

**INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN:
MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y GENÉTICA DE
ALTERNARIA SPP. EN CULTIVOS DE CEBOLLA
DEL SUR DE PUERTO RICO**

Por

Jessie Fernández García

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos
para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2005

Aprobado por:

Sharon Cantrell, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Irma Cabrera, M.S.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Lydia I. Rivera-Vargas, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Myrna Alameda, M.S.
Representante de Estudios graduados

Fecha

Miguel Muñoz, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Incidence and characterization of *Alternaria* spp. associated with foliar lesions at different stages of the onion cycle were determined. The study was carried out at commercial and experimental fields in the southern area of Puerto Rico. *Alternaria* spp. incidence increased in sixty-day-old onion plants of cultivars 'Mercedes' and 'Excalibur'. Sixty two percent of selected *Alternaria* isolates were placed within a "semi-arborescent" group, not described taxonomically. Other isolates were identified as: *Alternaria alli*, *A. destruens*, *A. palandui*, *A. tenuissima* and *Pleospora eturmiuna*. Pathogenicity tests conducted *in vitro* and in the field revealed that *A. alli*, *A. tenuissima*, *Alternaria* sp. "semi-arborescent" and *Pleospora eturmiuna* were pathogenic to onions, been *A. alli* the most virulent. Molecular characterization of *Alternaria* isolates was determined using RAPD-PCR, ITS1-5.8S-ITS2 region of the ribosomal DNA, and sequences analysis of region ITS1-ITS4 of rDNA.

RESUMEN

Se determinó la incidencia y caracterización de *Alternaria* spp. asociadas con lesiones foliares en diferentes etapas del ciclo de vida de la cebolla. El estudio se realizó en predios comerciales y experimentales en el área sur de Puerto Rico. La incidencia de *Alternaria* spp. aumentó en plantas de cebollas de sesenta días de edad de los cultivares 'Mercedes' y 'Excalibur'. El sesenta y dos por ciento de los aislados de *Alternaria* seleccionados fueron colocados dentro de un grupo "semi-arborescentes", no descrito taxonómicamente. Otros aislados fueron identificados como: *Alternaria alli*, *A. palandui*, *A. tenuissima*, *A. destruens* y *Pleospora eturmiuna*. Las pruebas de patogenicidad en *in-vitro* y en campo revelaron que *Alternaria alli*, *A. tenuissima*, *Alternaria* sp. "semi-arborescentes" y *P. eturmiuna* fueron patogénicas a la cebolla siendo *A. alli* la más virulenta. La caracterización molecular de los aislados de *Alternaria* fue determinada utilizando RAPD-PCR, la región de ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal y el análisis de las secuencias de la región de ITS1-ITS4 del rADN.

Con mucho amor para dos seres únicos y excepcionales en mi vida: mi hijo Nahir Shaman y mi esposo Rolando Alexis

AGRADECIMIENTOS

“Gracias Madre Tierra por llenarme de todas tus energías positivas permitiéndome estudiarte, contemplarte y serte útil al cuidarte. Gracias por bendecirme con tus rayos de luz alegrando mi corazón y fortaleciendo mi mente en el silencio de tus días y tus noches”.

Quiero agradecer al Proyecto T-STAR-97 del Departamento de Agricultura federal (USDA) que financió este trabajo de investigación. Deseo agradecer a mi consejera Lydia I. Rivera-Vargas por aceptarme como su estudiante graduada, por orientarme y aconsejarme en todo momento y brindarme su confianza, ayuda y amistad en los momentos más difíciles. Muchas gracias a los miembros de mi comité: Irma Cabrera por brindarme incondicionalmente las facilidades de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz (EEA) y por su gran apoyo y asesoría en el trabajo de campo y la Dra. Sharon Cantrell por facilitarme el uso de su laboratorio de Celular y Molecular de la Universidad del Turabo. También quiero agradecer al Dr. Emory G. Simmons por su colaboración y gran labor en la identificación de los aislados de *Alternaria*.

Deseo asimismo expresar mi gratitud a los Agrónomos Orlando Escalera y Marcos Morales por gentilmente proporcionarme el uso de sus fincas de cebollas para realizar el trabajo de campo. También quiero agradecer al Agrónomo Alberto Vélez y a los empleados de campo que ayudaron a establecer las siembras en la EEA-JD. No tengo palabras para dar las gracias a mis grandes amigos y compañeros de laboratorio: Juan Calle, Merari Feliciano e Ismael Badillo, que estuvieron en todo el trayecto de esta investigación ofreciendo su ayuda incondicional, mucha motivación y alegría. También quiero agradecer a otras personas que de cierto modo colaboraron en esta investigación: Yadzaida García y Lesly Colón por su gran ayuda en el laboratorio y a Jose R. Pérez por la secuenciación de algunos de los aislados de *Alternaria*. Gracias a los técnicos de laboratorio: Victor González y Luis Collazo y a las secretarias del Departamento Protección de Cultivos: Jeannette Morales y María Pagán.

Un agradecimiento especial a mi familia por todo su apoyo y motivación durante este tiempo.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	ii
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xvi
LISTA DE APÉNDICES	xviii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	
Cebolla, <i>Allium cepa</i> L.....	5
Enfermedades causadas por hongos.....	6
Género <i>Alternaria</i>	8
<i>Alternaria</i> en cultivos de cebolla.....	11
Características morfológicas.....	13
Identificación molecular.....	14
ADN ribosomal.....	16
RAPD-PCR.....	18
Aspectos y modelos evolutivos.....	20
Árboles filogenéticos.....	23
MATERIALES y MÉTODOS	
Determinación de la incidencia de <i>Alternaria</i>	26
Predios comerciales.....	27

Predios experimentales.....	32
Análisis estadístico.....	34
Aislación e identificación.....	34
Cultivos monospóricos.....	36
Pruebas de patogenicidad.....	37
Preparación del inóculo.....	37
Prueba en el campo.....	38
Pruebas en el laboratorio <i>in-vitro</i>	39
Extracción de ADN.....	42
Análisis de ADN ribosomal.....	42
RAPD-PCR.....	43
Análisis de las secuencias de ADN.....	44

RESULTADOS

Determinación de la incidencia de <i>Alternaria</i>	49
Predios comerciales.....	49
Predios experimentales.....	54
Descripción de las lesiones foliares	59
Aislación e identificación.....	63
Identificación morfológica.....	69
Grupo de <i>Alternaria palandui</i>	71
Grupo de <i>Alternaria destruens</i>	74
Grupo de <i>Alternaria tenuissima</i>	77

Grupo de <i>Alternaria tenuissima</i> Alt6 y Alt7..	80
Grupo de <i>Alternaria</i> sp. "semi-arborescentes"	84
Grupo de <i>Alternaria alli</i>	88
Grupo de <i>Alternaria arborescens</i>	91
Grupo de <i>Pleospora eturmiuna</i>	93
Pruebas de patogenicidad.....	97
Identificación molecular.....	107
Análisis filogenético.....	111
DISCUSIÓN	120
CONCLUSIÓN	132
LITERATURA CITADA	136
APÉNDICE A	143
APÉNDICE B	146
APÉNDICE C	149
APÉNDICE D	152
APÉNDICE E	156

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Páginas
Figura 1.	Localización de los iniciadores ITS1 al ITS5 en el ADN ribosomal.	18
Figura 2.	Modelo de Jukes Cantor de un parámetro de sustitución de nucleótidos.	22
Figura 3.	Modelo de Kimura parámetro dos de sustitución de nucleótidos.	23
Figura 4.	Localización de los municipios de Santa Isabel y Juana Díaz, productores de cebolla. (Mapa creado en el laboratorio PaSCoR de la Universidad de PR, Recinto de Mayagüez (UPRM) por Roy Ruíz Vélez utilizando el programador ArcMap, versión 9).	26
Figura 5.	Localización de la Finca Destino en el Barrio Jauca en el municipio de Santa Isabel. Foto aérea de la NOAA (1999) y carreteras de la Junta de Planificación. (Mapa creado por Roy Ruiz Vélez en el laboratorio PaSCoR, UPRM).	28
Figura 6.	Localización de los diferentes predios ubicados en la Finca Destino, Santa Isabel. Los predios A, C y D tienen aproximadamente de 7.3 acres y el B de 9.2 acres.	29
Figura 7.	Cortes del tejido de las hojas de cebolla realizados al azar para cada muestra.	31
Figura 8.	Estación Experimental Agrícola en el municipio de Juana Díaz, Puerto Rico. Imagen de Satélite ICONOS 2002 y carreteras por la junta de planificación. (Mapa creado por Roy Ruiz, del laboratorio PaSCoR, UPRM).	33
Figura 9.	Pruebas de patogenicidad <i>in-vitro</i> con diferentes cultivares de cebolla.	41
Figura 10.	Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en cultivos de cebolla de predios comerciales entre los 4-116 DDS.	51

Figura 11.	Cambios en la humedad relativa y temperatura promedio durante el desarrollo del cultivo de cebolla de fincas comerciales en el área sur de la isla entre los 4-116 DDS.	53
Figura 12.	Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en los cultivos de cebollas de predios experimentales entre los 4-87 DDS.	56
Figura 13.	Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en predios experimentales de cebolla de bajo tratamiento sin fungicida (control) entre los 4-87 DDS.	58
Figura 14.	Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de <i>Alternaria</i> spp. en predios experimentales de cebolla de bajo tratamiento con fungicida (iprodione) entre los 4-87 DDS.	58
Figura 15.	Lesiones comunes en los cultivos de cebollas en predios comerciales de la zona sur de PR. Lesión de color púrpura y marrón (A,B); <i>Alternaria</i> sp. creciendo en daño causado por minador y herbicidas (C,D); doblez de la hoja causado por <i>Alternaria</i> en la planta de cebolla (E,F).	60
Figura 16.	Lesiones típicas de <i>Alternaria</i> en predios experimentales. Lesiones rojizas y púrpuras (A,B); lesión marrón (C); lesión parecida a la causada por <i>Stemphylium</i> sp. (D); <i>Alternaria</i> en daño causado por el minador (E).	62
Figura 17.	Grupo de especies de <i>Alternaria palandui</i> : Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.	71
Figura 18.	Conidios de <i>A. palandui</i> (Nomarski, 600X, 400X).	72
Figura 19.	Grupo de especies de <i>A. palandui</i> . Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA	73

de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50µm

- Figura 20.** Grupo de especies de *Alternaria destruens*: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA. 74
- Figura 21.** Cadenas de conidios del grupo de especies de *A. destruens* (Nomarski, 400X). 75
- Figura 22.** Grupo de especies de *A. destruens*. Conidios (A), conidióforos (B) y conidióforos secundarios (C) observados a los 5 a 7 días de crecimiento. Barra= 50µm 76
- Figura 23.** Grupo de especies de *Alternaria tenuissima*: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA. 77
- Figura 24** Conidios del grupo de especies de *A. tenuissima* (Nomarski, 400X). 78
- Figura 25.** Grupo de especies de *A. tenuissima*. Conidios (A) y conidióforos (B) observados a los 5 a 7 días de crecimiento. Barra= 50µm 79
- Figura 26.** Grupo de especies de *Alternaria tenuissima* Alt6 y Alt7: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA. 81
- Figura 27.** Conidos multicelulares de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7 (Nomarski, 1000X). 82
- Figura 28.** Grupo de especies de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50µm 83
- Figura 29.** Grupo de especies de *Alternaria* sp.: Caracterización del aislado en diferentes 85

medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.

- Figura 30.** Conidios multicelulares de *Alternaria* sp. grupo no descrito (Nomarski, 400X). 86
- Figura 31.** Grupo de especies de *Alternaria* sp. no descrito taxonómicamente. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50µm 87
- Figura 32.** Grupo de especies de *Alternaria alli*: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA. 89
- Figura 33.** Conidio del grupo de especies de *A. alli* (400X). 90
- Figura 34.** Grupo de especies de *A. alli*. Pigmentación amarillo a anaranjado en medio de cultivo (PDA). 90
- Figura 35.** Conidios y conidióforos de *Alternaria arborescens* (Nomarski, 400X). 91
- Figura 36.** *A. arborescens* EGS39-128. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50µm 92
- Figura 37.** Aislado de *Pleospora eturmiuna*. Ascocarpos desarrollándose en medio de PCA. 94
- Figura 38.** Ascocarpo de *P. eturmiuna* (A) (Nomarski, 100X), conglomerados de ascas bitunicadas fuera del ascocarpo (B) (Nomarski, 200X), ascoporas multicelulares pigmentadas (C) (Nomarski, 1000X) y conidios y conidióforos de *Stemphylium eturmiunum* (D) (Nomarski 600X). 95
- Figura 39.** Estado sexual (A): *P. eturmiuna*. Ascas bitunicadas con 8 ascoporas multicelulares. Estado asexual (B): *S. eturmiunum* conidios 96

multiseptados. Barra= 50 μ m (Barra vertical para ascas y horizontal para conidios).

- Figura 40.** Lesiones foliares en plantas de cebolla producidas por el aislado Alt34 y Alt35 en pruebas de patogenicidad en campo. (1) con insición, (2) sin insición. 101
- Figura 41.** Lesiones del grupo de especies de *Alternaria alli* de pruebas de campo. Las lesiones se van extendiendo hasta que causa muerte del ápice de la hoja *tip blight*. 102
- Figura 42.** Lesiones producidas por Alt34 en las pruebas *in-vitro* (A). Reaislado de Alt34 de las lesiones cumpliendo con los postulados de Koch (B). (1) con insición, (2) sin insición. 103
- Figura 43.** Lesiones causadas por el grupo de *Stemphylium eturmiunum* en hojas de cebolla. (1) con insición, (2) sin insición. 104
- Figura 44.** Corte transversal de la lesión causada por Riv-St1 en hojas de cebolla (A) (Nomarski, 200X), estructuras microscópicas (conidióforo y conidios) de tejido vegetal infestado (B) (400X) con iniciadores ITS1/ITS2 del ADN. 104
- Figura 45.** Lesiones causadas por los aislados Alt6 (A,B) y Alt7 (C,D) que se encuentran bajo el grupo de las especies de *Alternaria tenuissima*. (1) con insición, (2) sin insición. 106
- Figura 46.** Lesiones causadas por el aislado Alt27 que es el grupo de las *Alternaria* sp. "semi-arborescentes". (1) con insición, (2) sin insición. 106
- Figura 47.** Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los iniciadores ITS1/ITS4 del rADN de diferentes especies de *Alternaria*. 107
- Figura 48.** Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los iniciadores ITS1/ITS2 del rADN de diferentes especies de *Alternaria*. 108

- Figura 49.** Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los iniciadores ITS3/ITS4 del rADN de diferentes especies de *Alternaria*. 109
- Figura 50.** Gel de electroforesis de RAPD-PCR de diferentes aislados de *Alternaria* utilizando el iniciador OPA 13. 110
- Figura 51.** Árbol filogenético generado por el método *neighbor-joining* de secuencias de la región ITS del rADN seleccionadas de diferentes *Alternaria* y hongos relacionados. Se utilizó la distancia Kimura parámetro dos con *bootstraps* de 1000 repeticiones. 114
- Figura 52.** Árbol filogenético generado por el método *neighbor-joining* de secuencias de la región ITS del rADN seleccionadas de diferentes *Stemphylium* y hongos relacionados. Se utilizó la distancia Kimura parámetro dos con *bootstraps* de 500 repeticiones. Riv-St1: *Pleospora eturmiuna*. 119

LISTA DE TABLAS

Tablas		Páginas
Tabla 1.	Diferentes secuencias de <i>Alternaria</i> , <i>Embellisima</i> y <i>Ulocladium</i> utilizadas en la creación de los árboles filogenéticos y su número de acceso del GeneBank.	47
Tabla 2.	Diferentes secuencias de <i>Stemphylium</i> y <i>Pleospora</i> utilizadas en la creación de los árboles filogenéticos y su número de acceso del GeneBank.	47
Tabla 3.	Aislados de <i>Alternaria</i> de cebolla que fueron utilizadas para el análisis filogenético con otras especies de <i>Alternaria</i> del GeneBank.	48
Tabla 4.	Porcentaje de incidencia de <i>Alternaria</i> durante las diferentes etapas del ciclo de vida de la cebolla en los predios comerciales en la Finca Destino, Santa Isabel.	50
Tabla 5.	Temperatura (°C), humedad relativa y precipitación durante los diferentes muestreos en predios comerciales.	52
Tabla 6.	Porcentaje de incidencia de <i>Alternaria</i> durante las diferentes etapas del ciclo vida de cebolla en predios experimentales en la Finca Destino, Santa Isabel.	55
Tabla 7.	Porcentaje en la incidencia de <i>Alternaria</i> en predios experimentales de cebolla de los cvs. 'Mercedes' y 'Excalibur' bajo tratamientos con o sin fungicidas (iprodione).	57
Tabla 8.	Aislados tipo de <i>Alternaria</i> obtenidos de cultivos de cebolla de los cultivares 'Mercedes' y 'Excalibur'.	64

Tabla 9.	Características morfológicas de diferentes grupos de especies de <i>Alternaria</i> aisladas de lesiones foliares en plantas de cebolla.	67
Tabla 10.	Clave dicótoma utilizada para clasificar diferentes grupos de especies de <i>Alternaria</i> aisladas del follaje de cebolla. Está basada en el crecimiento de los aislados en medios de cultivos y a sus características morfológicas	68
Tabla 11.	Caracterización morfológica del color y crecimiento micelial de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> utilizando diferentes medios de cultivos.	70
Tabla 12.	Aislados de <i>Alternaria</i> spp. y <i>Stemphylium</i> sp. que produjeron lesiones foliares en la cebolla en las pruebas de patogenicidad en campo.	99
Tabla 13.	Aislados de <i>Alternaria</i> spp. y <i>Stemphylium</i> sp. que produjeron lesiones foliares en la cebolla en las pruebas de patogenicidad <i>in-vitro</i> .	100
Tabla 14.	Aislados tipo de <i>Alternaria</i> de Emory G. Simmons utilizados para comparar los aislados encontrados en este estudio asociados al follaje de cebolla.	112
Tabla 15.	Identificación molecular de diferentes aislados de <i>Alternaria</i> y <i>Pleospora</i> utilizando la secuenciación de la región de la ITS del rADN y el programa de BLAST.	113

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices		Páginas
A-1.	Diseño experimental para determinar la incidencia de <i>Alternaria</i> sp. en cebolla para los cvs. 'Mercedes' y 'Excalibur' en predios experimentales.	144
A-2.	Diseño experimental de las pruebas de patogenicidad en el campo.	145
B-2.	Medio CZAPEK DOX	148
C-1.	Correlaciones entre los cultivares de cebolla 'Excalibur' y 'Mercedes' vs factores ambientales como humedad relativa, precipitación y temperatura.	150
D-1.	Reporte de las medidas de los fragmentos en la gel de electroforesis de la región del ITS1/ITS4.	153
D-2.	Reporte de las medidas de los fragmentos en la gel de electroforesis de la región del ITS1.	154
D-3.	Reporte de las medidas de los fragmentos en la gel de electroforesis de la región del ITS2.	155
E-1.	CLUSTAL X (1.83) Multiple alineamiento de las secuencias de <i>Alternaria</i>	157
E-2.	CLUSTAL X (1.83) Multiple alineamiento de las secuencias de <i>Stemphylium</i> .	165

INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una planta monocotiledónea herbácea bienal clasificada dentro de la familia Alliaceae. Esta planta es nativa de Asia Central. El cultivo de cebolla se considera uno de los más importantes en el mundo produciendo aproximadamente 55,153,027 toneladas métricas (mt) anualmente (FAO, 2004). La producción de cebolla en los Estados Unidos para el 2004 fue de 3,669,540 millones de toneladas métricas, aportando un valor total de \$863,295 millones (USDA-NASS, 2004). En Estados Unidos, 26 estados cultivan cebollas para fines comerciales, donde las mayores producciones son en Washington, California, Oregon, Idaho, Texas, Georgia, New Mexico, Colorado, Nueva York y Michigan (National Onion Association, 2004).

En Puerto Rico, la cebolla ocupa el cuarto lugar entre las hortalizas de importancia económica. Su aportación al ingreso bruto agrícola para los años 2003 al 2004 fue de aproximadamente \$2.0 millones con una producción de 7149.642 mt (Datos sin publicar, Departamento de Agricultura, 2004). Las siembras se encuentran localizadas en la costa sur de la isla, en los municipios de Guánica, Juana Díaz y Santa Isabel. Los cultivares más comunes son

'Excalibur', 'Nikita', 'Candy' y 'Mercedes'. La mejor época para las siembras es desde principios de noviembre hasta finales de enero, la cual coincide con las temperaturas frescas y días cortos (Estación Experimental Agrícola, 1999). Su ciclo de vida puede ser de 100-140 días. Por ejemplo, el cultivar 'Mercedes' posee un ciclo de vida de aproximadamente 100 días mientras que el cultivar 'Candy' tiene un ciclo de vida de 137 días.

En condiciones de campo y de almacenaje, las siembras de cebolla están sujetas a pérdidas significativas en el rendimiento y la calidad del bulbo debido a diferentes organismos causantes de enfermedades (Thornton y Mohan, 1996). Las hongos fitopatógenos que se han reportado causando enfermedades en las plantas de cebollas son: *Fusarium oxysporum* Schlechtend (FR)., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phoma* spp., *Alternaria porri* (Ellis) Cif, *Botrytis* spp., *Peronospora destructor* Berk, *Stemphylium vesicarium* Wallr, entre otros (Schwartz y Mahon, 1995). Pocos trabajos se han realizado en Puerto Rico sobre hongos patógenos en el cultivo de cebolla. Toro (1923) y Nolla (1927) realizaron los primeros informes sobre hongos patogénicos de cebolla. Para el 1927, Nolla reportó a

Alternaria alli afectando el follaje de la cebolla en el área norte de Puerto Rico. Recientemente, Vélez Rodríguez *et al.* (2004) documentó que *Stemphylium* sp. y *Alternaria* sp. aparecen asociados a lesiones encontradas en el follaje de las cebolla en el sur de la isla. Una de las enfermedades más importantes en los cultivos de cebollas a nivel mundial es la mancha foliar púrpura causada por *Alternaria porri*. Esta especie se caracteriza por formar lesiones foliares en la cebolla, las cuales interrumpen el proceso de fotosíntesis y disminuyen el rendimiento de los bulbos en la planta.

El propósito de esta investigación fue determinar la incidencia del género *Alternaria* en las diferentes etapas del ciclo de vida de la cebolla y reportar las distintas especies que están asociadas al cultivo de cebolla. Sin embargo, la clasificación taxonómica de las especies de *Alternaria* es muy compleja y resulta difícil separar las especies utilizando métodos tradicionales (Rotem, 1994). Por tal razón, para obtener una identificación correcta de las especies del género *Alternaria* afectando cultivos de cebollas se requiere utilizar nuevas y diferentes técnicas de diagnósticos complementarias a las tradicionales. Actualmente no existen reportes del uso de técnicas

moleculares para caracterizar las especies de *Alternaria* causando lesiones en cebollas. En adición, esta investigación tuvo como objetivo realizar pruebas de patogenicidad para distinguir las especies patogénicas de las saprófitas y desarrollar protocolos utilizando técnicas moleculares para facilitar el diagnóstico correcto y preciso de las especies de *Alternaria* que ocurren comúnmente en el campo. Por ejemplo, el uso de técnicas que comparen el ADN polimórfico amplificado al azar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR), la variabilidad en la región ITS del ADN ribosomal y realizar estudios filogenéticos utilizando el ADN ribosomal.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cebolla, *Allium cepa* L.

La cebolla es una planta monocotiledónea herbácea bienal clasificada dentro de la familia Alliaceae nativa de Asia Central. Entre las especies de *Allium* dentro de la familia de la cebolla se encuentran el ajo, el cebollín y el puerro. La cebolla produce un bulbo, que es un tallo modificado con hojas carnosas y raíces fibrosas que mayormente se encuentran en las primeras 12 pulgadas del suelo. El color del bulbo puede ser amarillo, lila o blanco; de tamaño pequeño, mediano, grande o extra grande con diferentes formas dependiendo del cultivar de la planta (Estación Experimental Agrícola, 1999; Schwartz y Mahon, 1995). Los bulbos pueden tener distintas formas y sabores conforme al cultivar escogido. La formación y el desarrollo adecuado del bulbo en la cebolla está influenciada por la disposición de nutrientes y agua en el suelo, temperaturas adecuadas, fotoperiodo y número de hojas disponibles en la planta. Los diferentes cultivares de cebolla se clasifican de acuerdo al largo del día mínimo requerido para la inducción del bulbo. Los cultivares de días cortos requieren de 11 a 12 horas de luz, cultivares de días intermedios de 12 a 13 horas y cultivares de días

largos de 14 a 16 horas. Una planta puede producir de 13-18 hojas cuando las condiciones ambientales son favorables (Estación Experimental Agrícola, 1999). Los suelos adecuados para la siembra de cebolla son del orden Mollisols o Vertisol con un pH que fluctúa entre 6 a 7.5 con buen drenaje (Granberry y Terry, 2000; Estación Experimental Agrícola, 1999).

Enfermedades causadas por hongos

La cebolla se considera uno de los vegetales más importantes en el mundo. La demanda por la calidad de la cebolla es alta, ya que los consumidores son exigentes en cuanto a la forma, tamaño y apariencia del bulbo (Vélez-Rodríguez *et al.*, 2004). La planta puede verse afectada por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, los cuales pueden surgir en el campo durante la cosecha o en el almacenaje del bulbo. Estos tienen un impacto significativo en la producción al disminuir la calidad y el rendimiento de los bulbos. Los hongos como *Alternaria porri*, algunas especies de *Botrytis* y *Peronospora destructor* Berk causan grandes pérdidas económicas en el campo así como en condiciones de almacenaje en cultivos de ajo y cebolla (Schwartz y Mohan, 1995). Las pérdidas

económicas causadas por *A. porri* fluctúan entre 30 a 50% y en algunos casos puede llegar hasta un 100% en Colorado, USA (Schwartz, 1999). En India, *A. porri* puede causar pérdidas mayores de 59% en los bulbos de cebolla (Gupta y Pathak, 1988). Se han reportado diferentes patógenos que afectan la parte radicular, el bulbo y el follaje de la planta. Los hongos radiculares reportados son *Fusarium* spp. causando sancocho, *Phoma terrestris* E. M. Hans provocando la raíz rosada y *Sclerotinia sclerotium* (Lib) de Bary causando una pudrición (Estación Experimental Agrícola, 1999; Schwartz y Mohan, 1995). Los hongos foliares reportados son la mancha púrpura (*Alternaria porri* (Ellis) Cif.), el añublo lanoso (*Peronospora destructor* Berk), el tizón de las hojas y pudrición del tallo (*Stemphylium vesicarium* Wallr) y el causante de la pudrición del cuello (*Botrytis alli* Munn). Entre los patógenos que afectan el bulbo se han reportado a *Aspergillus niger* Tiegh agente causal del moho negro y *Penicillium* sp., que provoca el moho azul en las cebolla (Schwartz y Mohan, 1995).

Género *Alternaria*

El género *Alternaria* fue establecido en el año 1817 por Nees von Esenbeck con el nombre de *Alternaria tenuis*. El nombre *Alternaria* viene del latín "alternare" y se refiere a la disposición que guardan los conidios (Ulloa y Herrera, 1994). El género *Alternaria* spp. es un hongo mitospórico (antes llamado deuteromycetos) que pertenece a la clase Hyphomycetes en el orden Moniliales de la familia Dematiaceae (Barnett y Hunter, 1998). Esta familia se distingue por agrupar los hongos que producen los conidios pigmentados. Los conidióforos de *Alternaria* se caracterizan por poseer uno o más septos transversales con apariencia geniculada (Ellis, 1971). Los conidios son de color marrón pálido a marrón oscuro, ovalados u obclavatos, con o sin cuello, poseen un annulus y son multicelulares con septos transversales, longitudinales y algunas veces oblicuos (Simmons, 1992; Ellis, 1971). Estos pueden estar solitarios o formando cadenas de manera acropetal donde el conidio más joven se encuentra en el ápice de la cadena. Needgaard (1945), citado por Rotem (1994), separó las especies de *Alternaria* dentro de tres grupos en base al número de esporas en la cadena. Los grupos son **Longicatenatae**, caracterizado por cadenas largas de

aproximadamente 10 conidios sin cuello, por ejemplo *A. alternata*, **Brevicatenatae** con cadenas cortas de 3-5 conidios con cuellos cortos, por ejemplo *A. tenuissima* y **Noncatenatae**, con conidios solitarios con cuellos largos, por ejemplo *A. helianthi* (Rotem, 1994).

Alternaria es un organismo cosmopolita el cual se encuentra en una variedad de habitats en el mundo. Muchas de las especies son saprofíticas, las cuales se pueden encontrar en materia orgánica en descomposición y en el suelo. Algunas especies son patógenas de cereales, plantas ornamentales, vegetales, hortalizas y frutales. Sin embargo, hay otras especies que afectan los productos postcosecha y las semillas como por ejemplo *A. radicina* Meier, Dres. & Eddy el cual causa la pudredumbre negra de la zanahoria en almacenaje (Pryor y Gilbertson, 2001). *Alternaria yaliinficiens* Rodney, *A. alternata* (Fr.) Keissler y *A. gaisen* Nagano provocan grandes daños en el cultivar de pera 'Ya Li Pear' en condiciones de almacenaje (Rodney, 2004). Las enfermedades causadas por diferentes especies de *Alternaria* se caracterizan por producir manchas foliares y pudriciones en raíces o frutos. Las manchas foliares son generalmente de color marrón oscuro a negro y usualmente forman anillos concéntricos (Agrios, 1997). En

algunas especies su teleomorfo corresponde a un loculoascomiceto del género *Lewia* Barr & E. Simmons y otras al género *Pleospora* Rabenh. ex Ces & De Not.

Su clasificación basada en las características de los conidios es complicada, ya que este hongo es mayormente confundido con otros hongos, entre los cuales se encuentran: *Stemphylium*, *Nimbya*, *Urocladium* y *Embellisia* (Rotem, 1994). Simmons (1995), diferenció el género *Alternaria* de *Stemphylium* y *Urocladium* por la apariencia del ápice del conidióforo y el terminal basal del conidio inmaduro, respectivamente.

Las especies de *Alternaria* poseen dos rasgos importantes, la producción de melanina especialmente en los conidios y la producción de toxinas específicas del hospedero en caso de las especies fitopatogénicas (Thomma, 2003). Se han reportado alrededor de siete especies de *Alternaria* que producen toxinas específicas para el hospedero (HST) (Simmons, 1999). Se han documentado aproximadamente 12 toxinas específicas al hospedero producidas por especies patogénicas de *Alternaria* (Thomma, 2003; Walton, 1996). Las toxinas son AAl (*Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*), ACT (*A. alternata* f.sp. *citri tangerine*), AF (*A. alternata* f.sp. *fragariae*), AK (*A.*

alternata f.sp. *kikuchiana*), ACTG (*A. alternata* f.sp. *citri tangarine*), ACR (*A. alternata* f.sp. *citri jambhriri*), AM (*A. alternata* f.sp. *mali*), Maculosina (*A. alternata*), AS (*A. alternata*, girasol), Destruixina (*A. brassicae*), AT (*A. alternata*, tabaco), ATC (*A. tenuissima*, frijol) y AB (*A. brassicicola*) (Thomma, 2003).

***Alternaria* en cultivos de cebollas**

Alternaria porri es muy importante a nivel mundial ya que afecta varias especies de *Allium* spp. Ésta es el agente causal de lesiones foliares de color púrpuras con anillos concéntricos en las plantas de cebollas. Se reportó por primera vez por Cooke y Ellis en Estados Unidos en el 1879 afectando plantas de *Allium porrum* L. (Citado por Skiles, 1953). La mancha foliar púrpura puede ocurrir en otras especies de *Allium* tales como el ajo, cebollín y puerro (Schwartz y Mohan, 1995). Los patógenos de plantas tienen diferentes formas de penetrar a su huésped. *Alternaria porri* invade el tejido a través de heridas, estomas o directamente por las células epidermales (Fahim y El-Shehedi, 1966; Agrios, 1997). El modo de penetración por heridas es un pre-requisito para que ocurra la infección causada por *A. alternata* y *A. tenuissima* en el

follaje de cebolla (Skiles, 1953). Las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad de *A. porri* en hojas de cebollas ocurre durante periodos largos de humedad relativa >90% o deposición de rocío y temperaturas de 20-25°C (Everts y Lacy, 1990). Bajo estas condiciones, la mancha púrpura puede distribuirse rápidamente causando pérdidas en el rendimiento del cultivo de cebolla que pueden fluctuar de un 30 a un 50%, y llegar hasta un 100% (Schwartz, 1999). El control con fungicidas es difícil cuando las condiciones ambientales favorecen la esporulación y germinación de los conidios de *A. porri* (Miller, 1983). Las lesiones de *A. porri* son muy parecidas a las que produce *Stemphylium vesicarium* en cebollas.

En Puerto Rico, Nolla en el 1924 reportó a *A. alli* causando daños severos al follaje de las plantas en cultivos de cebolla en la zona norte de la isla (Nolla, 1927). Esta especie es bien parecida a *A. porri*. No obstante, *A. tenuissima* y *A. alternata* otras especies se han reportado en la zona sur de la isla asociadas a lesiones marrón parecidas a las producidas por *A. porri* (Vélez-Rodríguez, 2001).

Caracterización Morfológica

Al caracterizar morfológicamente las especies de *Alternaria* hay que considerar varios criterios como lo son la producción de toxinas, planta huésped, catenulación, septos y esporulación, entre otras (Andersen *et al.*, 2001; Ellis, 1971; Simmons, 1995 y 1999; Simmons y Roberts, 1993). Estos criterios están influenciados por factores externos incluyendo la humedad, luz, temperatura y la nutrición. La esporulación de *Alternaria* ocurre en dos fases y ésta depende principalmente de la temperatura y la luz. Los rayos ultravioleta (UV) median la formación del conidióforo y la oscuridad la producción de conidios (Rotem, 1994). No obstante, la producción de los conidios puede ser inhibida por los rayos ultravioletas.

Simmons, (1999) caracterizó taxonómicamente diferentes especies de *Alternaria* utilizando como criterio la producción de toxinas específicas en cultivos anéxicos. Estas toxinas son esenciales para la patogénesis. Simmons utilizó medios especiales tales como agar de papa y zanahoria (PCA siglas en inglés), agar de grama en descomposición (Hay) y agar de jugo de vegetales (V8) para observar la esporulación y la forma de los conidios de las diferentes especies de *Alternaria*.

