

*Penicillium allii* Vincent et. Pitt, agente causal del  
moho azul del ajo. Identificación, distribución y  
patogenicidad en las provincias de Mendoza y San  
Juan, Argentina

Jorge Gustavo VALDEZ

Trabajo de Tesis presentado como requisito para optar  
al grado académico de Doctor en Biología

Programa de Postgrado en Biología PROBIOL

Fac. Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de Cuyo

Mendoza - Argentina

Agosto 2008

## **Director**

Ricardo William MASUELLI

Ing. Agr., M.Sc.,Dr.

-----

## **Codirector**

Ricardo José PICCOLO

Ing. Agr., M.Sc.

-----

## **Comité Tutorial:**

Enrique PEREYRA

Ing. Agr., M.Sc.

-----

Juan Bruno CAVAGNARO

Ing. Agr., M.Sc.

-----

## **Dedicatoria**

*a mi familia, que me apoyó mucho más allá de lo comprensible.*

## Prólogo

Este es un trabajo que se llevó a cabo para determinar la identidad y patogenicidad de los hongos del género *Penicillium* que afectan ajo en la principal área productora de Argentina.

Luego de muchos esfuerzos y la colaboración de mucha gente, entre ellos productores, personal técnico y de apoyo de la Estación Experimental Agropecuaria La Consulta (EEA La Consulta) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), docentes de la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, personal administrativo de ambas reparticiones, se ha llegado a conclusiones que son válidas para la gente de campo, a quienes quiero agradecer por autorizarnos a tomar muestras en sus propiedades cuando comenzamos estos estudios, allá por el verano de 1999-2000.

Quiero destacar que este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración del Ing. Agr. (M. Sc) José Luis Burba, quien fue parte del grupo que obtuvo el subsidio PICT 0803687 bajo el cual se inició este proyecto. Sus comentarios, sugerencias y correcciones fueron de mucha cuantía al momento de planificar, ejecutar y difundir estos resultados.

La facilitación de documentos institucionales realizada por la Ing. Marta Gatica (EEA Mendoza, INTA) se agradece.

Fue inconmensurable el aporte del Dr. Jens Frisvad del Biocentrum DTU (Lyngby, Dinamarca) con el cual se pudo discernir la identidad de las especies que encontramos colonizando tejidos de ajo. Fue especial mérito de los Drs. David Overy, Jens Frisvad y Thomas Larsen la gestión de una beca para realizar una visita rentada en dicho instituto durante el otoño boreal de 2004. Las

palabras del Dr. Pitt (Pitt 1973) "*Penicillium identification is not easy, even for the expert*" tomaron su real dimensión cuando observé colonias de diferentes especies de la Serie Corymbifera que presentan un morfotipo muy parecido cuando es evaluado por métodos estándares macro y microscópicos.

Hay muchas personas que de una u otra manera colaboraron con este proyecto y que sería muy largo de enumerar, pero no puedo dejar de mencionar la inestimable colaboración de la Ing. María A. Makuch y del Tec. Aldo F. Ordovini del laboratorio de Análisis de Semillas José Crnko, de la EEA La Consulta del INTA. Juntos compartimos desde la colecta del material, todas las alegrías y sinsabores lógicos que genera un proyecto de investigación. Los aportes económicos realizados por el laboratorio a través de la Fundación Argeninta para financiar muchos de los trabajos aquí presentados, fueron gestionados por la Ing. Makuch y su equipo de trabajo del citado laboratorio.

Gran parte del trabajo no hubiera sido posible sin el incondicional apoyo del Dr. Sergio Bramardi (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue) quien me introdujo en el maravilloso mundo del análisis multivariante. Es un orgullo para mí que datos generados en este proyecto constituyan ahora material didáctico que se usa en cursos regulares de análisis multivariado para explicar a estudiantes de posgrado en el país y en Europa, la técnica de los componentes principales.

La dirección de la EEA Rama Caída INTA y EEA La Consulta INTA fueron generosas más allá de lo administrativamente posible y jugaron un importante rol en el apoyo económico que me permitió iniciar y finalizar, respectivamente, los trabajos inherentes a esta tesis. Vaya para el Ing. Eduardo Vega, en la primer etapa; y para el Ing. Ricardo Piccolo, etapa final, mi agradecimiento.

Los miembros del comité tutorial realizaron críticas fundamentales en el

inicio de este trabajo y se agradece su participación.

Finalmente mi reconocimiento a la gente que constituye el Probiol, por haber confiado en mí al otorgarme la beca nro 11, Fomec, proyecto 238 y por la asistencia brindada durante todos estos años.

