.



Figura 2.11. Patrón de esporulación y conidios en *A. infectoria*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria pellucida* E. G. Simmons

Conidióforos primarios cortos, erectos. Conidióforos secundarios ausentes. Cadenas no ramificadas de 5- 12 conidios. Conidios ovoides, frecuentemente ancho elipsoide. Conidios de 11-50 x 7-18  $\mu\text{m}$ , presentan de 3-6 septos transversales y 1-2 septos longitudinales. Algunos conidios con la pared rugosa. Colonias de 75 mm de diámetro, con varios anillos concéntricos.

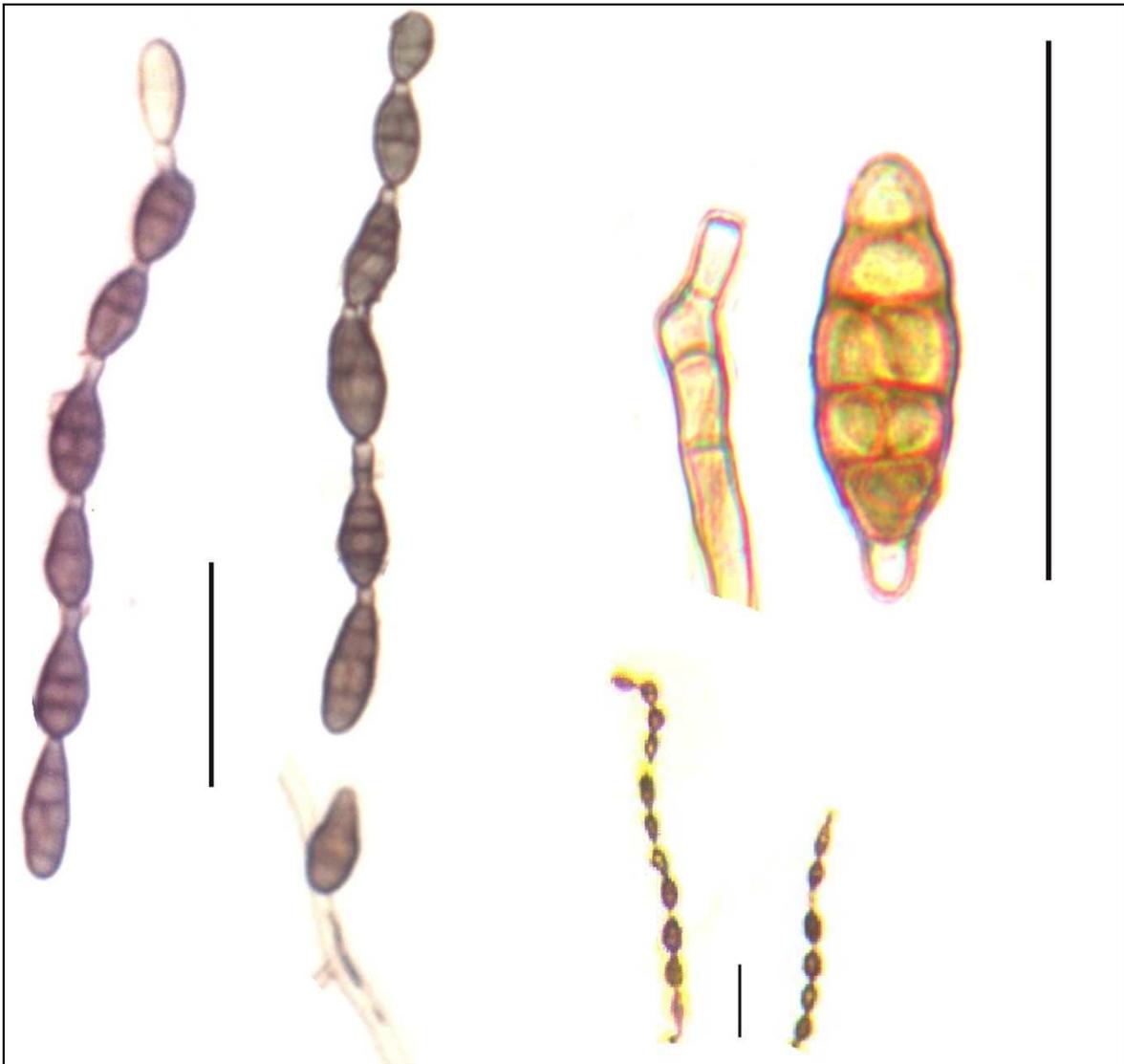


Figura 2.12. Patrón de esporulación, conidióforo y conidios en *A. pellucida*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria radicina* Meier, Drechsler & Eddy

Conidióforos primarios erectos, que pueden ramificarse y originan grupos de conidios en los ápices. Conidios variados, algunos, relativamente largos, elipsoides, largo elipsoides, hasta subcilíndricos, con 5 a 7 septos transversales y 1 o 2 septos longitudinales, otros cortos, ovoides obovoides a casi esferoides, con 2 a 4 septos transversales y 1 o 2 longitudinales. Conidios largos 25-45 x 10-20  $\mu\text{m}$ , conidios cortos 15-25 x 7-15  $\mu\text{m}$ . Algunos de los conidios presentan la pared rugosa. Colonias de 40 mm de diámetro.

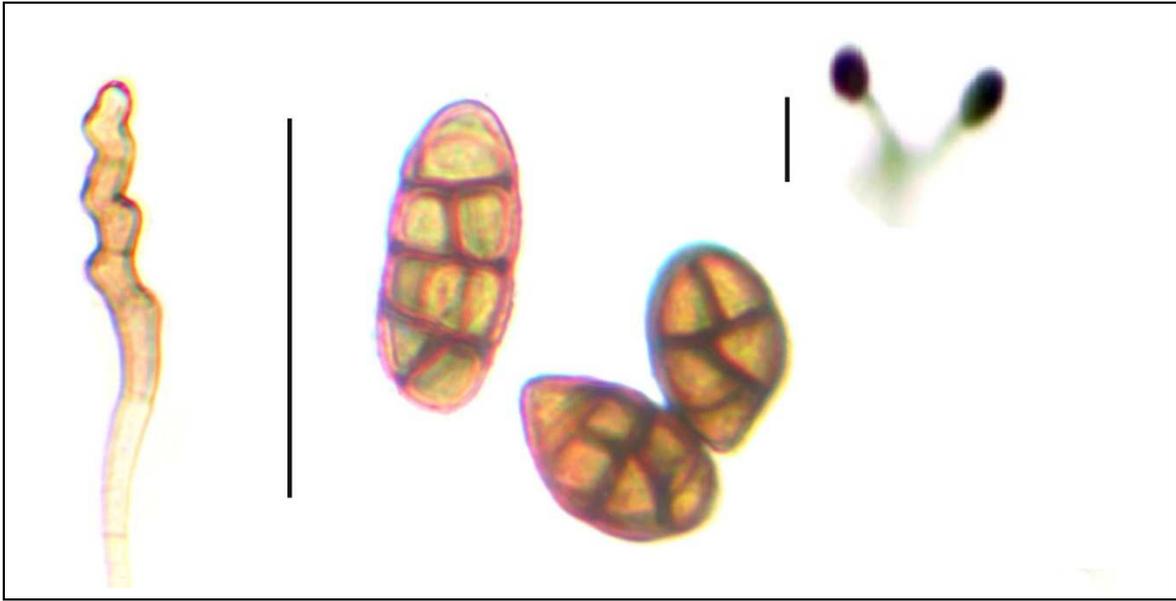


Figura 2.13. Patrón de esporulación, conidióforo y conidios en *A. radicina*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

*Alternaria tenuissima* (Ness & T. Ness : Fr.) Wiltshire

Conidióforos primarios cortos. Cadenas 5-15 conidios, algunas veces con una ramificación corta, originada en los conidios. Conidios ovoides o elipsoides, frecuentemente con 4 septos transversales y 1 longitudinal, conidios maduros más grandes, estrecho-ovoides, con hasta 7 septos longitudinales y 3 transversales. Algunos conidios presentan un pico cónico de 2 a 3 células de largo. Conidios de 11-40 x 8-16  $\mu\text{m}$ , algunas veces con la pared rugosa. Colonias de 70 mm de diámetro.



Figura 2.14. Patrón de esporulación y conidios en *A. tenuissima*, Barra = 50  $\mu\text{m}$

## 2.5.BIBLIOGRAFIA

- Aly, A., Edrada-Ebel, R., Indriani, I., Wray, V., Müller, F., Totzke, F., Zirrgiebel, U., Schächtele, C., Kubbutat, M., Lin, W., Proksch, P., Ebel, R. 2008. Cytotoxic Metabolites from the Fungal Endophyte *Alternaria* sp. and Their Subsequent Detection in Its Host Plant *Polygonum senegalense*. *Journal of Natural Products* 71:972-980
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. 5<sup>th</sup>. Ed. Elsevier Academic Publisher, California, 922 p.
- Andersen, B., Kroger, E., Roberts, R. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen*, and *A. longipes*. *Mycological Research* 105:291-299.
- Andrew, M., Peever, T., Pryor, B. 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia* 101:95-109.
- Barkai-Golan, R. 2008. *Alternaria* mycotoxins. P. 185-203. En: Barkai-Golan, R. Nachman P (Eds.). *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Ed. Academic Press, San Diego, 395 p.
- Barreto, J., Aguirre, M., Caicedo, A., Miranda, D., Echeverri, L., Campos, Y. 2002. El cultivo del tomate tipo milano, pimentón, maíz dulce y frijol en el sistema de siembra de camas plastificadas bajo las condiciones agroecológicas de la meseta de Ibagué. Editorial El Poirá, Ibagué, 49 p.
- Castro, B., Timmer, L., Muller, G. 2000. *Enfermedades de los cítricos en Colombia*. Bogotá, Produmedios, 101 p.
- Chou, W., Wu, W. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, 106:164–169.
- Cline, E., Farr, D., Rossman, A., Palm, M., McCray, E. *Fungal Nomenclature Database, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/nomen/Nomenclature.cfm>, consulta Enero de 2014
- Ellis, M. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, Surrey, England, 608 p.
- Ellis, M. (1976). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew. Surrey, England, 507 p.
- Farr, D., Rossman, A. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/> consulta Julio de 2013
- Joly, P. 1964. Le Genre *Alternaria*. *Encyclopédie Mycologique*, Paul Lechevalier, éditeur. Paris 250 p.
- Kaur, T., Sharma, D., Kaur, A., Manhas, R. 2013. Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* 46:1756-1768.

- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., Stalpers, J. 2008. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. CABI International. Wallingford, UK, 771 p.
- Lahlali, R., Hijri, M. 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. FEMS Microbiology Letters 311:152-159.
- Lantigua, P., Martinez, C., Pons-Kühnemann, J., Pérez, M. 2008. Grupos intraespecíficos de *Alternaria solani* de tomate y papa. Fitopatología Venezolana 21:44-50
- Neergaard, P. 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press, Copenhagen, Denmark, 560p.
- Orjuela, J. 1965. Índice de las enfermedades de las plantas cultivadas en Colombia. Boletín técnico 11. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá, 66 p.
- Ostry, V. 2008. *Alternaria* mycotoxins: An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin 1: 175-188
- Pitt, J., Hocking, A. 1997. Fungi and food spoilage. 2<sup>nd</sup> edn. Blackie Academic and Professional, London, 519 p.
- Pryor, B., Bigelow, D. 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium*, and *Stemphylium*. Mycologia 95:1139–1152.
- Pryor, B., Gilbertson, R. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. Mycological Research 104: 1312–1321.
- Roberts, R., Reymond, S., Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of smallspored *Alternaria* species and species groups. Mycological Research 104:151-160.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS press, St Paul, MN, USA, 326 p.
- Simmons, E. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. p. 1–35. En: Chelkowski J. y Visconti A. (Eds). *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, 573 p.
- Simmons, E. 1993. *Alternaria* themes and variations (54-62). Mycotaxon 46:171-199. (28305)
- Simmons, E. 1997. *Alternaria* Themes and Variations (151-223). Mycotaxon 65:1-91.
- Simmons, E. 1999. *Alternaria* Themes and Variations (236-243). Host specific toxins producers. Mycotaxon 70:325-369.

Simmons, E. 2007. *Alternaria*. An Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands, 780 p.

Simmons, E, Roberts R. 1993. *Alternaria* themes and variations (73). Mycotaxon 48:109-140.

Sun, X., Zhang, T. 2008. Morphological and molecular characterization of *Alternaria* isolates on fruits of *Pyrus bretschneideri* Rehd. "Ya Li". Mycosystema 27:105-117.

Woudenberg, J., Groenewald, J., Binder, M., Crous, P. 2013. *Alternaria* redefined. Studies in Mycology 75:171-212.

Zapata, J., Saldarriaga, A., Londoño, M., Díaz, C. 2002. Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia. Boletín Técnico 14. Centro de Investigación La Selva, Corpoica. Rionegro, Antioquia, 41 p.

Zhang, T. 2003. *Alternaria*, Flora Fungorum Sinicorum. Vol. 16. Science Press, Beijing, 283 p.

Zubieta, D, Alarcón P. 1974. Evaluación de las enfermedades del pimentón (*Capsicum annum* L.) en el Valle del Cauca, Colombia. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 157 p.

### 3. EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALTERNARIA

#### 3.1. RESUMEN

Cuatro regiones de ADN fueron evaluadas como potenciales marcadores taxonómicos para las especies del género de hongos *Alternaria*. El gen de la citocromo oxidasa (*COXI*), determinado como “Barcode” de animales, *ITS*, la región que se ha determinado como “Barcode” más promisorio de hongos, *Alt al*, un marcador frecuente en la taxonomía, particularmente en estudios filogenéticos del género, y el gen de la oxidasa alternativa (*AOX*), recientemente determinado como marcador Barcode promisorio por sus resultados en *Fusarium*. Entre las regiones evaluadas no fue posible identificar un marcador “Barcode” para *Alternaria* debido a la cercanía filogenética de los aislados evaluados. Sin embargo, el gen *AOX* sigue siendo promisorio como marcador taxonómico debido a su alta divergencia de secuencia, incluso dentro de clados estrechamente relacionados. A través del análisis de la región *ITS* es posible evidenciar una relación entre la filogenia y las características morfológicas de *Alternaria*, particularmente dentro del grupo de conidios pequeños. De igual manera se pudo establecer que la variación dentro del grupo de especies de conidios pequeños de *Alternaria* es insuficiente para separar claramente las especies. De esta manera se establece que los taxones dentro de esta sección corresponden a variaciones intraespecíficas dentro del género.

#### 3.2. INTRODUCCIÓN

La identificación de hongos es complicada, especialmente cuando se refiere al grupo de hongos que no presentan un estadio sexual. Esto ocurre principalmente porque la taxonomía de muchos de los géneros que integran este grupo de hongos está enteramente basada en caracteres morfológicos *in vitro*, particularmente los de sus conidios. El problema taxonómico es especialmente evidente en los antiguamente denominados hifomicetes, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Seifert y Rossman, 2010).