Identificación Molecular

Recientemente, se están llevando a cabo estudios utilizando diferentes técnicas moleculares que complementan la taxonomía tradicional para la caracterización de los organismos. Todas estas técnicas proveen una herramienta valiosa en el estudio de diferentes organismos en especial el estudio sistemático de los hongos (Konstantinova *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2001; Pryor y Gilbertson, 2001). El desarrollo de técnicas en la biología molecular ahora hace posible determinar diferencias entre dos organismos bien relacionados a nivel molecular (Burns *et al.*, 1991). Se han desarrollado diferentes técnicas para estudiar la relación evolutiva entre las especies. Las técnicas moleculares tales como isoenzimas, fragmentos de restricción de largos polimórficos (RFLP), amplificación de un segmento de ADN (RAPD), hibridización del ADN y la amplificación de las regiones de ITS del ADN se han estado utilizando para evaluar las variaciones intra o inter específicas en diferentes especies de hongos (Hibbett, 1991). Estas técnicas moleculares también se han utilizado en estudios de diversidad genética y orígenes evolutivos en poblaciones de muchos géneros de hongos (Bruns, *et al.*, 1991). Las secuencias del ADN ribosomal, en particular la

región de ITS1-5.8S-ITS2 han estado utilizándose en relaciones filogenéticas para un sin número de hongos patógenos de plantas (Jasalavich *et al.*, 1995). Las secuencias de la sub-unidad pequeña del ADN ribosomal es utilizada entre organismos distantemente relacionados mientras que la región del ITS y la región intergénica de RNA ribosomal pueden variar entre especies y poblaciones (White *et al.*, 1990).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas es inglés) es un método simple por el cual una secuencia de ácidos nucleicos puede ser amplificada exponencialmente *in-vitro* (Mullis y Faloona, 1987). Este consiste de tres pasos fundamentales: desnaturalización del ADN, hibridización de oligonucleotidos a la cadena de ADN desnaturalizada y la extensión de la secuencia de ADN mediante el uso de los iniciadores o *primers* por una polimerasa termoestable. Este método provee una gran oportunidad para desarrollar pruebas rápidas y precisas basadas en ácidos nucleicos para la detección de diferentes patógenos de plantas. Se han desarrollado pruebas para la detección de bacterias patogénicas asociadas a plantas de guisantes (Audy, *et al.*, 1996) y detección de teliosporas

de *Tilletia indica* causando daños en semillas de trigo (Smith *et al.*, 1997).

ADN ribosomal

Por medio del PCR se pueden amplificar muchas regiones de interés en el ADN. El estudio del ADN ribosomal ha sido una herramienta excelente para la sistemática molecular en hongos (Hibbett, 1992). El ADN ribosomal en hongos consiste de regiones altamente conservadas entre los organismos como los genes 18S, 5.8S y 28S, y regiones variables, como los espacios intergénicos (IGS) y las regiones internas que se transcriben (*internal transcribed spacers* o ITS). Estas regiones son bien variables en su composición y tamaño, lo cual sirve como una herramienta en la identificación, diferenciación y clasificación de hongos (White *et al.*, 1990). Las secuencias de los genes del ADN ribosomal, en particular las regiones internas que se transcriben que rodean la subunidad 5.8S se han utilizado en el desarrollo de *primers* específicos en la detección de hongos fitopatógenos (White *et al.*, 1990; Konstantinova *et al.*, 2002). Estas regiones se han estudiado para bajos niveles taxonómicos (Hibbett, 1992). White *et al.*, (1990) diseñaron varios iniciadores: ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e

ITS5, para la amplificación de los genes del ADN ribosomal en diferentes organismos (Figura 1). Las variaciones en las regiones del ITS se han utilizado para estudiar la relación filogenética de especies de *Alternaria* que producen toxinas específicas al hospedero (Kusaba y Tsuge, 1995) y la estructura poblacional de *Alternaria* spp. causando manchas marrón en mandarina y limón (Peever et al., 1999). Las relaciones filogenéticas entre varias especies de *Leptosphaeria* se han estudiando en base a las regiones del ITS, 5.8S y la unidad 18S (Morales et al., 1995). Estudios de la secuencias del ADN ribosomal, incluyendo la subunidad 18S, establecieron que las especies de *Pleospora herbarum* (el anamorfo es *Stemphylium*) y *Pleospora infectoria* (anamorfo de algunas especies de *Alternaria*) son distintas filogenéticamente y que *P. infectoria* esta más relacionada a las especies de *Alternaria* (Pryor y Gilbertson, 2000). Esta investigación complementa los estudios morfológicos que realizó Simmons (1986), en donde se estudiaron varias especies de *Pleospora* (anamorfo *Alternaria*) y por diferencias en la morfología del ascostroma los colocaron dentro del teleomorfo *Lewia*. Zambino y Szabo (1993) examinaron la relación filogenética

de líneas y formas especiales de diferentes *Puccinia* de cereales y otras gramas utilizando la región de ITS.

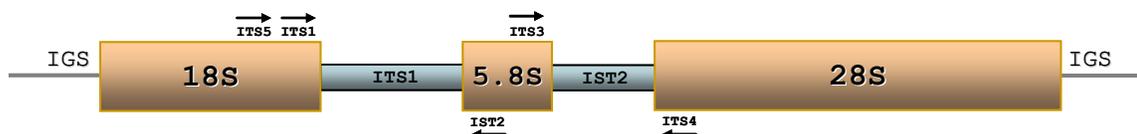


Figura 1. Localización de los iniciadores ITS1 al ITS5 en el ADN ribosomal del núcleo.

RAPD-PCR

RAPD es la amplificación de un segmento de ADN por PCR usando un iniciador de secuencia escogida al azar resultando en diferentes fragmentos amplificados que proveen una excelente selección de marcadores genéticos para análisis biosistemáticos (Williams, 1990). La técnica de RAPD-PCR se ha utilizado como herramienta de diagnóstico para distinguir entre especies de *Alternaria* morfológicamente similares tales como: *A. radicina*, patógeno de semillas de zanahorias y *A. brassicae* en los cultivos de repollo (Pryor y Gilbertson, 2001; Cooke et al., 1998). Una de las ventajas de utilizar la técnica de RAPD es porque los iniciadores universales pueden ser usados para análisis genéticos en una amplia variedad de

especies (Williams et al., 1990). La técnica es apropiada para organismos a nivel de especie (Kohn, 1992). Pruebas de RAPD-PCR desarrolladas para *A. radicina* fueron precisas, sensitivas y confiables en la detección de un marcador molecular en semillas de zanahorias (Pryor y Gilbertson, 2001). Utilizando RAPD, Cooke et al., (1998) resolvieron varias dificultades taxonómicas entre las especies de *Alternaria* patógenas de las Brassicas como: *A. brassicae*, *A. tenuissima* y *A. alternata* y de otros hongos patógenos importantes tales como *Stemphylium* y *Embellisia*. Fernández y Hanlin (1996) demostraron una relación cercana entre los aislados de *Diaporthe phaseolorum* cvr. *sojae* y los aislados del cultivar *caulivora*, utilizando caracteres morfológicos de la fase sexual y la amplificación del ADN utilizando RAPD. El análisis de RAPD podría detectar cambios de bases en las secuencias que son provocados por mutaciones o inserciones (Williams et al., 1990). Roberts et al., (2000) desarrollaron por RAPD grupos morfológicos que representaron el tamaño de esporas pequeñas de *Alternaria* y los analizaron en un dendrograma. Por otro lado, Sharma y Tewari (1998) utilizaron diferentes primers que fueron efectivos en la detección de variaciones genéticas inter e

intra regionales en diferentes aislados de *Alternaria* en crucíferas.

Aspectos y Modelos Evolutivos

Un proceso básico en la evolución de secuencias del ADN, es el cambio de nucleótidos en un tiempo dado. Estos cambios o mutaciones llevan a nuevas secuencias. Hay varios tipos de cambios causados por eventos mutacionales que envuelven uno o más nucleótidos por ejemplo sustitución, eliminación o inserción e inversión. En el estudio de los cambios evolutivos entre las especies es bien importante considerar la sustitución de nucleótidos en la secuencias del ADN. La sustitución de nucleótidos esta dividida en transiciones y transversiones. Las transiciones toman en cuenta la sustituciones entre purinas (G-A) y las transversiones entre pirimidinas (T-A). Éstas son muy importantes al hacer comparaciones entre dos secuencias y su ancestro común. La divergencia de éstas pueden medirse conociendo los sitios de nucleóticos en donde ocurre un cambio en la secuencia. Se puede estimar una proporción de cambio de nucleótidos en la secuencia, la cual está dada por la ecuación:

$$\hat{p} = n_d / n \quad (1)$$

Donde (1) n_d es el número de nucleótidos diferentes en ambas secuencias y n el total de nucleótidos. Además, de esta proporción, es importante conocer la frecuencia de diferentes pares de nucleótidos entre las secuencias. Según Nei y Kumar, (2000) existen 16 tipos de pares de nucleótidos cuando se comparan dos secuencias (X,Y). Estos son: 4 nucleótidos idénticos (AA, TT, GG y CC), 4 tipos de transición (AG, GA, TC y CT) y 8 tipos de transversiones (AT, TA, AC, CA, TG, GT, CG y GC).

Se han propuesto numerosos esquemas matemáticos para estimar el número de sustituciones de nucleótidos. Existen dos modelos simples y frecuentemente utilizados: Jukes Cantor modelo de un parámetro y Kimura parámetros dos.

Jukes Cantor (JC) es un modelo que se propuso para el 1969 y demuestra un esquema de sustitución (Figura 2). Este modelo asume que la sustitución de nucleótidos en la secuencia ocurre en cualquier sitio con igual frecuencia y que en cada sitio un nucleótido cambia a uno de los otros tres nucleótidos con una probabilidad de α por un tiempo

dato (Nei y Kumar, 2000). Por lo tanto, la probabilidad de cambio de un nucleótido a otro es 3α (Figura 2).

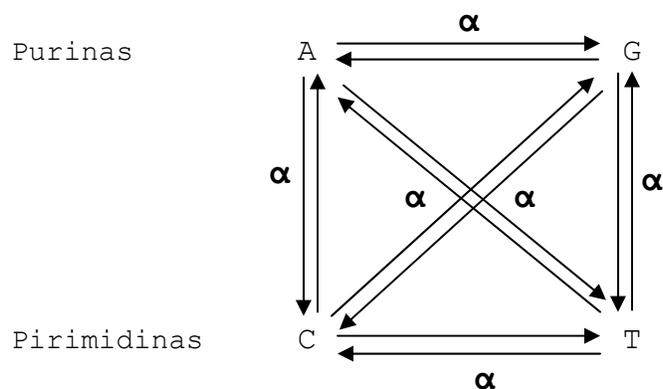


Figura 2. Modelo de Jukes Cantor de un parámetro de sustitución de nucleótidos.

Kimura parámetro dos desarrollado por Motoo Kimura en el 1980, propone un modelo para estimar el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. Este modelo considera la razón de sustitución transicional α por unidad de tiempo que es diferente a la sustitución transversional 2β por unidad de tiempo (Kimura, 1980, Nei y Kumar, 2000) (Figura 3). El total de la razón de sustitución por sitio por año es $\alpha + 2\beta$.

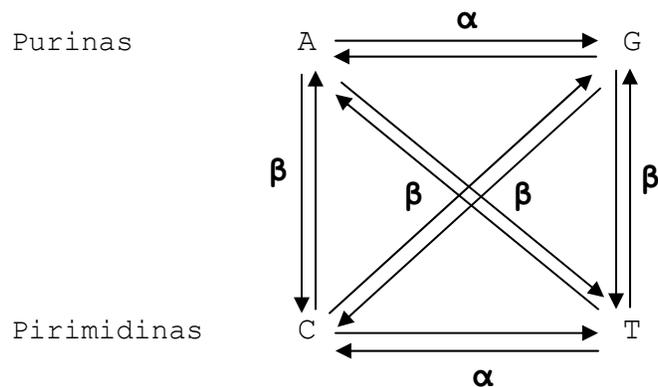


Figura 3. Modelo de Kimura parámetro dos de sustitución de nucleótidos.

Árboles Filogenéticos

El análisis filogenético de secuencias de ADN nos proveen una excelente herramienta para estudiar la historia evolutiva desde los organismos simples hasta los más complejos. Las relaciones filogenéticas de genes o de organismos son presentadas en diagramas parecidos a un árbol, el cual puede ser con raíz (*rooted*) o sin raíz (*unrooted*). Estos poseen un patrón de ramificaciones que depende del número de taxones (ejemplo; número de secuencias de ADN) utilizados (Hall, 2004). A este patrón se le conoce como topología. Hay métodos estadísticos que pueden ser utilizados para la construcción de árboles filogenéticos de diferentes datos moleculares. Los métodos más comunes están clasificados dentro de tres grupos:

método de distancia *neighbor-joining* (NJ), de parsimonio y probabilidad *likelihood* (Nei y Kumar, 2000). Los métodos de distancia crean árboles, reduciendo toda la información en caracteres genéticos para estimados *pairwise* de similitud y no similitud (Burns *et al.*, 1991). Cuando se construye un árbol filogenético es importante aplicar el método estadístico correcto en el cual la inferencia estadística sea buena. Hay dos procesos importantes que están envueltos en esta inferencia: la estimación de la topología y la estimación del largo de las ramas que provee la topología (Saitou y Nei, 1987). Cuando la topología es conocida es simple conocer la estimación del largo de las ramas. El problema es no conocer la estimación de la topología. El método de *neighbor-joining* para la construcción de árboles es muy eficiente para obtener la topología correcta. Saitou y Nei (1987) desarrollaron a NJ para la construcción de árboles basados en el principio de evolución mínima (ME). NJ es una versión simplificada del ME y es aplicado para cualquier tipo de datos que utilicen distancias evolutivas. El término vecinos *Neighbor* es definido como dos taxones unidos por el mismo nodo en un árbol sin raíz (Saitou y Nei, 1987). El método de NJ estima todas las distancias de los taxones y los va

agrupando de acuerdo a los más cercanos o con distancias cortas. Los pares de taxones más cercanos son agrupados dentro de nodos internos y la distancia de estos nodos con el resto de los nodos en el árbol son calculados y comparados. NJ comienza en forma de estrella y a medida que va uniendo los taxones se va formando el árbol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la Incidencia de *Alternaria*

Se determinó la incidencia del género *Alternaria* en el área sur de Puerto Rico, en los municipios de Santa Isabel y Juana Díaz (Figura 4). El estudio se llevó a cabo en la temporada de siembra de cebolla de noviembre a enero de 2003-2004 y en la temporada tardía de febrero a abril de 2004.



Figura 4. Localización de los municipios de Santa Isabel y Juana Díaz, productores de cebolla. (Mapa creado en el laboratorio PaSCoR de la Universidad de PR, Recinto de Mayagüez (UPRM) por Roy Ruíz Vélez utilizando el programador ArcMap, versión 9).

Predios comerciales

El estudio se realizó en la Finca Destino ubicada en la carretera PR-1 del Barrio Jauca, sector Destino, del municipio de Santa Isabel, localizada en el área sur de Puerto Rico (Figura 5). La misma, está dentro de las coordenadas: latitud N17° 58' 39. 8" y longitud W66° 22' 47. 1" a 22 mt sobre el nivel del mar (Map Datun Puerto Rico) (GPS 12 XL, 12 channel, Garmin 1996-2000). La finca cultiva pimientos, calabaza y papaya.

Las muestras de hojas de cebollas se colectaron durante los meses de enero a abril de 2004. Éstas se tomaron cada catorce días en cuatro predios de cebolla, dos predios del cultivar 'Mercedes' (Seminis®) y dos del cultivar 'Excalibur' (Sunseeds®). En el muestreo se utilizó un diseño experimental sistemático con un recorrido en el predio en forma de "zig zag" (Figura 6). Por el tamaño y forma de los predios, algunos se dividieron en predios más pequeños. Los predios se diferenciaron en A y B para el cultivar 'Mercedes' y, C y D para el cultivar 'Excalibur'. Los predios A, C y D tenían un tamaño de aproximadamente 7.3 acres y el predio B de 9.2 acres. De cada ocho bancos se colectó una muestra de hoja de cebolla

al azar, obteniendo un total de cincuenta muestras por cada predio.

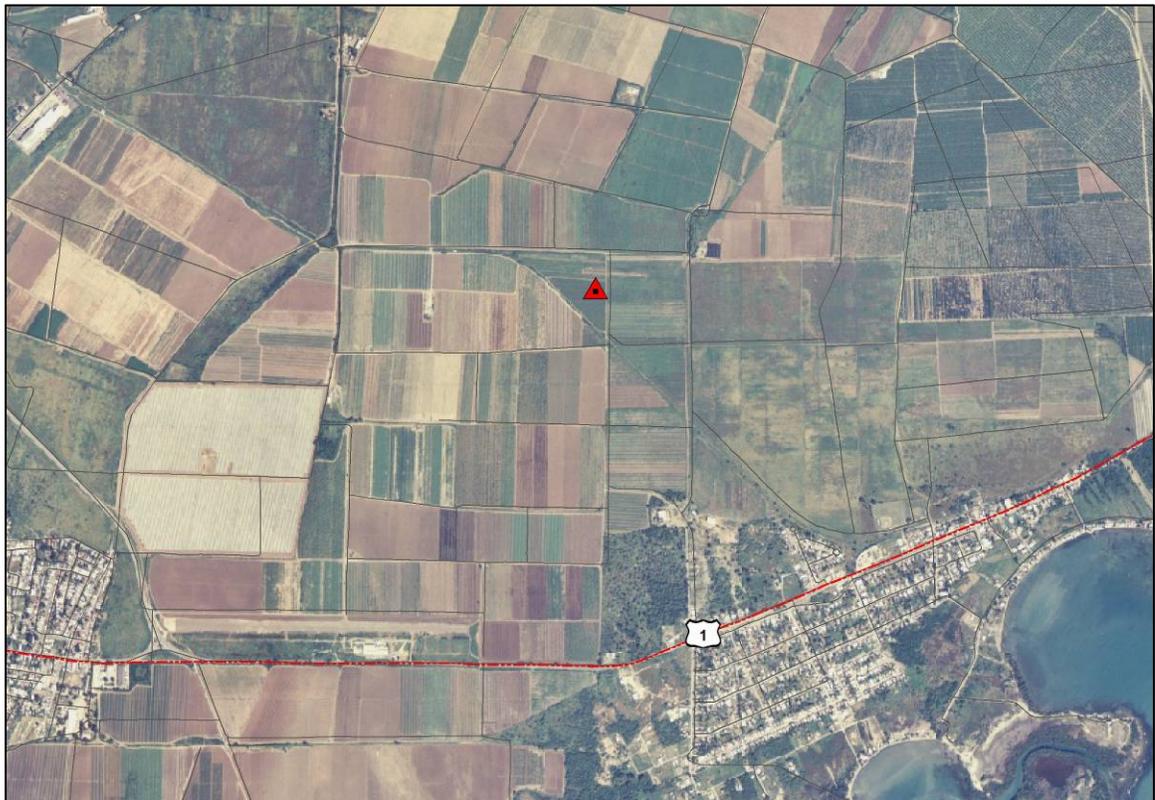


Figura 5. Localización de la Finca Destino en el Barrio Jauca en el municipio de Santa Isabel. Foto aérea de la NOAA (1999) y carreteras de la Junta de Planificación. (Mapa creado por Roy Ruiz Vélez en el laboratorio PaSCoR, UPRM).

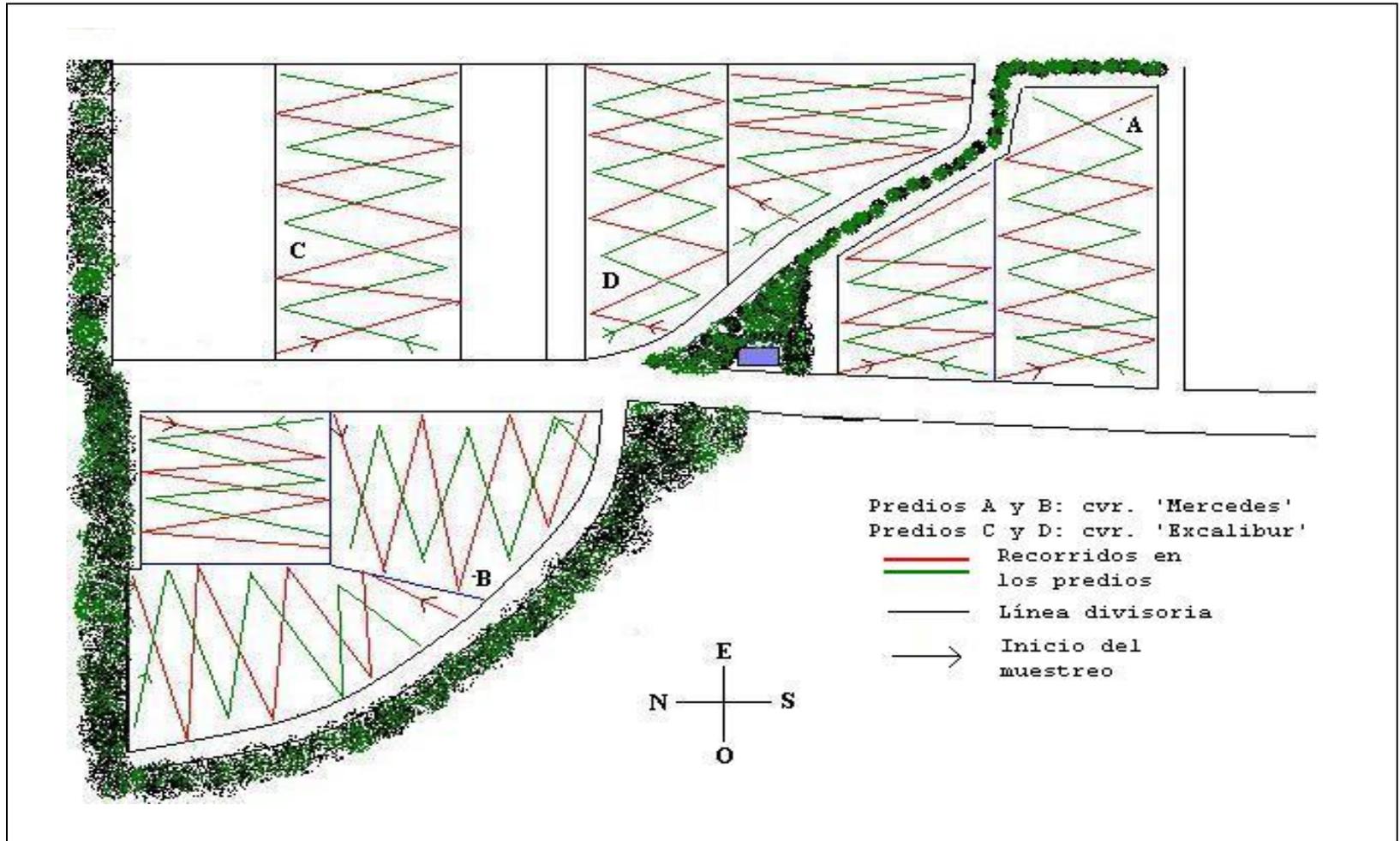


Figura 6. Localización de los diferentes predios ubicados en la Finca Destino, Santa Isabel. Los predios A, C y D tienen aproximadamente de 7.3 acres y el B de 9.2 acres.

Las muestras se guardaron en bolsas plásticas, se colocaron en una nevera con hielo y se transportaron al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección de Cultivos de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez (UPRM). Simultáneamente, se obtuvieron datos de temperatura, precipitación y humedad relativa del área utilizando la estación metereológica ubicada en la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz, P.R.

De cada muestra se realizaron cinco cortes de diferentes partes del tejido de la hoja de aproximadamente 0.5 cm (Figura 7). Los cortes se desinfectaron con alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 0.05% (ambos tratamientos por un minuto) seguido de dos lavados con agua destilada desionizada estéril. Éstos se transfirieron al medio de cultivo de agar de papa y dextrosa (PDA siglas en inglés, 39g/l Difco) con estreptomycin (Sigma®). Los platos petri (60 x 15 mm) se incubaron a $\pm 27^{\circ}\text{C}$ (VWR Scientific Products, Sheldon Manufacturing Inc. Modelo 2020). Luego de 7 días de incubación se documentó la presencia o ausencia del hongo para cada muestra.



Figura 7. Cortes del tejido de las hojas de cebolla realizados al azar para cada muestra.

Predios experimentales

Este estudio se llevó a cabo en la Estación Experimental Agrícola (EEA) localizada en la carretera 510 km 3.0 Sabana Llana, Juana Díaz, P.R. (Figura 8). Esta estación se encuentra dentro de las siguientes coordenadas: latitud N18° 01' 39. 1" y longitud W66° 31' 33. 2" a 34 mt sobre el nivel del mar (Map Datun, Puerto Rico) (GPS 12 XL, 12 channel, Garmin 1996-2000). Se realizaron dos siembras una del cultivar 'Mercedes' y la otra de 'Excalibur'. Cada predio tenía un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA) con dos tratamientos: (1) control y (2) tratamiento con fungicida (iprodione) (Apéndice A-1). En todos los bloques se aplicaron los herbicidas Fluazifop-P-Butil y Oxyflourfen, al comienzo de la siembra. Se colectaron 12 muestras de hojas al azar en cada predio divididas en seis muestras de cada tratamiento. Cada bloque contenía cuatro hileras, sin embargo, las muestras fueron colectadas de las hileras centrales. Las muestras fueron transportadas y procesadas en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección de Cultivos según descrito anteriormente.



Figura 8. Estación Experimental Agrícola en el municipio de Juana Díaz, Puerto Rico. Imagen de Satélite ICONOS 2002 y carreteras por la junta de planificación. (Mapa creado por Roy Ruiz, del laboratorio PaSCoR, UPRM).

Análisis Estadístico

Se llevará a cabo un análisis de correlación basado en un nivel de significancia de $p(0.05)$ entre el porcentaje de incidencia de *Alternaria* para ambos predios (comerciales y experimentales) y diferentes datos meteorológicos tales como temperatura, humedad relativa y precipitación. El coeficiente de correlación será por el método Pearson. El análisis se realizará por el programa estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0 de la Universidad Nacional de Córdoba.

Aislación e identificación de especies de *Alternaria*

Se recolectaron hojas de cebolla con lesiones foliares similares a las causadas por el género *Alternaria* spp. en cultivos de cebollas. Las hojas que mostraron lesiones, se colocaron en bolsas plásticas en una nevera portátil hasta ser transportadas al laboratorio de Fitopatología. Se documentó la morfología de las lesiones mediante fotografías y descripciones breves.

Para aislar los hongos se realizaron cortes de aproximadamente 0.5 cm de los bordes de las lesiones de las hojas, los cuales se desinfectaron con alcohol etílico al 70% por un minuto, hipoclorito de sodio al 0.05% por 30

segundos y luego dos lavados de agua destilada desionizada estéril. El tejido se transfirió al medio de cultivo agar de papa y dextrosa (Difco) acidulado con 25% ácido láctico y se incubaron a $\pm 27^{\circ}\text{C}$. Las colonias obtenidas se reaislaron en medio de agar de papa y zanahoria (Simmons, 1992). Luego de 5 a 7 días de incubación se documentó la catenulación de cada aislado según descrito por Simmons (1995). Además, se prepararon cámaras húmedas utilizando el medio de PCA para preparar laminillas semipermanentes las cuales se examinaron bajo un microscopio compuesto (Olympus BX40F4, Olympus Optical Co.). Se documentó el tamaño, largo y ancho de los conidios, el número de septos transversales, longitudinales y oblicuos y la ornamentación. En medio de PCA diariamente se observaron los aislados bajo un microscopio de disección (Olympus, SZ40) a 60x por siete días para documentar la forma de esporulación. También para la descripción y caracterización se tomaron datos del color de la colonias en diferentes medios de cultivo tales como: PCA (Difco 39g/l), agar de avena (OA siglas en inglés, Difco 72.5g/l), agar de harina de maíz (CMA siglas en inglés, Difco 17g/l), agar con sucrosa, extracto de levadura, rosa de bengala y dicloran (DRYES o Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose Agar, Apéndice B-1)

(Ardensen et al., 2001), agar de jugos de vegetales (V8) y CZAPEK DOX (Difco 35g/l, Apéndice B-2). Para ésta caracterización se describió el color de las colonias y se tomaron fotografías (Olympus, C-5000 5.0 Mega Pixel). Por otro lado, se realizaron dibujos de las diferentes formas de los conidios para cada especie identificada. Se observaron conidios entre 5 a 12 días de crecimiento de las colonias en PCA. Se tomaron fotos (Olympus, C-5000 5.0 Mega Pixel) de laminillas semipermeables a través del microscopio en una magnificación de 400X. Se le colocó una escala de medida (micrómetros) a las fotos basada en el promedio del tamaño de los conidios. Luego las fotos fueron impresas y los dibujos se desarrollaron a base de trazos.

Cultivos monospóricos

De cada aislado se realizaron cultivos monospóricos. Antes de comenzar la preparación del cultivo monospórico, los aislados se transfirieron al medio de agar agua (WA siglas en inglés, Difco 15g/l) para estimular su esporulación. Se utilizó un microscopio de disección para observar y recoger los conidios de *Alternaria* utilizando una pipeta Pasteur. Éstos se colocaron en un medio de PDA

para dispersarlas y poder reaislar una sola espora en PDA. Las placas se incubaron a 27°C.

Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron utilizando plantas de cebolla de aproximadamente 60 a 70 días de edad del cultivar 'Mercedes' (Seminis®), 'Candy' (Petoseed®) y 'Excalibur' (Sunseeds®).

Preparación del inóculo

Las colonias monospóricas se transfirieron al medio PCA por 7 a 8 días. Luego del crecimiento de las colonias, todo el micelio se removió utilizando una espátula esterilizada. Éste fue suspendido en 50 ml de agua destilada estéril a la cual se le añadieron 3 gotas de Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y luego se mezcló suavemente (Vélez-Rodríguez, 2001). Se determinó la concentración de conidios por mililitro utilizando un hemacitómetro. También se utilizaron discos de agar con micelio de 4 mm de diámetro.

Pruebas en el campo

Las pruebas de patogenicidad en el campo se realizaron en la EEA de Juana Díaz, P.R. Para éstas se utilizaron los cultivares 'Excalibur', 'Mercedes' y 'Candy'. El área del predio experimental tenía un tamaño de aproximadamente 0.29 acres. Las siembras tenían un diseño de bloques completamente aleatorizados (Apéndice A-2). Cada bloque estaba compuesto por tres parcelas las cuales estaban divididas en tres bancos de cuatro hileras con las tres cultivares de cebollas distribuidas al azar. A este experimento se le aplicaron los insecticidas, avermectina desde la segunda semana y cipermetrima desde la sexta semana. En cada parcela, los bancos se dividieron en 7 bancos pequeños de aproximadamente 8.3 pies de largo. Finalmente, se formaron 21 bancos pequeños por parcela. Se utilizaron 19 aislados de *Alternaria*, uno de *Pleospora* y una muestra control para cada parcela con las diferentes cultivares. Las plantas fueron inoculadas con una suspensión de esporas de 10^5 conidios por ml y simultáneamente con discos de agar con micelio de 4 mm de diámetro. Se seleccionaron al azar tres plantas de cebolla asintomáticas de cada banco pequeño y se marcaron en la parte basal con una cinta elástica. Luego, se eligieron

dos hojas adultas de cada planta las cuales fueron desinfestadas con alcohol etílico al 70% seguido de dos lavados de agua destilada desionizada estéril. Se realizó una insición a una de las hojas en la parte media. La insición en la hoja se llevó a cabo utilizando un corcho con tres alfileres estériles. Ambas hojas (con insición y sin insición) fueron inoculadas con la suspensión de conidios utilizando un hisopo estéril. En el mismo banco, se escogieron otro grupo de plantas para ser inoculadas con discos de agar con micelio. El grupo control fue inoculado con agua destilada desionizada estéril o un disco de agar de PCA estéril en hojas con o sin insición. Las plantas se examinaron diariamente para observar el desarrollo de los síntomas y al mismo tiempo se tomaron datos sobre la temperatura y la humedad relativa. Luego de 7 días las lesiones fueron descritas y fotografiadas. Se evaluaron las diferentes especies patógenas anotando el número de hojas infectadas y se midió el tamaño de las lesiones para determinar la virulencia.

Pruebas en el laboratorio in-vitro

Las pruebas de patogenicidad *in-vitro* se realizaron en el laboratorio de fitopatología de la UPRM. Se

seleccionaron plantas del campo asintomáticas de aproximadamente 60 a 70 días después de la siembra. Éstas fueron transportadas al laboratorio en una nevera portátil con hielo. Se cortaron dos hojas adultas de la planta y se desinfectaron con alcohol etílico al 70% por un minuto y dos lavados de agua destilada desionizada estéril. Luego se cubrieron las hojas con papel toalla estéril para eliminar el exceso de agua y se dejaron secar por aproximadamente 10 minutos. Se utilizó una caja de plástico de tamaño 85 x 40 x 10 cm, en la cual se colocó en el fondo papel toalla estéril y encima 10 platos petri (100 x 15 cm). Se colocaron dos hojas por cada placa petri. Una hoja para la prueba con insición y la otra sin insición. Se humedeció el papel toalla con agua destilada desionizada estéril para simular una cámara húmeda. El inóculo se aplicó por suspensión de conidios y se repitió con discos de agar con micelio (Figura 9). Los tratamientos se aplicaron de forma aleatorizada con tres cajas para cada una de los cultivares. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. Las cajas tenían un diseño de bloques completamente aleatorizados. Esta prueba se repitió con plantas de 80 a 90 días después de la

siembra para corroborar las especies que fueron patógenas en el campo e *in-vitro*.



Figura 9. Pruebas de patogenicidad *in-vitro* con diferentes cultivares de cebolla.

Identificación de especies de *Alternaria* por técnicas Moleculares

Extracción de ADN

Se crecieron las diferentes especies de hongos en un caldo nutritivo. Se colocó micelio en 50 ml de caldo de papa y dextrosa (PDB siglas en inglés, Difco) en un matraz de 125 ml. Luego se colocaron en un agitador por 7 a 10 días a 27°C. El micelio se filtró al vacío utilizando un embudo de Buchner con papel de filtro estéril (Fisher Scientific, P8) y se lavó dos veces con agua destilada desionizada estéril. La extracción de ADN se realizó utilizando el Fast DNA® Kit (Q-BIO gene, USA) según instrucciones del fabricante en un equipo Fast Prep™ Bio 101, Thermo Electron Corporation Milford, MA. El ADN se preservó a -20°C.

Análisis del ADN Ribosomal

Las regiones de ITS del ADN ribosomal de los aislados de *Alternaria* se amplificaron utilizando PCR con los iniciadores ITS1 (5' **TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'**), ITS2 (3' **GCTGCGTTCTTCATCGATGC5'**), ITS3 (5' **GCATCGATGAAGAACGCAGC3'**) y ITS4 (3' **TCCTCCGCTTATTGATATGC5'**) (White *et al.*, 1990; Konstantinova *et al.*, 2002). La reacción de amplificación

se realizó en un volumen total de 25 μ l conteniendo: 2.5 μ l 10X de amortiguador de la reacción ThermoPol (New England, BioLabs.), 50 mM de cada dNTP's (Roche®, USA), 20 pM de iniciadores, 1U/ μ l de polimerasa Taq (New England, BioLabs, MA) y 50 ng/ μ l de ADN. El ADN se amplificó utilizando un termociclador (Perkin Elmer, 2400). La reacción de PCR consistió de una desnaturalización a 94°C por 4 min, una hibridización a 55°C por 30 s, una extensión a 72°C por 1 min, con 35 ciclos, seguido de una extensión final a 72°C por 4 min. Se utilizaron 2 μ l del producto de amplificación para correr una electroforesis en una gel de 1.2% agarosa (Fisher Scientific, New Jersey) preparada con un amortiguador 1X de Borato de Sodio (SB) (Brody y Kern, 2004) y 4 μ l de bromuro de etidio (1 μ g/1 μ l, Sigma®, St. Louis, MO). La gel se visualizó en un iluminador de rayos ultravioleta para ser fotografiada (Quantity One® 4.5 2003, BioRad Laboratory, Inc., Japón). Para determinar el tamaño de las bandas se utilizó una escalera llamada PCR Marker (New England, BioLabs, MA).