Todos los errores, omisiones o equivocaciones presentados en el siguiente trabajo son de mi exclusiva responsabilidad.

Mendoza, Agosto de 2008.

## Indice General

Prólogo.....	iv
Abreviaturas y siglas .....	xi
Tablas .....	xiv
Figuras .....	xv
Resumen .....	xvii
Abstract.....	xx
I: Introducción.....	1
I.1 La podredumbre verde o moho azul. ....	2
I.1.1 El cultivo de ajo ( <i>Allium sativum</i> L.) en la región .....	2
I.1.2 La podredumbre verde.....	4
I.1.2.1 Sintomatología .....	5
I.1.2.2 Manejo de la enfermedad .....	9
I.1.2.3 Etiología.....	13
I.1.3 Estudios realizados en base a medios con extractos de ajo.....	19
I.1.4 Distribución.....	20
I.1.5 Estudios fitopatológicos .....	22
I.2 El género <i>Penicillium</i> .....	25
I.2.1 Antecedentes históricos e importancia del género. ....	25
I.2.2 Clasificación.....	28
I.2.2.1 Criterios culturales y morfológicos utilizados para la descripción de especies de <i>Penicillium</i> .....	42
I.2.2.2 Criterios fisiológicos y bioquímicos .....	47
I.2.2.3 Metabolitos secundarios .....	49
I.2.2.4 Taxonomía molecular.....	52
I.2.2.5 Clasificación de los <i>Penicillia</i> <i>terroverticilados</i> .....	54
II. Objetivos .....	56
II.1 Taxonómico .....	57
II.2 Fitopatológico.....	57
II.3 Ecológico .....	57
III. Plan de trabajo .....	58
III.1 Muestreo de ajo en la principal zona productora de Argentina. ....	59
III.2 Obtención de cultivos de <i>Penicillium</i> spp. ....	59
III.3 Identificación de la colección.....	59
III.4 Realización de análisis de patogenicidad .....	60
IV. Material y Métodos.....	61
IV.1 Muestreo de ajo en Mendoza y San Juan.....	62
IV.2 Aislamiento de <i>Penicillium</i> .....	68
IV.3 Identificación .....	77

IV.3.1 Identificación morfológica.....	77
IV.3.2 Identificación por metabolitos secundarios .....	96
IV.4 Caracterización patogénica de los aislamientos .....	98
IV.4.1 Desarrollo <i>in vitro</i> .....	99
IV.4.2 Patogenicidad <i>in vivo</i> 1: Cámara húmeda .....	101
IV.4.3 Patogenicidad <i>in vivo</i> 2: Ensayo a campo.....	103
V. Identificación, Distribución y Patogenicidad de <i>Penicillia</i> aislados de ajo en Mendoza y San Juan .....	109
V.1 Hipótesis de Trabajo .....	109
V.2 <i>Penicillium viridicatum</i> no es el agente causal del moho azul.....	111
V.3 <i>Penicillium allii</i> es el agente causal de la enfermedad conocida como podredumbre verde en las provincias argentinas de Mendoza y San Juan ...	114
V.3.1 Materiales y Métodos .....	115
V.3.2 Resultados y Discusión .....	120
V.4 Uso de espectrofotometría como una herramienta para cuantificar la esporulación de <i>Penicillium allii</i> en lesiones de ajo.....	137
V.4.1 Materiales y Método.....	138
V.4.2 Resultados y Discusión .....	139
V.5 Sobrevivencia de <i>Penicillia</i> en bulbillos de ajo inoculados.....	142
V.5.1 Materiales y Métodos .....	142
V.5.2 Resultados y Discusión .....	145
VI. Aislamiento e identificación de <i>P. allii</i> en un medio semiselectivo basado en extracto de ajo .....	149
VI.1 Introducción.....	149
VI.2 Hipótesis de trabajo .....	153
VI.3 Materiales y método .....	154
VI.3.1 Polvo y extracto acuoso de ajo .....	154
VI.3.2 Preparación de medios de cultivo.....	155
VI.3.3 Selección de microorganismos y preparación del inóculo .....	156
VI.3.4 Registro de características de la colonia.....	157
VI.3.5 Análisis estadísticos .....	158
VI.3.6 Aislamiento de <i>Penicillium allii</i> en medios estándares y GSA.....	158
VI.4 Resultados y Discusión .....	159
VI.4.1 Agrupamiento de <i>Penicillium spp.</i> según medios estándares.....	159
VI.4.2 Agrupamiento de <i>Penicillium spp.</i> según medios basados en extracto de ajo .....	163
VI.4.3 Descripción fenotípica de <i>Penicillium allii</i> en los medios GSA y GA .....	168
VI.4.4 Efecto del origen del extracto de ajo en el desarrollo de <i>P. allii</i> y otras especies de <i>Penicillium</i> .....	168