La identificación de *Alternaria*, es mucho más complicada, debido a la ambigüedad de muchos de sus caracteres y a su capacidad de variar morfológicamente ante pequeños cambios en las condiciones de cultivo (Groves y Skolko 1944; Misaghi et al, 1978; Simmons, 1992; Rotem, 1994; Adrew et al, 2009). Además muchos de los caracteres de los conidios, tenidos en cuenta para su clasificación, varían de acuerdo con la edad del cultivo (Simmons, 1992). Esta dificultad es más notoria en la sección de conidios pequeños en la cual existe un debate acalorado sobre la verdadera posición taxonómica de muchos grupos establecidos como especies (Sun y Zhang, 2008). Por ejemplo, dentro del grupo *alternata*, que integra un gran número de especies de importancia agronómica (Chou y Wu, 2002; Hong et al., 2005), existen dos posiciones, la de Simmons E. G., apoyada por Roberts R. G., quien establece la posibilidad de diferenciar morfológicamente entre las diferentes especies que él mismo ha descrito (Simmons, 2007). En contraposición, y ante la dificultad para separar las especies dentro del grupo, se ha sugerido, que muchos de los taxones, particularmente específicos de hospedero, como *A. mali* o *A. gaisen*, sean referidos como patotipos de *A. alternata* (Rotem, 1994). El problema de la taxonomía fundamentada en caracteres morfológicos, ha sido analizado también para otros grupos dentro del género (Lantigua et. al., 2008).

Existe entonces la necesidad de buscar herramientas alternativas para la identificación de las especies del género. Algunas ya han sido evaluadas con resultados variables. El uso de perfiles metabólicos ha sido empleado para clasificar las especies productoras de toxinas específicas de hospedero como patotipos de *A. alternata* (Nishimura, 1980; Otani y Kohmoto, 1992; Scheffer, 1992; Johnson et al 2001, Hatta 2002; Masunaka et al., 2005). Igualmente se han usado estos caracteres bioquímicos para distinguir el grupo *alternata* del grupo *infectoria* (Andersen y Thrane, 1996) y para distinguir entre especies morfológicamente distantes (Bilgrami et al., 1994).

Diversos métodos moleculares y características antigénicas (Bulajic, 2007) han sido utilizados como herramientas para la separación de especies del género *Alternaria*. Entre éstos, se encuentran: análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) (Nishimura, 1980; Adachi et al., 1993; Kusaba y Tsuge, 1994; Aradhya et al., 2001), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), técnicas que se han utilizado para determinar la relación entre especies (Cooke et al., 1998; Sharma y Tewari, 1998; Morris et al., 2000; Roberts et al., 2000) y poder discriminarlas (Weir et al., 1998, Roberts et al, 2000, Sun y Zhang, 2008).

Igualmente, son muchos los estudios filogenéticos que se han desarrollado intentado resolver las relaciones taxonómicas entre especies, para los cuales se ha usado la región del espaciador interno transcripcional (*ITS*) como principal marcador (Pryor y Gilbertson, 2000; Chou y Wu, 2002; Pryor y Michailides, 2002, Pryor y Bigelow, 2003; Peever et al, 2004; Hong et al, 2005; Pavón et al, 2010). De la misma manera se han empleado otras secuencias con este fin, como la del alérgeno principal de *Alternaria* (*Alt a1*), muchas veces combinada con *ITS* (Pryor y Gilbertson, 2000; Pryor y Bigelow, 2003; Peever et al, 2004; Hong et al, 2005; Pavón et al, 2010).

El “Barcode”, se ha propuesto como una herramienta molecular precisa en la clasificación de especies dentro de diversos grupos de organismos, principalmente animales. La propuesta y objetivo del consorcio *Barcode* fue encontrar una secuencia única para identificar todas las especies existentes e inicialmente se propuso el gen de la citocromo oxidasa (*COXI*) (Hebert et al, 2003, Hebert et al., 2004a, Hajibabaei, 2007, Ward et al., 2005; Ward y Holmes, 2007, Hebert et al., 2004b; Hajibabaei, 2006; Smith et al., 2005, Chen et al. 2010; Dai et al. 2012). Este gen es hoy en día ampliamente usado para la clasificación de animales y también se ha mostrado efectivo en otros grupos como protistas y macroalgas (Saunders, 2005; Robba et al., 2006).

Sin embargo, el establecimiento de un DNA Barcode universal para el reino Fungi ha presentado dificultades. El gen *COXI*, presenta resultados variables. Por ejemplo para *Fusarium*, se ha revelado un número significativo de multicopias del gen, además de la presencia de intrones, lo que determina un problema en el diseño de *primers* (Gilmore et al., 2009). Paralelamente se ha evidenciado que no existe la variación de secuencia suficiente como para discriminar entre especies del género (Galvez, 2009). Otras secuencias evaluadas presentan problemas similares, lo que dificulta su uso como marcadores tipo *Barcode* (Seifert et al. 2007, Santamaría et al. 2009, Schoch et al. 2012).

La región *ITS*, se ha mostrado como la región más promisoría para constituirse como marcador *Barcode* universal de hongos, porque presenta el mayor Barcode gap entre la variación inter e intraespecífica (Robert et al., 2011, Schoch et al. 2012). Sin embargo estos resultados contrastan

con los de Santamaría (2009) y Seifert et al. (2007), quienes han determinado que esta secuencia es menos efectiva que otras como *COXI*.

Recientemente se ha evaluado la eficacia del gen de la oxidasa alternativa (*AOX*) como marcador tipo “Barcode” en especies del género *Fusarium* (Gálvez, 2009, Vera, 2012). Este gen se presenta como un marcador promisorio en hongos debido a su marcada ubicuidad, además del mantenimiento de una gran similaridad de secuencia dentro del reino, lo que facilita el diseño de *primers* (Jiménez et al. 2007), también se ha determinado la existencia de múltiples copias del gen (Juszczuk y Rychter, 2003), lo que agiliza su amplificación. Finalmente se ha podido establecer que el gen *AOX* presenta la suficiente divergencia de secuencias como para distinguir entre taxones (Jiménez et al. 2007, Gálvez, 2009, Vera, 2012).

En el presente estudio se evaluó la utilidad de las secuencias *Alt a1*, *AOX*, *COXI* e *ITS* como marcadores taxonómicos, particularmente como *Barcode*, para el género *Alternaria*. La región *ITS* es considerada como el más importante marcador taxonómico y filogenético en hongos, mientras que *Alt a1* ha sido ampliamente utilizado como marcador taxonómico en el género, *COXI* se considera como el marcador *Barcode* más importante en varios organismos, mientras que se evaluó la utilidad de *AOX* en esta función.

### 3.3. MATERIALES Y METODOS

#### Colección de especímenes

Muestras de *Alternaria* spp. de plantas que presentaban síntomas, fueron colectadas de varias zonas de la abana de Bogotá e identificadas en base a sus características morfológicas (Simmons, 2007). Cuarenta y tres aislados pertenecientes a 14 especies de *Alternaria* y 7 aislados a géneros cercanos fueron incluidos en el presente estudio. Adicionalmente se emplearon 3 aislados de *A. tomatophila*, identificadas como 45, 46 y 47, cedidos por el Dr. Thomas Zitter de Cornell University (Tabla 3.1). Todos los aislados se encuentran depositados en la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada.

#### Extracción de ADN

A partir de cultivos monospóricos en papel, una muestra de cada uno de los aislados se creció en caldo papa dextrosa (PDB) por 7 días a 20°C. El micelio se recolectó mediante bomba de vacío y se liofilizó a -80°C por 2 días.

La extracción se realizó mediante un protocolo para hongos endófitos (anexo 1). 100 mg de micelio liofilizado se pulverizaron, posteriormente se adicionó 1 ml de buffer de lisis (2% CTAB, 3% SDS, 250 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl y 25 mM EDTA) y 80 µl de 2-mercaptoetanol. La separación y purificación de ADN se realizó mediante ciclos sucesivos con fenol-cloroformo-isoamil, cloroformo-isoamil y la precipitación con isopropanol. El ADN fue lavado con etanol al 70% y almacenado a -20°C en 50 µl de buffer TE 1X.

Se comprobó la existencia y calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed (Biotium), corrido a 70 voltios por 90 minutos.

## Diseño y selección de *primers*

Tres regiones del genoma de *Alternaria* se amplificaron usando *primers* específicos, que se hibridan al espaciador de transcrito interno 4 y 5 (*ITS*, 365-425 bp), el alérgeno mayor de *Alternaria* (*Alt al*, 510 bp), y el gen de la citocromo oxidasa I (*COXI*, *Ucox1* 595 y *Ucox2* 421-bp). Una región, la oxidasa alternativa (*AOX*, 600 bp aprox), fue amplificada con *primers* diseñados con Primer-BLAST (Ye et al., 2012), desde la secuencia de oxidasa alternativa de *Pyrenophora tritici-repentis*, usando parámetros por defecto. Los detalles de los *primers* se presentan en la tabla 3.2.

## Amplificación y secuenciación

Después de optimizar cada una de las amplificaciones, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad Laboratories Inc.), en un volumen final de 25 µl, con 2,5 µl de buffer de reacción, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl de dNTPs, 0,5 µl de cada uno de los *primers*, 0,25 µl de DNA polimerasa (BIOLASA, BIOLINE), 1 µl de molde de ADN y 18,125 µl de agua desionizada.

Las condiciones de amplificación de *ITS*, consistieron en una denaturación inicial de 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 56 °C, 60 s a 72 °C y una elongación final de 7 min a 72 °C. Para los demás pares de *primers* varió la temperatura de anillamiento de la siguiente manera: 50 °C para *COXI*, 53,5 °C para *COXI2*, 64 °C para *AOX1*, 62°C para *AOX2* y 57 °C para *Alt al*.

El tamaño de los amplicones fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed, corrido durante 90 minutos a 70 voltios. Como marcador de peso, se empleó Hyperladder II (BIOLINE). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen (Corea) en ambas direcciones, usando los *primers* empleados en la amplificación (tabla 3.2).

## Análisis bioinformáticos

Las secuencias obtenidas se editaron usando el software Geneious 4.8.5 (Biomatters Ltd.). Adicionalmente se usaron seis muestras de ADN de referencia, tres de *A. alternata* y tres de *A. solani*, provenientes de la colección del *Potato Pathology Lab, Department of Plant, Soil and Entomological Sciences, University of Idaho* (Tabla 3.1). A partir de las secuencias se obtuvo una secuencia consenso para cada aislado y se realizó un BLASTn (parámetros por defecto) para cada uno de los cuatro marcadores, comparado con todas las entradas de las bases de datos de la colección de nucleótidos no redundantes (nr/nt) del GenBank+EMBL+DDBJ+secuencias PDB. Todas las secuencias generadas serán depositadas en GenBank.

Se realizaron alineamientos múltiples de los cuatro marcadores con MAFFT 7 (Katoh. 2013), usando parámetros por defecto. Previamente, y con el fin de obtener resultados más precisos, se eliminaron las regiones con poca información con trimAl v1.2 (Capella-Gutierrez et al. 2009).

Con el fin de estimar las relaciones filogenéticas de los aislados de *Alternaria* con cada uno de los marcadores, se usó jModelTest (Posada, 2008) para la selección estadística del modelo de sustitución de nucleótidos, bajo la estrategia de Criterio de Información de Akaike (AIC). Para el gen *COXI* se empleó el modelo HKY+G, mientras que para las demás se utilizó GTR+G+I.

Los análisis filogenéticos de las secuencias consistieron en análisis bayesianos independientes de cada uno de los cuatro marcadores analizados, para lo cual se usó MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist et al. 2012). De la misma manera se construyeron árboles con el método de *máxima verosimilitud* con MEGA 5, con el fin de comparar las topologías con ambos métodos.

### **Análisis de distancias genéticas y “Barcode gap”**

Análisis de distancia infra- e interespecífica fueron desarrollados mediante el modelo Kimura 2-parameter (K2P) en MEGA 5 (Tamura et al. 2011). A través de este software, se construyeron matrices de divergencia evolutiva, se determinaron los porcentajes de máxima variación intraespecífica y los de mínima variación interespecífica, y se construyeron gráficas de éstas, con el fin de establecer la presencia de un “Barcode gap” entre los aislados de cada una de las especies para los cuatro marcadores analizados.

Se determinó la identidad entre las secuencias para cada uno de los marcadores, a partir de matrices de identidad obtenidas con MEGA 5.

Tabla 3.1. Aislamientos incluidos en este estudio.

No.	Nombre científico Identificación morfológica	Lugar de colección	Identificador del aislado
1	<i>A. alstroemeria</i>	Funza	25
2	<i>A. alstroemeria</i>	Funza	26
3	<i>A. alstroemeria</i>	Funza	27
4	<i>A. alstroemeria</i>	Bogotá (Suba)	9
5	<i>A. alstroemeriae</i>	Bojacá	18
6	<i>A. alternata</i>	Chía	10
7	<i>A. alternata</i>	Cajicá	20, 24
8	<i>A. alternata</i>	Bogotá (Suba)	31,32,33,34
9	<i>A. alternata</i>	Mosquera	37
10	<i>A. astragali</i>	Bogotá (BJJCM*)	16
11	<i>A. brassicicola</i>	Madrid	28,29
12	<i>A. brassicicola</i>	Cajicá	41, 43, 44
13	<i>A. brassicicola</i>	Cota	47, 48
14	<i>A. broccoli-italicae</i>	Funza	39, 40
15	<i>A. broccoli-italicae</i>	Cajicá	42
16	<i>A. colombiana</i>	Facatativá	15
17	<i>A. daucicaulis</i>	Zipaquirá	11
18	<i>A. gaisen</i>	Cajicá	14

19	<i>A. gaisen</i>	Cajicá	23
20	<i>A. gaisen</i>	Chía	6
21	<i>A. geophila</i>	Mosquera	2
22	<i>A. geophila</i>	Bogotá (Guaymaral)	30
23	<i>A. godetiae</i>	Cajicá	13
24	<i>A. pellucida</i>	Bogotá (Suba)	35
25	<i>A. pellucida</i>	Facatativá	8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g
26	<i>A. radicina</i>	Zipacquirá	12
27	<i>A. tenuissima</i>	Bogotá (Suba)	36
28	<i>A. tenuissima</i>	Chía	7
29	<i>A. infectoria</i>	Mosquera	38
30	<i>A. Tomatophila</i>	-	45, 46, 47
30	<i>Curvularia</i>	Cajicá	19, 21, 22
31	<i>Embellisia sp.</i>	El Rosal	1
32	<i>Ulocladium SP.</i>	Cota	17
33	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Chía	5
34	<i>A. Alternata*</i>	-	AS13, AS17, AS20
35	<i>A. Solani*</i>	-	AS4, AS15, AS25

\* Aislamientos de referencia

Tabla 3.2. *Primers* utilizados para amplificar cada una de las regiones evaluadas.

Marcador	Nombre del primer	Secuencia del primer (5´a 3´)	Referencia
<i>Alt al</i>	AltF	ATGCAGTTCACCACCATCGC	Hong et al. 2005
	AltR	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC	Hong et al. 2005
<i>AOX</i>	1AOXAltF	AATTGCCACCCGCGAAGCGA	-
	1AOXAltR	GCGTCCTGGCCGTTGCATCT	-
	2AOXAltF	CCCACCGCGAAGCGAAAGACC	-
	2AOXAltR	AAGCGTCCTGGCCGTTGCAT	-
<i>COX1</i>	UCox1F	TTCTACTAATGCTAAAGATATTGG	Damon et al. 2010
	UCox2F	ATGATTTTCTTTATGGTTATGCC	Damon et al. 2010
	UCoxR	CACCGGGCTAATACAGGTAA	Damon et al. 2010
<i>ITS</i>	<i>ITS5</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. 1990
	<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990

### 3.4. RESULTADOS

Se extrajo ADN de 53 aislados, que pertenecen a 14 especies del género *Alternaria* y a cuatro aislados de géneros cercanos (*Curvularia*, *Embellisia* y *Ulocladium*). Ocho de las 59 muestras evaluadas no pudieron ser amplificadas con alguno de los *primers* empleados en el estudio, mientras que solo seis fueron amplificadas con los cuatro marcadores analizados (Anexo 2).