RAPD-PCR

El análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (*RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA*) se realizó con el

ADN total genómico de diferentes aislados del género de interés. Se utilizó un iniciador comercial llamado OPA13 (5' **CAGCACCCAC3'**) (Operon Technologies Inc., USA). La reacción de RAPD se realizó según documentado por Cooke (1998) con algunas alteraciones. El volumen total de la reacción de PCR fue de 25 μ l conteniendo: 2.5 μ l 10X de amortiguador de la reacción (New England, BioLabs, MA), 50 ng del ADN genómico, 40 pM de iniciador, 100 mM de cada dNTP, 2.5 mM MgCl₂ y 2U/ μ l de la polimerasa Taq. La reacción de PCR consistió de una desnaturalización a 94°C por 4 min, una hibridización a 35°C por 1 min, una extensión a 72°C por 2 min, con 45 ciclos, seguido de una extensión final a 72°C por 4 min. El producto del PCR fue analizado en una gel de 1.5% agarosa en un amortiguador de electroforesis 1X SB. Los geles se visualizaron en un iluminador de rayos ultravioleta para ser fotografiada.

Análisis de las secuencias del rADN

Para el análisis del ADN ribosomal se amplificó la región completa del ITS utilizando los iniciadores ITS1 *foward* y IST4 *reverse*. Los fragmentos obtenidos fueron purificados utilizando el MinELute PCR Purification Kit (Qiagen® , Maryland) siguiendo las especificaciones del

manufacturero. El producto de amplificación de algunos aislados fueron secuenciados en ambas direcciones con los iniciadores ITS1/ITS4. La mayoría de las muestras se secuenciaron en las Facilidades de Recursos Moleculares de la Escuela de Medicina de New Jersey (The Molecular Resource Facility (MRF) of the New Jersey Medical School (UMDNJ) (<http://www.umdnj.edu/mrfweb/>) y otras en el Centro de Biotecnología Ambiental y Agricultura en el Colegio Cook de la Universidad de Rutgers. Estas secuencias fueron comparadas con la base de datos en el GeneBank utilizando el Centro National para Información Biotecnológica (NCBI o National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología con otras especies. El programa que se utilizó para comparar las secuencias con otras secuencias en la base de datos fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La secuencias del ITS rADN se alinearon utilizando el programa de ClustalX versión 1.83 (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). En base a las distancias de las secuencias de interés y las secuencias obtenidas del GeneBank, se construyó una árbol filogenético utilizando la región ITS. Los árboles filogenéticos fueron obtenidos utilizando el programa Phylo_win desarrollado en el

laboratorio *Genome Populations Interactions* de la Universidad de Montpellier, Francia. El método utilizado para analizar las secuencias fue *Neighbor-joining* utilizando la distancia Kimura parámetro dos con *bootstraps* de 500 repeticiones. El valor de similaridad entre las secuencias fue calculada por comparaciones *pair wise*. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron 14 secuencias de diferentes especies de *Alternaria* del GeneBank las cuales se analizaron evolutivamente con las especies de *Alternaria* en cebolla (Tabla 1). Además, se obtuvieron 11 secuencias de las especies de *Pleospora* y *Stemphylium* del GeneBank para comparar la relación evolutiva entre los aislados encontrados en los cultivos de cebolla (Tabla 2). Las secuencias de los aislados de *Alternaria* de cebolla fueron entradas a la base de datos del GeneBank para tener un número de acceso (Tabla 3).

Tabla 1. Diferentes secuencias de *Alternaria*, *Embellisima* y *Ulocladium* utilizadas en la creación de los árboles filogenéticos y su número de acceso en el GeneBank.

Especies	Número de acceso
<i>Alternaria alternata</i>	DQ156341
<i>A. arborescens</i>	AY154706
<i>A. destruens</i>	AY278836
<i>A. longipes</i>	AY154684
<i>A. macrospora</i>	AY154689
<i>A. porri</i>	AF229470
<i>A. sesamicola</i>	AF314588
<i>A. solani</i>	AY154716
<i>A. tenuissima</i>	AY751455
<i>A. zinniae</i>	AY154696
<i>Embellisima</i> sp	AF212307
<i>Ulocladium</i> sp.	AY943384
<i>Stemphylium botryosum</i>	Y17068
<i>S. vesicarium</i>	AF229484

Tabla 2. Diferentes secuencias de *Stemphylium* y *Pleospora* utilizadas en la creación de los árboles filogenéticos y su número de acceso en el GeneBank.

Especies	Número de Acceso
<i>Pleospora tomatonis</i>	AY329229
<i>P. tarda</i> strain	AY329168
<i>P. sedicola</i>	AY329232
<i>P. gigaspora</i>	AY329174
<i>S. vesicarium</i>	AF229484
<i>Stemphylium botryosum</i>	Y17068
<i>S. alfalfae</i>	AF071343
<i>P. herbarum</i>	AB026165
<i>S. majusculum</i>	AF442792
<i>S. gracilariae</i>	AF442784
<i>S. lancipes</i>	AF442787

Tabla 3. Aislados de *Alternaria* de cebolla que fueron utilizadas para el análisis filogenético con otras especies de *Alternaria* del GeneBank.

Aislado	Clasificación	Número de acceso
Alt1	<i>Alternaria destruens</i>	DQ323681
Alt2	<i>A. destruens</i>	DQ323680
Alt4	<i>A. tenuissima</i>	DQ323692
Alt5	<i>A. tenuissima</i>	DQ323695
Alt6	<i>A. tenuissima</i>	DQ323684
Alt8	<i>A. palandui</i>	DQ323686
Alt9	<i>A. palandui</i>	DQ323702
Alt10	<i>A. palandui</i>	DQ323682
Alt14	<i>A. palandui</i>	DQ323687
Alt16	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323688
Alt17	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323689
Alt18	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323690
Alt19	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323707
Alt20	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323701
Alt21	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323709
Alt22	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323694
Alt24	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323708
Alt26	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323685
Alt27	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323691
Alt28	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323696
Alt29	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323693
Alt30	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323703
Alt33	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	DQ323704
Alt34	<i>A. alli</i>	DQ323705
Alt35	<i>A. alli</i>	DQ323683
Riv-St1	<i>Pleospora eturmiuna</i>	DQ323706
EGS27-193	<i>A. infectoria</i>	DQ323697
EGS34-015	<i>A. tenuissima</i>	DQ323698
EGS34-016	<i>A. alternata</i>	DQ323699
EGS48-147	<i>A. porri</i>	DQ323700

RESULTADOS

Determinación de la incidencia de *Alternaria*

Predios comerciales

Se observó que la incidencia de *Alternaria* spp. en los predios comerciales aumenta a medida que la planta se va desarrollando. No obstante, cuando la planta tiene aproximadamente 15 a 20 días de edad, el hongo no es tan frecuente en el cultivo (Tabla 4). Se observó una incidencia de *Alternaria* de 52% y 48% en plantas de 60 a 100 días después de la siembra (DDS) en ambos cultivares 'Mercedes' y 'Excalibur' en predios comerciales, respectivamente (Tabla 4, Figura 10). Sin embargo, en el cuarto muestreo realizado a los 46-59 DDS, en la mayoría de los predios ocurrió una disminución en la incidencia del hongo (Figura 10). Observamos que la incidencia de *Alternaria* spp. fluctúa en respuesta a la humedad relativa en el campo (Tabla 5, Figura 11). En los días 60-73, 74-87 y 88-102, se reflejó un aumento en la humedad y al mismo tiempo un aumento en la incidencia de *Alternaria* spp. Por otra parte, en el cuarto muestreo ocurrió una disminución de la humedad y también en la incidencia del hongo en las plantas. Se realizó una correlación entre la humedad relativa, temperatura, precipitación y la incidencia del

hongo en ambos cultivares (Apéndice C-1). Al analizar los resultados se encontró una correlación significativa ($r=0.7$) en base $\alpha=0.05$ entre la incidencia de la *Alternaria* y la humedad relativa para el cultivar 'Mercedes'. Al analizar los datos de temperatura y precipitación respecto a la incidencia de *Alternaria* para ambos cultivares, no se observaron diferencias significativa comparadas con $\alpha=0.05$.

Tabla 4. Porcentaje de incidencia de *Alternaria* durante las diferentes etapas del ciclo de vida de la cebolla en los predios comerciales en la Finca Destino, Santa Isabel.

DDS ¹	Cultivares de cebolla			
	'Mercedes'		'Excalibur'	
	Cp ²	%	Cp	%
4-17	0	0	0	0
18-31	14	28	4	8
32-45	7	14	14	28
46-59	2	4	0	0
60-73	23	46	24	48
74-87	14	28	24	48
88-102	26	52	21	42
103-116	8	16	3	6

¹Días después de la siembra, 2004.

²Cp Colonias de *Alternaria* presentes en 50 muestras colectadas.

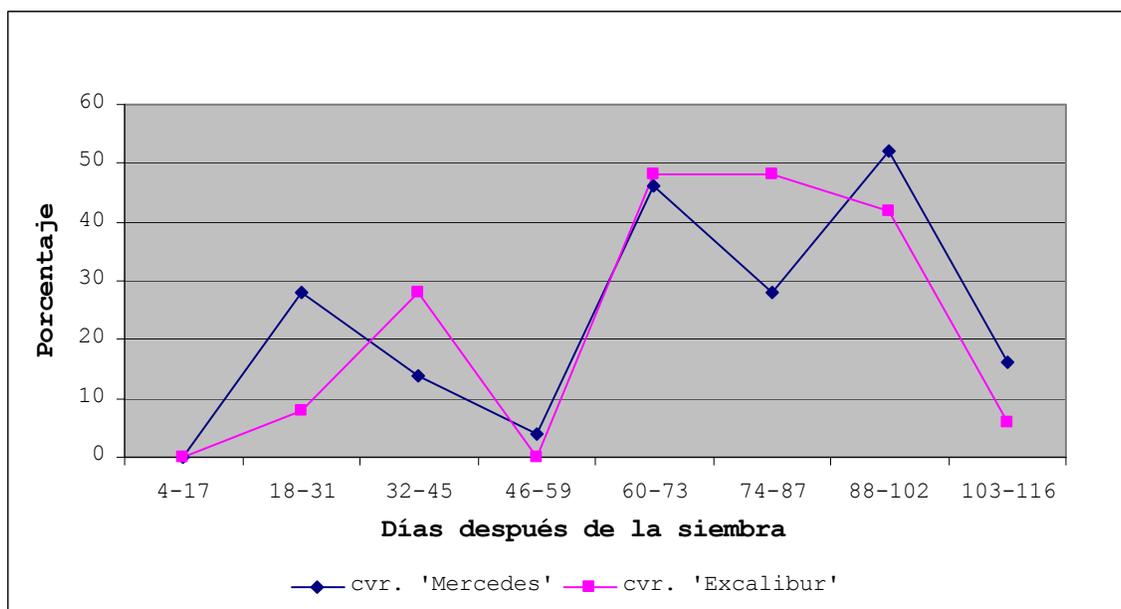


Figura 10. Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla de predios comerciales entre los 4-116 DDS.

Tabla 5. Temperatura (°C), humedad relativa y precipitación durante los diferentes muestreos en predios comerciales.

DDS¹	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)	Precipitación (cm)
2 enero (4-7)	26.29	77.78	0
16 enero (18-31)	25.71	76.73	0
30 enero (32-45)	24.46	77.43	0.14
12 febrero (46-59)	24.45	68.39	0
26 febrero (60-73)	25.09	88.38	0
12 marzo (74-87)	25.44	74.08	0
26 marzo (88-100)	23.84	84.27	0.29
9 abril (103-116)	26.13	81.13	0.29
Promedio	25.18	78.52	0.09

¹Días después de la siembra 2004.

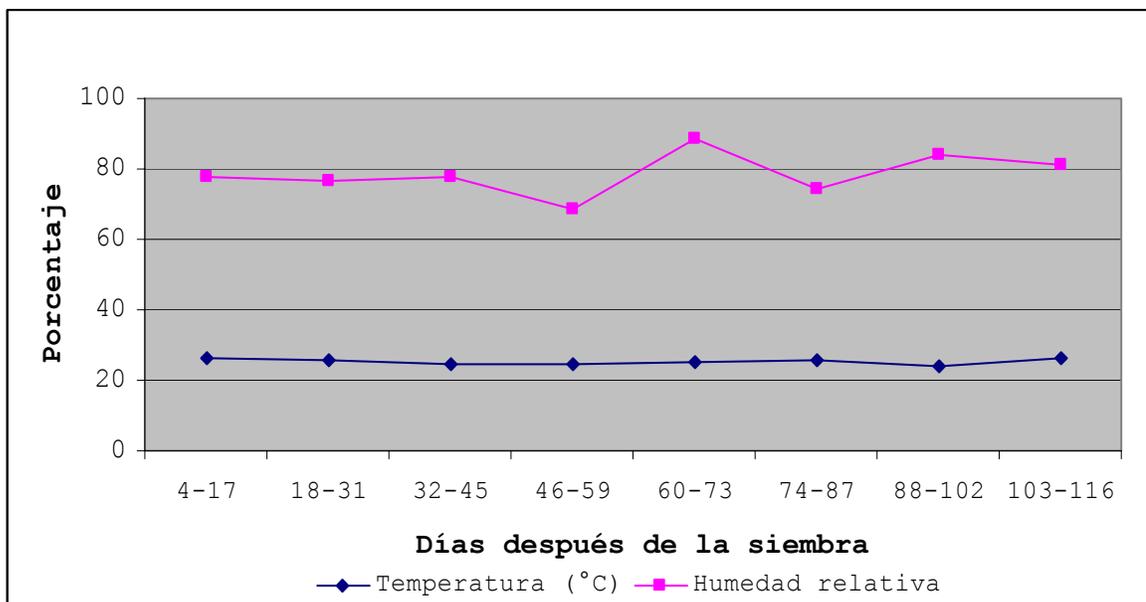


Figura 11. Cambios en la humedad relativa y temperatura promedio durante el desarrollo del cultivo de cebolla de fincas comerciales en el área sur de la isla entre los 4-116 DDS.

Predios experimentales

En el predio experimental observamos que *Alternaria* sp. no estaba presente en los primeros tres muestreos o sea de 4 a 45 DDS (Tabla 6). Ésta comenzó a parecer en las muestras para el cuarto muestreo (46-59 DDS) para ambos cultivares ('Excalibur' y 'Mercedes'). A medida que la planta avanza en edad, la incidencia del hongo aumenta en las muestras. La incidencia en los predios experimentales comparada con los predios comerciales fue menor, con un 33% y 25% en los cultivares 'Mercedes' y 'Excalibur' respectivamente (Figura 12). Al analizar los datos, se observó una mayor incidencia del hongo en los predios con el tratamiento 1 (control) comparado con el tratamiento 2 (con fungicidas) (Tabla 7). La incidencia de *Alternaria* en el grupo control fue de 67% y 50% para los cultivares 'Mercedes' y 'Excalibir', respectivamente (Figura 13). Sin embargo, en el grupo tratado con fungicidas, se observó una incidencia menor del hongo con 33% y 17% para 'Mercedes' y 'Excalibur', respectivamente (Figura 14).

Tabla 6. Porcentaje de incidencia de *Alternaria* durante las diferentes etapas del ciclo vida de cebolla en predios experimentales en la Finca Destino, Santa Isabel.

DDS ¹	Cultivares de cebolla			
	Mercedes		Excalibur	
	Cp ²	%	Cp	%
4-17	0	0	0	0
18-31	0	0	0	8
32-45	0	0	0	0
46-59	1	8	3	25
60-73	2	17	2	17
74-87	4	33	2	17

¹Días después de la siembra, 2004.

²Cp Colonias de *Alternaria* presentes en 12 muestras colectadas.

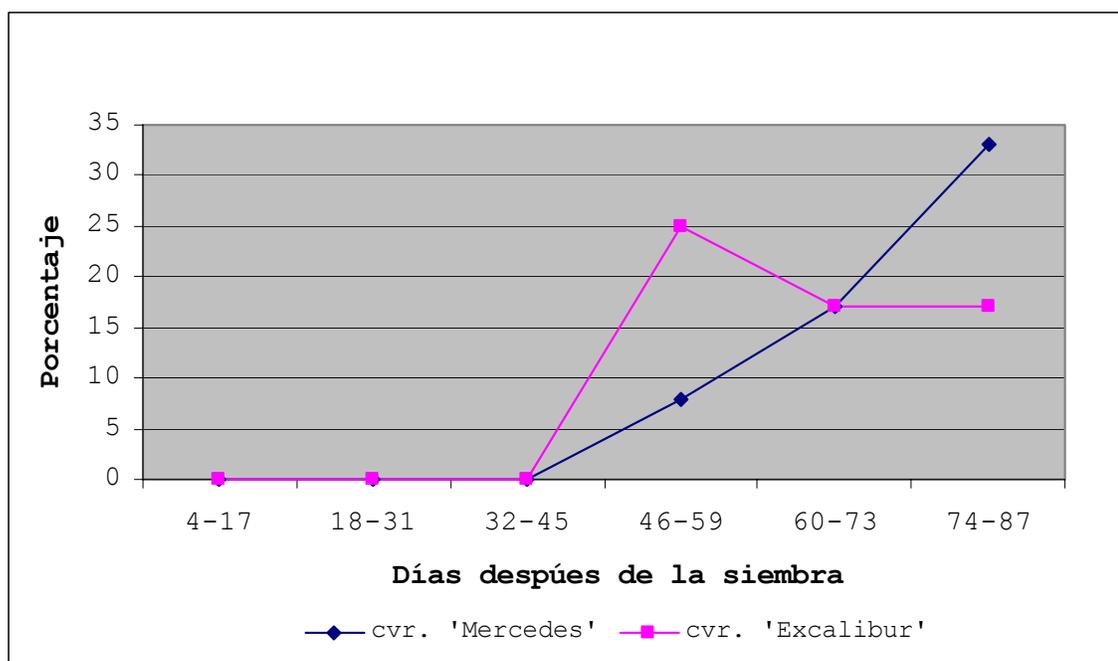


Figura 12. Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de *Alternaria* spp. en los cultivos de cebollas de predios experimentales entre los 4-87 DDS.

Tabla 7. Porcentaje en la incidencia de *Alternaria* en predios experimentales de cebolla de los cvs. 'Mercedes' y 'Excalibur' bajo tratamientos con o sin fungicidas (iprodione).

DDS ¹	Tratamientos			
	Control		Fungicida ³	
	M ²	E	M	E
4-17	0	0	0	0
18-31	0	0	0	0
32-45	0	0	0	0
46-59	1	3	0	1
60-73	1	1	1	0
74-87	4	1	2	0
Total^d	6	5	3	1

¹Días después de la siembra. Muestreos durante los meses de marzo a mayo, 2004.

²M: cultivar 'Mercedes' y E: cultivar 'Excalibur'.

³El fungicida utilizado es iprodione (Rovral).

⁴Total de colonias de *Alternaria* presentes en 6 muestras colectadas para cada tratamiento.

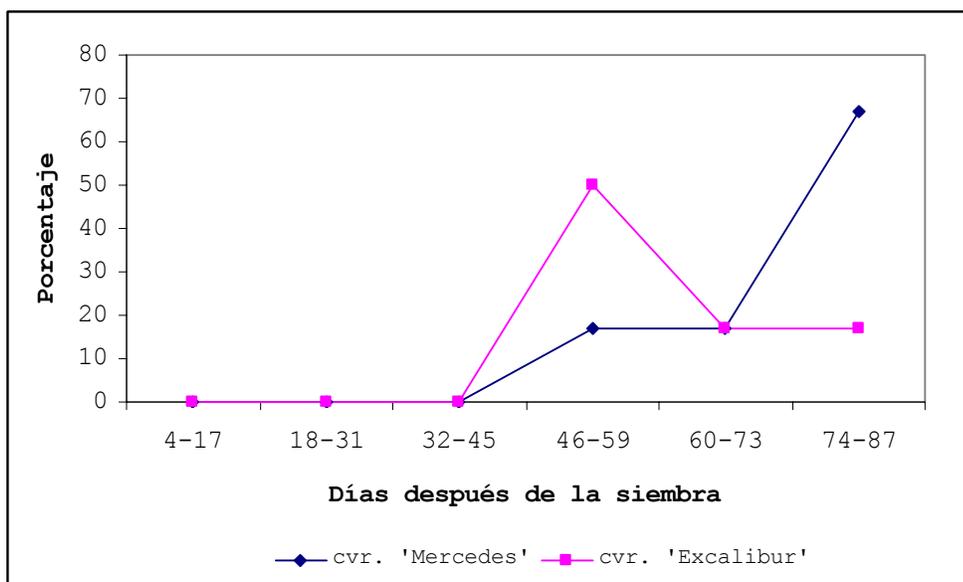


Figura 13. Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de *Alternaria* spp. en predios experimentales de cebolla de bajo tratamiento sin fungicida (control) entre los 4-87 DDS.

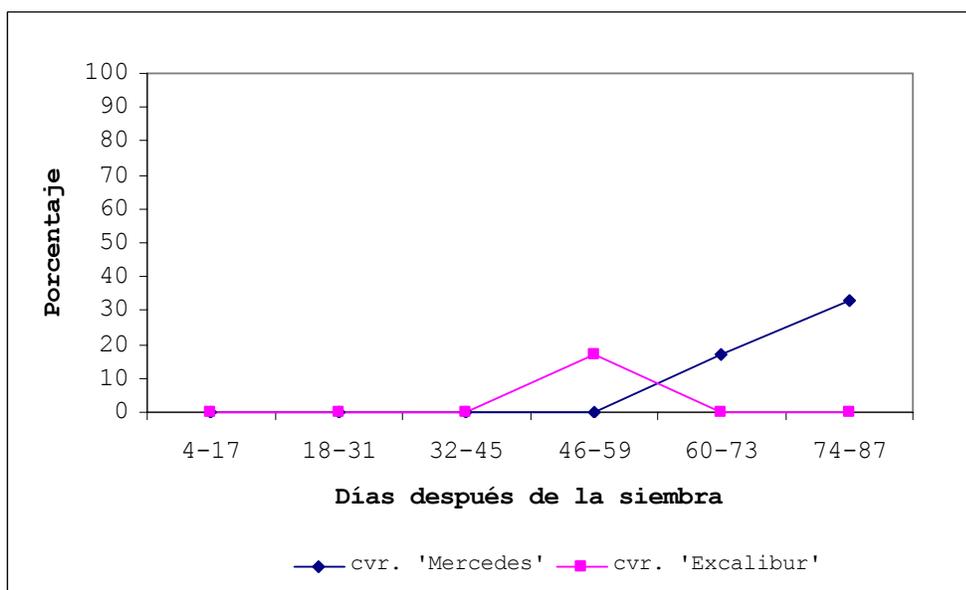


Figura 14. Fluctuaciones del porcentaje en la incidencia de *Alternaria* spp. en predios experimentales de cebolla de bajo tratamiento con fungicida (iprodione) entre los 4-87 DDS.

Descripción de las lesiones foliares

Las lesiones foliares más comunes que se observaron en los cultivos de cebollas se caracterizaron por tener una forma elíptica alargada con un centro necrótico y un halo clorótico. Algunas de las lesiones eran de color púrpura y otras de color marrón oscuro a negro o ambos colores en la lesión (Figura 15A,B). Estas lesiones, causan el doblez de las hojas, impidiendo que la planta se desarrolle adecuadamente (Figura 15E,F). Muchas de éstas lesiones eran similares a las causadas por la *A. porri* en la cebolla según descrito anteriormente por varios autores (Schwartz and Mohan, 1995, Nolla, 1927, Skiles, 1953). Las primeras lesiones foliares se comenzaron a observar en los predios comerciales y experimentales a los 60 a 70 DDS. Al analizar éstas bajo un microscopio de disección, se encontraron conidios del género *Alternaria* con conidióforos emergiendo del tejido infectado. Se observaron en los predios comerciales daños causados por los minadores y herbicidas causando lesiones similares (Figura 15C,D). Al evaluar estas lesiones encontramos a *Alternaria* spp. creciendo y formando lesiones típicas en los tejidos afectados.

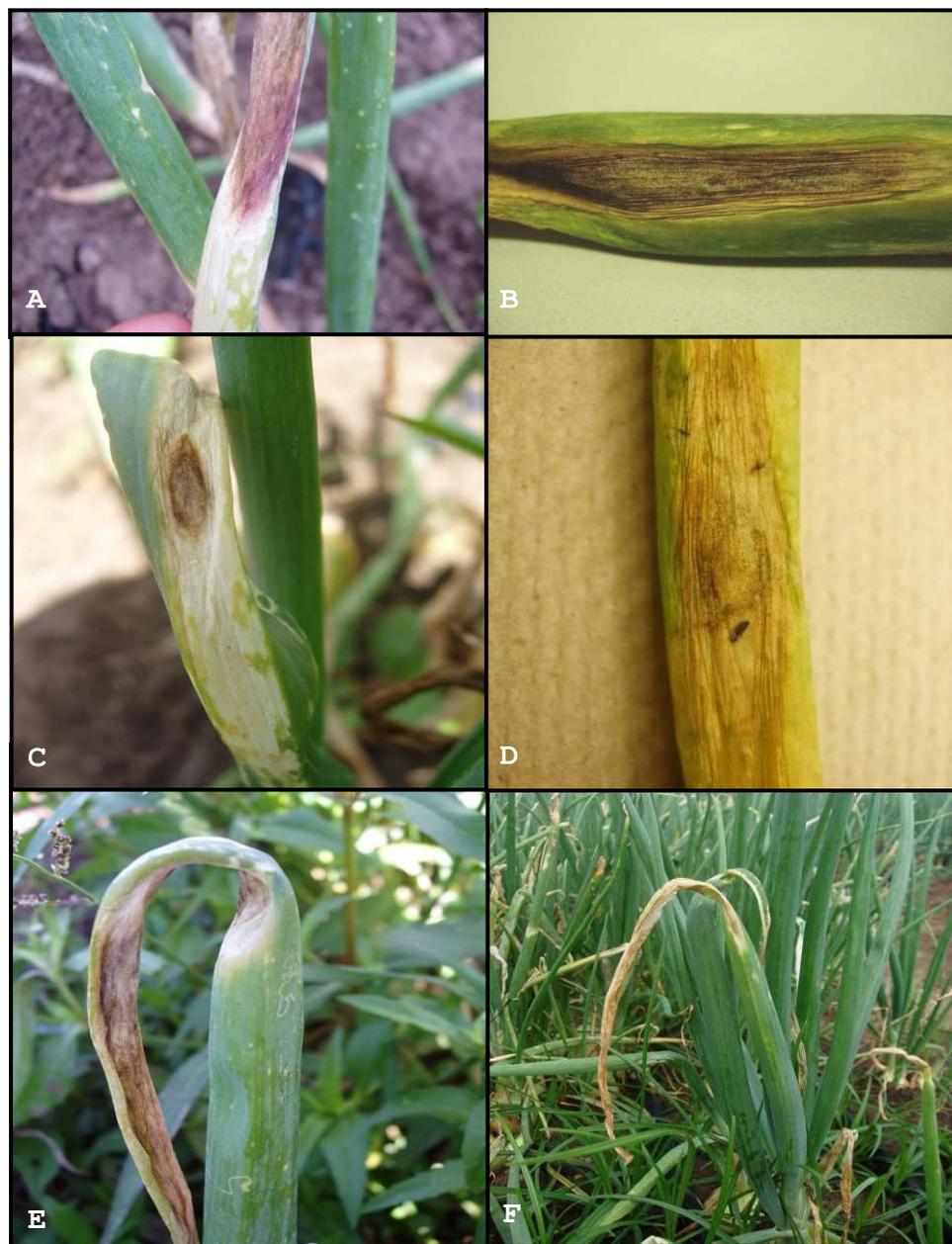


Figura 15. Lesiones comunes en los cultivos de cebollas en predios comerciales de la zona sur de PR. Lesión de color púrpura y marrón (A,B); *Alternaria* sp. creciendo en daño causado por minador y herbicida (C,D); doblez de la hoja causado por *Alternaria* en la planta de cebolla (E,F).

En los predios experimentales las primeras lesiones se observaron sobre las hojas para el cuarto muestreo (40-59 DDS) en plantas de aproximadamente 60 DDS. Las lesiones eran alargadas de color marrón rojizo con centro púrpura y otras de color marrón oscuro (Figura 16A,B,C). En el tejido infectado observamos esporulación de *Alternaria* spp. Además, observamos lesiones similares a las causadas por *Stemphylium* sp., el cual fue aislado en medio de cultivo (Figura 16D). Estas lesiones son elongadas, elípticas, inicialmente pequeñas y luego de color marrón con bordes púrpuras. También se observaron lesiones causadas por *Alternaria* spp. desarrollándose en plantas con daños causados por los minadores (*Liriomyza* sp.) (Figura 16E).

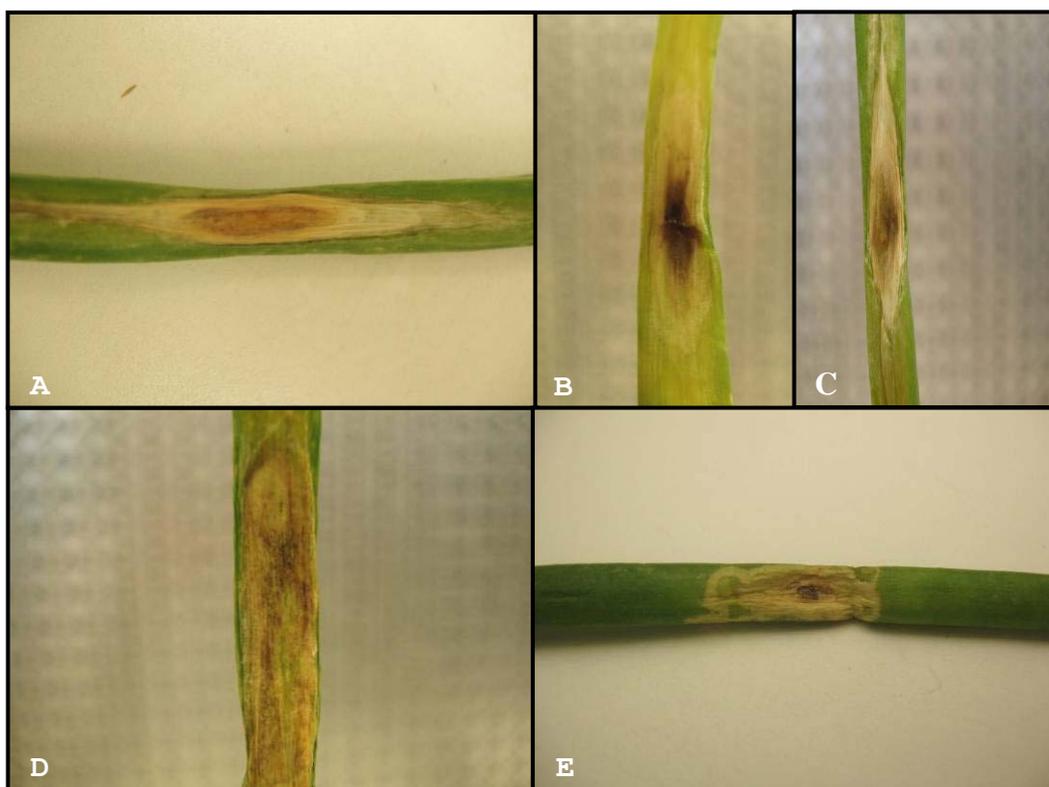


Figura 16. Lesiones típicas de *Alternaria* en predios experimentales. Lesiones rojizas y púrpuras (A,B); lesión marrón (C); lesión parecida a la causada por *Stemphylium* sp. (D); *Alternaria* en daño causado por el minador (E).

Aislación e identificación de especies de *Alternaria*

Se obtuvo un total de 280 aislados del género *Alternaria* asociados a lesiones foliares en el cultivo de cebollas en el sur de Puerto Rico. Del total de aislados 35 fueron seleccionados como aislados tipo para componer un grupo representativo (Tabla 8). Emory G. Simmons, (com. personal, 2004) agrupó parte de estos 35 aislados en grupos de especies de *Alternaria* basado en sus características microscópicas. Los grupos de especies que se identificaron son: *Alternaria destruens* E. G. Simmons, *A. tenuissima*, *A. palandui* C. R. Ayyangar y *A. porri* o *A. alli*. Alrededor de un 62% de los aislados representativos se colocaron bajo el grupo "semi-arborescentes", un grupo no descrito taxonómicamente. Los aislados Alt34 y Alt35 no esporularon y por lo tanto no se caracterizaron microscópicamente. Por el crecimiento de la colonia y la pigmentación en el medio se infiere que sea una colonia de *A. porri* o *A. alli*. Para la caracterización de morfológica, patogénica y genética estos aislados utilizaremos el nombre de *A. alli* ya que es la única especie reportada por Nolla (1927) en los cultivos de cebolla en Puerto Rico.

Tabla 8. Aislados tipo de *Alternaria* obtenidos de cultivos de cebolla de los cultivares 'Mercedes' y 'Excalibur'.

Aislado	Grupo¹	Cultivar	Localidad
Alt 1	<i>A. destruens</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 2	<i>A. destruens</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 3	<i>A. tenuissima</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 4	<i>A. tenuissima</i>	Mercedes	Juana Díaz
Alt 5	<i>A. tenuissima</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 6*	<i>A. tenuissima</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 7*	<i>A. tenuissima</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 8	<i>A. palandui</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 9	<i>A. palandui</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 10	<i>A. palandui</i>	Mercedes	Juana Díaz
Alt 11	<i>A. palandui</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 12	<i>A. palandui</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 13	<i>A. palandui</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 14	<i>A. palandui</i>	Excalibur	Juana Díaz
Alt 15	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 16	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 17	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 18	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 19	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 20	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 21	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 22	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 23	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 24	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 25	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 26	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 27*	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 28	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 29	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 30	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Juana Díaz
Alt 31	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 32	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Mercedes	Santa Isabel
Alt 33	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	Excalibur	Santa Isabel
Alt 34*	<i>A. porri</i> o <i>alli</i>	Excalibur	Juana Díaz
Alt 35*	<i>A. porri</i> o <i>alli</i>	Mercedes	Juana Díaz
Riv-St1*	<i>Pleospora eturmiuna</i>	Excalibur	Juana Díaz

¹Identificación confirmada por Dr. E. Simmons (Com. personal, 2004).