VII. Revisiones de la Serie <i>Corymbifera</i> del género <i>Penicillium</i> : agentes causales de moho azul en el almacenamiento de varios bulbos de flores y hortalizas. ...	173
VII.1 Hipótesis de Trabajo.....	173
VII.2 Comparación macromorfología y por metabolitos secundarios de hongos del genero <i>Penicillium</i> pertenecientes a la Serie <i>Corymbifera</i> . ....	173
VII.3 Clasificación de <i>Penicillium</i> spp. Serie <i>Corymbifera</i> por secuencias génicas. ....	180
VIII: Análisis de patogenicidad de cepas con agresividad diferencial de <i>Penicillium allii</i> en medios de cultivo con extracto fresco de ajo.....	188
VIII.1 Introducción.....	188
VIII.3 Objetivo.....	189
VIII.4 Hipótesis.....	190
VIII.5 Materiales y métodos.....	190
VIII.5.1 Aislamientos utilizados.....	190
VIII.5.2 Obtención del inóculo.....	190
VIII.5.3 Preparación del medio de cultivo e inoculación.....	191
VIII.6 Resultados y Discusión.....	192
IX. Discusión General.....	194
X. Conclusiones y perspectivas.....	202
Taxonomía.....	202
Fitopatología.....	202
Ecología.....	203
Posibles líneas de investigación derivadas de esta tesis.....	203
XI. Bibliografía General.....	206
XII. Anexos.....	224
XII.1: Medios de cultivo.....	224
Czapek Yeast Extract Agar (CYA) (Pitt 1973).....	224
Concentrado Czapek (Smith 1949).....	224
Yeast Extract Agar (YES) (Samson <i>et al.</i> 2000).....	225
Medio para monosporizar aislamientos (Valdez <i>et al.</i> , en prensa).....	225
Garlic Sucrose Agar (GSA) (Valdez <i>et al.</i> , en prensa).....	225
Oatmeal Agar (OA) (Samson <i>et al.</i> 2000).....	226
Solución con trazas de metales.....	226
Agar Extracto de Malta (MEA) (Raper & Thom, 1949).....	226
25% Glycerol Nitrate Agar (G25N) (Pitt 1973).....	227
Creatine Sucrose Agar (CREA) (Frisvad 1985b).....	227
XII.2: Tipos de compuestos químicos que se utilizan para el control de enfermedades fúngicas en plantas.....	228
XII.2.1 Compuestos de cobre.....	228
XII.2.2 Compuestos de azufre.....	228

XII.2.3	<i>Compuestos aromáticos</i> .....	229
XII.2.4	<i>Compuestos heterocíclicos</i> .....	230
XII.2.5	<i>Fungicidas sistémicos</i> .....	231
XII.2.5.1	<i>Acilalaninas</i> .....	232
XII.2.5.2	<i>Benzimidazoles</i> .....	232
XII.2.5.3	<i>Imadazoles</i> .....	233
XII.2.5.4	<i>Oxantinas</i> .....	233
XII.2.5.5	<i>Triazoles</i> .....	233
XII.2.5.6	<i>Otros Fungicidas sistémicos</i> .....	234
XII.3:	Informes servicios de identificación.....	235
XII.3.1	Informe H576/81/YA2. CAB.....	235
XII.3.2	Informe H199/01/YA2. CABI. ....	236
XII.3.3	Informe N 2002-104. Mayo 22, 2002. CSIRO. ....	238
XII.4:	Correspondencia citada .....	239
XII.4.1	Correspondencia Dr. Onions, 1ro Octubre 1981 .....	239
XII.4.2	Correo electrónico 03 de noviembre de 2006. Dr. R. Shattock, Editor Plant Pathology .....	240
XII.4.4	Correo electrónico 07 de enero de 2008. Dr. Brigitte Mauch-Mani, Editor Journal of Phytopathology.....	242
XII.5:	Artículos publicados.....	243
XII.5.1	Canadian Journal of Botany 83, 1422-1433.....	243
XII.5.2	Plant Pathology 55, 583. ....	256
XII.5.3	Fitopatologia Brasileira 31, 583-585.....	258

## Abreviaturas y siglas

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*): Polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados

ANAVA: Análisis de la Varianza. (ANOVA: *Analysis of variance*)

ARN: Acido Ribonucleico

ATP: Adenosín Tri-Fosfato

CABI Biosciences (*Commonwealth Agricultural Bureau Internacional*) Surrey, UK, centro de la colección IMI: *International Mycological Institute*, anteriormente CMI (*Commonwealth Mycological Institute*)

CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*), Utrecht, Holanda.