Se emplearon cuatro de los seis pares de *primers*, uno para cada uno de los marcadores: AltF y AltR para *Alt a1*, 1AOXAltF y 1AOXAltR para *AOX*, UCox1F y UCoxR para *COXI* e *ITS5* e *ITS4* para *ITS*. De los 53 aislados se amplificaron 19 de ellos con los primers para el gen *Alt a1*, más las tres muestras de referencia de *A. alternata*. Esto implica 37,93% de éxito en la amplificación de este locus, el más bajo de los cuatro loci analizados. Los productos de amplificación de este gen presentaron un tamaño aproximado de 600 pb (Figura 3.1.A).

Se obtuvieron 27 productos de amplificación del gen *AOX*, además de tres secuencias de *A. alternata* y una de *A. solani*, de las muestras usadas como referencia, todas ellas con una longitud aproximada de 450 pb. Esto representa el 53,45% de éxito en la amplificación, el más alto de los cuatro marcadores (Figura 3.1.B).

El gen *COXI* fue amplificado en 26 de los aislados, pero en ninguna de las secuencias de referencia. El tamaño aproximado de los productos de amplificación fue de 600 pb. En 44,86% de las muestras fue posible amplificar este gen (Figura 3.1.C).

De la región *ITS* se obtuvieron 24 secuencias, y cinco de los aislados de referencia (todas pertenecientes *A. alternata*), lo que corresponde a un 50% de éxito en la amplificación. Todos los productos de amplificación tuvieron un tamaño aproximado de 700 pb (Figura 3.1.D).

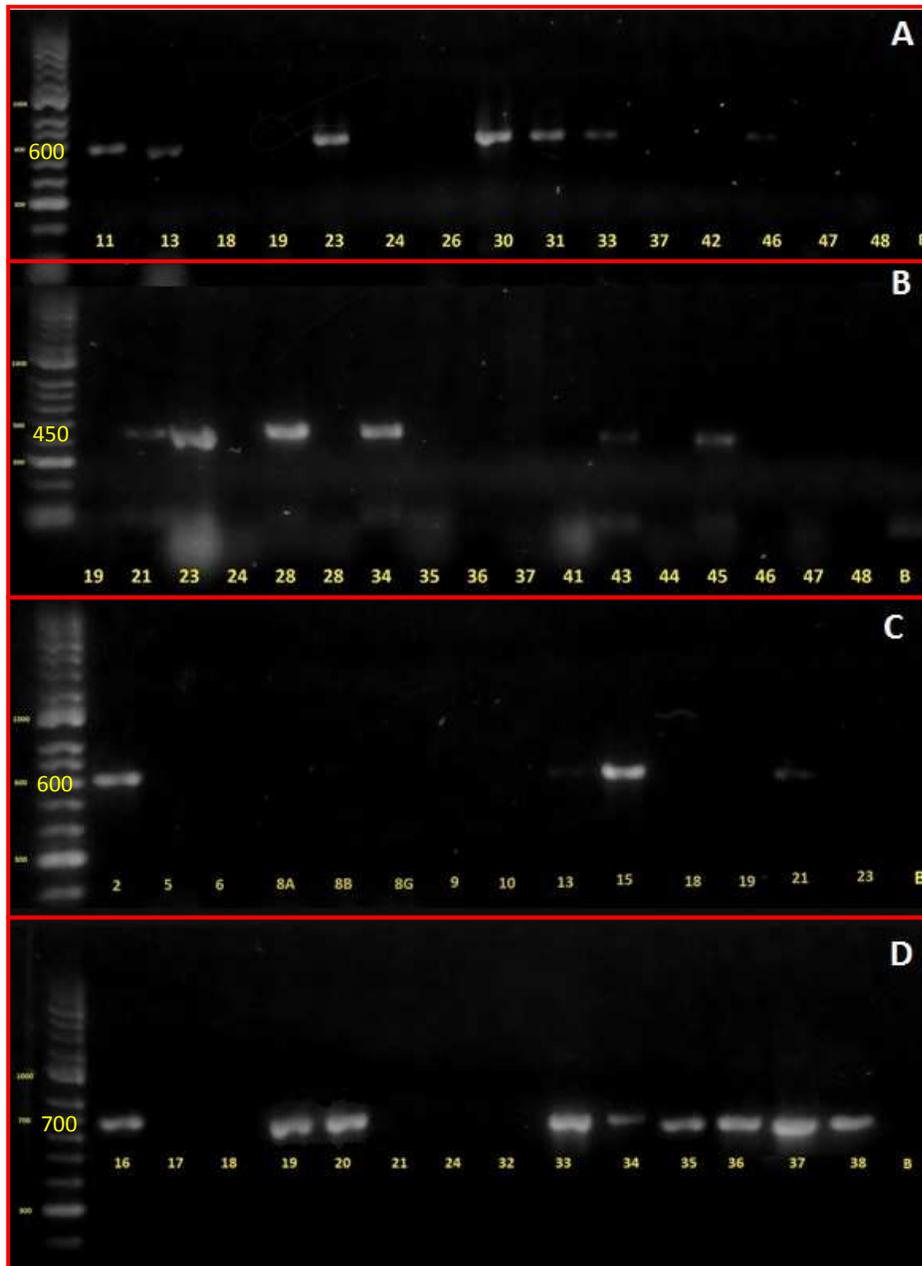


Figura 3.1. Geles de electroforesis de los cuatro marcadores analizados. En el primer carril aparece el marcador de peso molecular (Hyperladder II), en el último (B) el control H<sub>2</sub>O. A) Algunos productos de amplificación de Alta. 11. *A. daucicaulis*, 23. *A. gaisen*, 30. *A. geophila*, 31 y 33. *A. alternata*, 46. *A. tomatophila*. B) Algunos productos de amplificación de AOX. 21. *Curvularia*, 23. *A. gaisen*, 28 y 43. *A. brassicicola*, 34. *A. alternata*, 45. *A. tomatophila*. C) Algunos productos de amplificación de COX1. 2. *A. geophila*, 13. *A. godetiae*, 15. *A. colombiana*, 21. *Curvularia*. D) Algunos productos de amplificación de ITS. 16. *A. astragali*, 19. *Curvularia*, 20, 33, 34 y 37. *A. alternata*, 35. *A. pellucida*, 36. *A. tenuissima*, 38. *A. infectoria*.

En la comparación de las secuencias con BLASTn, la mayor parte de las secuencias de AOX no presentaron resultados significativos de identidad con las secuencias en las bases de datos, solo 11 de las 26 secuencias obtenidas de este gen presentaron el 85% de identidad con una secuencia

de *Fusarium fujikuroi* (GenBank HF679023.1). De la misma manera, para el gen *COXI*, la mayor similitud de todas las secuencias fue con *Phaeosphaeria nodorum* (GenBank EU053989.1). Para el gen *Alt a1*, las secuencias de *Alternaria alternata*, *Alternaria alstroemeriae* y *Alternaria tomatophila* correspondieron a la misma especie en las bases de datos de GenBank, mientras que los aislados de las otras especies tuvieron mayor similitud con especies diferentes, principalmente con *Alternaria alternata* (Tabla 3.3). Las secuencias de *ITS* correspondieron con secuencias encontradas en Gen Bank para *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, y para los aislados del género *Curvularia*, pero en los demás casos no (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Resultados de BLASTn para las secuencias obtenidas con *Alt a1*

Id	Especie	Resultado BLASTn				
		Organismo	Query cover	E value	Ident	Accession
L9	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	91%	0.0	100%	AB744031.1
L34	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L31	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
LAS17	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L20	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L29	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria longipes</i>	95%	0.0	99%	AY563304.1
L44	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria citriarbusti</i>	95%	0.0	98%	JQ646406.1
L41	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria citriarbusti</i>	95%	0.0	98%	JQ646406.1
L28	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria longipes</i>	95%	0.0	99%	AY563304.1
L43	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria resedae</i>	95%	0.0	96%	JQ646408.1
L39	<i>Alternaria broccoli-italicae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	AF288160.1
L15	<i>Alternaria colombiana</i>	<i>Alternaria longipes</i>	95%	0.0	99%	AY563304.1
L11	<i>Alternaria daucicaulis</i>	<i>Alternaria longipes</i>	95%	0.0	100%	AY563304.1
L23	<i>Alternaria gaisen</i>	<i>Alternaria sp.</i>	100%	0.0	98%	EF589829.1
L14	<i>Alternaria gaisen</i>	<i>Alternaria longipes</i>	95%	0.0	99%	AY563304.1
L30	<i>Alternaria geophila</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L13	<i>Alternaria godetiae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	95%	0.0	100%	AY563301.1
L13	<i>Alternaria godetiae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L35	<i>Alternaria pellucida</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L36	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	AF288160.1
L45	<i>Alternaria tomatophila</i>	<i>Alternaria tomatophila</i>	98%	0.0	100%	HE796703.1

Id = identificador del aislado

Tabla 3.4. Resultados de BLASTn para las secuencias obtenidas con *ITS*

Id	Especie	Resultado BLASTn				
		Organismo	Query cover	E value	Ident	Accession
I31	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
IAS13	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
I33	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
IAS20	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
I34	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
I37	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria brassicae</i>	100%	0.0	99%	HQ674659.1
I20	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria tenuissima</i>	100%	0.0	100%	KJ082100.1
I16	<i>Alternaria astragali</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
I28	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I29	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I41	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I45	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria solani</i>	100%	0.0	99%	AY154716.1
I42	<i>Alternaria broccoli-italicae</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	100%	0.0	99%	HQ829119.1
I39	<i>Alternaria broccoli-italicae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I15	<i>Alternaria colombiana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KJ082099.1
I11	<i>Alternaria daucicaulis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I23	<i>Alternaria gaisen</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I30	<i>Alternaria geophila</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I38	<i>Alternaria infectoria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	100%	KF731832.1
I35	<i>Alternaria pellucida</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100%	0.0	99%	KF731832.1
I12	<i>Alternaria radicina</i>	<i>Curvularia lunata</i>	100%	0.0	100%	JX960584.1
IAS15	<i>Alternaria solani</i>	<i>Alternaria solani</i>	100%	0.0	99%	AY154716.1
IAS4	<i>Alternaria solani</i>	<i>Alternaria solani</i>	100%	0.0	99%	AY154716.1
IAS25	<i>Alternaria solani</i>	<i>Alternaria solani</i>	100%	0.0	99%	AY154716.1
I36	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria tenuissima</i>	100%	0.0	100%	KJ082100.1
I47	<i>Alternaria tomatophila</i>	<i>Septoria lycopersici</i>	100%	0.0	100%	DQ841156.1
I19	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Curvularia trifolii</i>	98%	0.0	100%	JN712458.1
I22	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Curvularia lunata</i>	100%	0.0	100%	JX960584.1

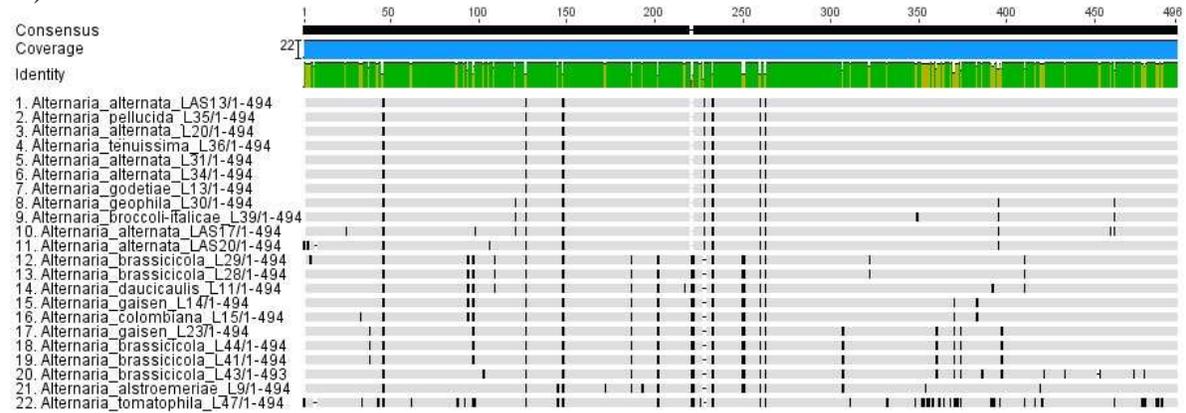
Id = identificador del aislado

### Alineamiento de secuencias

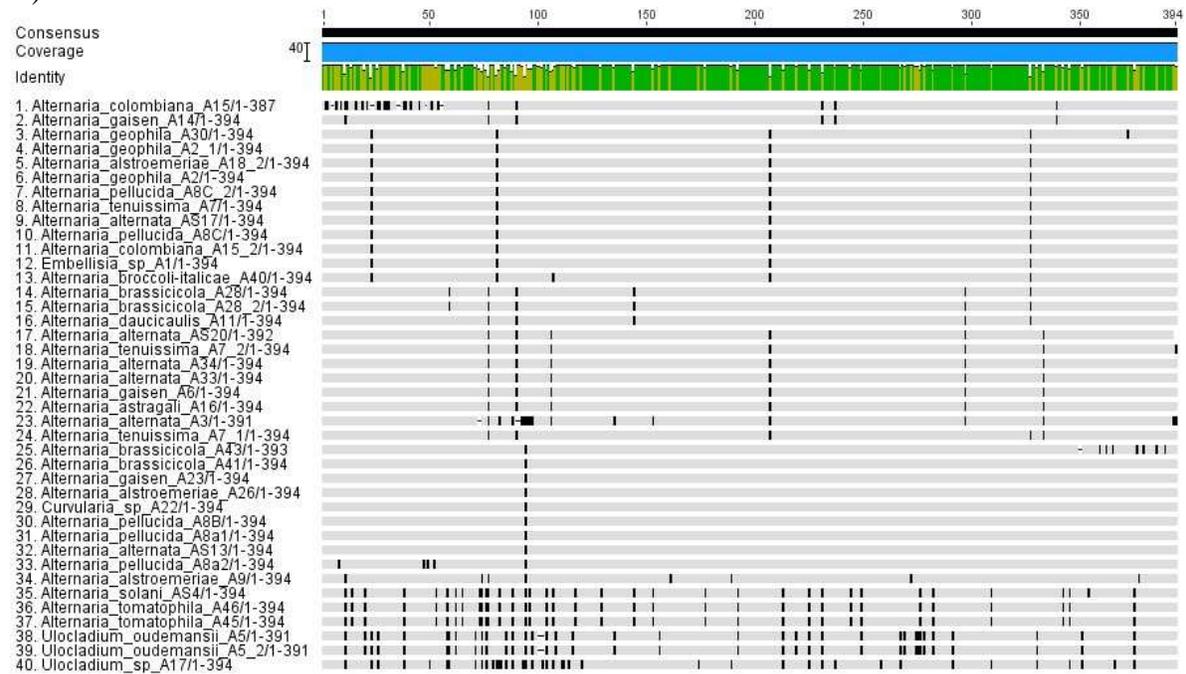
Con las secuencias obtenidas, se realizaron alineamientos múltiples para cada uno de los marcadores analizados utilizando el software MAFFT 7. A partir de los alineamientos se determinó la existencia de polimorfismos, tanto infraespecíficos como interespecíficos, en cada uno de ellos (Figura 3.2). Entre las secuencias de *Alt al* y *AOX* existen polimorfismos que abarcan una gran cantidad de aislados, pero las secuencias de *ITS* mostraron una mayor cantidad de polimorfismos. Las secuencias de *COXI* presentaron el menor número de polimorfismos, evidenciando de esta manera una mayor conservación de esta región dentro del género. Los sitios

polimórficos exactos para cada uno de los loci pueden encontrarse en las secuencias completas (Anexo 3, 4, 5, 6).