*Aislados patogénicos

Los aislados de *A. destruens* y *A. palandui* son especies que no se han reportado asociadas a los cultivos de cebolla en el área del Caribe. *Alternaria palandui* se reportó por primera vez en India por Ayyangar (1928) afectando el área foliar de la cebolla del cultivar 'Bellary'. Desde ese momento no se ha reportado en el oriente asociada a los cultivos de cebollas. Sin embargo, *A. destruens* fue reportada y caracterizada por primera vez por Simmons (1986) afectando severamente a una planta parasítica conocida como *Cuscuta gronovii* Willd en Rochester, Massachusetts. También, se obtuvieron cuatro aislados de *Stemphylium* de lesiones similares a las que desarrolla *A. porri* en cebolla a nivel mundial. Éstos fueron clasificados por Simmons dentro del grupo de especies de *Stemphylium eturmiunum* E. G. Simmons descritas como patógenas de tomate (Simmons , 2001). Luego de 7 días, *S. eturmiunum* produjo su estado sexual en medio de PCA. El teleomorfo de *S. eturmiunum* es *Pleospora eturmiuna* E. G. Simmons. Éste presenta un ascocarpo (ascomata) que desarrolla ascas bitunicadas con ascosporas multicelulares pigmentadas. Todos los aislados de *Stemphylium* obtenidos se agruparon dentro de esta especie. Este grupo no ha sido reportado causando lesiones foliares en las plantas de

cebolla. A todos los aislados representativos se midieron los conidios, se contó el número de septos y para las especies de *Alternaria* se consideró el número de conidios por catenulación (Tabla 9). En base a estas características morfológicas se desarrolló una clave dicótoma para identificar las especies encontradas asociadas a la cebolla (Tabla 10). Además, se identificaron otros hongos asociados al follaje de la cebolla: *Penicillium* sp., *Helminthosporium* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Verticillium* sp. y *Glomerella cingulata*.

Tabla 9. Características morfológicas de diferentes grupos de especies de *Alternaria* aisladas de lesiones foliares en plantas de cebolla.

Grupo de especies	Catenulación ¹	Num. Septos ²		Tamaño de los Conidios ³ (µm)			
				L		A	
				T	L- (O)	I	P
<i>Alternaria destruens</i>	4-8	3-6	0-2	(22-55)	36	(10-15)	11
<i>A. tenuissima</i>	6-13	4-8	0-2	(32-76)	56	(10-18)	13
<i>A. palandui</i>	5-12	3-8	0-2	(25-75)	55	(8-12)	10
<i>A. "semi-arborescentes"</i>	4-10	4-8	0-3	(35-68)	47	(10-16)	12
<i>A. tenuissima</i> ⁴	6-10	4-8	0-3	(22-68)	55	(10-16)	12
<i>A. arborescens</i> ⁵	4-6	2-4	0-1	(17-27)	21	(8-11)	10
<i>A. alli</i> ⁶	N/A	N/A		N/A		N/A	

¹Catenulación producida en PCA.

²Número de septos transversales (T), longitudinales (L) u oblicuos (O).

³Todas las medidas están dadas en micrometros (µm). I:intervalo y P: promedio.

⁴Aislado patogénico

⁵Aislado EGS39-128 de E. G. Simmons.

⁶Este aislado no formó conidios.

Tabla 10. Clave dicótoma utilizada para clasificar diferentes grupos de especies de *Alternaria* aisladas del follaje de cebolla. Está basada en el crecimiento de los aislados en medios de cultivos y a sus características morfológicas

-
- 1a La colonia produce pigmentación anaranjada y amarilla en los medios de PDA y DRYES, el micelio es color anaranjado con el centro verde oscuro.....*Alternaria alli*.
- 1b La colonia no produce pigmentación anaranjada y amarilla en los medios de PDA y DRYES, el micelio es color grisáceos a verde oliváceos.....2
- 2a La esporulación de los conidios en medio de PCA es de manera arbórea, formando muchas ramificaciones secundarias y terciarias con cadenas secundarias de 3-5 conidios.....A. "semi-arborescentes"
- 2b La esporulación de los conidios en medio de PCA no es de manera arbórea, forman pocas o ningunas ramificaciones secundarias y nunca terciarias con cadenas secundarias de 3-5 conidios.....3
- 3a Conidióforos secundarios largos (5-80 μm) dándole apariencia de cuello largo a los conidios, los conidios miden entre 22-55 (36) μm de largo en medio de PCA.....A. *destruens*
- 3b Conidióforos secundarios simples y los conidios pueden medir entre 32-75 (56) μm de largo en medio de PCA.....4
- 4a Conidios marrón oscuro rojizos con muchos septos transversales oscuros bien marcados y muy pocas veces longitudinales, posee un cuello simple el cual se va atenuando a medida que se acerca al ápice donde es más filiforme.....A. *palandui*
- 4b Conidios marrón claro con pocos septos transversales oscuros bien marcados y longitudinales, algunos conidios poseen un cuello corto o largo el cual se va atenuando hasta que llega al ápice donde es más globoso.....A. *tenuissima*
-

Identificación Morfológica

Los grupos de especies de *Alternaria* identificados por E. Simmons se caracterizaron macroscópicamente por el color de la colonia en diferentes medios de cultivos (Tabla 11). Los colores de la colonia en V8 varían entre marrón rojizo, verde oscuro con áreas rosadas a crema. En el medio CZAPEK DOX la mayoría de los aislados tuvieron un crecimiento rápido y el color de la colonia marrón oscuro. El PCA y CMA son medios que promueven la esporulación. En éstos no se observó mucha diferencia en el color, sólo en el desarrollo de micelio aéreo. En el medio OA la mayoría de los aislados formaron colonias verde grisáceo claro a oscuro. El aislado del grupo de *A. alli* presentó un color rosado en la superficie de la colonia en los medios de V8 y CZAPEK DOX. En el medio DRYES los colores variaron según los aislados (Tabla 11).

Tabla 11. Caracterización morfológica del color y crecimiento micelial de los grupos de especies de *Alternaria* utilizando diferentes medios de cultivos.

Aislados	Medios de Cultivos					
	V8	Czapek	OA	DRYES	PCA	CMA
<i>Alternaria palandui</i>	Colonia marrón rojizo con micelio crema aéreo	Colonia verde oliváceo oscuro con micelio aéreo grisáceo	Colonia verde grisáceo claro con micelio banco a crema aéreo	Colonia color crema arenosa	Colonia verde oliváceo oscuro, poco micelio	Colonia de poco micelio color marrón oscuro
<i>A. destruens</i>	Colonia marrón oscuro a negro sin micelio aéreo	Colonia inmersa al medio color marrón oscuro rojizo sin micelio aéreo	Colonia verde oliváceo bien oscuro sin micelio aéreo	Colonia color crema a amarillo claro con la superficie rosada.	Colonia con sólo conidios de color marrón ambar	Colonia con sólo conidios de color marrón claro
<i>A. tenuissima</i>	Colonia marrón rojizo con micelio aéreo crema y partes marrón	Colonia marrón a oliváceo oscuro con el centro crema a rosado	Colonia verde oliváceo oscuro	Colonia color ambar con áreas de color crema	Colonia color marrón (conidios)	Colonia con micelio aéreo marrón a crema
<i>A. tenuissima</i> Alt7 y Alt8	Colonia marrón claro a verde	Colonia verde grisáceo claro con el centro oscuro	Colonia verde claro con poco micelio aéreo de color banco	Colonia amarillo claro a marrón (ambar) con un borde banco	Colonia verde oscuro solo por la esporulación y un centro más oscuro	Colonia de poco micelio de color blanco a crema
<i>Alternaria</i> sp. "semi-arborescentes"	Color marrón inmerso al medio con micelio aéreo color gris claro	Gris claro con centro más oscuro	Color gris oscuro	Crema claro con margen blanco	Color marrón claro de los conidios	Poco micelio aéreo de color crema con el medio marrón en el centro
<i>A. alli</i>	Verde oscuro rojizo con poco micelio aéreo rosado, medio pigmentado	Verde oliváceo oscuro con micelio aéreo rosado	Verde claro con micelio gris cenizo	Amarillo con un verde oscuro, anillos concéntricos y margen verde claro	Poco micelio, verde claro	Poco micelio marrón oscuro

Grupo de *Alternaria palandui*

La colonia en CZAPEK DOX es color crema arenoso (Figura 17). La catenulación en PCA pueden ser de 5-12 conidios. Los conidios son marrón rojizo, elipsoidales, obclaviformes y a veces oblongadas, 25-75(55) x 8-12(10) μm con 3-8 septos transversales y de 0-2 septos longitudinales. Los septos transversales son septos bien marcados y oscuros que le proveen una pequeña contricción a las células (Figura 18 y 19). Los conidios poseen un cuello simple, que se va atenuando a medida que se acerca al ápice.

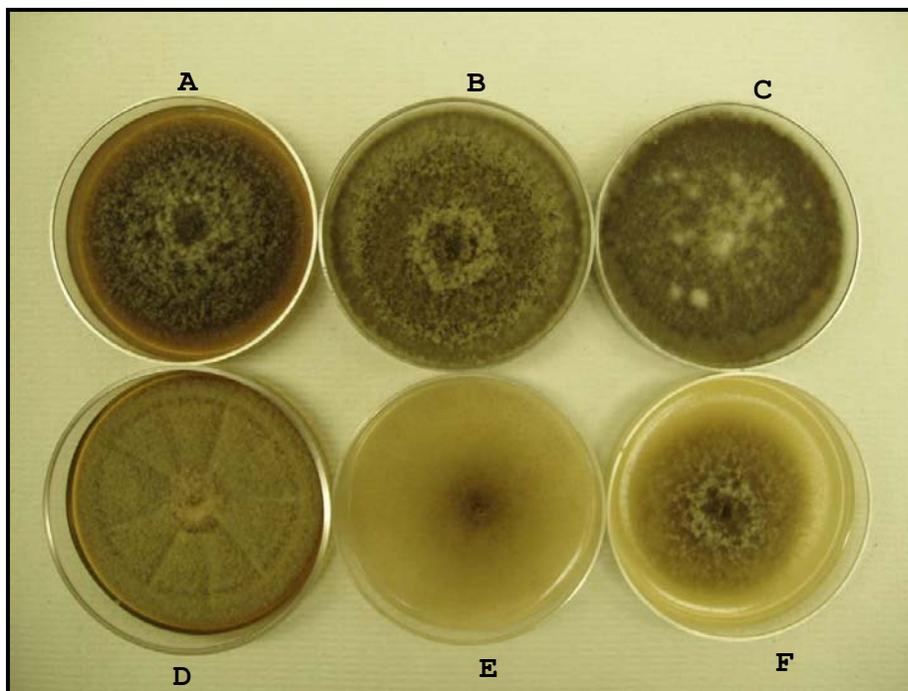


Figura 17. Grupo de especies de *Alternaria palandui*: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.



Figura 18. Conidios de *A. palandui* (Nomarski, 600X, 400X).

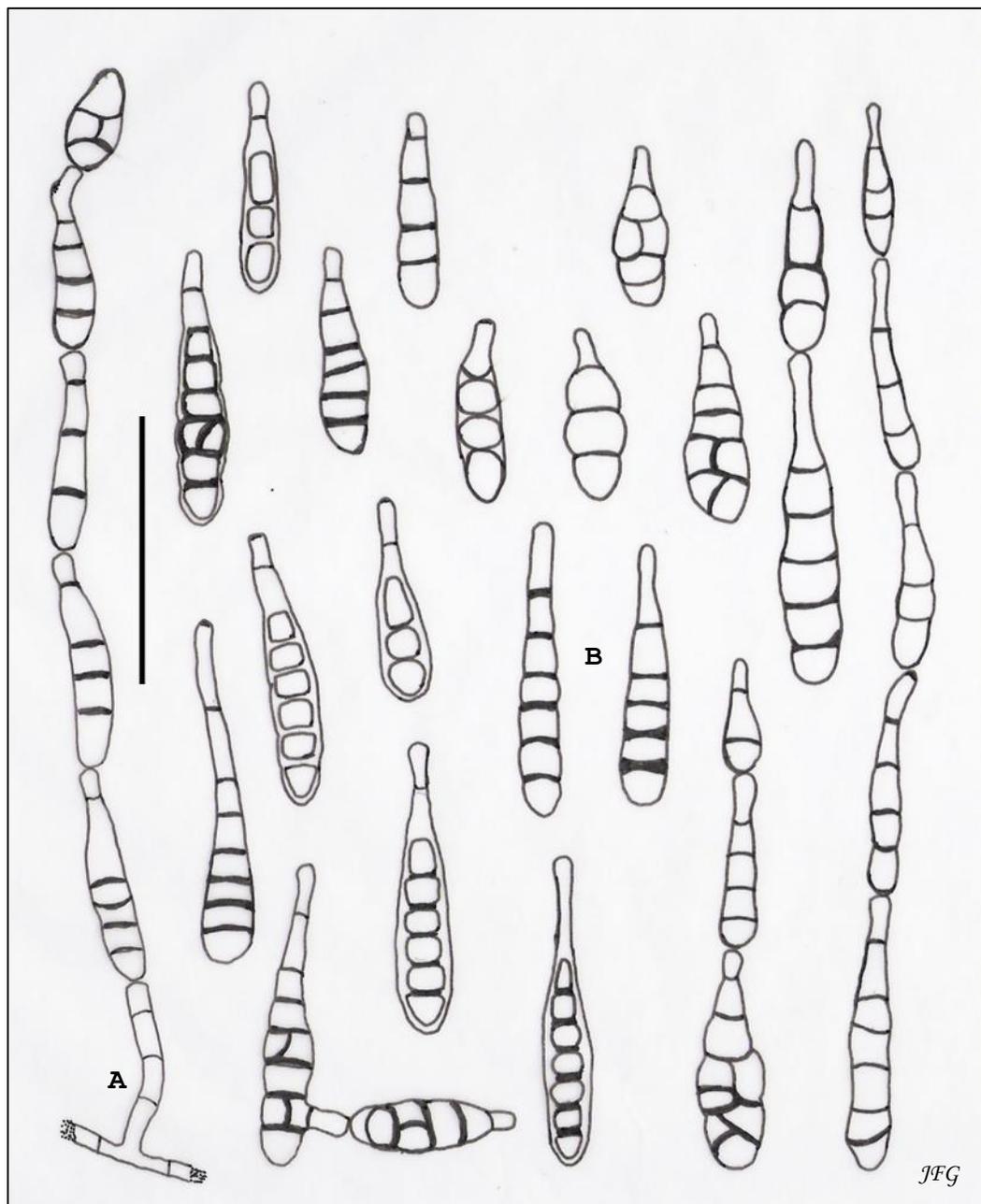


Figura 19. Grupo de especies de *A. palandui*. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50 μ m

Grupo de *Alternaria destruens*

La colonia en medio CZAPEK DOX es color crema a amarillo claro con parte de la superficie de ésta rosada (Figura 20). La catenulación en PCA puede ser de 4-8 conidios. Poseen conidióforos secundarios de 15-80 μm de largo que le dan la apariencia de cuello largo a los conidios (Figura 21 y 22). Los conidios son marrón claro, elipsoidales a ovoides, levemente ornamentadas, 22-55(36) x 10-15(11) μm con 3-6 septos transversales y de 1-2 longitudinales u oblicuos.



Figura 20. Grupo de especies de *Alternaria destruens*: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.

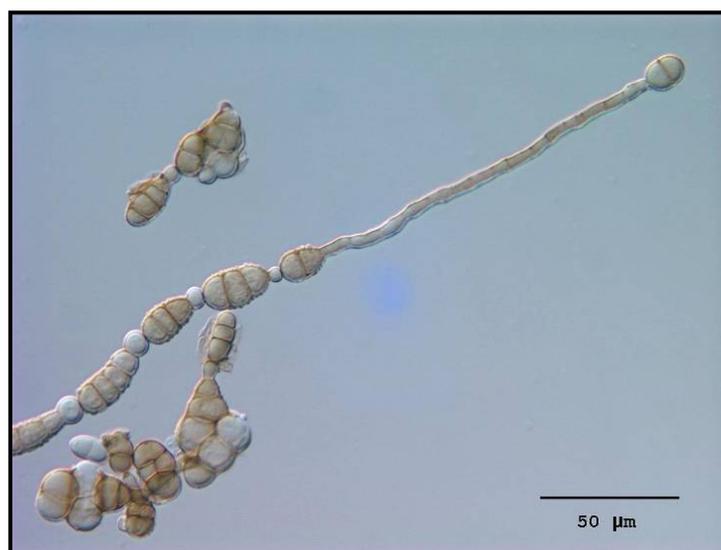


Figura 21. Cadenas de conidios del grupo de especies de *A. destruens* (Nomarski, 400X).

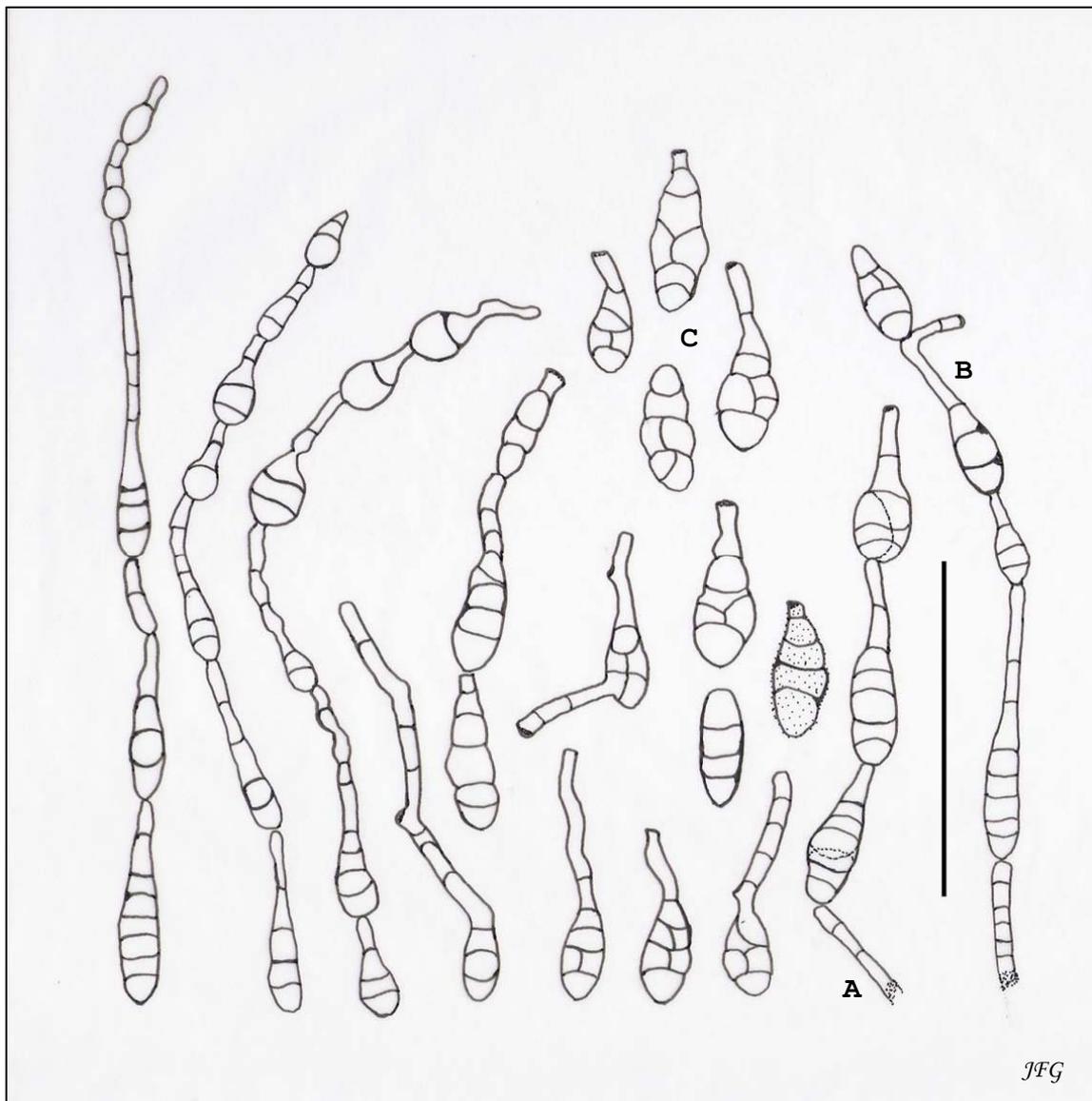


Figura 22. Grupo de especies de *A. destruens*. Conidios (A), conidióforos (B) y conidióforos secundarios (C) observados a los 5 a 7 días de crecimiento. Barra= 50 μ m

Grupo de *Alternaria tenuissima*

La colonia en medio CZAPEK DOX es color marrón rojizo o ambar (Figura 23). La catenulación en PCA pueden poseer de 6-12 conidios, son simples con pocas ramificaciones. Los conidios son derechos o curvos, marrón pardo, elipsoidales a obclavatos, poseen varias cicatrices en el ápice y en la base, levemente ornamentadas (puntados), 30-76(56) x 10-18(13) μm con 4-8 septos transversales y 1-3 longitudinales u oblicuos (Figura 24 y 25). Algunos septos transversales son más oscuros dándole una contricción central a los conidios.

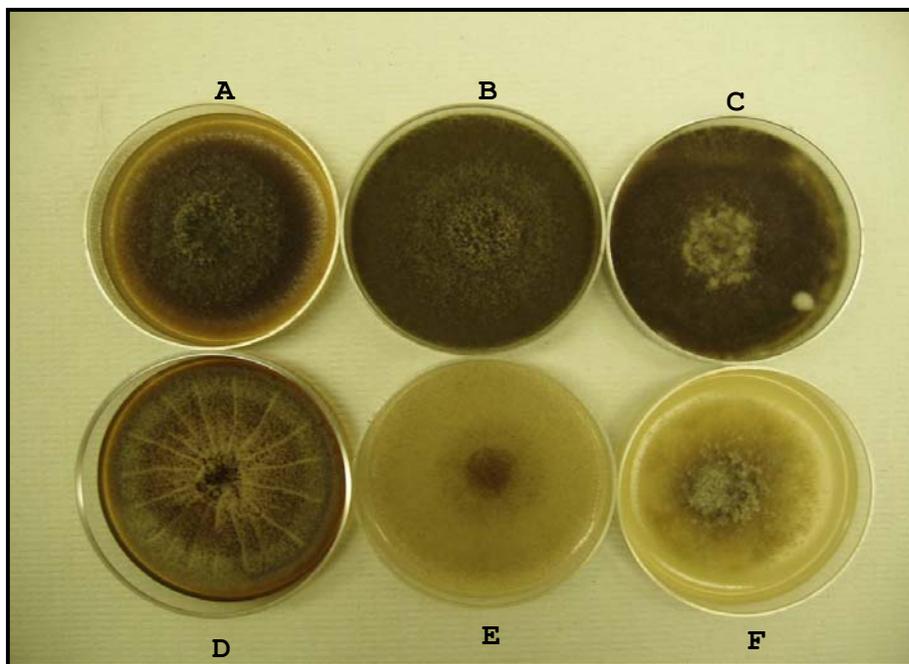


Figura 23. Grupo de especies de *Alternaria tenuissima*: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.



Figura 24. Conidios del grupo de especies de *A. tenuissima* (Nomarski, 400X).

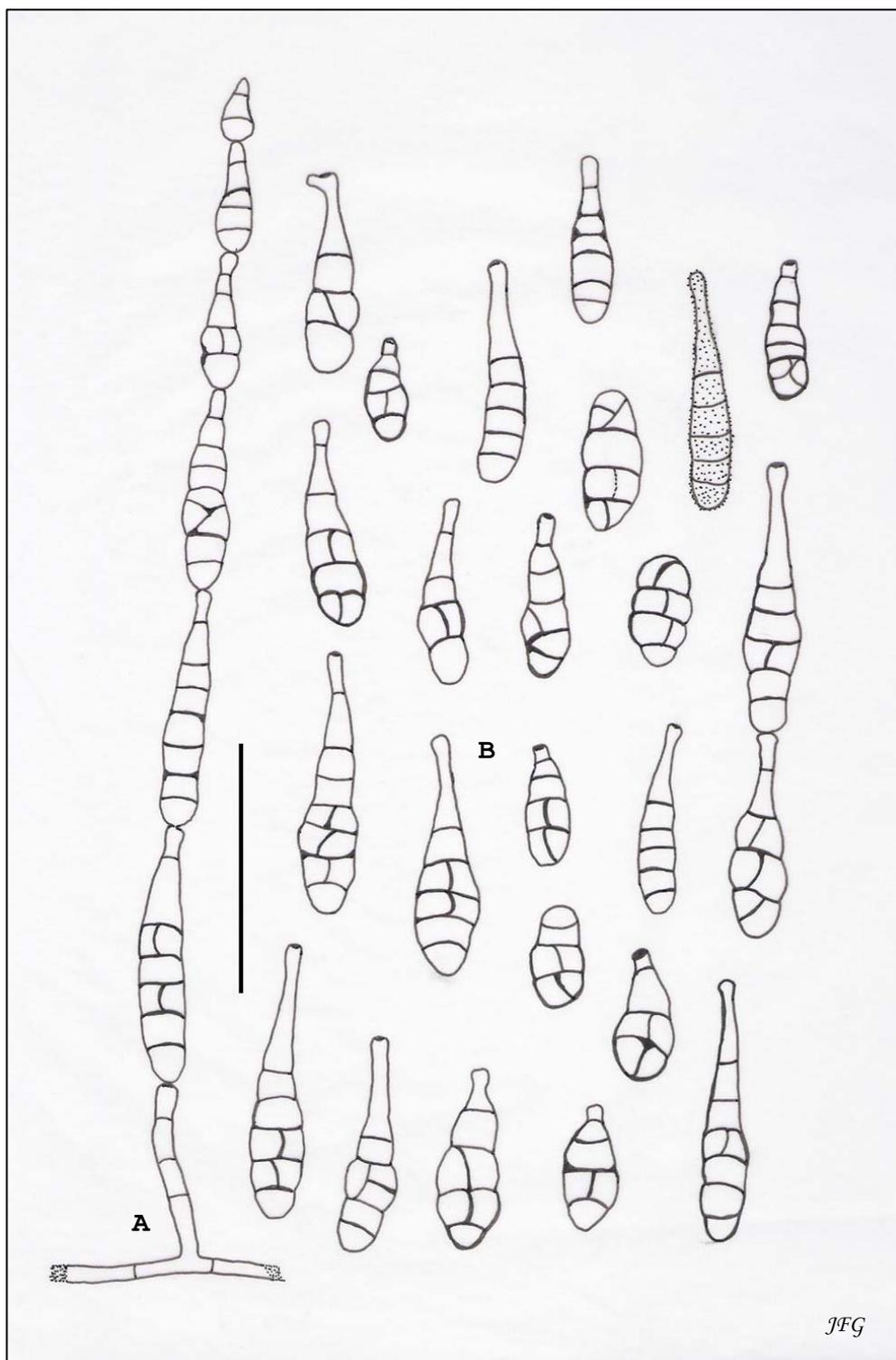


Figura 25. Grupo de especies de *A. tenuissima*. Conidios (A) y conidióforos (B) observados a los 5 a 7 días de crecimiento. Barra= 50 μ m

Grupo de *Alternaria tenuissima* Alt6 y Alt7

La colonia en medio CZAPEK DOX es color amarillo claro a marrón con el margen blanco (Figura 26). Este aislado posee características morfológicas parecidas al grupo anterior de *A. tenuissima* con algunas excepciones en las medidas de los conidios y la catenulación. La catenulación en PCA puede ser 6-10 conidios, simples de pocas ramificaciones. Los conidios son derechos o curvos, marrón pardo a amarillo con algunos septos más oscuros, elipsoidales a obclavatos, poseen cicatriz en el ápice y levemente ornamentadas (puntulados) (Figura 27 y 28). Miden 22-68(55) x 10-16(12) μm con 4-8 septos transversales y de 1-3 longitudinales u oblicuos y algunos septos transversales le dan contricción central a los conidios. Poseen un cuello corto que se va atenuando hasta que llega al ápice donde es más hinchado.

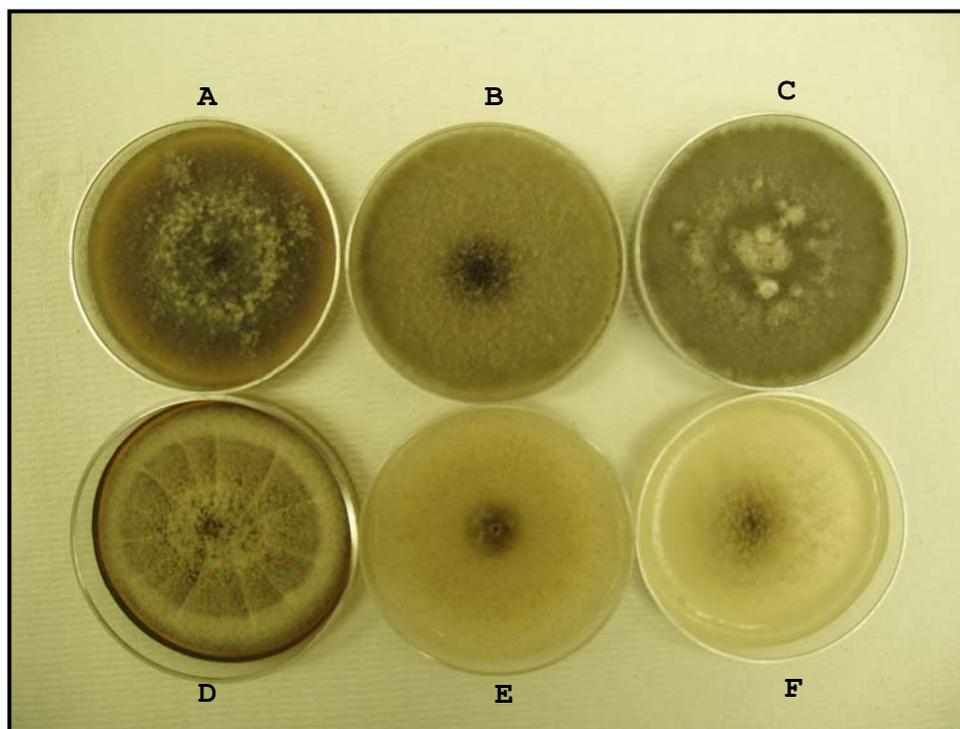


Figura 26. Grupo de especies de *Alternaria tenuissima* Alt6 y Alt7: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.

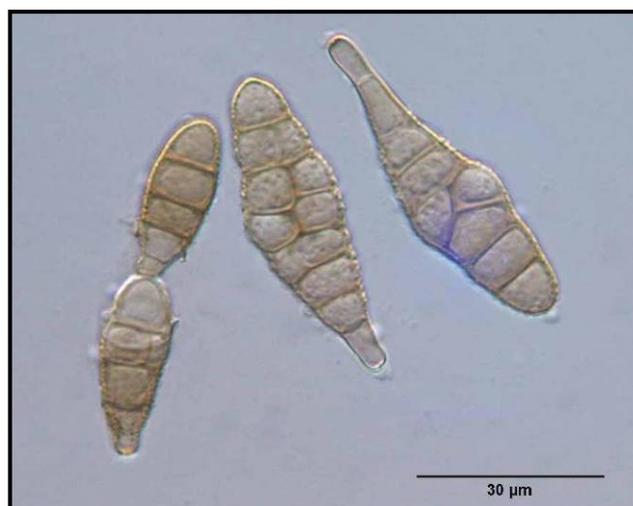


Figura 27. Conidos multicelulares de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7 (Nomarski, 1000X).

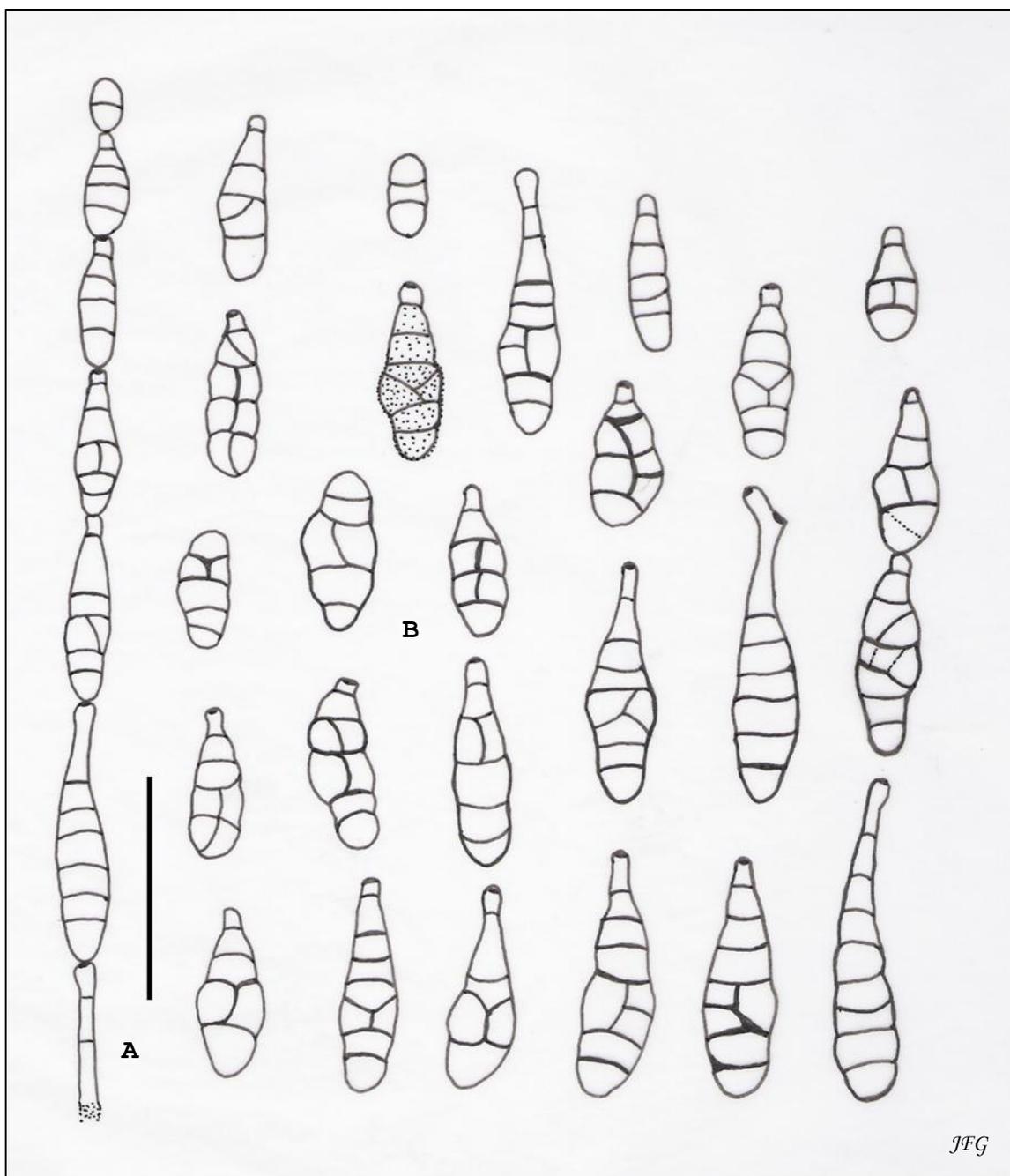


Figura 28. Grupo de especies de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50µm

Alternaria sp. "semi-arborescentes"

La colonia en medio CZAPEK DOX es crema claro con margen blanco (Figura 29). La catenulación en PCA puede ser 4-10 conidios con varias ramificaciones. Las cadenas en las ramificaciones tienen de 3-5 conidios. Posee conidióforos secundarios geniculados con un sitio conidiógeno en cada ángulo (Figura 30 y 31). Este aislado desarrolla los conidios de forma arborea con un conidióforo principal largo parecido a *A. arborescens*. Los conidios son marrón oscuro a bronceado, elipsoidales a ovoides, levemente ornementadas, (35-68)47 x (10-16)12 μm con 4-8 septos transversales y 0-3 longitudinales u oblicuos. Los septos le dan una contricción a los conidios.