CEE: Comunidad Económica Europea.

CMB (*Center for Microbial Biotechnology*) Lyngby, Dinamarca, centro de la colección de cultivos tipo IBT.

CMI (*Commonwealth Mycological Institute*). Instituto Micológico de la Commonwealth. Ver CABI.

con: Conidio, conidios.

CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*). Australia.

CYA (*Czapek Yeast Agar*): Agar levadura de Czapek, medio de cultivo.

DIC (*Differential interference contrast*): Contraste de Interferencia Diferencial.

DNA (*deoxyribonucleic acid*).

DTU (*Danmarks Tekniske Universitet*): Universidad Técnica de Dinamarca

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

FAO (*Food and Agriculture Organization*): Organización para la alimentación y la agricultura de las Naciones Unidas.

FRR (*Food Research Laboratory*), North Ryde, New South Wales, Australia. Colección de cultivos tipo.

G25N (25% *Glycerol Nitrate Agar*): Agar nitrato con 25% de glicerina, medio de cultivo.

gms: Gramos de materia seca.

GSA (*Garlic Sucrose Agar*): Agar ajo glucosado, medio de cultivo.

GC (*Gas Chromatography*): Cromatografía de gases.

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*): Cromatografía líquida de alto rendimiento.

IBT: DTU, Lyngby, Dinamarca. Colección de cultivos tipo.

IDR: Instituto de Desarrollo Rural, Mendoza, Argentina.

IMI: *International Mycological Institute*. Colección de cultivos tipo. Ver CABI

INDEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Argentina.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

ITS (*Internal Transcribed Spacer*): Secuencia intertranscripta de genes ribosomales.

IVD: Índice visual de dormición.

MEA (*Malt extract Agar*): Agar Extracto de Malta, medio de cultivo.

MS (*Mass Spectrometry*): Espectrometría de masa.

MST (*Minimum Spanning Tree*): Árbol del recorrido mínimo.

NRRL. ARS (NRRL) *Agricultural Research Service Culture Collection*. Peoria, Illinois, EEUU. Colección de cultivos tipo.

OAT (*Oatmeal Agar*): Agar avena, medio de cultivo.

OTUs (*Operational Taxonomic Units*): Unidad Taxonómica Operativa

PDA (*Potato dextrose agar*): Agar papa glucosado, medio de cultivo.

RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*): Polimorfismos de ADN amplificados al azar.

RP-HPLC (*reversed phase-HPLC*): HPLC de fase reversa.

TLC (*Thin Layer Chromatography*): Cromatografía de placa delgada.

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*): Método no ponderado de agrupamiento de pares con promedio aritmético.

YES (*Yeast Extract Sucrose agar*): Agar extracto de levadura sacarosado, medio de cultivo.

## Tablas

Tabla 1: Principales países exportadores de ajo.....	2
Tabla 2: Superficie de ajo implantada en el país por provincia (en ha).....	3
Tabla 3: Clasificación de productos químicos usados para el control de hongos.....	12
Tabla 4: Especies citadas como patogénicas en ajo ordenadas según el número de verticilos.....	17
Tabla 5: Clasificación de hongos del género <i>Penicillium</i> y relacionados ( <i>Eupenicillium</i> y <i>Talaromyces</i> ) en subgéneros (Pitt 1979a).....	38
Tabla 6: Propuesta de clasificación de los anamorfos del género <i>Penicillium</i> .....	41
Tabla 7: Clasificación jerárquica aceptada del género <i>Penicillium</i> (Kirk et al. 2001) .....	42
Tabla 8: Clasificación de hongos del género <i>Penicillium</i> Subgénero <i>Penicillium</i> en Secciones y Series (Frisvad & Samson 2004).....	55
Tabla 9: Área cultivada, estimación de muestras a obtener (n-est) y muestras obtenidas (n-obt) en los oasis productivos de Mendoza y San Juan según el tipo de ajo.....	64
Tabla 10: Muestra; Provincia; Departamento y Paraje donde se tomó la Muestra.....	69
Tabla 11: Diámetro alcanzado por el aislamiento LJC 402 en los medios de cultivos CYA y GSA según la dosis inoculada. ....	85
Tabla 12: Relación GSA/CYA según la concentración del inóculo .....	85
Tabla 13: Caracteres considerados para clasificar las colonias según su fenotipo en el medio de cultivo CYA y su diámetro en el medio GSA. ....	86
Tabla 14: Aislamientos usados en ensayos de patogenicidad (Aislamientos en negrita se utilizaron también en análisis de metabolitos secundarios). ....	118
Tabla 15: Distribución de especies de <i>Penicillium</i> aisladas de bulbos de ajo en 17 distritos agroclimáticos. ....	119
Tabla 16: Análisis de la varianza de variables de patogenicidad agrupadas por raza. ....	131
Tabla 17: Conteos de conidios y su coeficiente de variación (CV).....	141
Tabla 18: Sobrevivencia de <i>Penicillium allii</i> en bulbillos de ajo.....	144
Tabla 19: Inhibición a la germinación de conidios. ....	150
Tabla 20: Desarrollo de <i>Penicillium</i> spp aislados y relacionados con ajo en medios suplementados con extracto de ajo.....	170
Tabla 21: Cepas de <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> usadas para comparación morfológica y molecular. ....	175
Tabla 22: Análisis de <i>Cluster</i> fenotípico y quimotaxonómico de especies de <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> . ....	176
Tabla 23: Secuencias del gen de la $\beta$ tubulina de <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> . ....	181
Tabla 24: Distancia genética de <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> .....	182
Tabla 25: Matriz de distancia genética según frecuencias de metabolitos.....	182
Tabla 26: Secuencias de ITS de <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> .....	187
Tabla 27: Relación entre diámetros y razas agresivas.....	193