A)



B)



C)

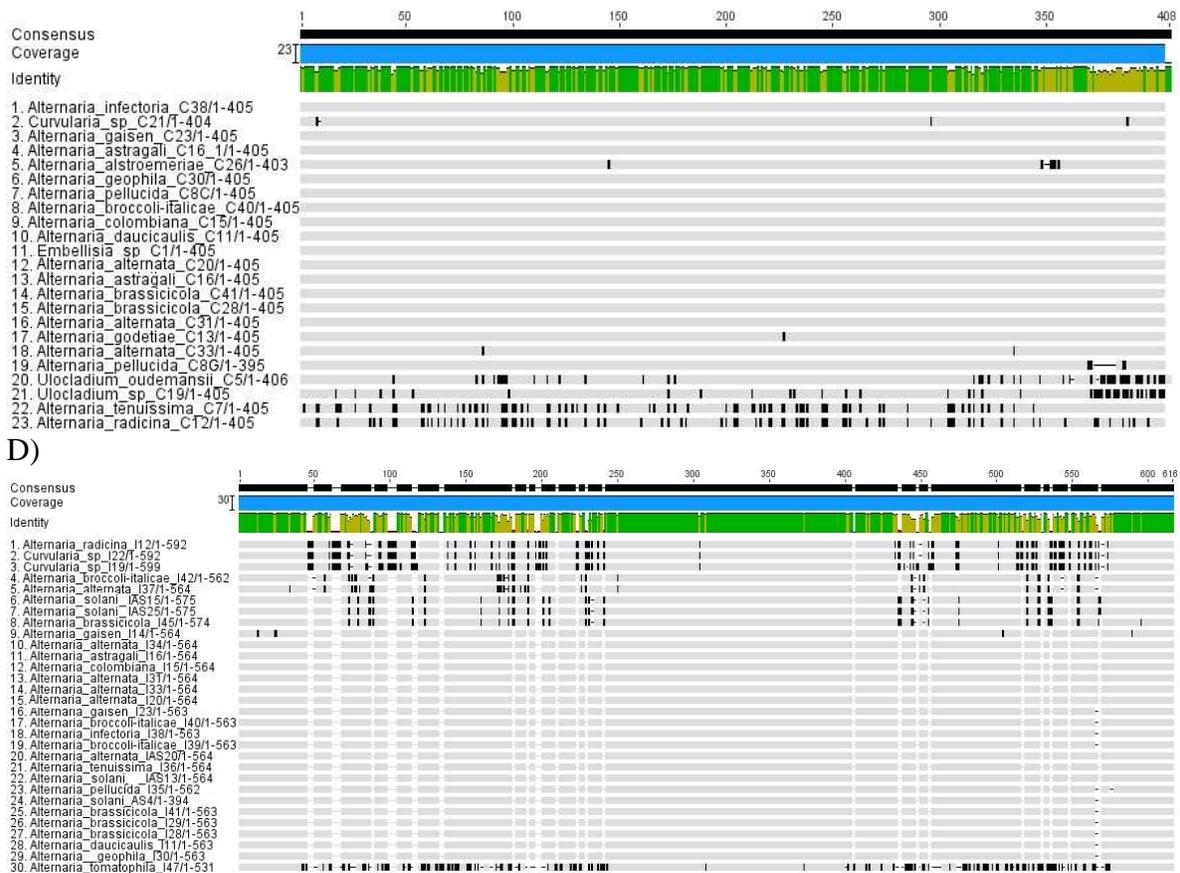


Figura 3.2. Alineamientos de las secuencias obtenidas mediante amplificación. A) secuencias Ala1; B) secuencias AOX; C) secuencias COXI; D) secuencias ITS. La barra verde en la parte superior de cada alineamiento muestra el porcentaje de identidad. Las barras negras dentro de los alineamientos indican sitios variables.

### Análisis filogenéticos

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas a partir de la similitud de las secuencias analizadas, se generaron árboles independientes para cada gen, a partir de los alineamientos, usando el método de inferencia bayesiana. Los árboles obtenidos a través de este método presentaron topologías similares a los que se obtuvieron con máxima verosimilitud (Anexos 7, 8, 9 y 10). Muchas de los agrupamientos obtenidos a través de estos árboles no *COX* coinciden con la identificación morfológica de las especies realizada previamente (capítulo II).

El árbol del gen *Alt a* fue construido con 23 secuencias, usando como grupo externo una secuencia de *Stemphylium vesicarium* ante la ausencia de este gen en *Fusarium oxysporum*, que fue usado como grupo externo en los restantes marcadores analizados. Solo *A. tomatophila* se presentó como un clado aislado y separado de los demás aislados que se agrupan en tres clados en los que no es clara la separación entre especies. Sin embargo, aparece un grupo grande en el que se concentran los aislados de *A. alternata* y en el que aparecen también algunas especies cercanas como *A. pellucida* o *A. tenuissima*. Especies de conidios pequeños poco catenados, aparecen formando un grupo interno dentro de este clado (Figura 3.3).



Figura 3.3. Árbol de las secuencias del gen *Alt a1* usando el método de inferencia bayesiana. Se muestra en los nodos los valores de soporte de la probabilidad posterior bayesiana (PP).

El árbol correspondiente a la secuencia *AOX* fue construido con 41 secuencias. El árbol presenta dos clados principales, uno muy grande, en el que se concentran todos los aislados pertenecientes a especies de conidios pequeños, todas ellas similares a *A. alternata*, pero además incluye especies de géneros diferentes a *Alternaria* (*Embellisia* y *Curvularia*). En el otro grupo se separan los aislados que presentan características morfológicas diferentes a *A. alternata*, conidios no catenados y con pico desarrollado (*A. solani* y *A. tomatophila*), además aparecen juntos los tres aislados del género *Ulocladium* (Figura 3.4).

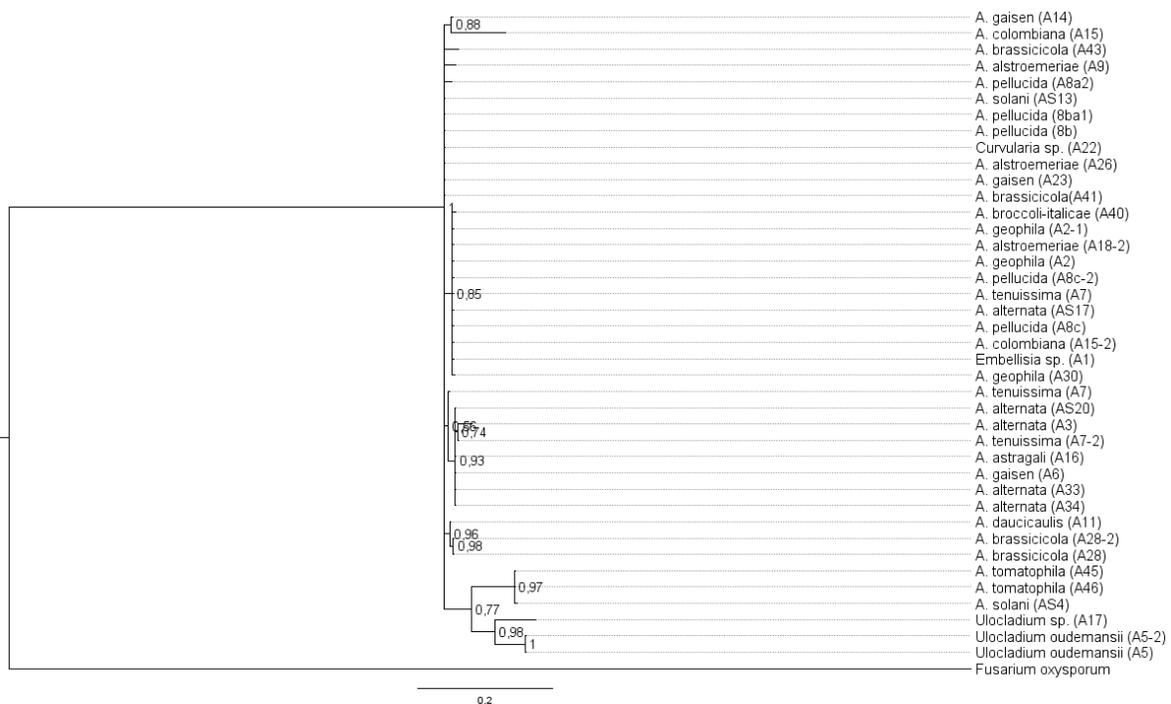


Figura 3.4. Árbol de las secuencias del gen *AOX* usando el método de inferencia bayesiana. Se muestra en los nodos los valores de soporte de la probabilidad posterior bayesiana (PP).

En el árbol del gen *COX1* se agrupan 29 secuencias, y presenta una topología similar al obtenido con *AOX*. Está caracterizado por la presencia de un gran clado con aislados de conidios pequeños, que una vez más incluyen los aislados de *Embellisia* y *Curvularia*, y dentro de él, como un grupo más reciente, los aislados pertenecientes al género *Ulocladium*. Para este gen aparecen como un grupo separado, un aislado de *A. tenuissima* y uno de *A. radicina*, esta último marcadamente diferenciado desde el punto de vista morfológico, pues presenta una escasa catenación en sus conidios.

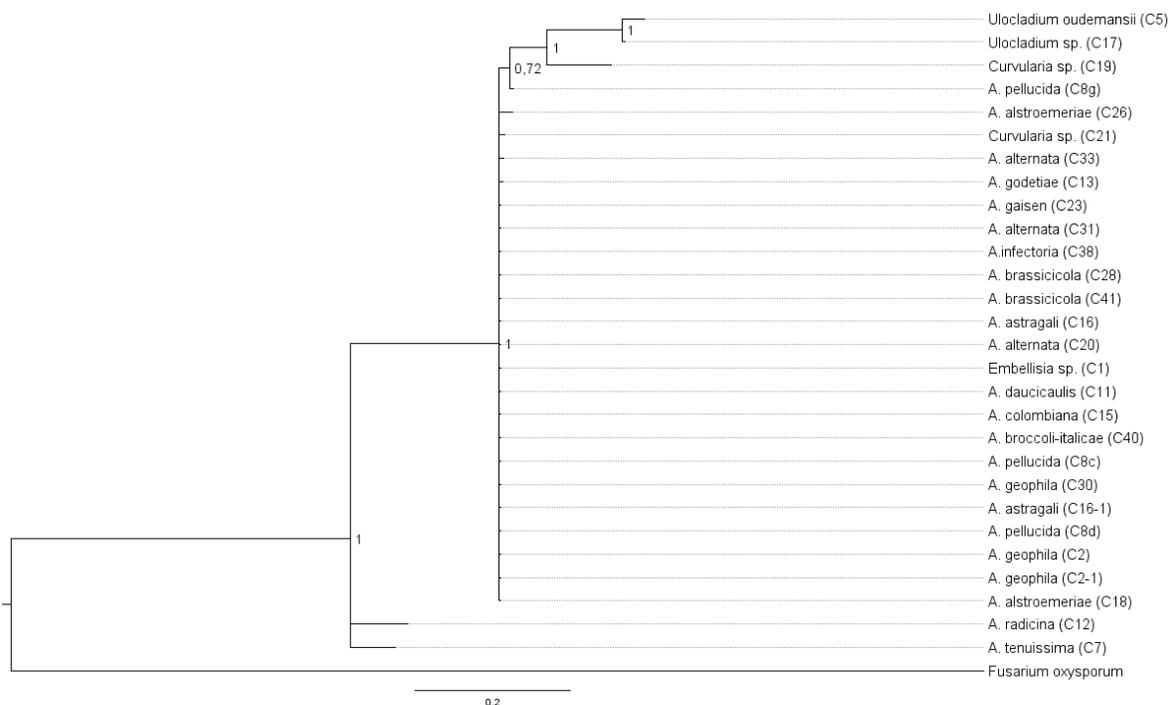


Figura 3.5. Árbol de las secuencias del gen *COXI* usando el método de inferencia bayesiana. Se muestra en los nodos los valores de soporte de la probabilidad posterior bayesiana (PP).

El árbol de *ITS* incluye 31 secuencias y agrupa los aislados analizados de forma similar a las agrupaciones obtenidas a partir de sus características morfológicas. El aislado de *A. tomatophila*, aparece como un grupo externo, alejado de los demás, un clado que integra aislados de conidios pequeños y redondos, poco catenados (*A. radicina* y *Curvularia*), un clado que incluye las especies de *A. solani*, usadas como material de referencia, un pequeño clado que incluye a los dos aislados de *A. broccoli-italicae*, y un gran clado en el que se distribuyen todos los aislados de conidios pequeños catenados, obtenidos en este estudio (Figura 3.6).

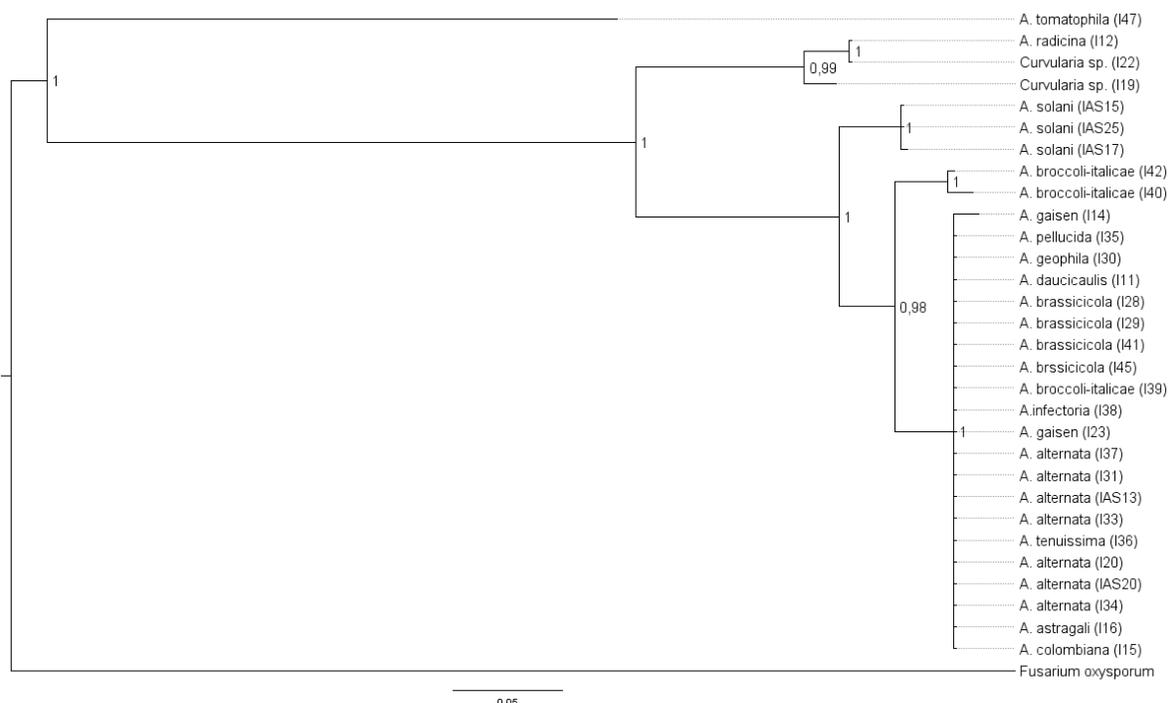


Figura 3.6. Árbol de las secuencias de la región *ITS* usando el método de inferencia bayesiana. Se muestra en los nodos los valores de soporte de la probabilidad posterior bayesiana (PP).