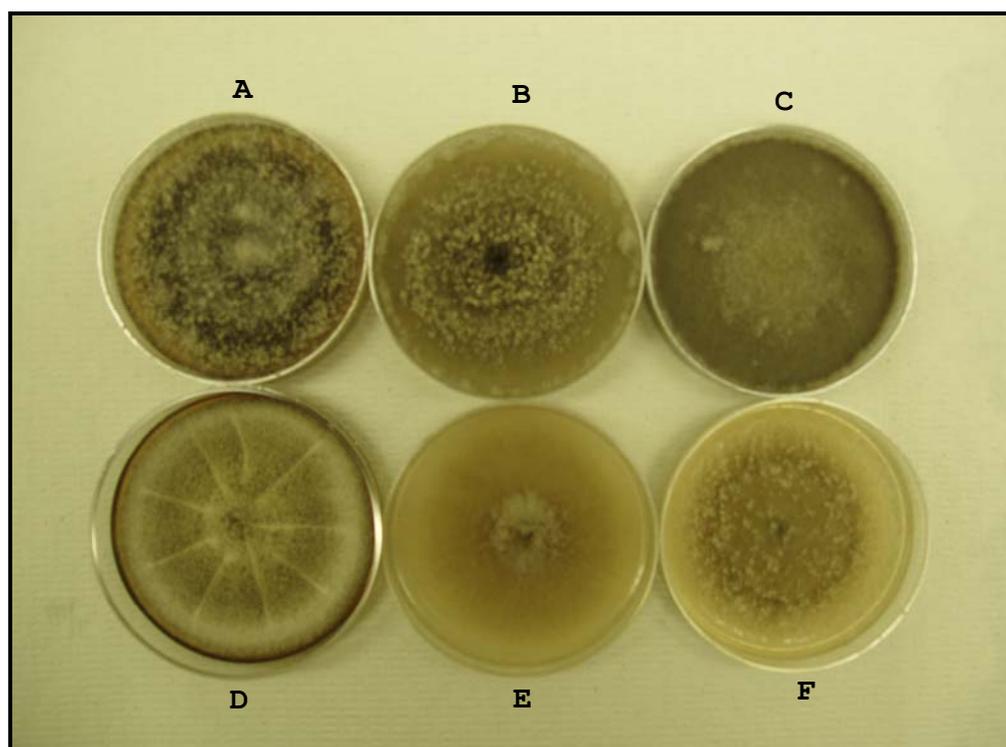


Figura 29. Grupo de especies de *Alternaria* sp.: Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.

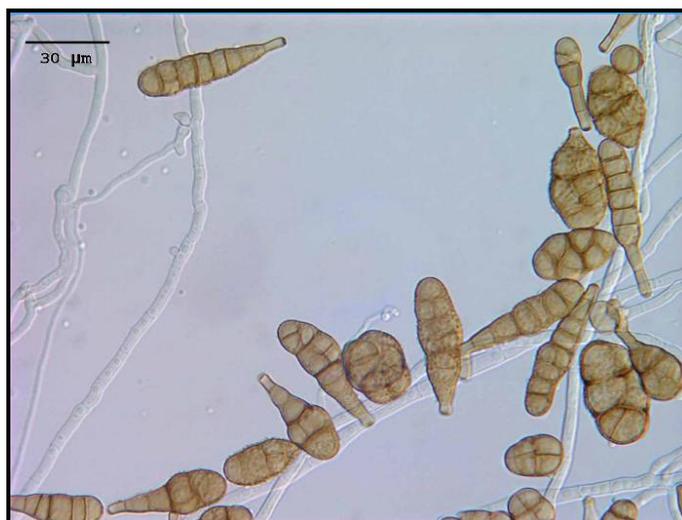


Figura 30. Conidios multicelulares de *Alternaria* sp. grupo no descrito (Nomarski, 400X).

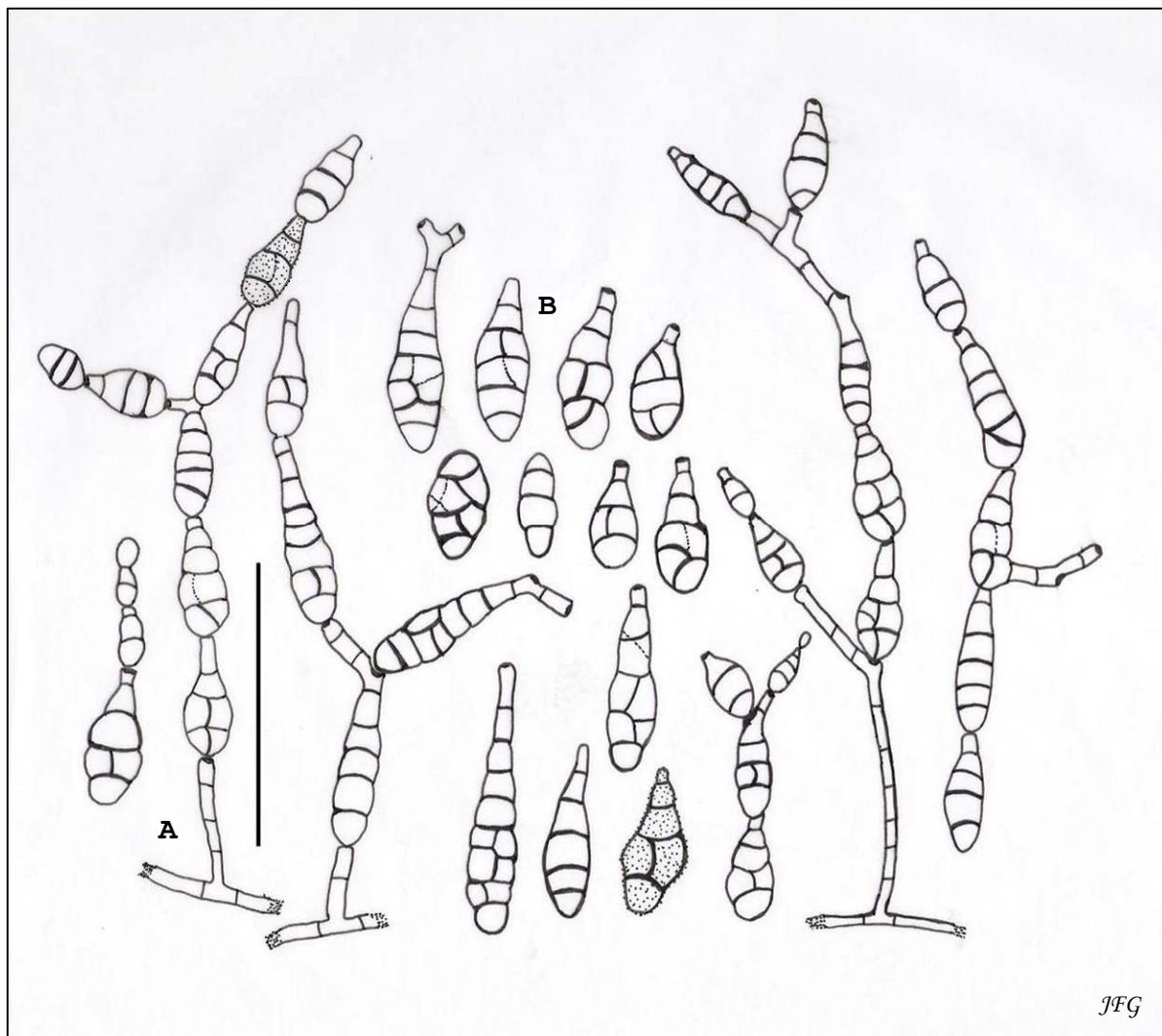


Figura 31. Grupo de especies de *Alternaria* sp. no descrito taxonómicamente. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50 μ m

Grupo de *Alternaria alli*

La colonia en CZAPEK DOX es color amarillo y verde oscuro, con anillos concéntricos y un margen verde claro (Figura 32). Este aislado a diferencia de los anteriores no esporuló en ningún medio de los que se utilizaron para la caracterización de color. Se observaron muy pocos conidios aislados directamente de la lesión pero no lo suficiente para realizar una descripción morfológica (Figura 33). Esta especie de *Alternaria* se caracteriza por producir pigmentación en los medios de PDA y V8. En PDA desarrolla el micelio un color verde oscuro con áreas alrededor de la colonia de color amarillo a anaranjado brillante (Figura 34). Conidios usualmente solitarios, derechos o curvos, obclavatos, elongados o elipsoidales antes del cuello largo, mide 100-300 x 15-20 μm con 8-12 septos transversales y de 0-2 longitudinales (Nolla, 1927, Ellis, 1971).

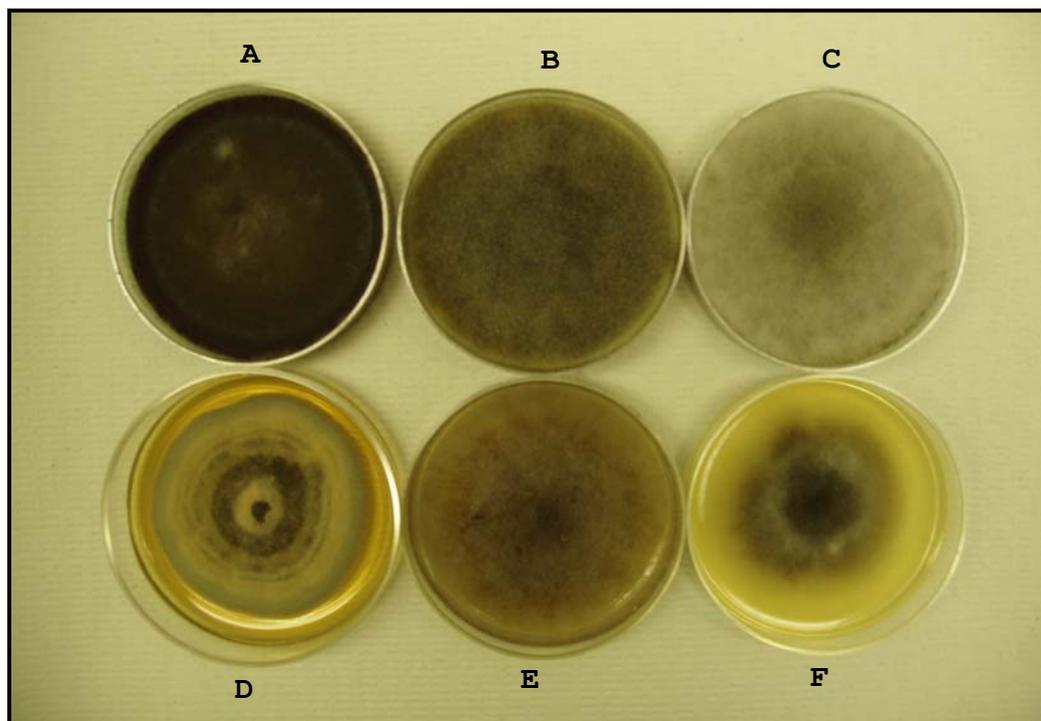


Figura 32. Grupo de especies de *Alternaria alli*. Caracterización del aislado en diferentes medios de cultivos por 7 días en periodos de luz y oscuridad. (A) Medio V8, (B) CZAPEK DOX, (C) Oatmeal agar, (D) DRYES, (E) PCA y (F) CMA.



Figura 33. Conidio del grupo de especies de *A. alli* (400X).

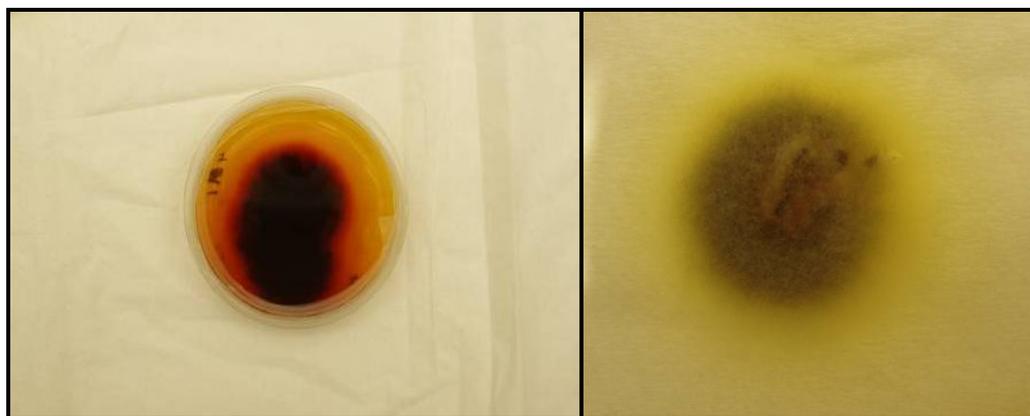


Figura 34. Grupo de especies de *A. alli*. Pigmentación amarillo a anaranjado en medio de cultivo (PDA).

Alternaria arborescens EGS39-128

Este aislados es de Emory G. Simmons. La esporulación ocurre de forma arborescente en donde consiste entre 50-125 conidios con un conidióforo primario que puede medir 200-300 μm de largo (Simmons, 1999). La catenulación en PCA es de 4-6 conidios por cadena y poseen muchas ramificaciones que pueden ser de 2-5 conidios. Posee conidióforos secundarios geniculados con un sitio conidiógeno (Figuras 35). Los conidios son marrón oscuro a bronceado claro, ovoides a elipsoidales, con ornamentaciones (puntulados a verrugosos), miden (17-27)21 x (8-11)10 μm con septos de 2-4 transversales y de 1-2 longitudinales u oblicuos (Figura 36 y 37). Los septos son oscuros y le proveen contricción a los conidios.



Figura 35. Conidios y conidióforos de *Alternaria arborescens* (Nomarski, 400X).

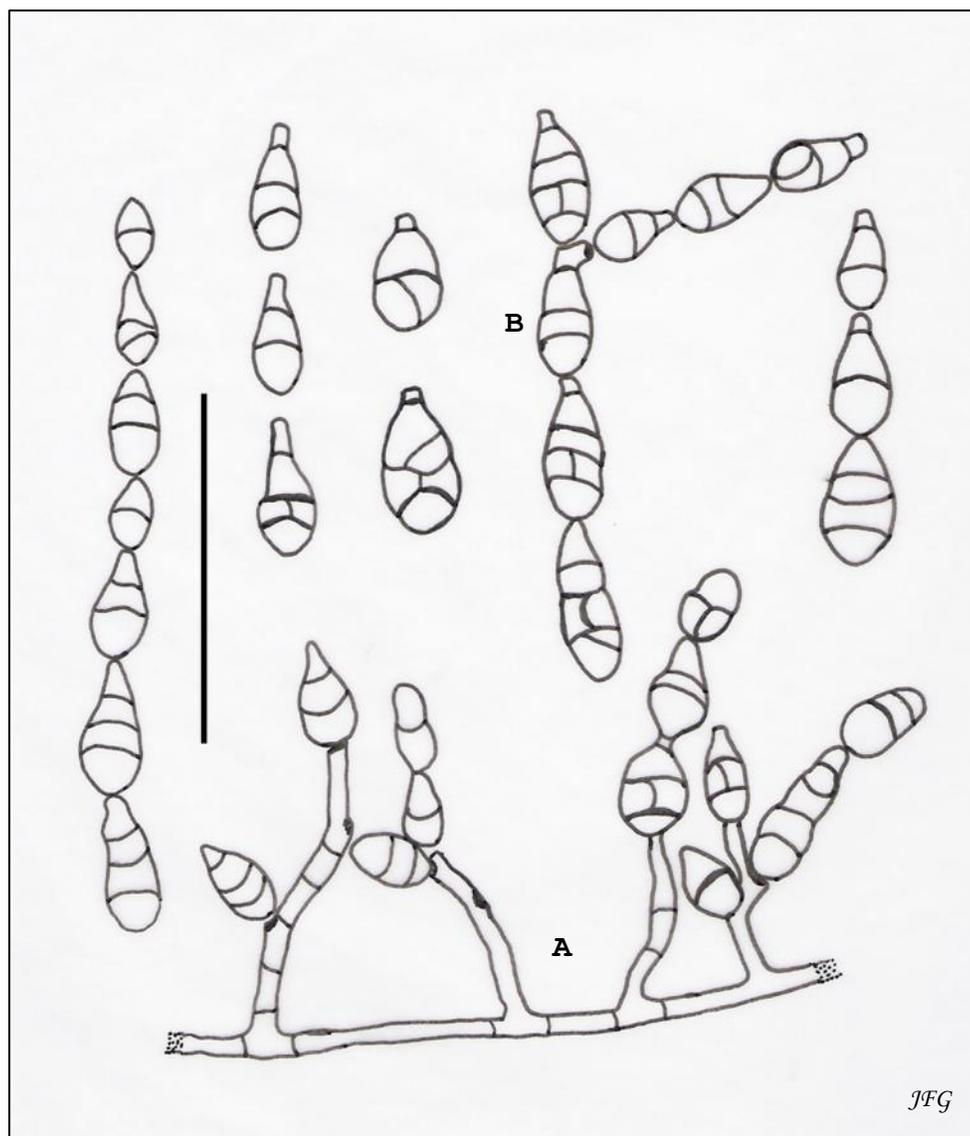


Figura 36. *A. arborescens* EGS39-128. Conidióforos (A) y conidios (B) en medio PCA de 5-7 días de crecimiento. Barra= 50 μ m

Grupo de *Pleospora eturmiuna*, teleomorfo de *Stemphylium eturmiunum*

Descripción en medio de PCA. Los ascocarpos se desarrollaron inmersos y superficialmente en el medio (Figura 37). En PCA, son marrón oscuro a negro, redondo a ovoide con hifas oscuras que los rodean (Figura 38A). Poseen un diámetro entre 200-300 μm aproximadamente. Las ascas son hialinas, bitunicadas largas de forma ovoide que miden entre 125-150 x 27 μm (Figura 38B,C). Poseen 8 ascosporas por ascas. Las ascosporas son pigmentadas de color marrón bronceado, ovoide a oblongadas, miden 25-30(30) x 10-12(11) μm (Figura 39A). Estas poseen de 5-8 septos transversales y de 1-2 septos longitudinales u oblicuos. Algunos septos transversales le dan una pequeña contricción a las esporas.

Su estado asexual es *Stemphylium eturmiunum* (Figura 38D). Éste se caracteriza por poseer conidióforos geniculados con un sólo conidio en el ápice. Los conidios son marrón claro, ovalados u oviodes, con ornamentaciones, miden 20-27(25) x 10-15(12) μm con 1-5 septos transversales y 1-2 septos longitudinales u oblicuos (Figura 39B). El septo transversal central le provee contricción a los conidios y es bien oscuro.

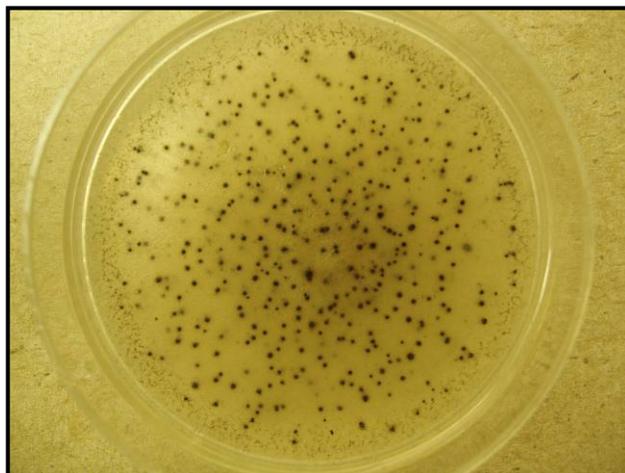


Figura 37. Aislado de *Pleospora eturmiuna*. Ascocarpos desarrollándose en medio de PCA.

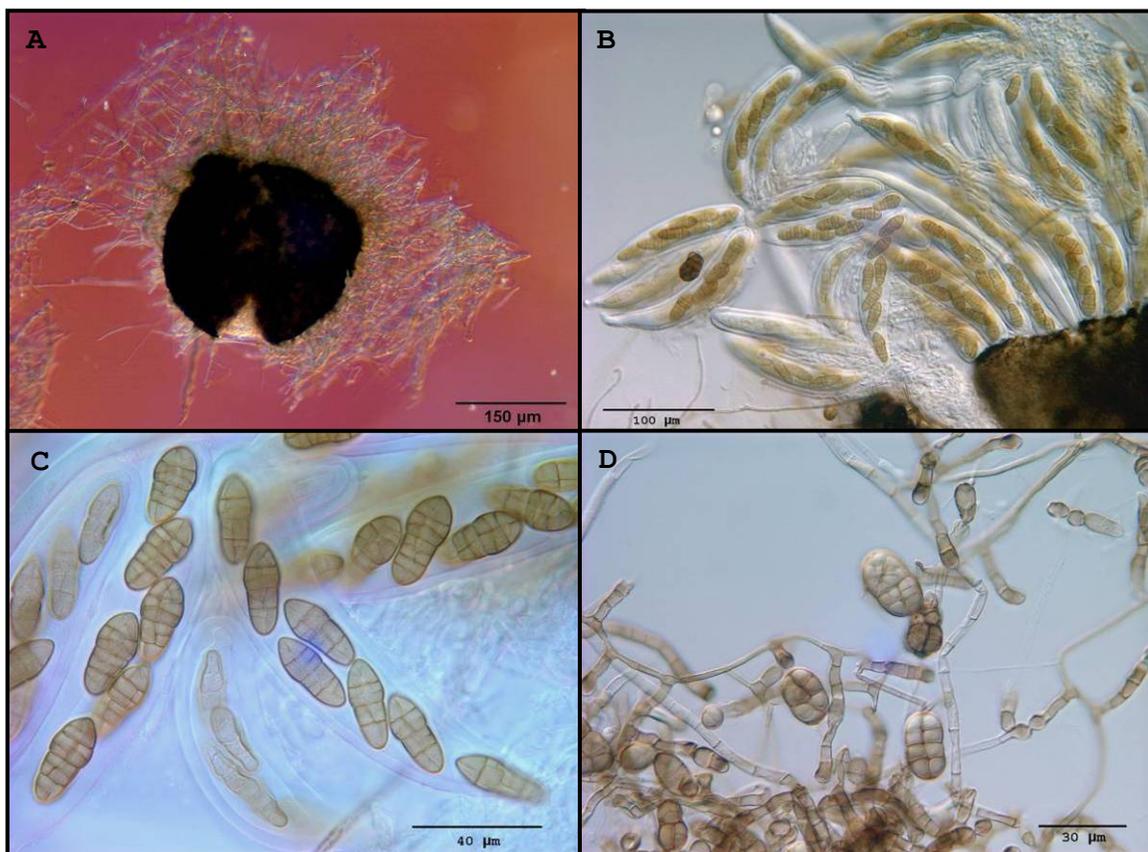


Figura 38. Ascocarpo de *P. eturmiuna* (A) (Nomarski, 100X), conglomerados de ascas bitunicadas fuera del ascocarpo (B) (Nomarski, 200X), ascoporas multicelulares pigmentadas (C) (Nomarski, 1000X) y conidios y conidióforos de *Stemphylium eturmiunum* (D) (Nomarski 600X).

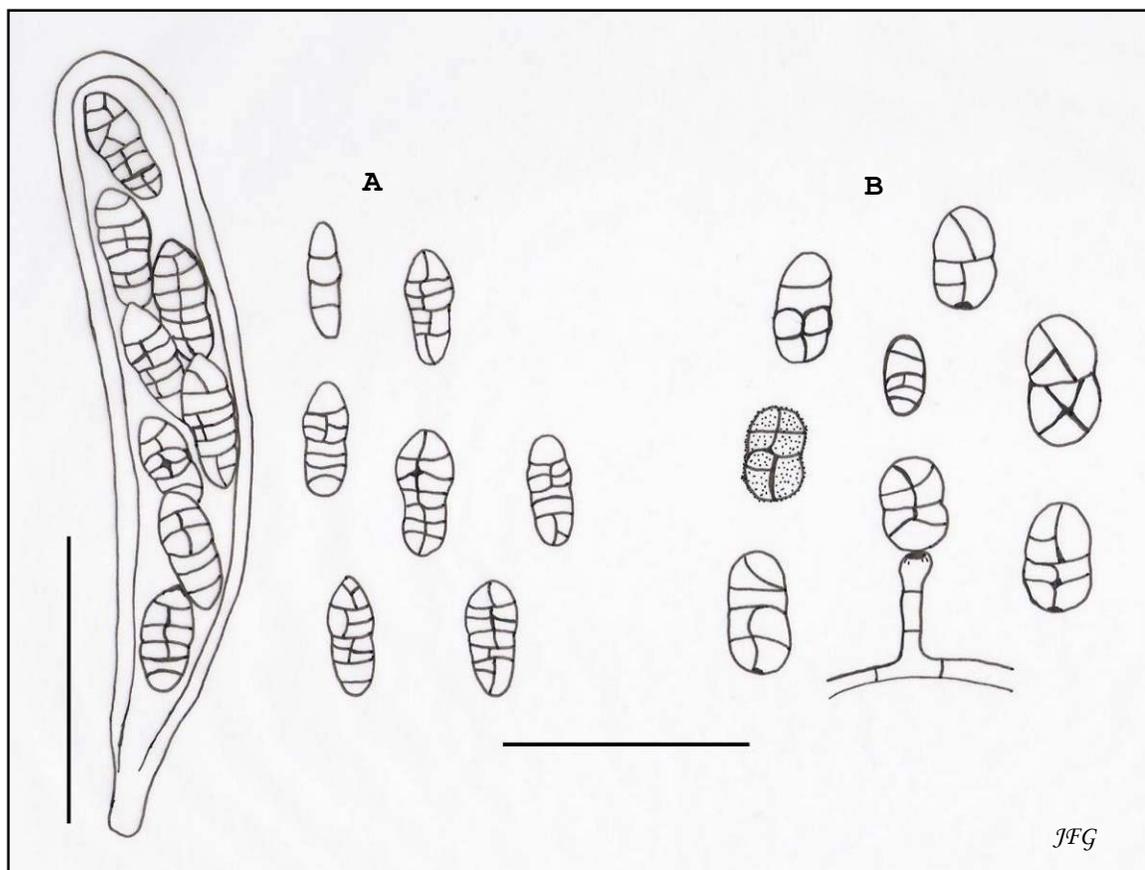


Figura 39. Estado sexual (A): *P. eturmiuna*. Ascas bitunicadas con 8 ascosporas multicelulares. Estado asexual (B): *S. eturmiunum* conidios multiseptados. Barra= 50 μ m (Barra vertical para ascas y horizontal para conidios).

Pruebas de Patogenicidad

Al realizar las pruebas de patogenicidad con los diferentes aislados de *Alternaria* y *Pleospora* observamos que sólo 6 aislados causaron lesiones foliares en la cebolla (Tabla 12 y 13). Las pruebas en el campo demostraron que cinco aislados de *Alternaria* y uno de *Pleospora* provocaron daños en las hojas de cebolla de los cvs. 'Mercedes', 'Excalibur' y 'Candy'. No se observó diferencias en la virulencia de los aislados patogénicos con respecto a los tres cultivares. Las especies patogénicas se comportaron uniformemente para ambas pruebas de patogenicidad.

Los aislados Alt34 y Alt35 del grupo de especies de *A. alli* fueron los más virulentos al desarrollar las lesiones foliares en hojas con o sin insición, pruebas de campo e *in-vitro* (Figura 40). El tamaño de las lesiones causadas por ambos aislados variaron entre 5.0-13 cm de largo y 0.9 a 1.2 cm de ancho. Sin embargo, también se observó en algunas plantas que la lesión se extendía hasta la punta de la hoja causando un coloración marrón (Figura 40). No se observó diferencia en la virulencia de estos aislados con respecto al cultivar de cebolla utilizado. Las lesiones fueron similares a las observadas en los predios

comerciales y experimentales al inicio del aislamiento. Éstas se caracterizaron por tener forma elipsoidal u oviode, de color marrón rojizo a púrpura que se extienden hacia el ápice de la hoja.

Tabla 12. Aislados de *Alternaria* spp. y *Stemphylium* sp. que produjeron lesiones foliares en la cebolla en las pruebas de patogenicidad en campo.

Aislado	Grupo de sp.	Pruebas en el campo					
		'Mercedes'		'Excalibur'		'Candy'	
		Con ¹	sin	con	sin	con	sin
Alt6	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+	-	+	-
Alt7	<i>A. tenuissima</i>	+	-	+	-	+	-
Alt27	<i>Alternaria</i> sp. "semi-arborescentes"	+	-	+	-	+	-
Alt34	<i>A. alli</i>	+	+	+	+	+	+
Alt35	<i>A. alli</i>	+	+	+	+	+	+
Riv-St1	<i>Pleospora eturmiuna</i>	+	+	+	+	+	+

¹Pruebas de patogenicidad con insición y sin insición.

Tabla 13. Aislados de *Alternaria* spp. y *Stemphylium* sp. que produjeron lesiones foliares en la cebolla en las pruebas de patogenicidad *in-vitro*.

Aislado	Grupo de sp.	Pruebas <i>in-vitro</i>					
		'Mercedes'		'Excalibur'		'Candy'	
		Con ¹	sin	con	sin	con	sin
Alt6	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-	-
Alt7	<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-	-
Alt27	<i>Alternaria</i> sp. "semi-arborescentes"	-	-	-	-	-	-
Alt34	<i>A. alli</i>	+	+	+	+	+	+
Alt35	<i>A. alli</i>	+	+	+	+	+	+
Riv-St1	<i>Pleospora eturmiuna</i>	-	-	-	-	-	-

¹Pruebas de patogenicidad con insición y sin insición.

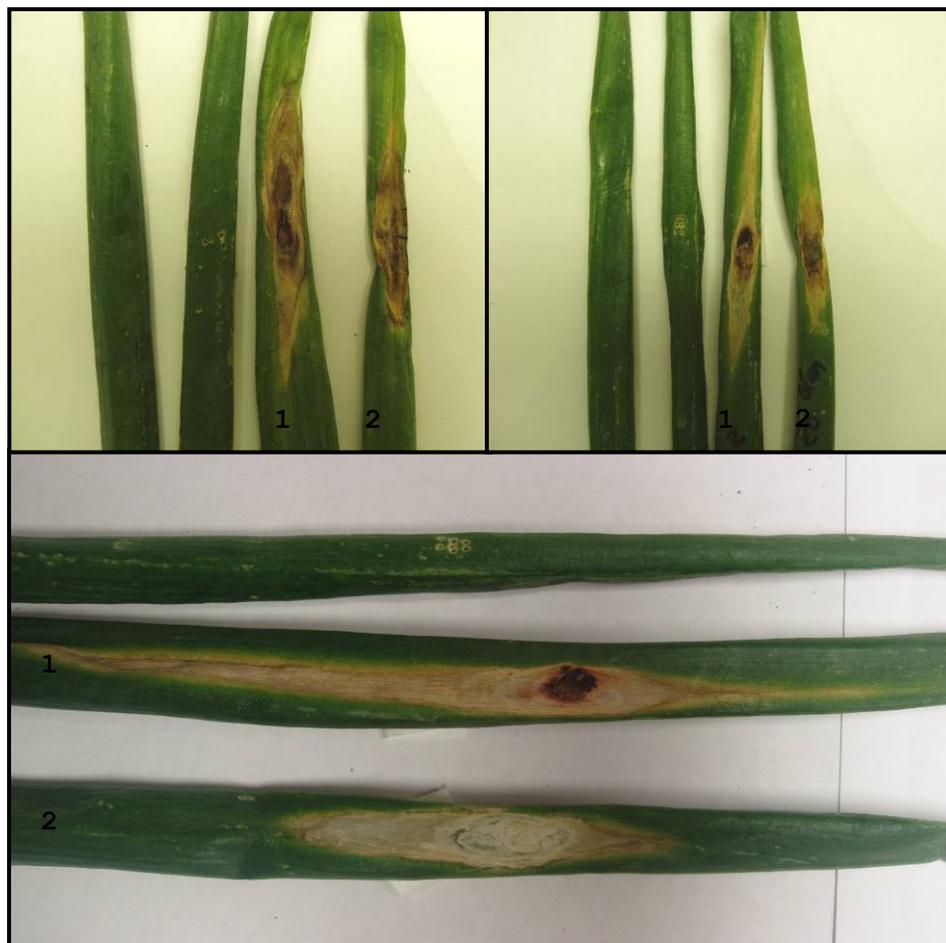


Figura 40. Lesiones foliares en plantas de cebolla producidas por el aislado Alt34 y Alt35 en pruebas de patogenicidad en campo. (1) con insición, (2) sin insición.

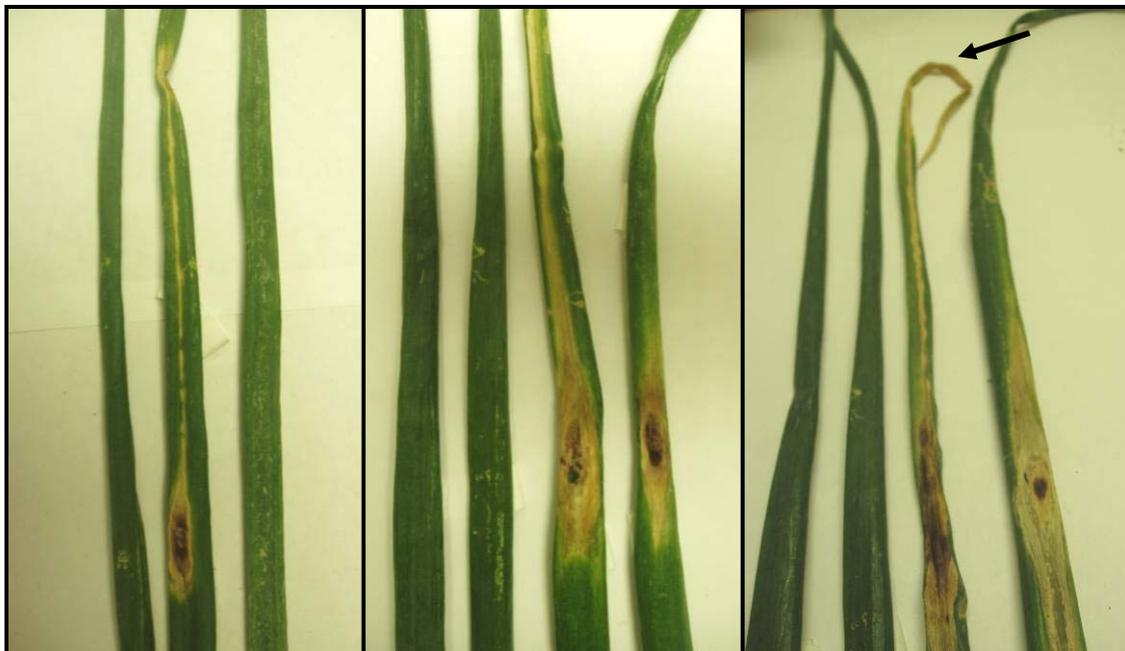


Figura 41. Lesiones del grupo de especies de *Alternaria alli* de pruebas de campo. Las lesiones se van extendiendo hasta que causa muerte del ápice de la hoja *tip blight*.