## Figuras

Figura 1: Planta con síntomas de ataque de <i>Penicillium allii</i> .....	6
Figura 2: Planta de Figura 1 a la que se le retiró la tierra que rodeaba al bulbo.....	7
Figura 3: Bulbos que sobrevivieron a inoculaciones experimentales con el aislamiento LJC 119 de <i>Penicillium allii</i> .....	8
Figura 4: Tipos de disposición del conidióforo de <i>Penicillium</i> y clasificación en subgéneros según Pitt (Pitt 1979a).....	31
Figura 5: <i>Penicillium allii</i> , aislamiento LJC 542. Nombre de las estructuras del conidióforo, adaptado de (Samson <i>et al.</i> 2000).....	32
Figura 6: Diagrama de clasificación establecido por Raper & Thom (1949).....	36
Figura 7: Relación filogenética de anamorfos de <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Paecilomyces</i> .....	40
Figura 8: Informe de participantes de un ensayo de eficiencia para determinar el grado de rugosidad de los conidióforos observados en el medio CYA.....	45
Figura 9: Informe de participantes de un ensayo de eficiencia para determinar la forma de conidios de <i>Penicillium</i> .....	46
Figura 10: Muestra 103 obtenida de cordones a campo en la localidad de Ugarteche, Mendoza.....	65
Figura 11: Muestra 69 obtenida en Uspallata (Mendoza).....	66
Figura 12: Muestra 104 obtenida en Agrelo (Mendoza) en secaderos verticales.....	67
Figura 13: Obtención de cultivos puros a partir de suspensiones combinadas de dos hongos del género <i>Penicillium</i> : LJC 202 y LJC 317.....	76
Figura 14: Esquema de selección aleatoria de los aislamientos en 12 grupos (Tandas) de 45 aislamientos cada uno.....	80
Figura 15: Esquema de la metodología utilizada para la inoculación aleatoria de los aislamientos en medio GSA correspondientes a la Tanda 10.....	81
Figura 16: Ajuste del inóculo utilizado en pruebas de patogenicidad.....	82
Figura 17: Efecto de la concentración del inóculo <i>in vitro</i> , medio GSA.....	84
Figura 18: Análisis de cluster de 538 aislamientos de <i>Penicillium</i> obtenidos de ajo en las provincias de Mendoza y San Juan.....	95
Figura 19: Ensayo de Desarrollo <i>in vitro</i> .....	100
Figura 20: Ensayo de Patogenicidad <i>in vivo</i> . Cámara húmeda, correspondiente a la caja N° 12 del clon Fuego INTA.....	102
Figura 21: Vista general del ensayo de patogenicidad a campo.....	104
Figura 22: Elemento punzante y herida generada en bulbillos a inocular.....	105
Figura 23: Planta de ajo del clon Fuego INTA inoculada con el aislamiento LJC 517 mostrando el signo de la enfermedad.....	107
Figura 24: Vista general del área donde se produjo el “curado” de los bulbos.....	108
Figura 25: LJC 517, hongo terverticilado, identificado como <i>Penicillium allii</i> .....	113
Figura 26: Fenotipos de <i>P. allii</i> afectando ajo en Mendoza y San Juan observados en CYA, 7d 25°C (frente y reverso).....	123
Figura 27: <i>P. viridicatum</i> IBT 15039. Fenotipo observado en CYA, 21 °C 7d. Detalle de exudado amarillo en anillo periférico.....	124