### Analisis de distancias genéticas y Barcode gap

Los análisis de la variación infra- e interespecífica obtenidos a través del modelo K2P, permitieron determinar los porcentajes de variación dentro de las especies y entre las especies. La tabla 3.5, muestra los porcentajes de variación para cada uno de los marcadores estudiados. Los datos corroboran los resultados obtenidos a partir de los árboles de cada una de estas secuencias. Se observó escasa variación entre las secuencias de todos los marcadores, en las especies analizadas, particularmente dentro del grupo de conidios pequeños. Las matrices de distancia intra- e interespecífica, en donde se especifican los valores mínimos y máximos de distancia, se encuentran en los anexos 11, 12, 13 y 14.

Tabla 3.5. Distancias intra- e interespecíficas de los aislados para cada uno de los marcadores analizados.

Marcador	Especie	Número de secuencias	Mínima divergencia interespecífica	Máxima divergencia intraespecífica
<i>Alt a1</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	6	0	3,06
	<i>Alternaria gaisen</i>	2	0	0,74
	<i>Alternaria alternata</i>	5	0	0,24
<i>AOX</i>	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	3	0	2,78
	<i>Alternaria alternata</i>	4	0	1,64
	<i>Alternaria brassicicola</i>	5	0	3,61

	<i>Alternaria colombiana</i>	2	0	9,93
	<i>Alternaria gaisen</i>	2	0	1,36
	<i>Alternaria geophila</i>	3	0	0,27
	<i>Alternaria pellucida</i>	5	0	1,91
	<i>Alternaria solani</i>	2	0	10,63
	<i>Alternaria tenuissima</i>	3	0	1,64
	<i>Alternaria tomatophila</i>	2	0,27	0
	<i>Ulocladium sp.</i>	3	11,06	9,8
COX1	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	2	0	1,57
	<i>Alternaria alternata</i>	3	0	0
	<i>Alternaria astragali</i>	2	0	0
	<i>Alternaria brassicicola</i>	2	0	0
	<i>Alternaria geophila</i>	2	0	0
	<i>Alternaria pellucida</i>	3	0	0,78
	<i>Curvularia sp.</i>	2	0,52	10,88
	<i>Ulocladium sp.</i>	2	12,65	2,12
ITS	<i>Alternaria alternata</i>	7	0	16,59
	<i>Alternaria brassicicola</i>	4	0	0
	<i>Alternaria broccoli-italicae</i>	3	0	0
	<i>Alternaria gaisen</i>	3	0	0
	<i>Alternaria pellucida</i>	2	0	4,64
	<i>Alternaria solani</i>	3	0,18	16,86
	<i>Alternaria tenuissima</i>	3	0,55	8,08
	<i>Curvularia sp.</i>	2	0	0

En la figura 3.7 se representa la variación entre la máxima divergencia intraespecífica en relación con la mínima divergencia interespecífica para cada uno de los marcadores estudiados. A partir de estas gráficas es posible determinar la insuficiencia de los cuatro loci como marcadores taxonómicos tipo “Barcode”, debido a la inexistencia de un “gap” que permita separar las especies de *Alternaria*. Esta evidencia está en consonancia con los agrupamientos obtenidos en los análisis filogenéticos previos.

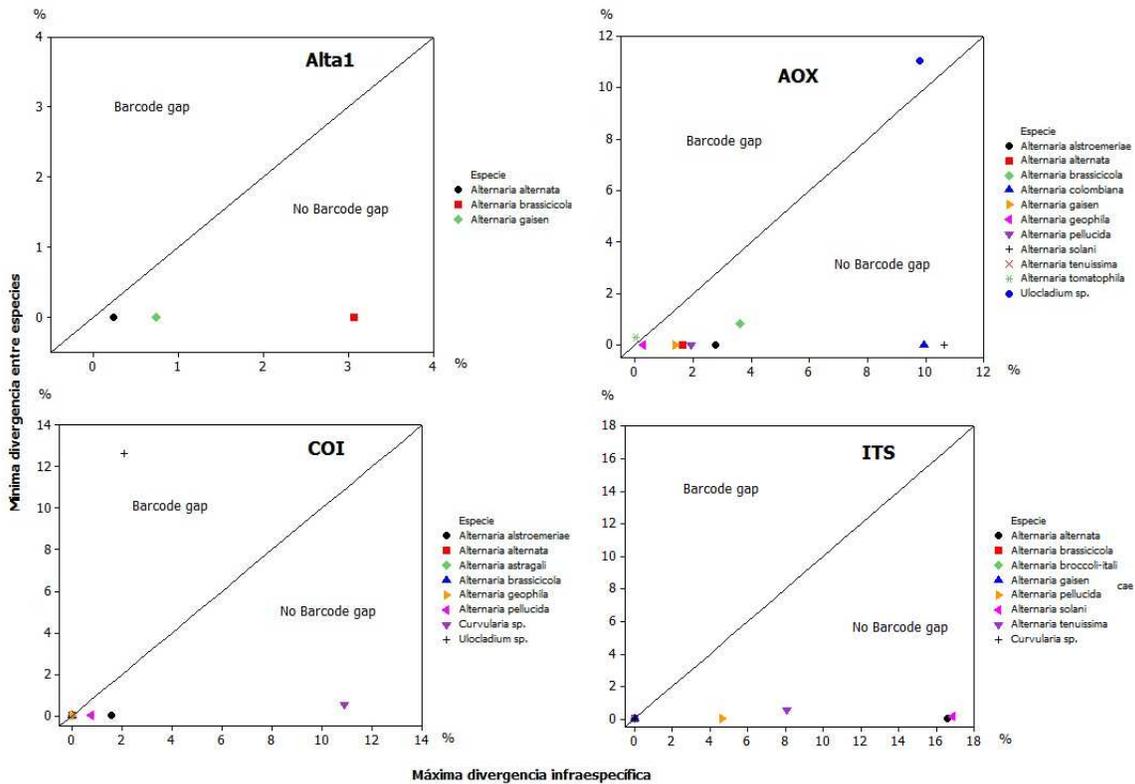


Figura 3.7. “Barcode gap” para los cuatro marcadores en algunas especies de *Alternaria* y géneros asociados.

### Identidad de las secuencias

La figura 3.8 representa la comparación entre las identidades de las secuencias de cada uno de los marcadores analizados a través de las matrices en las que se compara la identidad de cada secuencia con respecto a las demás. Para el caso del gen *Alt a1* es posible evidenciar que los aislados de *A. pellicida*, *A. tenuissima* y *A. godetiae* presentan una identidad del 100% junto con un par de aislados de *A. alternata*. Existe un grupo un poco más variable, que incluye dos de los aislados de *A. alternata* usados como referencia y los aislados de *A. broccoli-italicae* y *A. geophila* (99%). Los aislados de *A. brassicicola*, *A. daucicaulis*, *A. gaisen*, *A. colombiana* y *A. alstroemeriae* presenta un porcentaje menor de identidad (alrededor del 96%). El aislado con menor identidad para este gen fue *A. tomatophila* con cerca del 90% (Figura 3.8.A).

Para el caso del gen *AOX* se observó mayor variación en las secuencias (Figura 3.8.B). Se pueden observar varios grupos pequeños que resultan ser idénticos (100%), el más grande de ellos incluye aislados de *Embellisia*, *A. colombiana*, *A. pellicida*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. geophila* y *A. alstroemeriae*. Existe un grupo más grande con alrededor del 97% de identidad que incluye, además de los aislados de las especies antes mencionadas, aislados de *A. brassicicola*, *A. gaisen*, *A. alternata*, *A. daucicaulis* y *Curvularia*. Dos secuencias, una de *A. alternata* y una de *A. colombiana* presentan menor identidad (cerca del 92%). Los aislados con menor identidad (85% aproximadamente) fueron de *A. solani*, *A. tomatophila*, y *Ulocladium*.

El gen *COXI* presenta un grupo grande que integra secuencias con un 100% de identidad, y en la que aparecen la mayor parte de las especies asociadas a *A. alternata*, incluyendo ésta. Es notorio además que en este grupo aparece el aislado de *Embellisia*. Con alrededor del 95% de identidad aparece uno de los aislados de *A. alstroemeriae*, uno de *Curvularia* y uno de *A. pellucida*. Los aislados de *Ulocladium* presentan aproximadamente el 85 % de identidad. Los menos idénticos (75%) corresponden a un aislado de *A. tenuissima* y uno de *A. radicina* (Figura 3.8.C).

En la matriz de identidad para el marcador *ITS* (Figura 3.8.D), se observa el ordenamiento de las secuencias en el árbol presentado previamente. Un grupo grande con el 100% de identidad, que integra a todas las especies asociadas a *A. alternata*, uno con el 95% de identidad con los dos aislados de *A. broccoli-italicae*, uno con el 90% de identidad con los aislados de *A. solani*. Un grupo integrado por aislados de *Curvularia* y *A. radicina* con el 85%. Finalmente el aislado de *A. tomatophila* aparece con el 75% de identidad con respecto a los demás aislados.

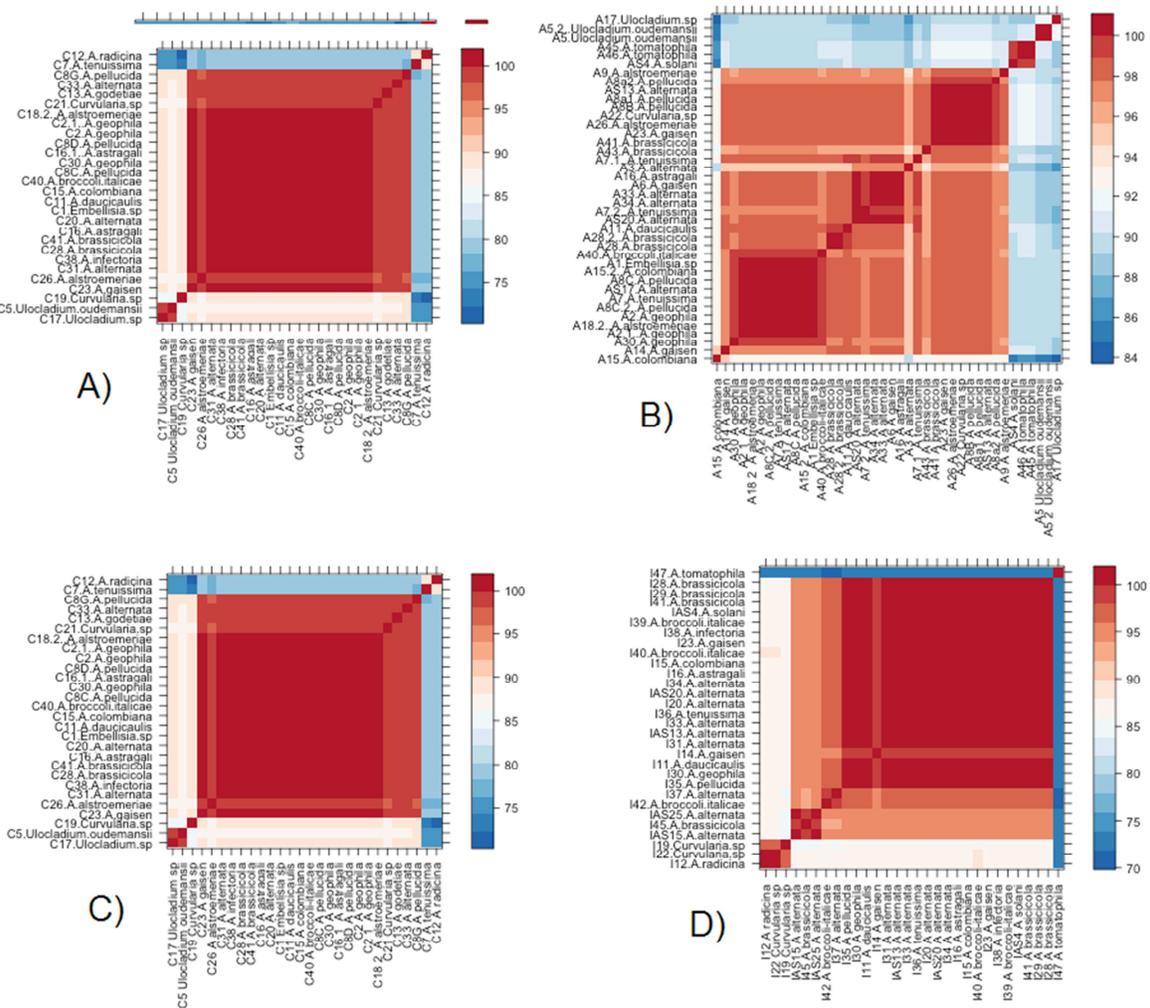


Figura 3.8. Matrices de porcentaje de identidad. A) Secuencias del gen *Alt a1*. B) Secuencias del gen *AOX*. C) Secuencias del gen *COXI*. D) Secuencias del marcador *ITS*.

### 3.5. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio era el de evaluar la utilidad de cuatro secuencias genéticas, *Alt a1*, *AOX*, *COXI* e *ITS* como marcadores taxonómicos para el género *Alternaria*, un enfoque fundamentado en DNA *Barcode*. Hasta donde sabemos, este sería entonces el primer estudio de DNA *Barcode* para este género. Para esto, se analizaron 52 aislados que fueron clasificados a partir de criterios morfológicos en 14 especies de *Alternaria* y 3 géneros cercanos (*Curvularia*, *Embellisia* y *Ulocladium*). Los caracteres definitorios de las especies fueron registrados, y se fundamentaron en mediciones de sus conidios, que aparecen registradas en las descripciones morfológicas (Tabla 2.2).

De acuerdo con los criterios planteados por Simmons (2007) se todas las determino que las especies del estudio eran parte del grupo de conidios pequeños y dentro de ellas se determinó que 10 aislados eran parte del grupo *alternata*. Además, se encontraron tres especies (*A. brassicicola*, *A. infectoria* y *A. tenuissima*) cuyas características morfológicas se solapaban con las de *A. alternata* (Pryor y Michailides, 2002). Los caracteres morfológicos de *Alternaria*, en general, son muy variables, y están determinados por las condiciones sobre las cuales crecen los mismos, la humedad, la luminosidad, así como la disponibilidad de nutrientes (Simmons 1992). Esta plasticidad fenotípica de *Alternaria* no permite una diferenciación reproducible de varias morfoespecies (Andrew et al. 2009).

De la misma manera, Andrew et al. (2009) pudieron determinar que no existe una correlación entre morfoespecies asignadas en diferentes laboratorios, ya sea por la plasticidad antes mencionada, o por el uso de diferentes esquemas morfotaxonómicos de identificación. Particularmente para el grupo *alternata*, las dificultades en identificación morfológica implica una serie de inconvenientes que han llevado a que se plantee la hipótesis de que algunas especies asignadas a tal grupo estén incorrectamente identificadas (Rotem. 1994). Estos problemas asociados a la variabilidad fenotípica han demostrado la insuficiencia de los caracteres morfológicos para obtener una identificación robusta dentro del grupo de especies *alternata* (Andrew et al. 2009).