Las lesiones desarrolladas *in-vitro* por los aislados Alt34 y Alt35 se caracterizaban por ser de color marrón grisáceo con bordes anaranjado oscuro (parecido al que produce en medio de PDA), de forma ovoide y tiene un tamaño de 3.8-4.1 cm de largo y 0.6-0.9 cm de ancho (Figura 42A). Éstas se formaron en tejidos con o sin insición en los tres cultivares evaluados. Al completar los postulados de Koch obtuvimos nuevamente los aislados de interés (Figura 42B).

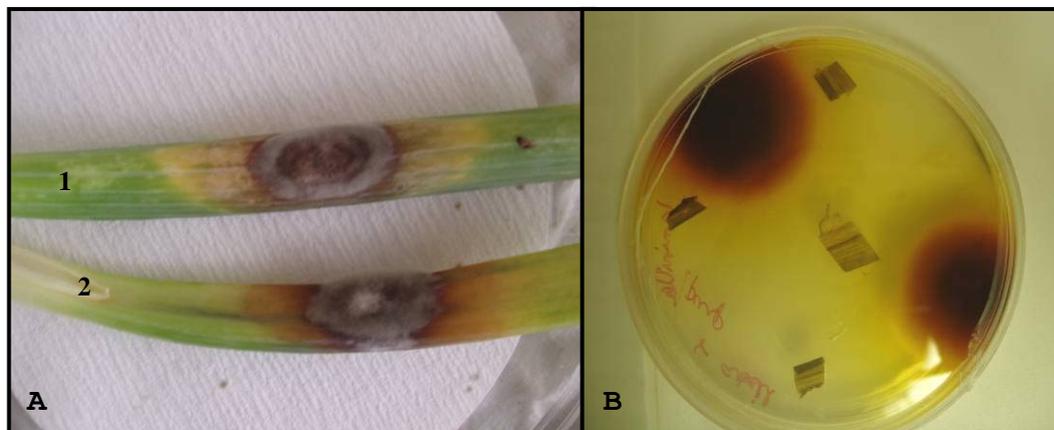


Figura 42. Lesiones producidas por Alt34 en las pruebas *in-vitro* (A). Reaislado de Alt34 de las lesiones cumpliendo con los postulados de Koch (B). (1) con insicición, (2) sin insicición.

El aislado Riv-St1 del grupo de las especies de *Stemphylium eturmiunum* fue el segundo más virulento de todos los aislados patogénicos encontrados causando lesiones en las hojas con o sin insicición en las pruebas de campo en los tres cultivares evaluados (Figura 43). Las lesiones se caracterizaron por ser elipsoidales a ovoides con un halo clorótico y un centro de color marrón oscuro a púrpura. Éstas tenían un tamaño entre 4.5-6.5 cm de largo y 0.7-1.0 cm de ancho. Al realizar un corte transversal de la lesión observamos los conidióforos con conidios emergiendo del tejido de la hoja (Figura 44).

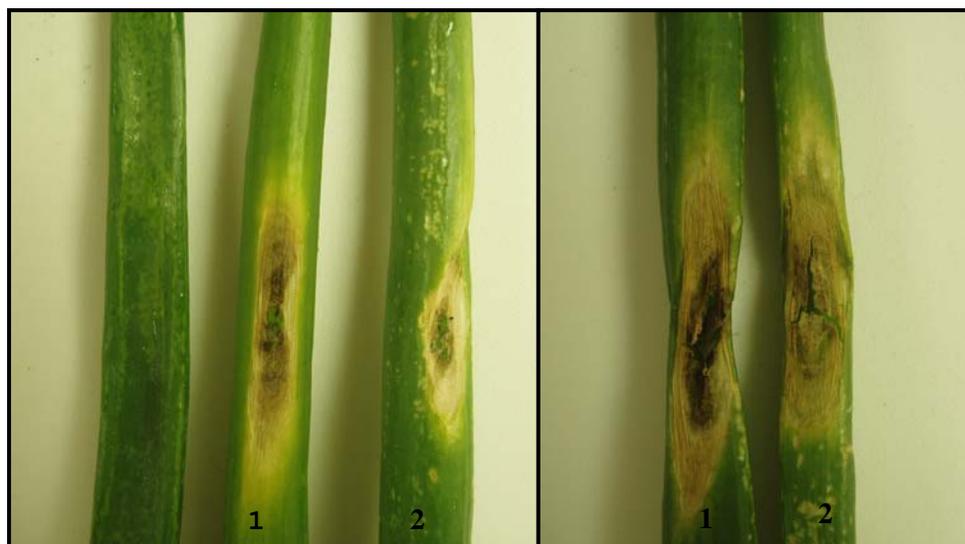


Figura 43. Lesiones causadas por el grupo de *Stemphylium eturmiunum* en hojas de cebolla. (1) con insición, (2) sin insición.

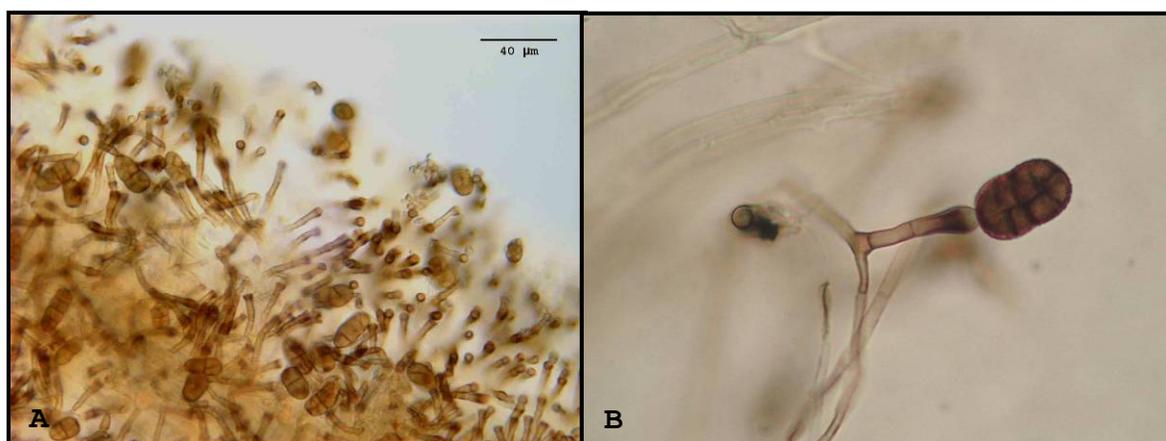


Figura 44. Corte transversal de la lesión causada por Riv-St1 en hojas de cebolla (A) (Nomarski, 200X), estructuras microscópicas (conidióforo y conidios) de tejido vegetal infestado (B) (400X).

Los aislados Alt6 y Alt7 del grupo de especies de *A. tenuissima* desarrollaron lesiones foliares solamente en pruebas de campo con insición en los tres cultivares. Éstos fueron menos virulentos, produciendo lesiones entre 1.3-3.6 cm de largo y 0.6-0.8 cm de ancho. Las lesiones eran pequeñas, de color marrón claro a rojizo y a medida que se extendía el daño se colapsaba el tejido (Figura 45).

El aislado Alt27 del grupo de *Alternaria* sp. "semi-arborescentes" desarrolló lesiones con bordes irregulares de forma elipsoidal sólo en pruebas de campo con insición en los tres cultivares. Éstas eran de color crema a marrón claro de 4.2-6.2 cm de largo y 0.7-1.0 cm de ancho colapsándose en el centro de la lesión (Figura 46).

Los aislados Alt6, Alt7 y Alt27 no mostraron síntomas en las pruebas *in-vitro* y sólo causaron lesiones en el campo en las hojas con insición. Los discos de micelio fueron más efectivos que la suspensión de conidios para causar la infección en las plantas.

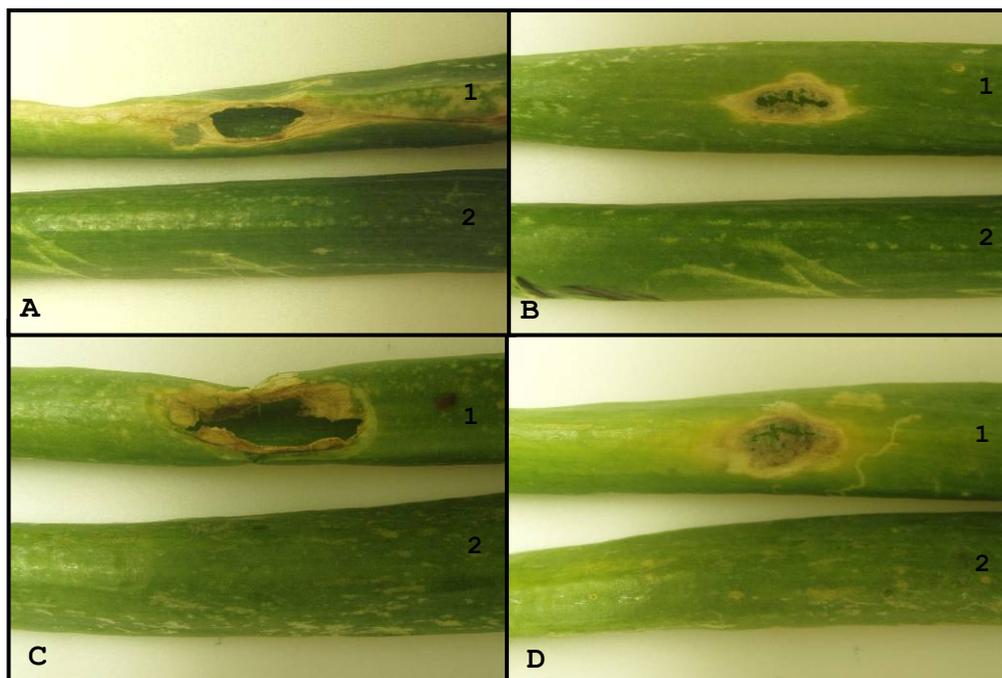


Figura 45. Lesiones causadas por los aislados Alt6 (A,B) y Alt7 (C,D) que se encuentran bajo el grupo de las especies de *Alternaria tenuissima*. (1) con insición, (2) sin insición.



Figura 46. Lesiones causadas por el aislado Alt27 que es el grupo de las *Alternaria* sp. "semi-arborescentes". (1) con insición, (2) sin insición.

Identificación de especies de Alternaria por técnicas molecular

Amplificación de la región ITS del ADN ribosomal

Al amplificar utilizando PCR la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal de diferentes especies de *Alternaria* observamos que el tamaño de la región varía de 530 a 600 pb (Figura 47, Apéndice D-1). No hay diferencias marcadas en el tamaño de éstas entre los aislados.

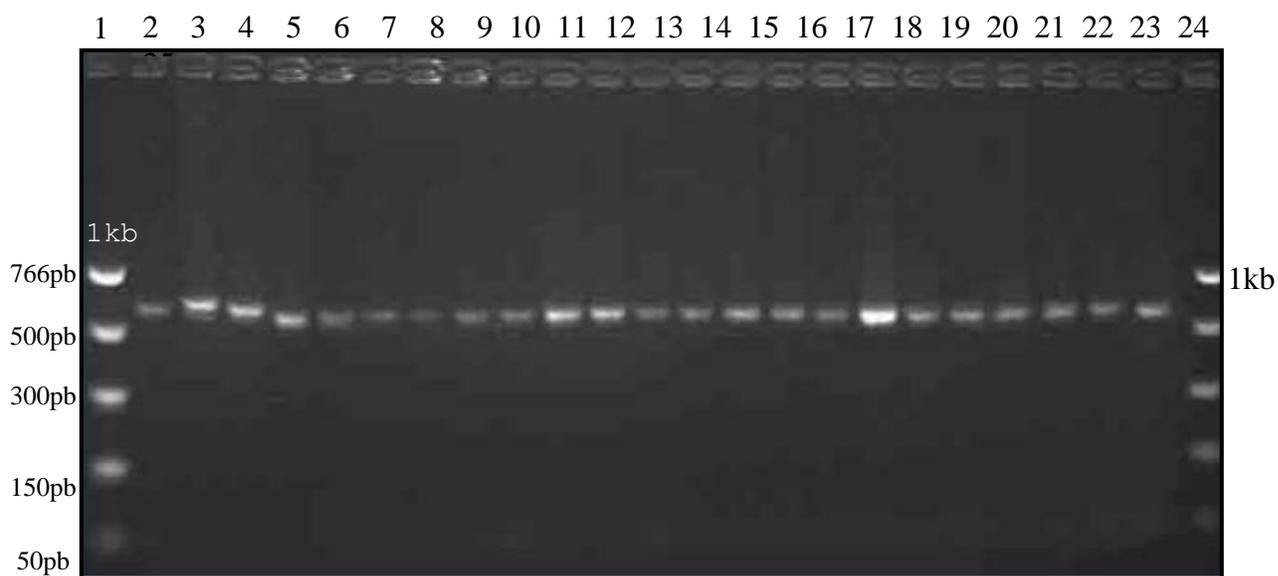


Figura 47. Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los iniciadores ITS1/ITS4 del rADN de diferentes especies de *Alternaria*. Fosa 1, marcador de PCR 1kb (766pb); fosa 2, *Alternaria arborescens* EGS39-128, fosa 3, *A. alternata* EGS34-016; fosa 4, *A. infectoria* EGS27-193; fosa 5, *A. tenuissima* EGS34-015; fosa 6, *A. porri* EGS48-147; fosa 7-8, grupo de *A. destruens*; fosa 9-10, grupo de *A. tenuissima*; fosa 11-14, grupo de *A. palandui*; fosa 15-19, grupo de *Alternaria* sp. "semi-arborescentes"; fosa 20-21, grupo de *A. alli*, fosa 22-23, grupo de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7; fosa 24, grupo de *Stemphylium eturmiunum* y fosa 25, marcador 1 kb.

El tamaño de la región ITS1 del rADN incluyendo parte de la unidad 18S fluctuó entre 216-232 pb (Figura 48, Apéndice D-2). La región ITS2 del rADN la cual incluye la región 5.8S y parte de la 28S obtuvo un tamaño mayor que fluctuó entre 320-346 pb (Figura 49, Apéndice D-3).

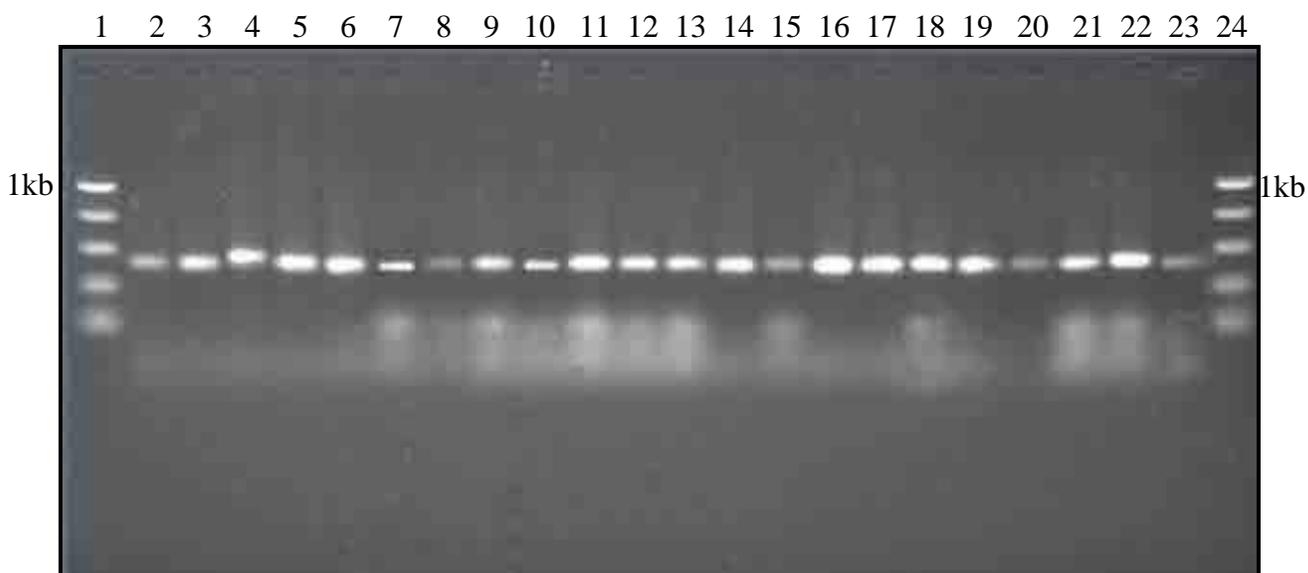


Figura 48. Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los iniciadores ITS1/ITS2 del rADN de diferentes especies de *Alternaria*. fosa 1, marcador 1kb (766pb); fosa 2, *Alternaria arborescens* EGS39-128, fosa 3, *A. alternata* EGS34-016; fosa 4, *A. infectoria* EGS27-193; fosa 5, *A. tenuissima* EGS34-015; fosa 6, *A. porri* EGS48-147; fosa 7-8, grupo de *A. destruens*; fosa 9-10, grupo de *A. tenuissima*; fosa 11-14, grupo de *A. palandui*; fosa 15-18, grupo de *Alternaria* sp. "semi-arborescentes"; fosa 19-20, grupo de *A. alli*, fosa 21-22, grupo de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7 y fosa 23, grupo de *Stemphylium eturmiunum* y fosa 24, marcador 1kb.

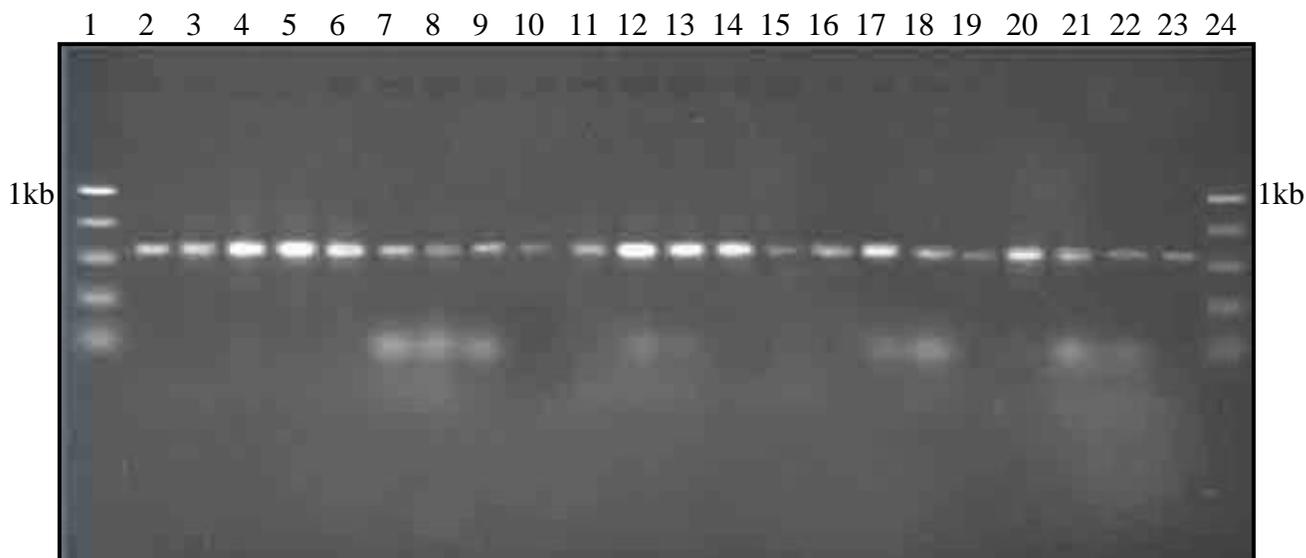


Figura 49. Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los iniciadores ITS3/ITS4 del rADN de diferentes especies de *Alternaria*. Fosa 1, marcador 1kb (766pb); fosa 2, *Alternaria arborescens* EGS39-128, fosa 3, *A. alternata* EGS34-016; fosa 4, *A. infectoria* EGS27-193; fosa 5, *A. tenuissima* EGS34-015; fosa 6, *A. porri* EGS48-147; fosa 7-8, grupo de *A. destruens*; fosa 9-10, grupo de *A. tenuissima*; fosa 11-14, grupo de *A. palandui*; fosa 15-18, grupo de *Alternaria* sp. "semi-arborescentes"; fosa 19-20, grupo de *A. alli*, fosa 21-22, grupo de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7 y fosa 23, grupo de *Stemphylium eturmiunum* y fosa 24, marcador de PCR 1kb.

RAPD-PCR

La técnica de RAPD-PCR utilizando el iniciador, OPA 13, generó una gran cantidad de fragmentos para los diferentes grupos de especies de *Alternaria* (Figura 50). Cada aislado generó un patrón claro y distintivo de fragmentos. Sin embargo, al comparar los fragmentos generados de diferentes aislados de la misma especie de *Alternaria*, encontramos que los patrones no distinguen los

aislados. Por ejemplo, dentro de una misma especie hay muchas variaciones entre los aislados y no es uniforme el patrón. En las fosas 9-11 y 22 la reacción de PCR no fue efectiva, no ocurrió amplificación del ADN.

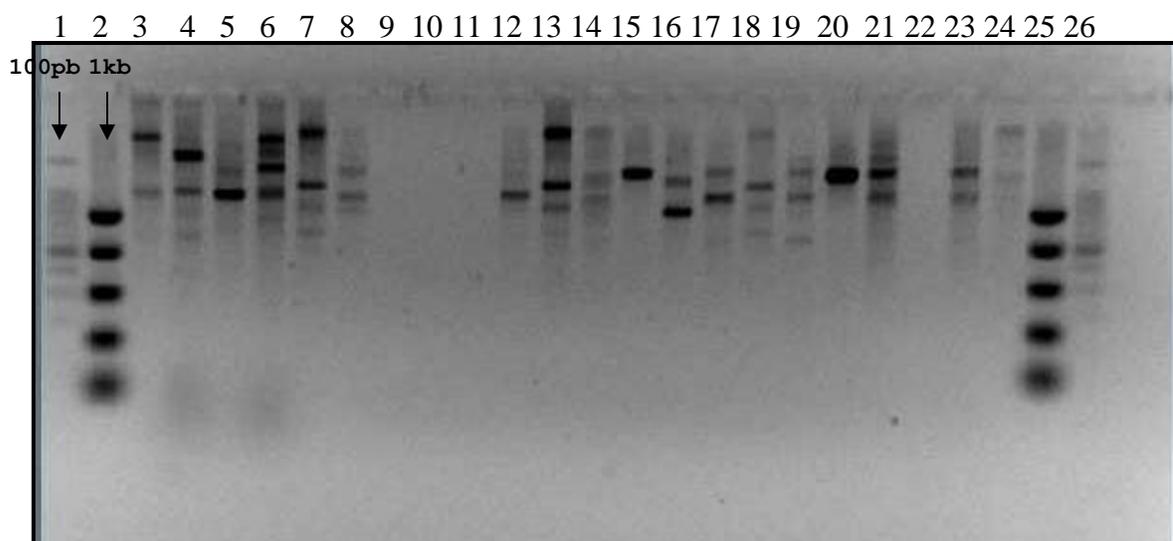


Figura 50. Gel de electroforesis de RAPD-PCR de diferentes aislados de *Alternaria* utilizando el iniciador OPA 13. Fosa 1, marcador 100bp (Promega) ; fosa 2, marcador 1 kb (766pb) , fosa 3, *A. alternata* EGS34-016; fosa 4, *A. infectoria* EGS27-193; fosa 5, *A. tenuissima* EGS34-015; fosa 6, *A. porri* EGS48-147; fosa 7-8, grupo de *A. destruens*; fosa 9-12, grupo de *A. tenuissima*; fosa 13-16, grupo de *A. palandui*; fosa 17-20, grupo de *Alternaria* sp. "semi-arborescentes"; fosa 21-23, grupo de *A. alli*, fosa 24, grupo de *A. tenuissima* Alt6 y Alt7; fosas 25 y 26, marcador 1 kb y marcador 100bp.

Análisis Filogenético

Se analizaron las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN de 30 aislados de *Alternaria* encontradas asociadas al follaje de cebolla y 4 aislados tipo de *Alternaria* caracterizados por E. G. Simmons (Tabla 14). Además se determinó el porcentaje de similaridad con otras especies en el Genbank. Diferentes especies de *Stemphylium* fueron incluidos como grupos distantes o *outgroups* para hacer comparaciones evolutivas entre éstos. Los géneros *Ulocladium* y *Embellisia* también se incluyeron para el análisis filogenético. Por otro lado, también analizamos y comparamos el aislado de *Stemphylium* encontrado durante este estudio con otras especies del mismo género en el GeneBank. Se contruyeron árboles filogenéticos con las especies que tuvieron una alta similaridad con *Stemphylium* y los aislados de *Alternaria* para determinar relaciones cercanas evolutivas entre los aislados.

Tabla 14. Aislados tipo de *Alternaria* de Emory G. Simmons utilizados para comparar los aislados encontrados en este estudio asociados al follaje de cebolla.

Aislados tipo	Número de aislado
<i>Alternaria alternata</i>	EGS34-016
<i>A. infectoria</i>	EGS27-193
<i>A. tenuissima</i>	EGS34-015
<i>A. porri</i>	EGS48-147
<i>A. arborescens</i>	EGS39-128

Aislados de *Alternaria* spp.

Al comparar las secuencias de los aislados de *Alternaria* sp. con otras especies en el GenBank utilizando el método de BLAST observamos que el porcentaje de similitud entre las secuencias era mayor de 98% (Tabla 15). Al construir el árbol filogenético utilizando la distancia Kimura parámetro dos con el método de *neighbor-joining* se establecieron varios grupos monofiléticos o clados. Este método para el análisis filogenético dividió los 37 taxones en tres grupos mayores. El primer grupo de *Alternaria* de esporas grandes tales como *A. porri*, *A. alli* y *A. solani*, el segundo: especies de *Alternaria* de esporas pequeñas a medianas y el género *Ulocladium* y el tercero: un

grupo distante compuesto por especies de los géneros *Stemphylium* y *Pleospora* (Figura 51).

Tabla 15. Identificación molecular de diferentes aislados de *Alternaria* y *Pleospora* utilizando la secuenciación de la región de la ITS del rADN y el programa de BLAST.

Aislado	Clasificación	Resultado en BLAST	% Homología	Valor e-
Alt1	<i>A. destruens</i>	<i>Alternaria porri</i>	(474/475) 100%	0
Alt2	<i>A. destruens</i>	<i>A. porri</i>	(326/330) 98%	4E-173
Alt3	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. gaisen</i>	(483/483) 100%	0
Alt4	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. longipes</i>	(547/559) 99%	0
Alt5	<i>A. tenuissima</i>	<i>Alternaria</i> sp.	(485/488) 99%	0
Alt6	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. longipes</i>	(526/527) 99%	0
Alt7	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. longipes</i>	(427/427) 100%	0
Alt8	<i>A. palandui</i>	<i>A. alternata</i>	(481/482) 99%	0
Alt9	<i>A. palandui</i>	<i>Alternaria</i> sp.	(503/503) 100%	0
Alt10	<i>A. palandui</i>	<i>A. triticimaculans</i>	(500/501) 99%	0
Alt11	<i>A. palandui</i>	<i>A. longipes</i>	(419/419) 100%	0
Alt12	<i>A. palandui</i>	<i>Alternaria</i> sp.	(529/533) 99%	0
Alt14	<i>A. palandui</i>	<i>A. compacta</i>	(525/527) 99%	0
Alt15	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. triticimaculans</i>	(395/397) 99%	0
Alt16	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. alternata</i>	(438/439) 99%	0
Alt17	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. alternata</i>	(549/549) 100%	0
Alt18	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. alternata</i>	(543/543) 100%	0
Alt19	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. longipes</i>	(526/527) 99%	0
Alt20	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. alternata</i>	(549/549) 100%	0
Alt21	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. gaisen</i>	(481/485) 99%	0
Alt22	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. compacta</i>	(547/549) 99%	0
Alt24	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>Alternaria</i> sp.	(549/549) 100%	0
Alt25	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. porri</i>	(430/430) 100%	0
Alt27	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. longipes</i>	(526/527) 99%	0
Alt28	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. alternata</i>	(479/479) 100%	0
Alt29	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. longipes</i>	(482/483) 99%	0
Alt30	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>Alternaria</i> sp.	(515/518) 99%	0
Alt32	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. porri</i>	(443/443) 100%	0
Alt33	<i>A. "semi-arborescentes"</i>	<i>A. alternata</i>	(455/455) 100%	0
Alt34	<i>A. alli</i>	<i>A. solani</i>	(541/543) 99%	0
Alt35	<i>A. alli</i>	<i>A. solani</i>	(561/561) 100%	0
Riv-St1	<i>Pleospora eturmiuna</i>	<i>S. versicarium</i>	(530/532) 99%	0

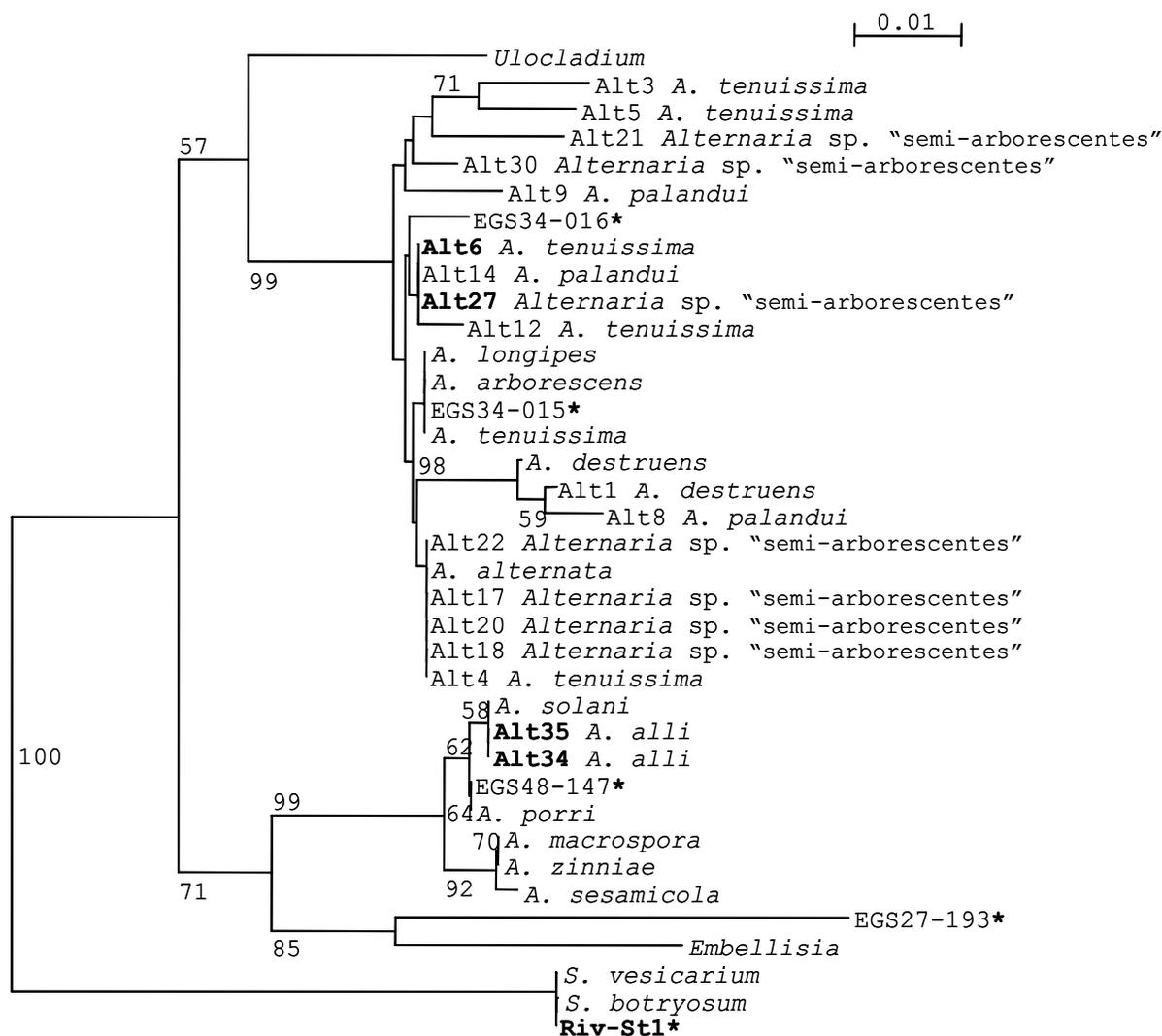


Figura 51. Árbol filogenético generado por el método *neighbor-joining* de secuencias de la región ITS del rADN seleccionadas de diferentes *Alternaria* y hongos relacionados. Se utilizó la distancia Kimura parámetro dos con bootstraps de 1000 repeticiones. Aislados tipo caracterizados por E. G. Simmons: EGS27-193, *A. infectoria*; EGS34-015, *A. tenuissima*; EGS34-016, *A. alternata*, EGS48-147 *A. porri* y Riv-St1 *Pleospora eturmiuna*(*). Negrillas: aislados patogénicos.

Se desarrolló un clado del grupo de las especies encontradas que resultaron patogénicas al follaje de cebolla (*A. alli*; Alt34 y Alt35), junto a un aislado tipo de *A. porri* (EGS48-147) y otras especies de conidios grandes tal como *A. solani*, *A. macrospora* y *A. sesamicola*, entre otras (Figura 51). El establecimiento de este clado fue apoyado por un valor de *bootstrap* de 99%. A pesar que los aislado Alt34 y Alt35 se clasificaron morfológicamente bajo *A. porri* o *alli* por Simmons, el aislado clave de *A. porri* fue colocado en otra rama en el mismo grupo. Esta separación nos demuestra que ambos aislados patogénicos tienen un ancestro en común con respecto al aislado tipo de *A. porri* (EGS49-147).