Figura 28: Agrupamiento de 32 aislamientos de <i>Penicillium</i> spp. obtenidos de bulbos de ajo según su perfil de metabolitos secundarios .....	125
Figura 29: (a) Riqueza de especies de <i>Penicillium</i> , (b) Inóculo relativo de <i>P. allii</i> por <i>grid</i> en San Juan y Mendoza. ....	126
Figura 30: Análisis de procrustes mostrando la interacción entre años de muestreo y aislamientos.....	128
Figura 31: Análisis de <i>cluster</i> realizado sobre los dos primeros componentes principales de análisis de patogenicidad.....	129
Figura 32: Análisis de Componentes Principales de variables de patogenicidad. ....	133
Figura 33: Emergencia y sobrevivencia de plantas de acuerdo a cada raza en los cvs. Fuego INTA y Castaño INTA .....	135
Figura 34: Reaislamiento de hongos de la especie <i>Penicillium allii</i> inoculados. ....	136
Figura 35: Relación entre la transmitancia registrada en un espectrofotómetro y la concentración de conidios de <i>P. allii</i> estimada con cámara de Neubauer.....	140
Figura 36: Clivado de aliina catalizado por la enzima aliinasa en ácido allyl sulfénico, ácido pirúvico y amoniaco. ....	152
Figura 37: Gráfico biplot y MST de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de aislamientos de <i>Penicillium</i> en CYA. ....	159
Figura 38: Gráfico biplot y MST de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de aislamientos de <i>Penicillium</i> en MEA.....	160
Figura 39: Gráfico biplot y MST de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de aislamientos de <i>Penicillium</i> spp. en G25N. ....	162
Figura 40: Gráfico biplot de la configuración consenso observada en los medios de cultivo CYA, MEA y G25N. ....	163
Figura 41: Gráfico biplot de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de <i>Penicillium</i> spp en GSA.....	165
Figura 42: Gráfico biplot de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de <i>Penicillium</i> spp en GA.....	166
Figura 43: Fenotipo de <i>P. allii</i> en medio GSA.....	167
Figura 44: Esporulación de <i>Penicillium</i> spp en el medio GSA .....	172
Figura 45: Clasificación de aislamientos de <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> en medios de cultivo estándares.....	177
Figura 46: Clasificación de cepas de la Serie <i>Corymbifera</i> por análisis de cluster basados en producción de metabolitos secundarios en tres medios de cultivo (CYA, YES y OA). ....	178
Figura 47: Perfil de metabolitos secundarios en TLC presentado por las especies de la Serie <i>Corymbifera</i> en diferentes medios de cultivo.....	179
Figura 48: Dendograma mostrando las diferencias genéticas en <i>Penicillium</i> Serie <i>Corymbifera</i> .....	184
Figura 49: Dendograma ( <i>Neighbour joining method</i> ) sólo de las especies de la Serie <i>Corymbifera</i> estimado por frecuencias de 43 metabolitos secundarios.....	185

## Resumen

Se tomaron 149 muestras de ajo en chacras de las provincias de Mendoza y San Juan, Argentina, donde se encuentra implantado el 85% del ajo argentino, el segundo en cantidad a nivel mundial exportado. De estas muestras se realizaron 538 aislamientos de *Penicillium* spp., los cuales se identificaron por morfología en medios estándares y en un medio semiselectivo basado en extracto de ajo. El 81,8 % de las colonias analizadas se identificaron como *P. allii*. Otras especies observadas fueron *P. chrysogenum* Thom (13,7%), *P. brevicompactum* Dierckx (2,8%), *P. phoeniceum* Beyma (0,9%), *P. aurantiogriseum* Dierckx (0,2%) y *P. flavigenum* Frisvad et Samson (0,6%). Las colonias de *P. allii* se pudieron clasificar en cuatro morfotipos. La distribución de la especie estaría influenciada por actividades propias de la explotación agrícola: movimiento entre zonas de “ajo semilla” y desde áreas de producción hacia los galpones de empaque. Una selección constituida por 60 aislamientos se utilizó para llevar adelante pruebas de patogenicidad inoculando bulbillos y midiendo la esporulación en cámaras húmedas e inoculando bulbillos y observando el comportamiento a campo. La agresividad expresada por *P. allii*, la única especie aislada de ajo que resultó patogénica, tanto en un cultivar susceptible (Fuego INTA) como en otro más tolerante (Castaño INTA), pudo ser separada en tres razas de poca, media y alta agresividad. Las variables de emergencia a 191 días de plantación y el peso del