Por estas razones sigue existiendo incertidumbre sobre la acertada identificación en cualquier estudio que se fundamente en caracteres morfológicos, que ha llevado a que autores como Wounderberg et al. (2013) concluyan que la diferenciación dentro de la sección *alternata*, debe estar determinada por la variación molecular, más que por la morfológica.

En este estudio se evaluó la utilidad de los genes *Alt a1*, *AOX*, *COXI* e *ITS* como marcadores tipo *Barcode*, para las especies del género *Alternaria*. El uso de esta herramienta moleculares una estrategia valiosa en la identificación de varios grupos de organismos (Hebert et al., 2004a). Sin embargo, es es poco valiosa en otros. Por ejemplo, el marcador más ampliamente utilizado para este fin, es el gen de la citocromo oxidasa (*COXI*), que ha sido útil en la discriminación entre especies de muchos grupos animales (Hebert et al., 2004a; Hajibabaei; 2007; Ward y Holmes, 2007; Hajibabaei, 2006; Smith et al., 2005; Chen et al. 2010; Dai et al. 2012). Debido a la posibilidad de diseñar unos *primers* robustos, que permiten recuperar el extremo 5' de todos los filos animales, además de presentar una fuerte señal filogenética.

Para otros organismos, que incluyen plantas, dinoflagelados y varios grupos de hongos, los resultados demuestran la poca utilidad de *COXI* marcador “Barcode”. De la misma manera, este trabajo demuestra la dificultad en la obtención de un Barcode gap usando *COXI*, que permita separar las morfoespecies empleadas en este estudio (Figura 3.7). En primera instancia se observaron dificultades en la amplificación de *COXI*, ya que solo se logró en 55% de las muestras., lo que va en contra de uno de los paradigmas fundamentales del *Barcode* que es la amplificación universal (Kress et al. 2007). Gilmore et al., (2009) y Santamaría et al. (2009), ya habían mencionado la presencia de intrones en el gen, lo que implica un problema en el diseño de primers y la amplificación. Sin embargo, el problema fundamental de *COXI* radica en el bajo polimorfismo de la secuencia (figura 3.2.C). Cho et al., (1998) ya se habían referido a la baja tasa mutacional de *Cox1* y otros genes mitocondriales, lo que va en contra el segundo postulado del DNA Barcode, la existencia de una tasa máxima de divergencia de la secuencia entre especies. A conclusiones semejantes llegó Galves (2009), evaluando este marcador en *Fusarium*, quien menciona que el gen *COXI* es altamente conservado en el género.

Los otros marcadores evaluados (*Alt a1*, *AOX* e *ITS*) tampoco presentaron el Barcode gap necesario para ser considerados marcadores taxonómicos tipo Barcode.

Para el gen *AOX* es necesario anotar que, ante la inexistencia de información suficiente de la secuencia para el género *Alternaria* en las bases de datos bioinformáticas, fue necesario el diseño de primers. A pesar de ello, con este marcador se obtuvo el mayor éxito en la amplificación, cerca del 54%. Además fue posible reconocer un gran número de sitios polimórficos que existen entre especies (Figura 3.2.B). A pesar de que las secuencias de este gen cumplen con los requisitos establecidos para considerarse como un buen Barcode, según Kress et al. (2007) el análisis de la variación infraespecífica *versus* la variación interespecífica (Figura 3.7), mostró que no existe el Barcode gap. Se observó que hay más polimorfismo de las secuencias dentro de las especies que entre ellas, es decir., que en lo que se refiere a este marcador las especies de *Alternaria* analizadas en el presente estudio, son indistinguibles. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Galves (2009) y Vera (2012) en *Fusarium*, y los análisis *in silico* realizados por Jiménez et al. (2007), en los cuales la divergencia entre las secuencias permite distinguir entre taxones. De cualquier manera sigue siendo inquietantes, que de los cuatro marcadores analizados, *AOX* presenta el menor porcentaje de identidad entre secuencias de diferentes especies (Figura 3.8.A), lo que ameritaría seguir analizando este gen. En conclusión, es posible que el fracaso de este gen como identificador *Barcode* en este estudio se deba a la colección de microorganismos analizados, la que incluye aislados pertenecientes a grupos taxonómicos que no pueden considerarse como especies diferentes.

La secuencia de *ITS* es considerada como el marcador tipo DNA Barcode más promisorio para hongos (Robert et al. 2011; Schoch et al. 2012). Sin embargo, es necesario resaltar que estos estudios se realizaron analizando la capacidad del marcador de separar entre taxones que correspondían a subdivisiones y no a nivel de especie como en el presente estudio. *ITS* presentó un valor similar de éxito en la amplificación que *AOX*, que es bajo, para las necesidades de un marcador tipo *Barcode*. De igual manera, a pesar de la presencia de diversos sitios polimórficos en la secuencia (Figura 3.2.D), y de usar una secuencia relativamente larga (cerca de 700 pb), debido al uso de los primers para las regiones *ITS4* e *ITS5*, no permitió encontrar suficiente variación interespecífica como para establecer la presencia de un Barcode gap. Schoch (2012), ya

había mencionado que con el marcador *ITS* podría esperarse éxito en la identificación en los principales grupos de macrohongos en Basidiomycota, pero un éxito inferior en los grupos microfungales económicamente importantes, concretamente en los Ascomycota filamentosos. La existencia de secuencias compartidas dentro de esta región ha sido reportada, especialmente en géneros de Pezizomicotina ricos en especies y con amplicones cortos, muchos de ellos de importancia económica, como *Cladosporium*, *Fusarium* y *Penicillium* (Schubert et al. 2008; O'Donnell y Cigelnik, 1997; Skouboe et al. 1999). Además es importante mencionar que se han reportado secuencias idénticas de *ITS* en especies de varios complejos de *Aspergillus* (Geiser et al. 2007). La falta de variación en las secuencias de *Alternaria*, sería una confirmación adicional a lo previamente reportado. También podría considerarse un posible error en la determinación de la variación intraespecífica, pues como lo expone O'Donnell y Cigelnik, (1997), existe una variación intragenómica, debida a la existencia de múltiples copias paralogas o no ortólogas dentro de cultivos axénicos, que podría llevar a una sobre estimación de la variabilidad intraespecífica.

La secuencia del alergeno mayor de *Alternaria* (*Alt a1*), a pesar de su utilidad en estudios filogenéticos a través de diferentes metodologías moleculares (Park et al. 2008; Pryor y Gilbertson, 2000; Hong et al. 2005; Pavón et al. 2010), demostró tener resultados más pobres como marcador tipo *Barcode* para *Alternaria*. Debido al hecho de tener el menor éxito en la amplificación, de apenas el 38%. Lawrence et al, (2013), ya habían encontrado dificultades para amplificar *Alt a1* en varias especies de *Alternaria* y en varios géneros asociados. A pesar de la existencia de polimorfismos dentro de las secuencias (Figura 3.2.A), la variación interespecífica, no fue suficiente para sustentar este gen como un marcador *Barcode* (Figura 3.7). Igualmente, este marcador presenta dificultades para agrupar las especies según a sus características morfológicas (Figura 3.3). Una posible explicación, es que tal como lo evidenció Santamaría et al, (2009), para varios genes codificantes de proteínas, es frecuente la presencia de intrones, lo que dificulta su uso como *DNA Barcode*. Los estudios de Hong et al. (2005) han revelado la presencia de un intrón en la posición 334 desde el codón de inicio en *A. brassicicola* y *A. alternata*. Anteriormente se había informado de la presencia de este intrón en otras especies (Breathnach et al. 1978).

Una alternativa para el análisis de estos resultados es la posibilidad de la ambigüedad de las morfoespecies de *Alternaria* de conidios pequeños sustentada en los análisis genéticos, lo que abriría las posibilidades de que marcadores como *AOX* puedan seguir siendo valiosos en la taxonomía de hongos, que para nuestro caso, el de *Alternaria*, implicaría la evaluación de aislados de este género, pertenecientes a grupos más distantes morfológicamente.

Para el caso de *Alternaria* no existen reportes sobre el análisis de *Barcode*. Sin embargo varios estudios de naturaleza filogenética han permitido resolver algunas inquietudes taxonómicas. La mayor parte de estos estudios han usado *ITS* como marcador. Sin embargo el uso de *Alt a1* también es frecuente (Pryor y Gilbertson, 2000; Pryor y Bigelow, 2003; Peever et al, 2004; Hong et al, 2005; Pavón et al, 2010). Existe la posibilidad de distinguir entre grupos de conidios grandes y pequeños empleando *ITS*, sin embargo la segregación de grupos dentro de cada uno de ellos, particularmente dentro del grupo de conidios pequeños ha resultado en fracaso (Kusaba y Tsuge, 1995; Pryor y Gilbertson, 2000; Chou y Wu, 2002; Pryor y Michailides, 2002; Kang et al.,

2002; Pryor y Bigelow, 2003; Hong et al., 2005). Los análisis filogenéticos permiten complementar los resultados obtenidos a partir de nuestros análisis de *Barcode*.

La mayor parte de los aislados obtenidos en este estudio, hacen parte de la sección de conidios pequeños, particularmente del grupo *alternata* (Tabla 3.1). Muchas de las especies de conidios pequeños que forman cadenas, han sido consideradas variantes patogénicas específicas de hospedador (Rotem, 1994). Para algunos autores, como Simmons (2007), se evidencian diferencias morfológicas, como para considerarlas especies, mientras que para otros, los integrantes de este grupo se encuentran dentro de límites muy difusos como para ser considerados verdaderas especies (Rotem, 1994; Andersen et al., 2001; Adrew et al, 2009).

En este estudio, no fue posible segregar entre especies pertenecientes al grupo *alternata*. En la filogenia obtenida con *AOX*, *COX1*, e *ITS* (Figuras 3.4, 3.5 y 3.6), es posible observar un gran clado, que integra especies similares a *Alternaria alternata*, todas ellas de conidios pequeños en cadenas, lo que las ubica dentro del grupo *alternata*. Estos resultados están en consonancia con lo reportado por Andrew et al, (2009), quienes evaluaron tres marcadores genéticos con el fin de establecer una filogenia dentro del grupo de conidios pequeños. Dicho estudio, estableció que solo a través de un marcador se pudo separar un clado bien soportado, *A. infectoria*, mientras que, al igual que los resultados que presentamos en el nuestro, los clados que se establecen no presentan asociaciones claras con la separación morfológica. En los diferentes clados establecidos dentro del grande, aparecen aislados de diferentes especies pobremente soportados, por ejemplo *A. alternata*.

Acuerdos estrictos entre la morfología y los linajes filogenéticos se observaron solo para el marcador *ITS* (Figura 3.6). Aunque el soporte de los clados es muy débil, es posible observar una agrupación que coincide con la identificación morfológica realizada previamente. Chou y Wu (2002), usando las secuencias de *ITS* (primers *ITS1* e *ITS2*) separaron sus aislados en tres clados bien soportados, uno de especies de *Alternaria* con pico filamentosos, el segundo con especies de *Alternaria* de conidios pequeños, y especies de *Ulocladium*, y el tercer grupo con géneros diferentes. de Hoog y Horré (2002) usando la variabilidad de la secuencia *ITS*, determinaron que era posible distinguir entre *A. alternata* y *A. infectoria* (las especies más importantes longicatenadas) por las diferencias en este dominio, sin embargo concluyeron que varias taxones como *A. tenuissima* no eran fácilmente distinguibles de *A. alternata* usando este método. Afirmaron además, que la carencia de melanización en aislados de *A. infectoria* conduce frecuentemente a identificaciones erróneas de dichos aislados.

En todas las filogenias los aislados clasificados morfológicamente como *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. brassicicola*, fueron genéticamente. Estos resultados contradicen lo expresado por Pryor y Gilbertson (2000), Pryor and Bigelow (2003), Hong et al. (2005), Andrew et al. (2009) y Lawrence et al. (2013), quienes sustentan cada uno de estos grupos como grupos monofiléticos bien diferenciados, e incluso expresan que *A. infectoria* se encuentra filogenéticamente más distante y está más cercano a géneros sexuales como *Macrospora* (anomorfo *Nimbya*) y *Allewia* (anomorfo *Embellisia*). Pero se reitera que todos estos estudios han sido incapaces de proveer un soporte fuerte para la monofilia de las especies asexuales de *Alternaria* o fuertes soportes para el orden de divergencia de los grupos de especies descritos.

Según Lawrence et al, (2013), los caracteres morfológicos conidiales son adecuados para la delimitación de muchas de las secciones de *Alternaria*, sin embargo se presenta una homoplasia morfológica sustancial. Secciones morfológicamente distantes, como *brassicicola* y *alternata*, y el grupo de especies *infectoria* han experimentado hipotéticamente evolución convergente por producir cadenas morfológicamente similares, cadenas de conidios pequeños, multicelulares, pigmentados conidios. Por ejemplo, la sección *alternata* y el grupo de especies *infectoria* producen cadenas de phaeodictioconidios que son virtualmente idénticas a pesar de que estos grupos son filogenéticamente divergentes (Lawrence et al 2013). Entonces, se propone que en nuestros resultados la inclusión de los aislados de *A. infectoria* y de todos los aislados de *A. brassicicola*, dentro del mismo clado de *alternata*, tiene que ver con limitaciones de la determinación taxonómica o variaciones de los caracteres morfológicos mencionados anteriormente, debidos a esta homoplasia.

Parece entonces, que el problema fundamental de la taxonomía de *Alternaria* tiene que ver con el agrupamiento de los aislados referidos como de conidios pequeños. Estos, de acuerdo con nuestros resultados tampoco se separan por diferencias genéticas. Pryor y Gilbertson (2000) no pudieron encontrar variabilidad entre especies de la secuencia *ITS* entre aislados de *A. alternata*, *A. dauci* y *A. radicina*. Kang et al. (2002), estudiaron la posibilidad de separar aislados de *Alternaria* de conidios pequeños que incluían *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. citri*, *A. arborescens* y *A. pellucida*, a través del marcador *ITS*, pero encontraron que solamente fue posible separar dos clados, uno que incluyó los aislados de *A. infectoria* y un gran clado en el que se agruparon el resto de aislados. De manera menos evidente, Kang et al. (2002), expresaron la formación de un grupo interno dentro del gran clado, formado por *A. tenuissima*. Otros marcadores usados para evaluar el grupo de conidios pequeños tampoco han sido exitosos, como la subunidad pequeña mitocondrial (mtLSU), betatubulina, actina, calmodulina, quitinsintasa, el factor de elongación alfa y el 1,3,8-trihidroxinaftaleno, evaluadas en el estudio de Peever et al. 2004.