Otro grupo monofilético fue desarrollado con diferentes aislados de *Alternaria* sp. ("semi-arborescentes"), *A. palandui* y *A. tenuissima* y éste esta apoyado por 99% en el valor de *bootstrap*. En este grupo la similaridad evolutiva entre las especies es bien cercana y de poca variabilidad en la región ITS del rADN. Dentro de este grupo los aislados Alt21, Alt3 y Alt5 se agruparon aparte en el mismo clado con un valor mayor de 71% de *bootstrap*. Por otro lado, los aislados Alt1, Alt8 junto a

A. destruens del GeneBank, se formó un clado con un valor de *bootstrap* de 98%.

El porcentaje de similaridad entre los aislados de *Alternaria* con *A. tenuissima* y *A. alternata* en la base de datos eran mayor de 98%. Al comparar las secuencias de los diferentes grupos de *Alternaria* de cebolla se observó una mayor variabilidad entre los aislados de Alt34, Alt35 y EGS27-147 comparado con las otras especies. Estos aislados fueron colocados dentro de un clado de especies de *Alternaria* que poseen conidios grandes con un cuello filiforme. Los demás aislados patogénicos de *Alternaria* demostraron compartir características evolutivas similares a los grupo de *Alternaria* sp. ("semi-arborescentes"), *A. tenuissima*, *A. destruens* y *A. palandui*. La mayoría de los aislados se aguparon en un grupo monofilético estrechamente similares entre si junto a las especies *A. alternata* y *A. tenuissima* del GeneBank. Estas dos especies varían mucho en morfología y hay muchos aislados que son agrupados bajo estas especies. No obstante, el aislado de *A. infectoria* EGS27-193 se agrupó en un clado separado de las demás especies de *Alternaria*, como un grupo aparte (Figura 51). Ésta especies aparenta tener una relación evolutiva más cercana al género *Embellisia* que algunas especies de

Alternaria. Las secuencias alineadas revelaron que los géneros *Ulocladium*, *Embellisia* y *Stemphylium* fueron distintos de las otras especies, y la región de ITS del rADN de estos aislados fue de 92 a 94% de similitud con las diferentes especies de *Alternaria*. Las especies de *Stemphylium* sp. fueron los aislados distantes en el árbol apoyando su clado con un 100% del valor de *bootstrap* (Figura 51). El aislado de *Pleospora eturmiuna* fue colocado junto a las especies de *Stemphylium botryosum* y *S. versicarium* reportados en cebolla.

Aislados de *Stemphylium*.

La región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN del aislado Riv-St1 secuenciada fue comparada con diferentes especies de *Stemphylium* de la base de datos. Este aislado obtuvo un valor mayor de 98% de similitud con las especies relacionadas de este grupo. Al comparar la homología de la secuencia de Riv-St1 con otras secuencias en el Genbank demostró que este aislado comparte características morfológicas similares en la forma de los conidios a *S. herbarium*, *S. alfalfae*, *S. gracilariae*, *S. majusculum* y *S. versicarium*. El aislado Riv-St1 fue identificado morfológicamente como *Pleospora eturmiuna*. Al generar un árbol filogenético por medio del método de *neighbor-joining* el aislado Riv-St1 fue colocado bajo un grupo monofilético con un apoyo de 100% del valor de *bootstrap* (Figura 52). Las especies de *S. versicarium* y *S. botryosum* comparten un ancestro en común junto a Riv-St pero éstos son colocados en ramas apartes en el árbol. En este árbol se generó grupo monofilético distante con los géneros *Urocladium* y *Alternaria* con un apoyo de 100% del valor de *bootstrap*.

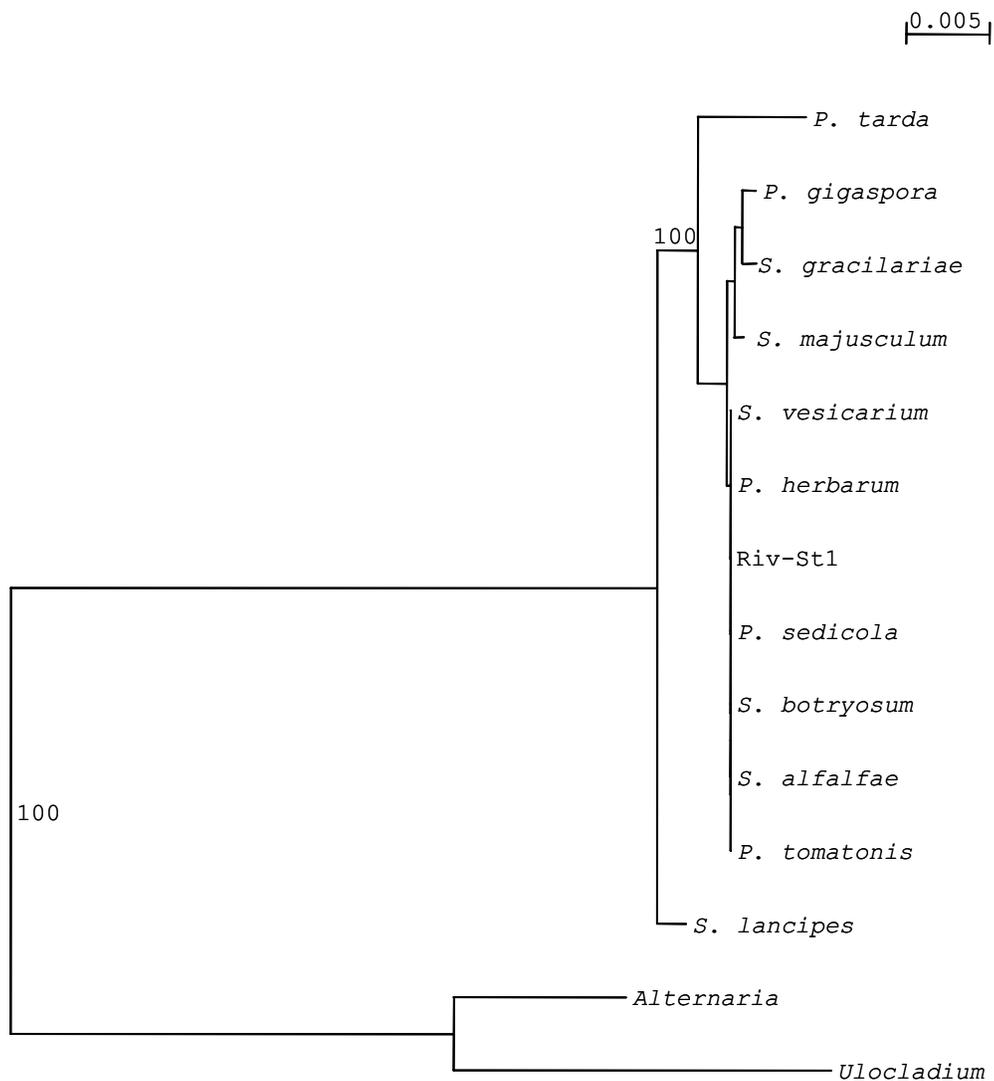


Figura 52. Árbol filogenético generado por el método *neighbor-joining* de secuencias de la región ITS del rADN seleccionadas de diferentes *Stemphylium* y hongos relacionados. Se utilizó la distancia Kimura parámetro dos con *bootstraps* de 500 repeticiones. Riv-St1: *Pleospora eturmiuna*.

DISCUSIÓN

El género *Alternaria* ocurre con mayor incidencia en el follaje de la cebolla a medida que se desarrolla el área foliar de la planta. Este aumento se comenzó observar en plantas que tenían aproximadamente 60 DDS. Nolla (1927) reportó que las primeras infecciones por *A. porri* usualmente ocurren antes de la formación del bulbo de las plantas de cebolla, donde éstas tienen más área foliar. Ésto nos demuestra que este hongo requiere mayor área foliar para causar infección. Siendo las hojas maduras o senescentes más susceptibles al patógeno en comparación con las hojas más jóvenes (Miller, 1983; Stavely y Slana, 1971). Además del tejido foliar, *Alternaria* requiere ciertas condiciones ambientales las cuales son importantes para que ocurra la infección. Este estudio reflejó que sólo la humedad relativa mostró una correlación significativa para $p(\alpha 0.05)$ de $r= 0.70$ con la incidencia del patógeno en el cultivar 'Mercedes'. Los factores temperatura y precipitación no mostraron correlaciones significativas, aunque éstos son importantes en la infección. Miller (1975) demostró que periodos de humedad mayores o iguales de 11 h en las hojas y más de 14 h de humedad relativa (> 90%) están asociadas positivamente con

el aumento en el número de esporas de *A. porri* colectadas mediante una trampa de esporas en los predios de cebolla. Las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad causada por *A. porri* en las hojas de cebollas ocurre por periodos largos de humedad relativa >90% o deposición de rocío y temperaturas de 20-25°C (Everts y Lacy, 1990). Nuestros datos de humedad relativa y temperatura fueron muy bajos para demostrar alguna relación con la incidencia de *Alternaria* con ambos cultivares. Sin embargo, Everts y Lacy (1990) informan que la exposición de los conidios de *A. porri* a 9 horas de humedad promueven su germinación y de 12 a 16 h causan lesiones en las hojas. Kare y Nema (1984) sugieren que la luz no afecta la sintomatología, sin embargo, la temperatura, la humedad y la edad del hospedero son factores determinantes para el desarrollo de la lesión.

Las lesiones foliares que se encontraron asociadas a *Alternaria* spp. eran de color púrpura o marrón oscuro a negro. Observamos lesiones donde ambos colores podían estar presentes. Estas eran de forma elíptica alargada con un centro necrótico y un halo clorótico. Mayormente se observó una alta incidencia de lesiones foliares de color marrón en comparación con las púrpuras en los predios. No obstante, las lesiones púrpuras están más relacionadas a la

sintomatología causada por *A. porri* en plantas de cebollas por tal razón se le llama comúnmente mancha púrpura o *purple blotch*. Estudios realizados por Skiles (1953), demostraron que las lesiones marrones y púrpuras en el follaje de la cebolla, pueden estar relacionadas a las especies *A. porri*, *A. tenuissima* y *A. tenuis*.

Encontramos muchas lesiones desarrollándose en daño causado por minadores (*Liriomyza* sp.) y efectos de los herbicidas. Se conoce que las especies *A. tenuissima* y *A. tenuis* pueden causar más infección en las hojas de cebollas cuyo tejido presenta alguna herida (Skiles, 1953). Ésto sugiere, que además de penetrar a través de las estomas (forma indirecta) o directamente por las células epidermales también penetra de forma indirecta por medio de heridas o daños mecánicos causados a la planta (Fahim y El-Shehedi, 1966; Agrios, 1997). Los aislados *A. alli* fueron más virulentos a la cebolla causándoles daños en hojas con o sin heridas. Los aislados que fueron patogénicos de *A. tenuissima* causaron lesiones sólo en plantas con incisión, esto nos demuestra que esta especie requiere una entrada indirecta (heridas, estomas o a través de un patógeno primario) para causar lesiones a las hojas de cebolla. Es necesario realizar investigación para

determinar si existe una relación directa entre el aumento en la incidencia de las *Alternaria* encontradas y los daños causados por herbicidas e insectos como minadores y tripsidos. Se ha documentado que el daño de los tripsidos, en especial por *Thrips tabaci* a las plantas jóvenes de cebolla, está relacionado con las lesiones foliares causadas por diferentes especies de *Alternaria* y la severidad de la enfermedad (Skiles, 1953; Schwartz y Mohan, 1995). Al tripsido causar daño en las hojas de la cebolla, promueve la entrada de patógenos secundarios como *A. tenuissima* y *Alternaria* sp. ("semi-arborescentes") y patógenos primarios como es *A. porri*. McKenzie et al., (1993) demostraron que cuando los tripsidos causan daños a las hojas de cebolla, *Alternaria porri* está presente y utiliza estos daños como sitios alternativos para penetrar el tejido. No obstante, podemos inferir que las especies que no resultaron patogénicas [*A. destruens*, *A. palandui*, algunos aislados de *Alternaria* sp. ("semi-arborescentes")] crecen epífitamente en las hojas o sobre las lesiones de *Alternaria porri*. Sin embargo, *A. palandui* fue reportada como patógena de cebolla en India en el cultivar 'Bellary' (Ayyangar, 1928). Al analizar esto podemos inferir que la patogenicidad de *A. palandui* pudo ser afectada por las

condiciones ambientales o la susceptibilidad del cultivar. Estas condiciones podrían ser un factor importante para el desarrollo de esta especie en la cebolla.

El aislado Riv-St1 identificado como *Stemphylium eturmiunum* se caracterizó por formar conidios multicelulares melanizados y su estado sexual *Pleospora eturmiuna* forma ascas con ascoporas multiseptadas de color ambar. Éste puede causar lesiones en hojas de cebolla de forma indirecta (con insición) o directa (sin insición). Suheri y Price (2002) informaron que tanto como *Alternaria* y *Stemphylium* pueden causar infección en cebolla y ajo a través de heridas o directamente por células epidermales.

En ambos muestreos de incidencia observamos que el cultivar 'Mercedes' demuestra ser más susceptible al ataque de *Alternaria* sp. comparado con el 'Excalibur' en los cultivos de cebolla. *Alternaria* sp. presentó una mayor incidencia en ambos predios en el cvr. 'Mercedes'. Se puede observar que un buen manejo en las aplicaciones tempranas (antes de los 60 días de edad de la planta) de fungicidas en los cultivos podrían disminuir la infección de *Alternaria*. En adición, un buen control de los minadores en los cultivos podría disminuir considerablemente los daños foliares en la planta y a su

vez la infección causada por *Alternaria* u otros patógenos secundarios.

Los aislados de *Alternaria* identificados fueron agrupados bajo diferentes especies por su gran variabilidad morfológica. La relación molecular de las diferentes especies de *Alternaria* encontradas fue estudiada utilizando la secuencia del ADN ribosomal. Esta secuencia tiene regiones altamente conservadas entre los organismos (unidad 18S, 5.8S y 28S) y una región pequeña no codificante altamente polimórfica entre especies. Estas regiones polimórficas son conocidas como las regiones ITS. Al analizar el producto del PCR en la electroforesis, no se observaron diferencias en el tamaño de las bandas del ADN. La región completa del ITS tienen aproximadamente un tamaño de 500-600 pb, la región ITS1 de 216-232 pb con parte de la unidad 18S y ITS2 de 320-346 pb incluyendo la unidad 5.8S (Figura 5). Esta región ITS del rADN no pudo distinguir entre las especies de *Alternaria* estudiadas ya que son muy similares. Sin embargo, Fujita *et al.*, (2001) encontraron grandes diferencias en los fragmentos amplificados de la región ITS1-ITS4 en diferentes especies de *Candida* siendo ésto una excelente herramienta para su identificación. El tamaño de la ITS1-ITS4 para algunas de las especies eran

Candida albicans 529-535pb, *C. Glabrata* 869-879pb, *C. inconspicua* 447-449pb y *C. Intermedia* 384-388pb. No obstante, Föster y colaboradores (Citado por Burns et al., 1991) encontraron muchas variaciones en la region de ITS de distintas especies de *Phytophthora*. Por estas variaciones ellos separaron a *Phytophthora capsici* de *P. megakarya*.

En la técnica de RADP no se obtuvo un patrón uniforme en los fragmentos para segregar las especies en diferentes grupos morfológicos. Por RAPD se pueden crear grupos morfológicos que representen el tamaño de esporas de *Alternaria* y luego analizarlos en un dendrograma. Roberts et al., (2000) utilizó diferentes iniciadores universales que demostraron diferentes patrones de bandas entre grupos morfológicos de distintas especies de *Alternaria* de esporas pequeñas. Por otro lado, Cooke, et al., (1998) demostró que al realizar una amplificación al azar por RAPD utilizando el primer OPA 13, aislados de *A. brassicae* de diversos orígenes geográficos presentaron un alto nivel de similaridad o uniformidad entre sus bandas y poca similaridad con otras especies de *Alternaria*.

Las relaciones moleculares filogenéticas entre diferentes grupos de *Alternaria* sp. con otras especies de *Alternaria* del GeneBank y hongos relacionados fueron

examinadas en base al análisis de las secuencias del ADN ribosomal. En el análisis se utilizó la distancia Kimura parámetro dos por el método de *neighbor-joining* para diferentes grupos de especies de *Alternaria*. Los análisis filogenéticos de las variaciones de la región del ITS de especies de *Alternaria* revelaron que los aislados Alt34 (*A. alli*), Alt35 (*A. alli*) y EGS48-147 (*A. porri*) formaron un grupo monofilético junto a otras especies del GeneBank. Estas especies se caracterizan por desarrollar conidios grandes con la célula apical larga y filiforme (Simmons, 1992). Chow y Wu (2002) realizaron un análisis filogenético de la región de ITS en diferentes especies de *Alternaria* y determinaron la relación evolutiva que presentan las *Alternaria* de cuello filiforme comparado con otras especies. Ellos propusieron una hipótesis basada en evidencias moleculares, que el cuello largo en los conidios es el único rasgo de adaptación morfológica para la liberación y estrategias de sobrevivencia de éstos.

A pesar que los aislados Alt34 y Alt35 no produjeron conidios en medio de cultivo para corroborar la caracterización morfológica, molecularmente se pueden identificar dentro del grupo de especies de *Alternaria porri*. Al analizar las ramificaciones en este grupo

monofilético, observamos que los aislados Alt34 y Alt35 son agrupados aparte con respecto a los aislados de *A. porri* del GeneBank y del aislado clave. Alt34 y Alt35 están filogenéticamente más relacionados a *A. solani* que con *A. porri*. Al analizar el árbol podemos inferir que este grupo patogénico podría ser *A. alli*, grupo antes descrito afectando el área foliar de las cebollas en Puerto Rico por Nolla (1927).

Por otro lado, las especies de *A. palandui*, *A. tenuissima* y *Alternaria* sp. del grupo "semi-arborescentes" no presentaron grupos monofiléticos característicos para cada grupo de especies. La mayoría de los aislados "semi-arborescentes" se agruparon bajo las especies de *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. destruens*. También, los aislados Alt6, Alt7, Alt27 y los aislados tipo de *A. alternata* y *A. tenuissima* se colocaron bajo este grupo. Estas especies se caracterizan por formar grupos de especies, ya que poseen muchas variaciones morfológicas en sus células asexuales (conidios). Simmons (1992, 1995) clasifica estas especies bajo grupos por el tipo de esporulación en medio de cultivo. Rotem (1994) señala que la alta variabilidad y cambio de caracteres morfológicos y fisiológicos en las especies de *Alternaria* puede afectar

los análisis filogenéticos para comparar grupo de especies de este género. Al observar los aislados "semi-arborescentes", *A. tenuissima*, *A. destruens* y algunas de *A. palandui* mostraron tener una relación evolutiva bien cercana comparada con los aislados patogénicos del grupo de *A. porri*. Los aislados Alt3, Alt5 y Alt21 fueron agrupados en clados apartes con 71% del valor de *bootstrap*. Los aislados Alt21 y Alt5 son del grupo de especies de *A. palandui* y se caracterizan por tener conidios con áreas que se van atenuando y septos bien oscuros. La caracterización morfológica de estos aislados es bien diferente a los demás grupos de especies identificadas. Por otro lado, encontramos que el aislado de *Ulocladium* está más relacionado evolutivamente a *Alternaria* que los aislados de *Stemphylium* y *Embellisia*. No obstante, Pryor y Gilbertson, (2000) basados en el análisis de *Neighbour-joining* de diferentes secuencias de *Alternaria*, *Stemphylium* y *Ulocladium* demostraron una relación cercana entre *Ulocladium* y *Alternaria* a diferencia de *Embellisia* que fue colocado en un grupo distante. Según el análisis filogenético de las secuencias de *Alternaria*, observamos que *A. infectoria* es un grupo separado evolutivamente de las otras especies de *Alternaria* encontradas en cebolla.

Sin embargo, Pryor y Gilbertson (2000) informaron que al realizar un análisis filogenético de la región de ITS1-5.8S-ITS2, la subunidad pequeña mitocondrial y la técnica de RAPD (Pryor y Michailides, 2002) del grupo de especies de *A. infectoria*, éstas demuestran que están distantemente relacionados de los aislados de *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. alternata*. Al analizar el alineamiento de las secuencias de *Alternaria* observamos que *A. infectoria* tiene una inserción de 29 nucleótidos en la región de ITS1 (Apéndice E-1). Ésto nos demuestra la razón evolutiva del porque esta especie forma un grupo monofilético distante a las especies mencionadas anteriormente. McKay *et al.*, (1999) informaron que las especies de *A. infectoria* de estado sexual *Lewia infectoria*, poseen de 27-30 nucleótidos adicionales en la región de ITS1. Andersen *et al.*, (2001) presentan que los grupos de especies de *A. infectoria* son químicamente muy diferente a las especies *A. tenuissima* y *A. arborescens*, con sólo pocos metabolitos en común.

El análisis filogenético de las diferentes especies de *Stemphylium* y *Pleospora* demostraron que Riv-St1 está evolutivamente más relacionada a las especies de *S. versicarium*, *S. botryosum* y *P. herbarium*, entre otras (Apéndice E-2). Estas especies han sido reportadas

asociadas a los cultivos de cebolla (Suheri y Price (2002), Vélez-Rodríguez, 2004). Camara et.al, 2002 (3) agrupó estas especies junto a *Stemphylium* sp. aislado tipo de Nueva Zelandia EGS 48-077 bajo el mismo análisis sistemático molecular. Al analizar el árbol filogenético podemos decir que Riv-St1 es una especie aislada evolutivamente de las *P. tarda* y *S. lancipes*.

CONCLUSIONES

- La incidencia de *Alternaria* aumenta a medida que la planta va desarrollando el área foliar.
- Las primeras lesiones causadas por *Alternaria* comienzan a parecer a los 60-70 días de edad de la planta de cebolla de los cultivares 'Mercedes' y 'Excalibur'.
- Este hongo se observa con mayor incidencia cuando la planta esta lista para desarrollar su bulbo, justo cuando la planta tiene más área foliar para que ocurra la infección.
- Las especies de *Alternaria* asociadas al follaje de la planta de cebolla fueron *A. tenuissima*, *A. destruens*, *A. palandui*, *A. alli* y *Alternaria* sp. "semi-arborescentes".
- La mayoría de las lesiones foliares encontradas en los cultivos de cebollas son provocadas por el hongo *Alternaria porri*.
- La humedad relativa mostró ser un factor significativo en la incidencia de *Alternaria* en predios de cebolla del cultivar 'Mercedes'.

- En este estudio no hubo diferencias significativas en la temperatura y precipitación para determinar si existe una correlación entre la incidencia del hongo y los factores ambientales.
- Este es el primer informe de *A. palandui* y *A. destruens* en PR y en el Caribe. Los siguientes aislados de *Alternaria* fueron patogénicos al follaje de cebolla: *A. tenuissima* (Alt6 y Alt7), *Alternaria* sp. ("semi-arborescentes") (Alt27), y *A. alli* (Alt34 y Alt35).
- Este es el primer informe de *Pleospora eturmiuna* teleomorfo de *Stemphylium eturmiunum* causando mancha foliar en cebolla. El aislado Riv-St1 del grupo de *Stemphylium eturmiunum* causó lesiones foliares en plantas de cebolla.
- No se observó diferencias en la región de ITS del DNA ribosomal en la distintas especies de *Alternaria*.
- No se encontró una patrón de bandas característicos para los diferentes grupos de *Alternaria* sp. utilizando el primer OPA 13 y la técnica de RAPD-PCR.
- Los aislados de *Alternaria* asociadas a la cebolla tuvieron un porcentaje de similaridad con otras *Alternaria* en el GenBank de >98%.

- Los estudios filogenéticos nos agruparon los aislados de Alt34 y Alt35 bajo un grupo monofilético junto con las especies *A. porri* (EGS48-147), *A. porri* del GeneBank, *A. solani* y especies relacionadas a este grupo de esporas grandes y de cuello filiforme.
- Las especies patogénicas Alt34 y Alt35 están más relacionadas filogenéticamente a la especie de *A. solani*. Al estudiar las relaciones evolutivas en el árbol filogenético podemos decir que los aislados Alt34 y Alt35 son *A. alli*.
- Los aislados de las especies: *A. tenuissima*, *A. destruens*, *A. palandui* y *Alternaria* sp. "semi-arborescentes" fueron colocados en un grupo monofilético que comparten relaciones evolutivas con los grupos de especies de *A. tenuissima* y *A. alternata*.
- El aislado Riv-St1 de *Pleospora eturmiuna* mostró ser un grupo monofilético aparte de las especies *P. tarda* y *S. lancipes*.
- Los estudios filogenéticos utilizando la región de ITS de ADN ribosomal no fueron efectivos en separar las especies de *Alternaria* que comparten características morfológicas similares.

- Para estudios futuros se pueden considerar otras regiones tales como: IGS o regiones que codifiquen para el ARN ribosomal, microsátélites o la técnica de AFLP.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4^{ta} ed. Academic Press Inc., San Diego, California. 635 pp.
- Andersen, B., Kroger, E. y R.G. Roberts. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* **106**(2):170-182.
- Audy, P., Braatt, C. Saindon, G., Huang, H. C. y A. Laroche. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common blight and halo blight in bean seeds. *Phytopathology* **86**:361-366.
- Ayyangar, C. R. 1928. A leaf spot and blight disease of onions caused by *Alternaria palandui* nov. sp. Agricultural Research Institute, Pusa. **79**:1-14.
- Barnet H. L. y B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Mac Millan Publishing Co., New York, 218 pp.
- Brody, J. R., y S. E. Kern. 2004. Sodium boric acid: a Tris-Free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* **36**:214-216.
- Burns, T. D., Thomas, W. y J. W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review Ecology Systematic. **22**:525:564.
- Camara, M. P., O'Neill, N. R., P., van Berkum. 2002. Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Micologia* **94**(4):660-672.
- Chou H. H. y W. S. Wu. 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. E. L., Forster, J. W., Jenkins, P. D., Jones, D. G. y D. M. Lewis. 1998. Analysis of intraspecific

and interspecific variations in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals Applied Biology* **132**:197-209.

Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK, 471-497 pp.

Estación Experimental Agrícola. 1999. Conjunto Tecnológico para la Producción de Cebolla. Publicación **156**, Río Piedras, P. R. 35 pp.

Everts, K. L. y M. L. Lacy. 1990. The influence of dew duration, relative humidity, and leaf senescence on conidial formation and infection of onion by *Alternaria porri*. *Phytopathology* **80**:1203-1207.

Fahim, M. M. y A. El-Shehedi. 1966. The mode of penetration of *Alternaria porri* into onion leaves. *Transactions of the British Mycological Society*. **49**:79-80.

Fujita, S., Senda Y., Nakaguchi S. y T. Hashimoto. 2001. Multiplex pcr using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(10):3617-3622.

FAO. 2004. FAO Statistical Databases. <http://apps.fao.org/>

Fernández, F. A. y R. T., Hanlin. 1996. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia* **88**(3):425-440.

Granberry, D. M. y K. W. Terry. 2000. Dry Bulb Onions: Commercial Vegetable Production. Cooperative Extension Service, University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences. Circular **80**:1-10.

Gupta, R. B. L. y V. N. Pathak. 1988. Yield losses in onions due to purple leaf blotch disease caused by *Alternaria porri*. *Phytophylactica* **20**:21-23.

Hall, B. G. 2004. Phylogenetic trees made easy: A how-to manual. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 221 pp.

- Hibbett, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **33**: 533-556.
- Jasalavich, C.A., Morales, V.M., Pelcher, L.E. y G. Seguin-Swartz. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research* **99**:604-614.
- McKay, G. J., Brown, A. E., Bjourson, A. J. y P. C. Mercer 1999. Molecular characterization of *Alternaria linicola* and its detection in linseed. *European Journal of Plant Pathology* **105**:157-166.
- Morales, V. M., Jasalavich, C. A., Pelcher, L. E., Perrie, G. A. y J. L. Taylor. 1995. Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences. *Mycological Resesearch* **99**:593-603 .
- Khare, U. K. y K. G. Nema. 1984. Factors affecting development of purple blotch (*Alternaria porri*) on onion leaves. *India Phytopathology* **37**:327-328.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution*. **16**:111-120.
- Kohn, L. M. 1992. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Micologia* **84**:139-153.
- Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., ean Gent-Pelzar, M. P. E., van der Zouwen, P. y R. van den Bulk. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* ssp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research* **106**(1):23-33.
- Kusaba, M. y T. Tsuge. 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* **28**:491-498.

- McKenzie C. L., Cartwright, B., M. E. Miller y J. V. Edelson. 1993. Injury to onions *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) and its role in the development of purple blotch. *Entomological Society of America* **22**(6):1266-1277.
- Miller, M. E. 1975. Environmental factors associated with the spread of purple blotch of onions. *Proc. American Phytopathology Society* **2**:35.
- Miller, M. E. 1983. Relationships between onion leaf age and susceptibility to *Alternaria porri*. *Plant Disease* **67**:284-286.
- Mullis, K. B. y F. A. Faloon 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
- National Onion Association. 2004. About Onions: Bulb Onion Production
<http://www.onions-usa.org/about/production.asp>.
- Nei M. y S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York USA. 333 pp.
- Nolla, J. A. B. 1927. New *Alternaria* disease of onions (*Allium cepa* L.). *Phytopathology* **17**:115-132.
- Peever, T. L., Canihos, Y., Olsen, L., Ibañez, A., Liu, y L. W. Timmer. 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. *Phytopathology* **89**:851-860.
- Pryor, B. M. y R. L. Gilbertson. 2000. Molecular phylogenetic relationships among *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* **104**:1312-1321.
- Pryor, B. M. y R. L. Gilbertson. 2001. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Disease* **85**:18-23.

- Pryor, B. M. y T. J. Michailides. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* **92**:406-416.
- Roberts, R. G., Reymond, S. T. y B. Ardensen. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological research* **104**(2):151-160.
- Rodney, G. R. 2004. *Alternaria yallinficiens* sp. nov. on Ya Li Pear fruit: From interception to identification. *Plant Diseases* **89**:134-145.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press. St. Paul, Minnesota, 326 pp.
- Saitou N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sharma T. R. y J. P. Tewari. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research* **120**:807-814
- Schwartz, H. F. y S. K. Mohan. 1995. Compendium of onion and garlic diseases. APS Press, St Paul, MN. 54 pp.
- Schwartz, H. F. 1999. *Botrytis*, Downy Mildew and Purple Blotch of onion. *Crop Series, Diseases*. Colorado State University Cooperative Extension. www.colostate.edu/Depts/CoopExt
- Simmons, E. G. 1986. *Alternaria* themes and variations (22-26). *Mycotaxon* **25**:287-309.
- Simmons, E. G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, view-point, challenge. In *Alternaria: biology, plant disease and metabolites* (J. Chelkowski & A Visconti, eds); pp. 1-35. Elsevier, Amsterdam.
- Simmons, E. G. y R. G. Roberts. 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* **48**:109-140.

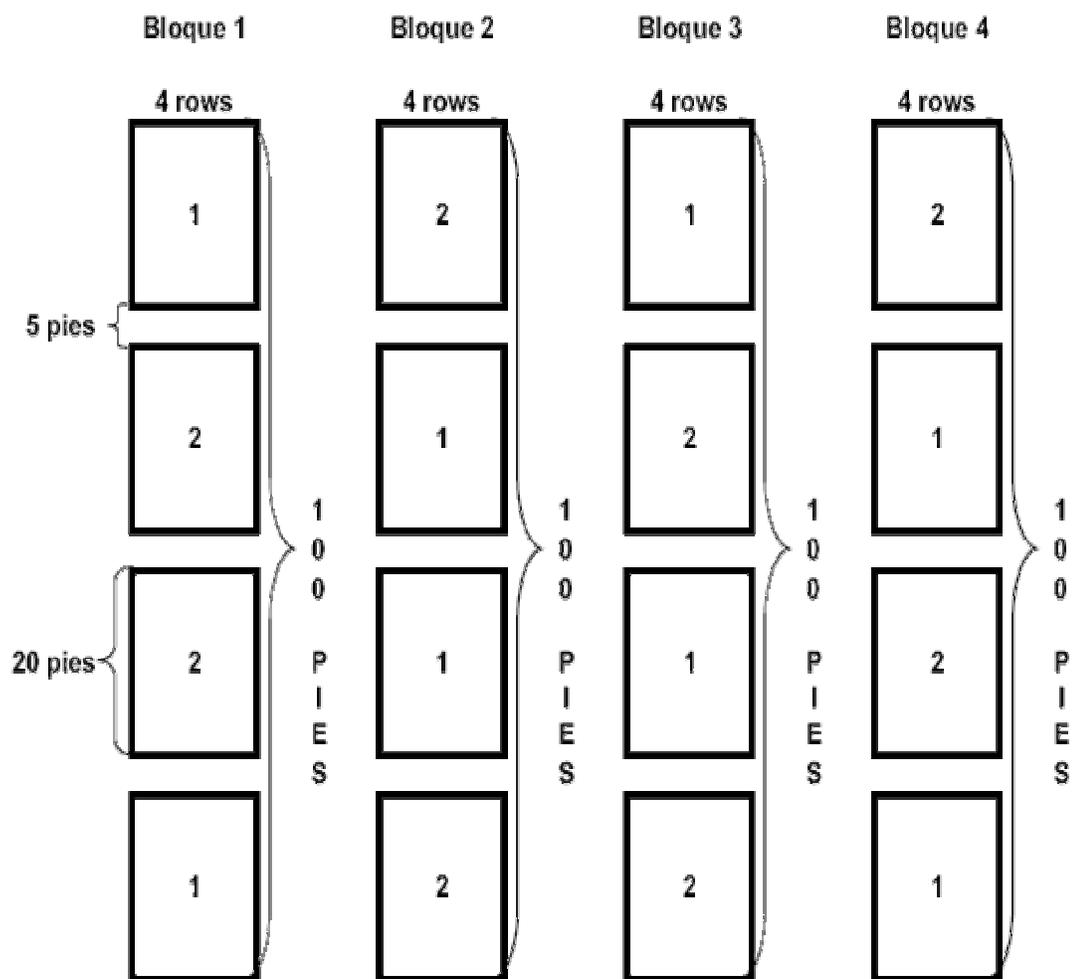
- Simmons, E. G. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon* **55**:55-163.
- Simmons, E. G. 1998. *Alternaria* themes and variations (224-225). *Mycotaxon* **28**:417-427.
- Simmons, E. G. 1999. *Alternaria* themes and variations (236-243) Host-Specific toxin producers. *Mycotaxon* **20**:325-369.
- Simmons, E. G. 2001. Perfect states of *Stemphylium*-IV. *Harvard Papers in Botany*. **6**:199-208.
- Skiles, R. L. 1953. Purple and Brown blotch of onions. *Phytopathology* **43**:409-412.
- Smith, O. P., Peterson, G. L., Beck, R. J., Schaad, N. W. y M. R. Bonde. 1996. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. *Phytopathology* **86**:115-122.
- Suheri H. y T. V. Price. 2000. Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. *Plant Pathology* **49**:375-382.
- Stavelly, J. R. y L. J. Slana. 1971. Relation leaf age to the reaction of tobacco to *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **61**:73-78.
- Thomma B. 2003. Pathogen profile: *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* **4**:225-236.
- Thornton, M. K. y S. K. Mohan. 1996. Response of sweet Spanish onions cultivars and numbered hybrids to basal rot and pink root. *Plant Disease* **80**(6):660-663.
- Toro, R. A. 1923. Una enfermedad importante de las cebollas en Puerto Rico. Departamento de Agricultura. *Circular* 71:1-6.
- Ulloa, M. C. y R. T. Herrera. 1994. Etimología e iconografía de géneros de hongos. Universidad Autónoma de Mexico. Mexico. 98 pp.