bulbo cosechado, fueron las que más contribuyeron a la caracterización de las razas de agresividad. Ni los medios de cultivo suplementados con extracto de ajo ni la esporulación medida en los bulbillos inoculados fueron exitosas para predecir los niveles de agresividad de los aislamientos de *P. allii* ensayados; El uso, sin embargo, de medio con extracto fresco de ajo posibilitó separar consistentemente la raza más agresiva (4) de la menos agresiva (2) de *Penicillium allii*. Representantes de cada especie de la Serie *Corymbifera* se compararon usando caracteres fenotípicos y quimiotaxonómicos por análisis de *clusters*. Las especies clasificadas por caracteres fenotípicos se ubicaron en diferentes clusters mientras que se ubicaron en clusters únicos cuando se utilizaron los datos de metabolitos secundarios. Sin embargo, algunos caracteres fenotípicos distintivos fueron suficientes para clasificar los especímenes de cada especie, aunque la clasificación más confiable fue cuando se analizaron los metabolitos secundarios producidos en más de dos medios de cultivo. El medio CYA presentó la mayor diversidad química, pero sólo en los medios YES y OA se produjeron los metabolitos ácido terréstrico (*P. hirsutum*; *P. hordei*; *P. radiccicola*; *P. tulipae* y *P. venetum*), corymbiferona (*P. hirsutum*; *P. hordei* y *P. venetum*), lactones de corymbiferona (*P. albocoremium*; *P. allii*; *P. hirsutum*; *P. hordei* y *P. venetum*) y daldinina D (*P. hirsutum*). En base a los resultados obtenidos se concluye que el uso exclusivo de caracteres morfológicos llevó a la identificación

presumiblemente errónea de *P. viridicatum* como el agente causal de la enfermedad en la zona en 1984.

*Palabras clave*

*Penicillium*, ajo, extracto, distribución, hongo, patogenicidad, análisis multivariado, metabolitos secundarios, taxonomía, razas agresivas.

## Abstract

The 85% of the garlic of Argentina, the second world garlic exporter, is cultivated on the provinces of Mendoza and San Juan. Garlic samples, (totalizing 149 samples), were taken from farm fields on these provinces. From those samples, 538 isolates of *Penicillium* spp. were obtained. *Penicillium* spp. isolates were identified on standards media as well as on one semiselective media based on garlic extract. Additionally to *P. allii* (81.8%) the species *P. chrysogenum* Thom (13.7%), *P. brevicompactum* Dierckx (2,8%), *P. phoeniceum* Beyma (0.9%), *P. aurantiogriseum* Dierckx (0.2%) and *P. flavigenum* Frisvad et Samson (0,6%) were also isolated. *P. allii* colonies were classified on four morphotypes. The distribution of the species seemed to be influenced by agriculture practices and seed trade between production areas and packaging. A selected set of 60 isolates were used to carry out pathogenicity test on inoculated bulbils, considering sporulation on damp chamber trials and the behaviour on field on two garlic cultivars: Fuego INTA and Castaño INTA. The aggressiveness expressed by *P. allii*, the unique pathogenic species isolated from garlic, was used to separate three aggressive races of low, medium and high virulence. Emergence after 191 d of plantation and weight of harvested bulb were the variables which more contributed to the aggressive race characterization. Culture media amended with garlic extracts and sporulation

over inoculated bulbils failed on predicting the virulence of tested *P. allii* strains. However, the use of fresh garlic extract media consistently separated the most aggressive *P. allii* race (4) from the less aggressive one (2). Fifteen strains representing each *Penicillium* ser. *Corymbifera* taxa were compared using phenotypic and chemotaxonomic characters by cluster analysis. Variability in phenotypic expression of species strains resulted in a more fragmented classification compared with secondary metabolite expression. However, it was possible to classify strains into species grouping them based only upon a few distinctive phenotypic traits. When secondary metabolites from two culture media were analyzed, a more reliable classification was obtained. Czapek yeast autolysate agar typically yielded the greatest chemical diversity. However, the metabolites terrestric acid (*P. hirsutum*; *P. hordei*; *P. radicola*; *P. tulipae* y *P. venetum*), corymbiferone (*P. hirsutum*; *P. hordei* y *P. venetum*), the corymbiferan lactones (*P. albocoremium*; *P. allii*; *P. hirsutum*; *P. hordei* y *P. venetum*), and daldinin D (*P. hirsutum*), were only produced when strains were grown on either yeast extract sucrose or oatmeal agar. On the base of obtained results it is concluded that the exclusive use of morphological characters drove to the presumably misidentification in 1984 of *P. viridicatum* as the causal agent of the disease on the area.