Un asunto más que se debería analizar, es la aparición de aislados de géneros asociados a *Alternaria* dentro de las filogenias establecidas (Figuras 3.3, 3.4, 3.5, 3.6). La naturaleza de estas topologías tiene que ver con la similitud de las secuencias de cada uno de los cuatro marcadores analizados entre estos géneros (Figura 3.2). Desde hace tiempo se ha discutido la cercanía entre estos géneros. Pryor y Gilbertson (2000) estudiaron las relaciones filogenéticas entre *Alternaria* y géneros asociados, encontraron que las especies de *Alternaria* y *Ulocladium* se disponen juntas en un gran clado *Alternaria/Ulocladium*, por lo que, en su momento, sugirieron expandir la descripción morfológica de *Alternaria* para incluir *Ulocladium*. De la misma manera, Pryor y Bigelow (2003), describieron la cercanía de especies de *Ulocladium* con *Alternaria*. De los estudios más actuales se ha podido obtener información valiosa con relación a la cercanía de varios géneros. Por ejemplo, Lawrence et al. (2013) mencionan que el complejo *Alternaria*, comprometería varios géneros, como *Embellisia*, *Stemphylium*, *Ulocladium*, entre otros. De acuerdo con la más reciente revisión del género, *Alternaria* contiene 24 clados internos y seis linajes monofiléticos, Esto pone a los géneros *Allewia*, *Brachycladium*, *Chalastospora*, *Chmelia*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Lewia*, *Nimbya*, *Sinomyces*, *Teretispora*, *Ulocladium*, *Undifilum* y *Ybotromyces*, en sinonimia con *Alternaria* (Woudenberg et al. 2013). No es de extrañar que dentro de nuestras filogenias aparezcan varios de estos géneros supuestamente externos ocupando espacios conjuntos con aislados de *Alternaria*.

### 3.6. BIBLIOGRAFIA

- Adachi, Y., Watanabe, H., Tanabe, K., Doke, N., Nishimura, S., Tsuge, T. 1993. Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:3197-3205.
- Andersen, B., Thrane, U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 42:685-689.
- Andrew, M., Peever, T., Pryor, B. 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia* 101(1):95-109.
- Aradhya, M., Chan, H., Parfitt, D. 2001. Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternate*. *Mycological Research* 105:300-306.
- Breathnach, R., Benoist, C., O'hare, K., Gannon, F., Chambon, P. 1978. Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:4853-4857.
- Bilgrami, K., Ansari, A., Sinha, A., Shrivastava, A., Sinha, K. 1994. Mycotoxin production by some Indian *Alternaria* species. *Mycotoxin Research* 10(1):56-59.
- Bulajić, A., Dukić, N., Đekić, I., Krstić, B. 2007. Antigenic characteristics as taxonomic criterion of differentiation of *Alternaria* spp., pathogenic for carrot and parsley. *bornik Matice srpske za prirodne nauke* 113:143-154.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J., Gabaldón, T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 25(15):1972–1973
- Cho, Y., Qiu, Y., Kuhlman, P., Palmer, J. 1998. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14244–14249.
- Chen, J., Li, Q., Kong, L., Zheng, X., Yu, R. 2010. *COXI*-based DNA Barcoding in Tapetinae Species (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) along the coast of China. *Zoological Research* 31(4):345-352.
- Chou, W., Wu, W. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research* 106:164–169.
- Cooke, D., Forster, J., Jenkins, P., Jones, G., Lewis, D. 1998. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology* 132:197-209.

Dai, L., Zheng, X., Kong, L., Li, Q. 2012. DNA barcoding analysis of Coleoidea (Mollusca: Cephalopoda) from Chinese waters. *Molecular Ecology Resources* 12(3):437-47.

Damon, C. 2010. Performance of the COX1 gene as a marker for the study of metabolically active Pezizomycotina and Agaricomycetes fungal communities from the analysis of soil RNA. *FEMS Microbiology Ecology*. 74:693–705

de Hoog, G., Horré, R. 2002. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in routine laboratory. *Mycoses* 45:259–276.

Gálvez, E. 2009. *EVALUACIÓN DE LOS GENES Cox1 y AOX COMO POSIBLES MARCADORES TIPO “DNA BARCODE” PARA IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO FUSARIUM*. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá DC, Colombia.

Gilmore, S., Gräfenhan, T., Louis-Seize, G., Seifert, K. 2009. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1):90–98.

Geiser, D., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59:1–10.

Groves, J., Skolko, A. 1944. Notes on seed-borne fungi. II. *Alternaria*. *Canadian Journal of Research* 22(5):217-234.

Hajibabaei, M., Singer, G., Clare, E., Hebert, P. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* 5:24.

Hajibabaei, M., Janzen, D., Burns, J., Hallwachs, W., Hebert, P. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(4):968-971.

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

Hebert P., Stoeckle M., Zemplak T., Francis C. (2004a). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. 2(10):E312

Hebert P., Penton E., Burns J., Janzen D., Hallwachs W. (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 101:14812–14817.

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., deWaard, J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:313–321.

Hong, S., Cramer, R., Lawrence, C., Pryor, B. 2005. *Alt a1* allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology* 42:119-129.

Jiménez, P., Franco-Lara, L., Restrepo, S. 2007. Proyecto código de barras en Colombia: una posible estrategia para la identificación de hongos fitopatógenos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas Universidad Militar Nueva Granada* 3:25-39.

Johnson, L., Johnson, R., Akamatsu, H., Salamiah, A., Otani, H., Kohmoto, K., Kodama, M. 2001. Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from *Alternaria alternata* Apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Current Genetics* 40:65-72.

Juszczuk, I., Rychter, A. 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica* 50:1257-1271.

Kang, J., Crous, P., Mchau, G., Serdani, M., Song, S. 2002. Phylogenetic analysis of *Alternaria spp.* associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research* 106:1151–1162.

Katoh, S. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780

Kress, W., Erickson, D. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnHpsbA* Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508.

Kusaba, M., Tsuge, T. 1994. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce hosts-specific toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3055-3062.

Lantigua, P., Martinez, C., Pons-Kühnemann, J., Pérez, M. 2008. Grupos intraespecíficos de *Alternaria solani* de tomate y papa. *Fitopatología Venezolana* 21:44-50

Lawrence, D., Gannibal, P., Peever, T., Pryor, B. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105(3):530-46.

Masunaka, A., Otani, K., Peever, T., Timmer, L., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H., AkimITSu, K. 2005. An isolate of *Alternaria alternate* that is pathogen to both tangerine and rough lemon and produces two host selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology* 95:241-247.

Misaghi, I., Grogan, R., Duniway, J., Kimble, K. 1978. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternate*. *Phytopathology* 68:29-34.

Nishimura, S. 1980. Host-specific toxins from *Alternaria alternate*: problem and prospects. *Proceedings of the Japan Academy. Series B* 56:362-366.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA *ITS2* types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:103–116.

Otani, H., Kohmoto, K. 1992. Host-Specific Toxins of *Alternaria* Species. In: Topics in Secondary Metabolism., 3, *Alternaria - Biology, Plant Diseases and Metabolites* (J. Chelkowski, A. Visconti, Eds.), ELSEIVIER, Amsterdam - London - New York - Tokyo, 123-156.

Park, M., Romanoski, C., Pryor, B. 2008. A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae*. *Mycologia* 100:511-527.

Pavón, M., García, T., Martín R. 2010. PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control* 21.

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

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253-1256.

Pryor, B., Michailides, T. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406–16.

Pryor, B., Gilbertson, L. 2002. Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultea* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. *Mycologia* 94(1):49-61.

Pryor, B., Gilbertson, R. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear *ITS* and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104: 1312–1321.

Pryor, B., Bigelow, D. 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium*, and *Stemphylium*. *Mycologia* 95: 1139–1152.

Robba, L., Russell, S., Barker, G., Brodie, J. 2006. Assessing the use of the Mitochondrial *Cox1* marker for use in DNA Barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93(8): 1101–1108.

Robert, V., Szöke, S., Eberhardt, U., Cardinali, G., Meyer, W., Seifert, K., Lévesque, A., Lewis, C. 2011. The quest for a general a reliable fungal DNA Barcode. *The Open Applied Informatics Journal*. 5 (Suppl 1-M6):45-61.

Roberts, R., Reymond, S., Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104:151-160.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., Huelsenbeck, J. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3): 539–542.

Rose, T., Henikoff, J., Henikoff, S. 2003. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3763-3766.

Rotem, J. 1994. *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. St Paul, MN, USA: APS press.

Santamaria, M., Vicario, S., Pappadà, G., Scioscia, C., Scazzocchio, C., Saccone, C. 2009. Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria. *BMC Bioinformatics* 10(Suppl 6):S15.

Saunders, G. 2005 Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360:1879–1888.

Scheffeer, R. 1992. Ecological and evolutionary roles of toxins from *Alternaria* species. En: Chelkowski J, Visconti A, eds. *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites*. New York: Elsevier Science Publishers. p 101-122

Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Chen, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16):6241-6246.

Seifert, K., Samson, R., Dewaard, J., Houbraken, J., Lavesque, C., Moncalvo, J., Louis-Seize, G., Hebert, P. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:3901-3906

Schubert, K. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* 58:105–156

Sharma, T., Tewari, J. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenetic to crucifers. *Mycological Research* 102(7):807-814.

Simmons, E. 1992 *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites* (Chelkowski, J. and Visconti, A., eds), pp. 1–35. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Simmons, E. 2007. *Alternaria*. An Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

Skouboe, P. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the *ITS* region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research* 103:873–881.

Smith, M., Fisher, B., Hebert, P. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1462:1825-34.

Sun, Zhang. 2008. Morphological and molecular characterization of *Alternaria* isolates on fruITS of *Pyrus bretschneideri* Rehd. “Ya Li”. *Mycosystema*. 27(1):105-117.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msr121. First published online: May 4, 2011

Vera, S. 2012. EVALUACIÓN DE MARCADORES TIPO “BARCODE” COMO ESTRATEGIA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *FUSARIUM*. Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biología Aplicada. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá DC, Colombia.

Ward, R., Holmes, B. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (COX1) in fishes. *Molecular Ecology Notes* 7:899–907.

Weir, T., Huff, D., Christ, B., Romaine, C. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* 90:813-821

White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

Woudenberg, J., Groenewald, J., Binder, M., Crous, P. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75:171-212

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I, Rozen S, Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.

#### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

i) Ninguno de los marcadores evaluados en este estudio, *Alt a1*, *AOX*, *COX1* e *ITS*, presenta características de Barcode para el género *Alternaria*, debido a la cercanía filogenética de los aislados analizados en este estudio, a la dificultad en la amplificación y a la falta de secuencias externas de grupos de grupos alejados.

ii) La región *ITS* se presenta como un marcador molecular de interés en la taxonomía del género *Alternaria*, pues a través de él se pudo obtener un ordenamiento acorde con los criterios morfológicos, particularmente dentro del grupo de conidios pequeños, el cual reviste la mayor dificultad. Por lo que se sugiere continuar analizando la utilidad de *ITS* como marcador taxonómico de la sección de conidios pequeños de *Alternaria*.

iii) El gen *AOX*, sigue siendo promisorio como marcador taxonómico, pero debería probarse en primera instancia con aislados que hagan parte de grupos distantes dentro del género, evitando el uso de grupos como *alternata*, en el que no existe claridad sobre la prevalencia de las morfoespecies designadas hasta el momento. De igual manera debería evaluarse sobre los taxones establecidos después de la redefinición del género realizada por Woudenberg et al. (2013).

iv) Fue posible una segregación de los aislados en morfoespecies, a partir de características difusas de sus conidios y de su patrón de esporulación. Sin embargo el sustento genético, referido a la variación de secuencias, por lo menos para los marcadores analizados, es insuficiente para designar a los aislados pertenecientes a la sección *alternata*, como especies.

v) La polifilia de algunos grupos de *Alternaria* se debe a la inclusión dentro de la sección *alternata* de clados no cercanos filogenéticamente de *infectoria* y *brassicicola*, como resultado de la delimitación morfológica basada en caracteres homoplásicos de los conidios. Debe tenerse especial cuidado cuando se incluyan taxones dentro de grupos previamente descritos, basados en caracteres morfológicos potencialmente homoplásicos en la ausencia de datos moleculares.

vi) La sistemática de *Alternaria*, así como la de géneros cercanamente relacionados, como *Ulocladium*, *Embellisia*, *Stemphylium*, entre otros, está llena de errores taxonómicos debidos al uso de caracteres morfológicos variables. Muchos de los taxones ubicados por la similitud morfológica podrían estar lejos filogenéticamente, lo que demuestra que algunos caracteres morfológicos de *Alternaria* y géneros relacionados pueden ser engañosos y no son filogenéticamente informativos.

vii) Este estudio revela la existencia de clados de especies de *Alternaria* que no siempre están correlacionados con las agrupaciones morfológicas, por lo que se hace necesario una revisión taxonómica del género particularmente dentro de la sección *alternata*, que permita descartar la polifilia que se presenta dentro de él y que permita fusionar especies que no posean el suficiente sustento filogenético como para seguir siendo consideradas como tales.

viii) El uso de filogenias a través genes simples frecuentemente conduce a árboles pobremente soportados debido al limitado número de sitios informativos y al ruido estocástico que lleva a hipótesis filogenéticas inadecuadas. Por lo que más allá de estudiar marcadores alternativos, es

necesario establecer filogenias en las que se condese la información de los ya existentes.

## ANEXO 1. Protocolo de extracción de ADN de hongos endófitos

1. Colectar el micelio crecido en 40ml de caldo Sabouraud por filtración al vacío usando filtros Whatman N°1.
2. Pasar el filtrado a frascos de liofilización y congelar inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  (mínimo por 30 minutos).
3. Llevar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
4. Liofilizar hasta tener el micelio completamente seco (12 a 24 horas).
5. Macerar en seco el liofilizado hasta convertirlo en polvo muy fino.
6. Tomar 100mg del polvo y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo.
7. Adicionar 1000 $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (2% CTAB, 3% SDS, 250 mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH 8.5 y 25mM EDTA) precalentado a  $65^{\circ}\text{C}$ .
8. Homogenizar con vortex.
9. Añadir 40 $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol por cada 500 $\mu\text{L}$  de buffer de lisis.
10. Homogenizar con vortex.
11. Incubar las muestras a  $65^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Homogenizar, por inversión suave, cada 10min los tubos.
12. Repartir 500 $\mu\text{L}$  del lisado en tubos eppendorf (aquí se dobla la cantidad de tubos).
13. Adicionar un volumen igual (500 $\mu\text{L}$ ) de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1). Invertir y destapar para permitir salida de gases.
14. Centrifugar a 16,000 x g por 5min a temperatura ambiente.
15. Recuperar el sobrenadante (75% del total) de cada uno de los dos tubos eppendorf y pasarlos a un solo tubo nuevo (aquí se vuelve a tener un solo tubo por cepa).
16. Adicionar un volumen igual de cloroformo:isoamil (24:1).
17. Centrifugar a 16,000 x g por 5min a temperatura ambiente.
18. Recuperar el sobrenadante (75% del total) en un tubo eppendorf nuevo.
19. Adicionar un volumen igual de isopropanol frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Mezclar suave por inversión y ver aparición de mota blanca.

- Si aparece, sacar la mota a un tubo eppendorf nuevo con 200µL de etanol al 70% frío para lavar el ADN.
- Centrifugar 5min a 13000rpm, descartar alcohol y dejar secar el pellet.
- Resuspender como sigue en el punto 24 de este protocolo.

20. Dejar precipitando a -20°C toda la noche.

21. Centrifugar a 16,000 x g por 10min.

22. Descartar el sobrenadante y observar pellet blanco.

23. Lavar el pellet con 200 µL de etanol al 70%, descartar el alcohol y dejar secar el alcohol remanente.

24. Resuspender el pellet seco en 50µL de buffer TE 1X (Tris-HCl 0.1mM y EDTA 10mM) precalentado a 37°C. Si el pellet no resuspende, dejar a 37°C por 1 hora.