- USDA-NASS online. 2004. *Vegetables 2004 Summary*
<http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/fruit/pvg-bban/vgan0105.pdf>.
- Vélez-Rodríguez, L. 2001. Catastro de hongos asociados al cultivo de cebolla (*Allium cepa*) en la zona sur de Puerto Rico. M.S. Tesis, Depto. Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez. 99 pp.
- Vélez, L., L.I. Rivera, R. Rodríguez e I. Cabrera. 2004. Hongos asociados al cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) en la zona sur de Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* **88**(1-2):55-72.
- Walton, J. D. 1996. Host-selective toxins: Agents of compatibility. *The Plant Cell* **8**:1723-1733.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. y J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide the methods and applications. Eds. M.A. Innis, D.H. Gelgard, J.J. Snisky and T.J. White. pp. 315-322. Academic Press, N.Y.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6535.
- Zambino, P. J. y L. J. Szabo. 1993. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. *Mycologia* **85**:401-414.

APÉNDICE A

Diseños experimentales

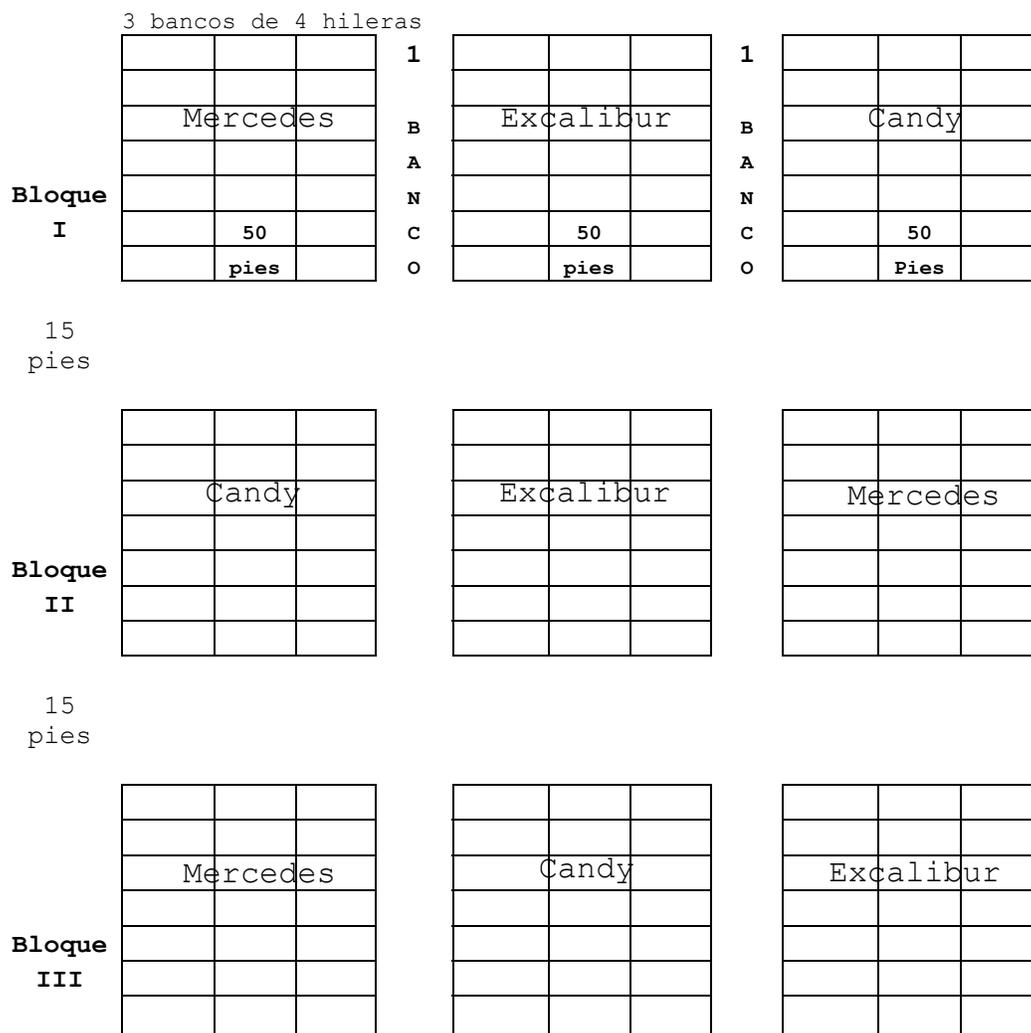
A-1. Diseño experimental utilizado para determinar la incidencia de *Alternaria* sp. en cebolla para los cvrs. 'Mercedes' y 'Excalibur' en predios experimentales.



Tratamiento 1 Control

Tratamiento 2 Fungicida

A-2. Diseño experimental utilizado para las pruebas de patogenicidad en el campo.



APÉNDICE B

Medios de cultivos

B-1. Medio DRYES (Dichloran rose bengal yeast extract sucrose agar)

Extracto de levadura.....	20.0 g
Sacarosa.....	150 g
Agar.....	20 g
Solución de rosa de bengala.....	25 mg
Dicloran.....	2 mg
Cloranfenicol.....	50 mg
Solución de traza de metal.....	1 ml
ZnS ₄ O·7H ₂ O.....	1.0 g
CuS ₄ O·5H ₂ O.....	0.50 g
Agua destilada.....	100 ml
Agua destilada.....	1 L

Ajustar el pH de 5.6 ± 0.1

Después de autoclavar dejar que disminuya la temperatura hasta aproximadamente 55° C. Añadir 10 ml de una solución de Clortetraciclina.

B-2. Medio de CZAPEK DOX

Sucrosa.....	30.0g
Nitrato de sodio.....	3.0g
Sulfato de Magnesio.....	0.5g
Cloruro de potasio.....	0.5g
Sulfato de Hierro.....	0.01g
Fosfato de hidrógeno Di-potasio	1.0g
Agar.....	15.0g
Agua destilada.....	1L

35gr/l, pH final de 7.3

APÉNDICE C

Estadística

C-1. Correlaciones entre los cultivares de cebolla 'Excalibur' y 'Mercedes' vs factores ambientales como humedad relativa, precipitación y temperatura.

Coefficientes de correlación

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	Cvr. Excalibur	Humedad Relativa
Cvr. Excalibur	1.00	0.19
Humedad Relativa	0.51	1.00

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	Cvr. Excalibur	Temperatura
Cvr. Excalibur	1.00	0.27
Temperatura	-0.44	1.00

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	Cvr. Excalibur	Precipitación
Cvr. Excalibur	1.00	0.86
Precipitación	0.07	1.00

Cultivar 'Mercedes' vs humedad relativa, precipitación y temperatura.

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	Cvr. Mercedes	Humedad Relativa
Cvr. Mercedes	1.00	0.05
Humedad Relativa	0.70	1.00

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	Cvr. Mercedes	Temperatura
Cvr. Mercedes	1.00	0.29
Temperatura	-0.43	1.00

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	Cvr. Mercedes	Precipitación
Cvr. Mercedes	1.00	0.53
Precipitación	0.26	1.00

APÉNDICE D

Reportes de las medidas de los fragmentos de ADN en el
análisis de la región de la ITS

D-1. Reporte de las medidas de los fragmentos en la gel de electroforesis de la región del ITS1/ITS4.

Lane Number	Band Number	Base Pairs	Status
1	1	766.000	=
1	2	500.000	=
1	3	300.000	=
1	4	150.000	=
1	5	50.000	=
2	1	598.702	
3	1	592.921	
4	1	594.756	
5	1	555.104	
7	1	569.539	
8	1	569.067	
9	1	568.612	
10	1	568.135	
11	1	567.655	
12	1	575.133	
13	1	582.754	
14	1	574.195	
15	1	573.723	
16	1	573.248	
17	1	580.948	
18	1	556.307	
19	1	563.754	
20	1	563.634	
21	1	579.085	
22	1	598.070	
23	1	595.026	
24	1	766.000	=
24	2	500.000	=
24	3	300.000	=
24	4	150.000	=
24	5	50.000	=

D-2. Reporte de las medidas de los fragmentos en la gel de electroforesis de la región del ITS1.

Lane Number	Band Number	Base Pairs	Status
1	1	766.000	=
1	2	500.000	=
1	3	300.000	=
1	4	150.000	=
1	5	50.000	=
2	1	228.723	
3	1	228.346	
4	1	255.888	
5	1	227.579	
6	1	218.622	
7	1	218.262	
8	1	226.442	
9	1	226.069	
10	1	225.681	
11	1	225.310	
12	1	224.939	
13	1	224.553	
14	1	215.715	
15	1	215.345	
16	1	214.991	
17	1	214.637	
18	1	214.269	
19	1	213.916	
20	1	221.933	
21	1	221.568	
22	1	229.887	
24	1	766.000	=
24	2	500.000	=
24	3	300.000	=
24	4	150.000	=
24	5	50.000	=

D-3. Reporte de las medidas de los fragmentos en la gel de electroforesis de la región del IST2.

Lane Number	Band Number	Base Pairs	Status
1	1	766.000	=
1	2	500.000	=
1	4	150.000	=
1	5	50.000	=
1	6	339.000	=
2	1	341.602	
3	1	342.535	
4	1	344.605	
5	1	346.764	
6	1	338.641	
7	1	341.632	
8	1	342.811	
9	1	344.941	
10	1	346.989	
11	1	349.124	
12	1	351.176	
13	1	353.315	
14	1	365.858	
15	1	368.038	
16	1	339.354	
17	1	333.421	
18	1	343.425	
19	1	345.506	
20	1	347.505	
21	1	349.590	
22	1	351.593	
24	1	760.000	=
24	2	500.000	=
24	3	300.000	=
24	4	150.000	=
24	5	50.000	=

Apéndice E

Resultado de CLUSTAL X (1.83) para los aislados de
Alternaria y *Stemphylium*

E-1. CLUSTAL X (1.83) Multiple alineamiento de las secuencias de *Alternaria*.

```

EGS48-147 -----
A.porri -----
Alt35 -----
Alt34 -----
A.solani GTTGGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAA
A.zinniae GTTGGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAA
A.sesamicola -----TCGAAGGTGAA
A.macrospora GTTGGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAA
Embellisia -----TCCGTAGGTGAA
Alt17 -----
Alt20 -----
EGS34-015 -----
Alt4 -----
Alt22 -----
Alt18 -----
A.tenuissima -----
Alt8 -----TCCGTAGGGGAA
Alt1 -----
A.arborescens GTTCGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAA
A.destruens -----TCTCCGTAGGTGAA
A.longipes GTTCGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAA
A.alternata -----TCCGTAGGTGAA
Alt5 -----
Alt21 -----
Alt30 -----
Alt9 -----
Alt3 -----
Alt12 -----
Alt27 -----
Alt14 -----
Alt6 -----
EGS34-016 -----
Ulocladium -----
EGS27-193 -----
Riv-St1 -----
S.vesicarium -----
S.botryosum -----

```

18S **ITS1**

```

EGS48-147 -----AAGGATCATTA|CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCCCG----- 42
A.porri -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCCCG----- 42
Alt35 -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCCCG----- 42
Alt34 -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCCCG----- 34
A.solani CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCCCG----- 409
A.zinniae CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCTCG----- 409
A.sesamicola CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCTCG----- 60
A.macrospora CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGC-ACCTCTCG----- 409
Embellisia CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAA-TAAGAAG-GCGGGCTGGC-TCTCTCCG----- 60
Alt17 -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 41
Alt20 -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 41
EGS34-015 -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ACCTCTCG----- 41
Alt4 -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 41
Alt22 -----AAGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 42
Alt18 -----GGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 41
A.tenuissima -----AGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA--CCTCTCG----- 41
Alt8 CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 61
Alt1 --TGC GGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 47
A.arborescens CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ACCTCTCG----- 409
A.destruens CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ACCTCTCG----- 63
A.longipes CCTGCGGAGGGATCATTA-CACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ACCTCTCG----- 409

```

```

A.alternata      CCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 61
Alt5             -----GGTACATAG-TGGCGG-AGGAA----GGGCTGGT-CCCT-TCG----- 35
Alt21            -----GGGCCACA--TAGCGG-AAGAA----GGGCTGGA-TCCT-TCG----- 34
Alt30            -----GATATCA-TAGCGG-AGGAAAGGCGGGCTGGA-TTCTCTCG----- 38
Alt9             -----GGGCTACA--TAGCGG-AGAA----GGGGTGAT-CTCT--CG----- 32
Alt3             -----GGGCATA--CAGCGG-AAGAA----GGGCTGGT-CACC--CG----- 32
Alt12            -----TACA--TAGCGG-AGGAAAG-ACGGGCTGGA-ATCT-TCG----- 33
Alt27            --AGATAAATACATATA--CATCGGTAGGAAGGACGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 47
Alt14            -----AGAGGATCATATACGCCGTAGGAAGGACGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 45
Alt6             -----AGAGGATCATA--CACCAGTAGGAAG-GCGGGCTGGA-ATCTCTCG----- 42
EGS34-016       -----GAAGGA----CGGGCTGGA-ACCTCTCG----- 23
Ulocladium      -----ATATGAAA-GCGGGCTGGC-ATCCTTCG----- 26
EGS27-193       -----AGGGATCATTACAC-AATAACAAG-GCGGGCTGGACACCCCCCGCT----- 44
Riv-St1         -----CATTACAC-AATATGAAA-GCGGGTTGGG-ACCTCACCTCCGGTGA 43
S.vesicarium    -----AGGGATCATTACAC-AATATGAAA-GCGGGTTGGG-ACCTCACCTC-GGTGA 48
S.botryosum     -----CAC-AATATGAAA-GCGGGTTGGG-ACCTCACCTC-GGTGA 37
                *          *** **          *

EGS48-147       GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 78
A.porri         GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 78
Alt35          GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 78
Alt34          GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 70
A.solani        GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 445
A.zinniae       GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 445
A.sesamicola   GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 96
A.macrospora   GGGT-----GGCCAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTC 445
Embellisia     GAG-----GACTGGCCCTGCTGAATTATTC-ACCCGTGTC 94
Alt17          GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 75
Alt20          GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 75
EGS34-015     GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 75
Alt4           GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 75
Alt22         GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 76
Alt18         GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 75
A.tenuissima   GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 75
Alt8          GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 95
Alt1          GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 81
A.arborescens  GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 443
A.destruens    GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 97
A.longipes     GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 443
A.alternata    GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 95
Alt5          GGGG-----G--AACCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 67
Alt21         GGGT-----GC-AACCTTGCTGAATTATTC-CCCCTTGTC 67
Alt30         GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-CCCCTTGTC 72
Alt9          GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 66
Alt3          GGGG-----GG-GGACTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 65
Alt12         GGGG-----GAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 67
Alt27         GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 81
Alt14         GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 79
Alt6          GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 76
EGS34-016     GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCTTGTC 57
Ulocladium    GGGT-----TAC-AGCCTTGCTGAATTATTC-ACCCGTGTC 60
EGS27-193     GGGCACTGCTTCACGGCGTGCCGCGCGGGCCGGCCCTGCTGAATTATTC-ACCCGTGTC 103
Riv-St1       GGGC-----TCCAGCTTGCTGAATTATTC-ACCCATGTC 77
S.vesicarium  GGGC-----TCCAGCTTGCTGAATTATTC-ACCCATGTC 82
S.botryosum   GGGC-----TCCAGCTTGCTGAATTATTC-ACCCATGTC 71
                * *          ***** ** *

EGS48-147       TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 138
A.porri        TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 138
Alt35         TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 138
Alt34         TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 130
A.solani      TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 505
A.zinniae     TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 505
A.sesamicola TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 156
A.macrospora  TTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACC 505

```

Embellisia 133
Alt17 133
Alt20 133
EGS34-015 133
Alt4 133
Alt22 134
Alt18 133
A. tenuissima 133
Alt8 153
Alt1 139
A. arborescens 501
A. destruens 155
A. longipes 501
A. alternata 153
Alt5 125
Alt21 125
Alt30 130
Alt9 124
Alt3 123
Alt12 125
Alt27 139
Alt14 137
Alt6 134
EGS34-016 115
Ulocadium 118
EGS27-193 162
Riv-St1 137
S. vesicarium 142
S. botryosum 130

* *

ITS1 5.8S

EGS48-147 197
A. porri 197
Alt35 197
Alt34 189
A. solani 564
A. zinniae 563
A. sesamicola 214
A. macrospora 563
Embellisia 210
Alt17 190
Alt20 190
EGS34-015 190
Alt4 190
Alt22 191
Alt18 190
A. tenuissima 190
Alt8 210
Alt1 196
A. arborescens 558
A. destruens 212
A. longipes 558
A. alternata 210
Alt5 182
Alt21 182
Alt30 187
Alt9 181
Alt3 180
Alt12 182
Alt27 196
Alt14 194
Alt6 191
EGS34-016 172
Ulocadium 177
EGS27-193 220

Riv-St1 TTTTGTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATT-ACAACTTTCAACAACGG 196
S. vesicarium TTTTGTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATT-ACAACTTTCAACAACGG 201
S. botryosum TTTTGTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATT-ACAACTTTCAACAACGG 189
 **** * ** * ***** * * * * *

EGS48-147 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 257
A. porri ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 257
 Alt35 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 257
 Alt34 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 249
A. solani ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 624
A. zinniae ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 623
A. sesamicola ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 274
A. macrospora ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 623
 Embellisia ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 270
 Alt17 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 250
 Alt20 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 250
 EGS34-015 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 250
 Alt4 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 250
 Alt22 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 251
 Alt18 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 250
A. tenuissima ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 250
 Alt8 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 270
 Alt1 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 256
A. arborescens ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 618
A. destruens ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 272
A. longipes ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 618
A. alternata ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 270
 Alt5 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 242
 Alt21 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 242
 Alt30 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 247
 Alt9 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 241
 Alt3 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 240
 Alt12 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 242
 Alt27 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 256
 Alt14 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 254
 Alt6 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 251
 EGS34-016 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 232
 Ulocladium ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC 237
 EGS27-193 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACGTAGTGTGAATTGC 280
 Riv-St1 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACGTAGTGTGAATTGC 256
S. vesicarium ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACGTAGTGTGAATTGC 261
S. botryosum ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACGTAGTGTGAATTGC 249

EGS48-147 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 317
A. porri AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 317
 Alt35 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 317
 Alt34 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 309
A. solani AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 684
A. zinniae AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 683
A. sesamicola AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 334
A. macrospora AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 683
 Embellisia AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 330
 Alt17 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 310
 Alt20 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 310
 EGS34-015 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 310
 Alt4 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 309
 Alt22 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 311
 Alt18 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 310
A. tenuissima AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 310
 Alt8 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 330
 Alt1 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 316
A. arborescens AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 678
A. destruens AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 332
A. longipes AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 678

A.alternata AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 330
 Alt5 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 302
 Alt21 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 302
 Alt30 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 307
 Alt9 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 301
 Alt3 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 300
 Alt12 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 302
 Alt27 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 316
 Alt14 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 314
 Alt6 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 311
 EGS34-016 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 292
 Ulocladium AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 297
 EGS27-193 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 340
 Riv-St1 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 316
 S.vesicarium AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 321
 S.botryosum AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGG 309

5.8S ITS2

EGS48-147 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 377
 A.porri CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 377
 Alt35 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 377
 Alt34 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 369
 A.solani CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 744
 A.zinniae CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 743
 A.sesamicola CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 394
 A.macrospora CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 743
 Embellisia CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTG 390
 Alt17 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 367
 Alt20 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 367
 EGS34-015 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 367
 Alt4 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 366
 Alt22 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 368
 Alt18 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 367
 A.tenuissima CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 367
 Alt8 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 387
 Alt1 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 373
 A.arborescens CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 735
 A.destruens CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 389
 A.longipes CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 735
 A.alternata CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 387
 Alt5 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 359
 Alt21 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 359
 Alt30 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 364
 Alt9 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 358
 Alt3 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 357
 Alt12 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 359
 Alt27 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 373
 Alt14 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 371
 Alt6 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 368
 EGS34-016 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 349
 Ulocladium CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT---G 354
 EGS27-193 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTT---G 399
 Riv-St1 CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTT---G 374
 S.vesicarium CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTT---G 379
 S.botryosum CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTT---G 367

EGS48-147 TCTCTCC----TTGCGGG-AGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 432
 A.porri TCTCTCC----TTGCGGG-AGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 432
 Alt35 TCTCCCC----TTGCGGG-AGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 432
 Alt34 TCTCCCC----TTGCGGG-AGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 424
 A.solani TCTCCCC----TTGCGGG-AGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 799
 A.zinniae TCCCCCCCCCTTGGGGGAGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 803
 A.sesamicola TCCCCCGG--CTTGGGGGAGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 452
 A.macrospora TCCCCCGG--CTTGGGGGAGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC 801

Embellisia	TCTCCGGC---TTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTGATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	446
Alt17	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	424
Alt20	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	424
EGS34-015	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	424
Alt4	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	423
Alt22	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	425
Alt18	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	424
A.tenuissima	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	424
Alt8	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	444
Alt1	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	430
A.arborescens	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	792
A.destruens	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	446
A.longipes	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	792
A.alternata	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	444
Alt5	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	416
Alt21	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	416
Alt30	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	421
Alt9	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	415
Alt3	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	414
Alt12	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	416
Alt27	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	430
Alt14	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	428
Alt6	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	425
EGS34-016	TCTCTAGC--TTTGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	406
Ulocadium	TCTCCAG---TTCGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTAATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	410
EGS27-193	TCTCCAGT---TCGCTGG-AGACTCGCCTTAAAGTCATGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC	455
Riv-St1	TCTCTCAC-----G-AGACTCGCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGACCTACTGGTTTC	424
S.vesicarium	TCTCTCAC-----G-AGACTCGCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGACCTACTGGTTTC	429
S.botryosum	TCTCTCAC-----G-AGACTCGCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGACCTACTGGTTTC	417

*** * * ***** * ***** * *****

EGS48-147	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	489
A.porri	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	489
Alt35	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	489
Alt34	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	481
A.solani	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	856
A.zinniae	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	860
A.sesamicola	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	509
A.macrospora	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGT-CTAGCATCCACCAAGCC	858
Embellisia	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTTCCAGCC--AAGGT-C-AGCGTCCACCAAGCC	500
Alt17	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	479
Alt20	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	479
EGS34-015	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	479
Alt4	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	478
Alt22	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	480
Alt18	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	479
A.tenuissima	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	479
Alt8	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGTGCTAGCATGCGCTGTAT-	499
Alt1	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATGC---CAAT-	481
A.arborescens	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	847
A.destruens	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCC---AT-	495
A.longipes	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	847
A.alternata	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	499
Alt5	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	471
Alt21	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	471
Alt30	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	476
Alt9	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	470
Alt3	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	469
Alt12	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	471
Alt27	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	485
Alt14	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	483
Alt6	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAGCA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	480
EGS34-016	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCCTCTCTATCAAGA--AAGGT-CTAGCATCCATTAAGCC	461
Ulocadium	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTCTCCAGCC--AAGGT--CAGCATCCACCAAGCC	464
EGS27-193	GGAGCGCAGCACAAGTC--GCGCTCTTCCAGCC--AAGGT--CAGCGTCCAGCAAGCC	509

```
Riv-St1          GGAGCGCAGCACAATTCTTGCACCTTTGAATCAGCCT--TGGT-TGAGCATCCATCAAGAC 481
S.vesicarium    GGAGCGCAGCACAATTCTTGCACCTTTGAATCAGCCT--TGGT-TGAGCATCCATCAAGAC 486
S.botryosum     GGAGCGCAGCACAATTCTTGCACCTTTGAATCAGCCT--TGGT-TGAGCATCCATCAAGAC 474
*****          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

ITS2 28S

```
T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 527
A.porri         T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 527
Alt35          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 527
Alt34          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 519
A.solani       T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 894
A.zinniae      T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 897
A.sesamicola   T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 546
A.macrospora   T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 895
Embellisia     A---CATTTTCCA-CTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 537
Alt17          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 515
Alt20          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 515
EGS34-015     T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 516
Alt4           T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 515
Alt22          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 517
Alt18          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 515
A.tenuissima   T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 516
Alt8           -----AGC-----AGTCCGGTAGG-----CAGGAACATA 523
Alt1           -----AG-----AGTCCGGTTGGT-----CAACATTAGA 505
A.arborescens T---TTTT-T-CAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA 902
A.destruens    -----T-AAGCCT-----TTTTTTCAACTTT-----TGACCTCGGA 525
A.longipes     T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA 903
A.alternata    T---TTTT-T-CAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA 554
Alt5           T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 508
Alt21          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 507
Alt30          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 513
Alt9           T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 507
Alt3           T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 505
Alt12          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 507
Alt27          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 522
Alt14          T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 520
Alt6           T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 517
EGS34-016     T---TTTTTTCAACTTTTG-----ATA 477
Ulocladium    T---TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 500
EGS27-193     T---TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 547
Riv-St1       CACATTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----A-A 521
S.vesicarium  CACATTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 527
S.botryosum   CACATTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG-----ATA 515
*
```

```
EGS48-147      CCCGCTGAACCTAA-----ATA 541
A.porri        CCCGCTGAACCTACA-----ATA 542
Alt35         CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGG-A----- 561
Alt34         CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAG----- 552
A.solani       CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGG-AAAAGA 933
A.zinniae     CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGC-GGAGGAAAAGA 936
A.sesamicola  CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGGA----- 581
A.macrospora  CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGC-GGAGGAAAAGA 934
Embellisia    CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGGA----- 571
Alt17         CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGG-AGGAA----- 550
Alt20         CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGG-AGGAA----- 550
EGS34-015    CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGGAA----- 552
Alt4          CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGC-GGAGGA----- 549
Alt22         CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGG----- 551
Alt18         CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGC----- 543
A.tenuissima  CCCGCTGAACCTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGG-AGGAAGG-- 553
Alt8          TCAA-TAAGAGGAGG-----CAG-----TCTCGTG----- 547
Alt1          TCAG-CG-GAGCAGT-----TCG-----TGAGTGAGAAGTGTGAGGA-- 542
A.arborescens TCAA-TAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAAACGGCAGTGAAGCGG 961
A.destruens   TCAGGTAGGGATAC-----CCG-----CTGAACCTAA----- 552
A.longipes    TCAA-TAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAAACGGCAGTGAAGCGG 962
```

<i>A.alternata</i>	TCAA-TAAGCGGAGG-----	568
Alt5	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCAT-----	531
Alt21	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATATT-----	530
Alt30	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCATT-----	537
Alt9	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCATTAA-----	533
Alt3	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TA-AAT-----	527
Alt12	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGGAAAA---	544
Alt27	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGAGGAA-----	557
Alt14	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCAATAAGCCGGAGGAA-----	556
Alt6	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGG-----	547
EGS34-016	--CACT-----	481
<i>Ulocladium</i>	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TAT-----	520
EGS27-193	CCCGCTGAACTTAAG-----CA-----TATCAATAAGCGGGAGGAA-----	583
Riv-St1	CCCGCTGAAC-----	531
<i>S.vesicarium</i>	CCCGCTGAACTTACA-----	542
<i>S.botryosum</i>	CCCGCTGAACTTAAGCA-----TATCAATAAGC-----	543

E-2. CLUSTAL X (1.83) Multiple alineamiento de las secuencias de *Stemphylium*.

18S ITS1

↔

```

S.gracilariae      -----CATTACACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 42
S.alfalfae        AGGGATCATTACACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 48
S.majusculum      -----CATTACACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 42
S.vesicarium      AGGGATCATTACACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 48
S.lancipes        -----CATTACACA-ATATGAAAGCGGGCTGGGACCTCACTTC-GGTGC 42
P.herbarum        AGGGATCATTACACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 48
Riv-St1           -----CATTACACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTCCGGTGA 43
P.sedicola        -----GCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 25
P.tomatonis       -----GCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 25
P.gigaspora       -----GCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 25
P.tarda           -----GCGGGTTGGGACCTCACTTT-GGTGA 25
S.botryosum       -----CACA-ATATGAAAGCGGGTTGGGACCTCACCTC-GGTGA 37
Ulocladium        -----ATATGAAAGCGGGCTGGCATCCT---TC-----G 26
Alternaria        -AGGATCATTACACAAATATGAAGCGGGCTGGAACCTC---TC-----G 41
                    *****  ***  *  *  *

```

```

S.gracilariae      GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 92
S.alfalfae        GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 98
S.majusculum      GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 92
S.vesicarium      GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 98
S.lancipes        GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 92
P.herbarum        GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 98
Riv-St1           GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 93
P.sedicola        GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 75
P.tomatonis       GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 75
P.gigaspora       GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 75
P.tarda           GGGCTCCAGCTCGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 75
S.botryosum       GGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGGCGCACTTCTTG 87
Ulocladium        GGGTTACAGCCTTGTCTGAATTATTCACCCGTGTCTTTTGGCGTACTTCTTG 76
Alternaria        GGGTTACAGCCTTGTCTGAATTATTCACCCGTGTCTTTTGGCGTACTTCTTG 91
                    ***  *  *****  *****  *****

```

```

S.gracilariae      TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 142
S.alfalfae        TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 148
S.majusculum      TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 142
S.vesicarium      TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 148
S.lancipes        TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 142
P.herbarum        TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 148
Riv-St1           TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 143
P.sedicola        TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 125
P.tomatonis       TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 125
P.gigaspora       TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 125
P.tarda           TTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 125
S.botryosum       TTTCTGGGCGGGTTCGCC -GCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTG 136
Ulocladium        TTTCTTGGTGGGTTTCGCCACCA-TAGGAC-AAACCATAAACCTTTTTG 124
Alternaria        TTTCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGAC-AAAC-ATAAACCTTTT-G 138
                    *****  **  *****  ***  *****  *****  *****

```

ITS1 5.8S

↔

```

S.gracilariae      TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 192
S.alfalfae        TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 198
S.majusculum      TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 192
S.vesicarium      TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 198
S.lancipes        TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 192
P.herbarum        TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 198
Riv-St1           TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 193
P.sedicola        TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 175
P.tomatonis       TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 175
P.gigaspora       TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 175
P.tarda           TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAA 175

```

S.botryosom	TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAA	186
Ulocladium	TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAAAAATTAATAATTACAACCTTTTAACAA	174
Alternaria	TAATTGCAATCAGCGTCAGTAAACAAA-TTAATAATTACAACCTTTCAACAA	187
	***** ** *****	
S.gracilariiae	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	242
S.alfalfae	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	248
S.majusculum	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	242
S.vesicarium	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	248
S.lancipes	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	242
P.herbarum	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	248
Riv-St1	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	243
P.sedicola	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	225
P.tomatonis	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	225
P.gigaspora	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	225
P.tarda	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	225
S.botryosom	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG	236
Ulocladium	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG	224
Alternaria	CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG	237
	***** *	
S.gracilariiae	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	292
S.alfalfae	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	298
S.majusculum	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	292
S.vesicarium	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	298
S.lancipes	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	292
P.herbarum	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	298
Riv-St1	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	293
P.sedicola	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	275
P.tomatonis	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	275
P.gigaspora	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	275
P.tarda	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	275
S.botryosom	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	286
Ulocladium	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	274
Alternaria	TAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	287

	5.8S ITS2	
S.gracilariiae	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	342
S.alfalfae	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	348
S.majusculum	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	342
S.vesicarium	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	348
S.lancipes	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	342
P.herbarum	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	348
Riv-St1	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	343
P.sedicola	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	325
P.tomatonis	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	325
P.gigaspora	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	325
P.tarda	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	325
S.botryosom	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	336
Ulocladium	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	324
Alternaria	GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC	337

S.gracilariiae	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	385
S.alfalfae	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	391
S.majusculum	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	385
S.vesicarium	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	391
S.lancipes	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	385
P.herbarum	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	391
Riv-St1	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	386
P.sedicola	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	368
P.tomatonis	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	368
P.gigaspora	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	368
P.tarda	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	368
S.botryosom	CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTC-----TCAC--GAGA	379

```

Ulocladium          CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTC-TTGTCTCCAG-TTCGCTGGAGA 372
Alternaria          CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTC-TTGTCTCTAGCTTTTCTGGAGA 386
*****
S.gracilariae      CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 435
S.alfalfae         CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 441
S.majusculum       CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 435
S.vesicarium       CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 441
S.lancipes         CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 435
P.herbarum         CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 441
Riv-St1            CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 436
P.sedicola         CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 418
P.tomatonis        CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 418
P.gigaspora        CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 418
P.tarda            CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 418
S.botryosum        CTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 429
Ulocladium         CTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGCGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 422
Alternaria         CTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGCGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC 436
*****

S.gracilariae      AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 484
S.alfalfae         AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 490
S.majusculum       AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 484
S.vesicarium       AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 490
S.lancipes         AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 484
P.herbarum         AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 490
Riv-St1            AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 485
P.sedicola         AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 467
P.tomatonis        AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 467
P.gigaspora        AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACAA 468
P.tarda            AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 467
S.botryosum        AATTCTTGCACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACA- 478
Ulocladium         AAGTC--GCGCTCTCTCCAGCCAAGGTC-AGCATCCACAAAGCC----- 464
Alternaria         AAGTC--GCACTCTCTATCAGCAAAGGTC-TAGCATCCATTAAGCC----- 479
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                ITS2 28S
                ←
S.gracilariae      TTTTT--AACTTTTGAC----- 500
S.alfalfae         TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCA----- 517
S.majusculum       TTTTTTT--AACTTTTGACC----- 502
S.vesicarium       TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA 540
S.lancipes         TTTTTTT--AACTTTTGACC----- 502
P.herbarum         TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA 540
Riv-St1            TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAACCCGCTGAAC---- 531
P.sedicola         TTTTTTTCAACTTTTGAC----- 485
P.tomatonis        TTTTTTTCAACTTTTGAC----- 485
P.gigaspora        TTTTTTTTAACTTTTGAC----- 486
P.tarda            TTTTTT--AACTTTTGAC----- 483
S.botryosum        TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA 528
Ulocladium         TTTTTT--CAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA 513
Alternaria         TTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA 529
*****

S.gracilariae      -----
S.alfalfae         -----
S.majusculum       -----
S.vesicarium       CA----- 542
S.lancipes         -----
P.herbarum         A----- 541
Riv-St1            -----
P.sedicola         -----
P.tomatonis        -----
P.gigaspora        -----
P.tarda            -----
S.botryosum        AGCATATCAATAAGC----- 543
Ulocladium         AGCATAT----- 520
Alternaria         AGCATATCAATAAGCGGGAGGAA 552

```