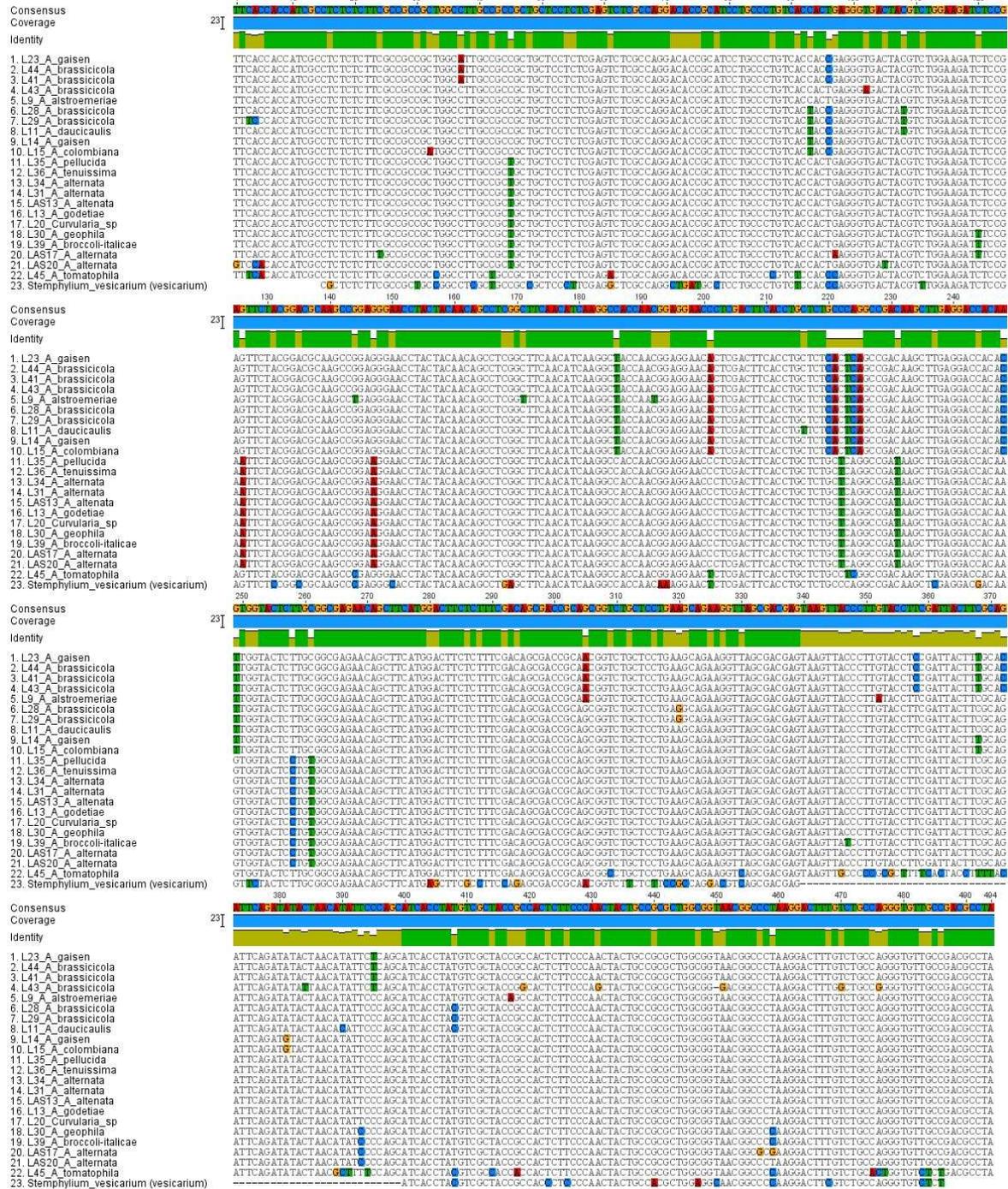
25. Almacenar a -20°C.

ANEXO 2. Éxito en la amplificación de los 4 marcadores analizados. El color amarillo corresponde a aislados que no pudieron ser amplificadas con ninguno de los cuatro locus, el color azul para las que pudieron ser amplificadas con todos ellos. El color gris corresponde a los aislados usadas como referencia.

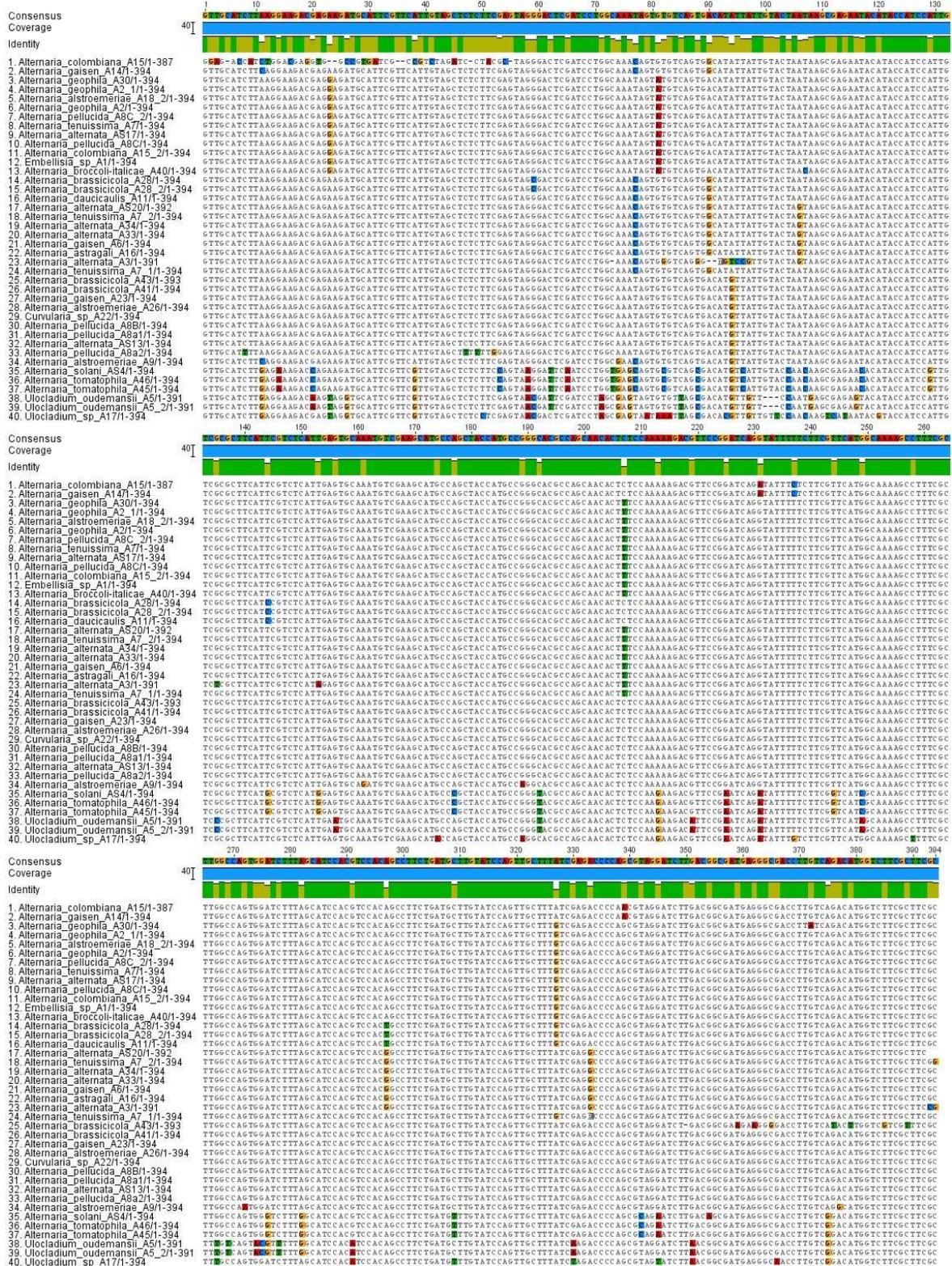
Aislado	Locus			
	<i>AltaI</i>	<i>AOX</i>	<i>COI</i>	<i>ITS</i>
1		X	X	
2		X	X	
5		X	X	
6		X		
7		X	X	
9	X	X		
10				
11	X	X	X	X
12			X	X
13	X		X	
14	X	X		X
15	X	X	X	X
16		X	X	X
17		X	X	
18		X	X	
19			X	X
20	X		X	X
21			X	

22		X		X
23	X	X	X	X
24				
25				
26		X	X	
27				
28	X	X	X	X
29	X			X
30	X	X	X	X
31	X		X	X
32				
33		X	X	X
34	X	X		X
35	X			X
36	X			X
37				X
38			X	X
39	X			X
40		X	X	X
41	X	X	X	X
42				X
43	X	X		
44	X			
45		X		X
46		X		
47	X			
48				
8a		X		
8b		X		
8c		X	X	
8d			X	
8e				
8f				
8g			X	
AS4		X		
AS13	X	X		X
AS15				X
AS17	X	X		X
AS20	X	X		X
AS25				X
Muestras amplificadas	22	31	26	29
% ampliación	37,93	53,45	44,83	50
Muestras no amplificadas	36	27	32	29

### ANEXO 3. Alineamiento de las secuencias obtenidas con *Alt a1*

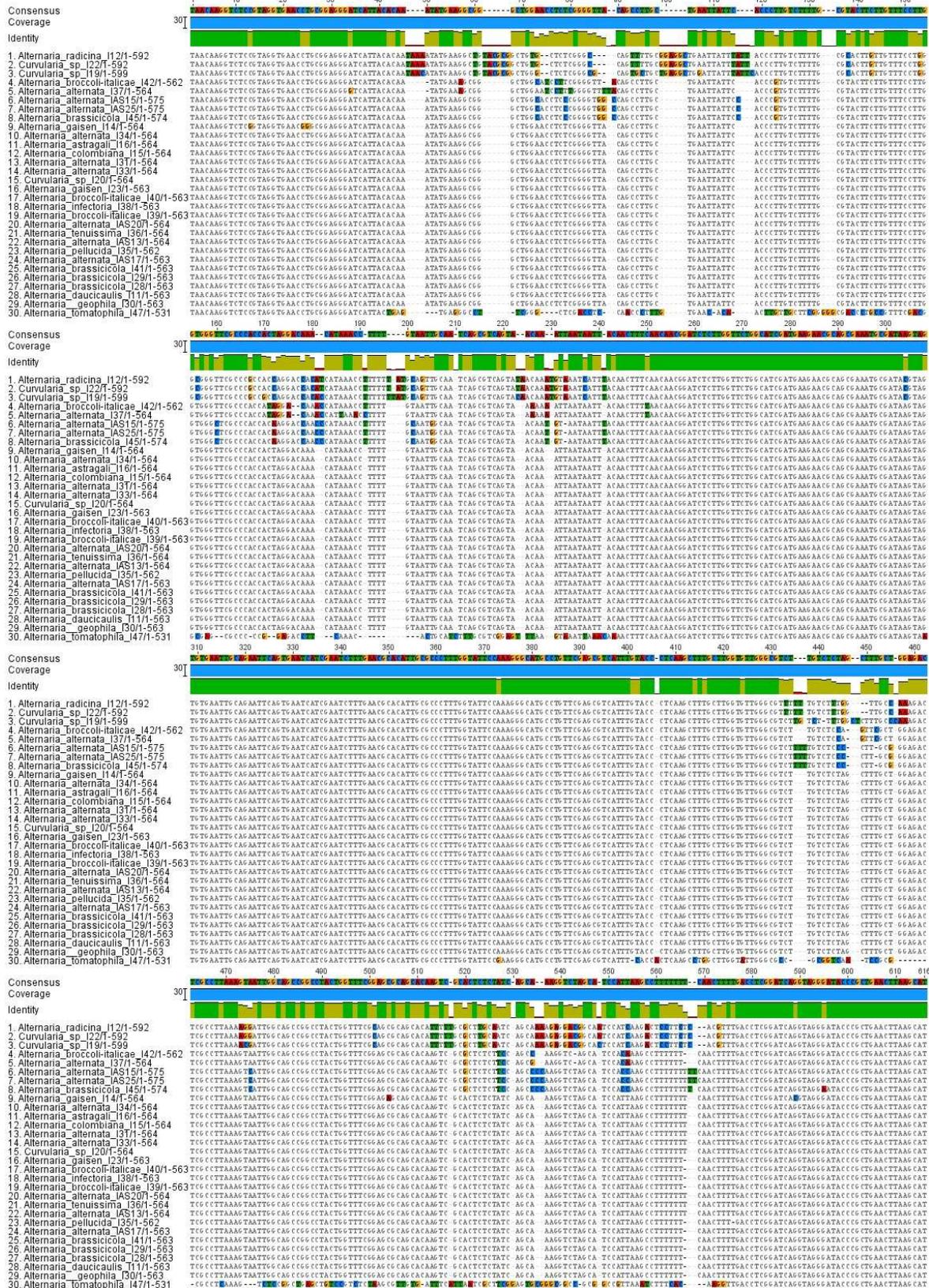


# ANEXO 4. Alineamiento de las secuencias obtenidas con AOX

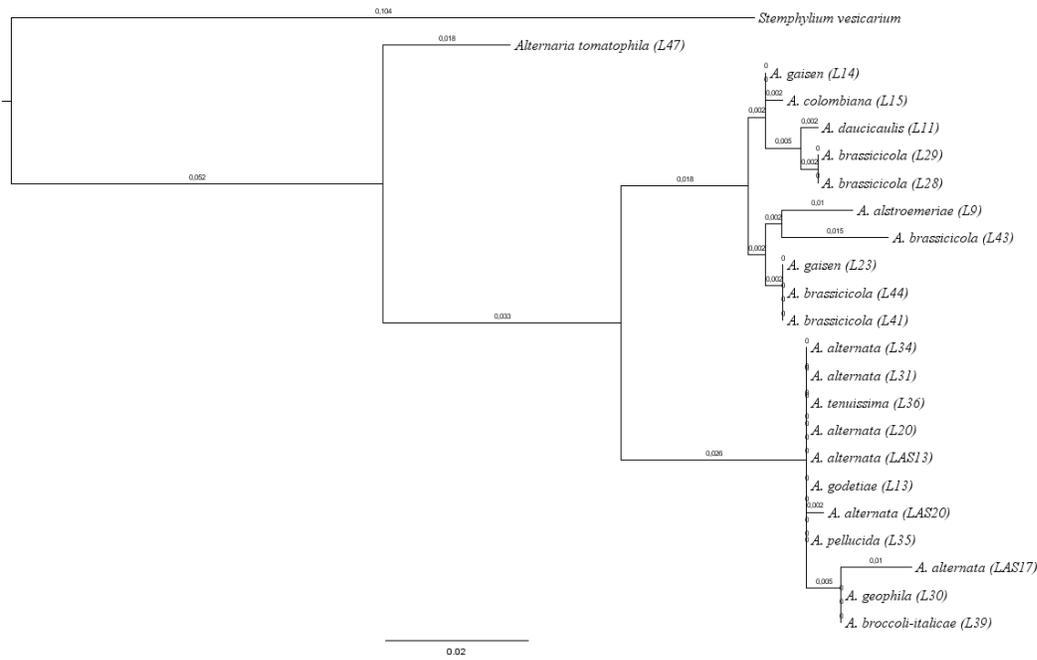




# ANEXO 6. Alineamiento de las secuencias obtenidas con *ITS*



ANEXO 7. Árbol de las secuencias del gen *Alt a1* usando el método de *máxima verosimilitud*.



ANEXO 8. Árbol de las secuencias del gen *AOX* usando el método de *máxima verosimilitud*.