*Keywords*

*Penicillium*, garlic, extract, distribution, fungi, pathogenicity, multivariate analysis, secondary metabolites, taxonomy, aggressive races.

# **I: Introducción**

## *1.1 La podredumbre verde o moho azul.*

### *1.1.1 El cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) en la región*

Con una producción aproximada de 130.000 t y exportaciones por unas 85.000 t (IDR 2002c), Argentina se posiciona como el segundo exportador mundial de ajo Tabla 1 (FAO 2004).

Tabla 1: Principales países exportadores de ajo.

Valor FOB expresado en millones de dólares de EEUU. Promedio 2000-2002.

País	Exportaciones	
	Miles de t	Valor FOB
China	407	150
Argentina	85	71
España	59	70
Méjico	17	32

Las principales provincias productoras son Mendoza y San Juan, con 10.951 y 2.381 ha promedio para las temporadas 1998-2002 respectivamente (Tabla 2), siendo la primera responsable del 97% del ajo exportado (IDR 2002c). El destino de esta mercadería es principalmente Brasil (75,6%) y la CEE (12,5%, (IDR 2002a). Datos recientes no muestran notables diferencias con años anteriores (IDR 2005b).

El ajo es uno de los pocos cultivos hortícolas bajo riego durante el invierno y origina anualmente divisas en concepto de exportaciones por un valor de entre 70 y 100 millones de dólares (IDR 2002c).

Tabla 2: Superficie de ajo implantada en el país por provincia (en ha) IDR (2003, 2005a) con modificaciones.

Provincia	Promedio 93/98	Temporada 98/02
Mendoza	7.769	10.951
San Juan	1.641	2.381
Buenos Aires	694	793
Córdoba	635	314
Otros	403	532
Total	11.142	14.971

En ambas provincias el ajo se explota en unas 2.400 chacras (INDEC 2001). El 40 % de la superficie implantada corresponde a chacras familiares de menos de 5 ha mientras que sólo el 4 % de los productores utiliza chacras de más de 20 ha. En la provincia de Mendoza hay unos 160 galpones de empaque. Se estima que la mano de obra ocupada en implantación, cosecha, procesado y transporte es de unos 3.000.000 de jornales por año, fletes internos por más de U\$S 6.000.000, industrias conexas que facturan más de U\$S 8.000.000 en ambas provincias (Portela 2006). Para otros autores habrían unos 140 galpones de empaque que emplean unas 8.840 personas sólo en actividades de empaque (Pereyra *et al.* 2006).

El cultivo de ajo en la Argentina tiene por estos motivos un alto interés social y económico.

### *I.1.2 La podredumbre verde*

El ajo se propaga agámicamente por medio de sus bulbillos o “dientes”. El bulbillito utilizado como “semilla”, está afectado por distintos patógenos que comprometen la brotación, la emergencia y la calidad del producto final durante el almacenamiento (Messiaen *et al.* 1993). Entre los principales hongos transmitidos por el ajo “semilla” se citan especies de los géneros *Sclerotium*, *Fusarium* y *Penicillium* (Gatica & Oriolani 1989). La podredumbre verde o moho azul es atribuida a diferentes especies de *Penicillium* y es responsable de importantes pérdidas en campo y en almacenamiento (Smalley & Hansen 1962, Böttcher & Polhe 1993, Bertolini & Tian 1996). Pese a que las condiciones ambientales y la interacción genotipo ambiente condicionan las pérdidas por *Penicillium* en ajo, se acepta que las pérdidas anuales ocasionadas por este hongo en ajos colorados son del orden del 15 %. Considerando que sólo en Mendoza se plantan unas 4.500 ha con este tipo de ajo y que el ingreso bruto por la venta de una hectárea es del orden de los U\$S 6.000 como mínimo, las pérdidas atribuidas a *Penicillium* se encuentran en el orden de los U\$S 4.000.000 anuales (Burba 2006).

Esta enfermedad fue detectada por primera vez para la provincia de Mendoza en la década del '60 del siglo pasado donde se informan pérdidas del 20 al 30% en cultivos vigorosos y aparentemente sanos (Urbieta 1976). A finales de los '70 se produjeron graves epifitias, que justificaron un estudio más detallado (Gatica & Oriolani 1984). En ese estudio se identificó a *P. viridicatum* como el agente causal en Mendoza. Recientemente, la enfermedad se abordó desde otro enfoque, buscando resistencia en diferentes clones de ajo por medio de inoculaciones controladas (Cavagnaro *et al.* 2005).

#### *I.1.2.1 Sintomatología*

En el cultivo, la enfermedad se desarrolla al principio del periodo vegetativo y los síntomas consisten en plantas amarillentas, débiles, marchitas que terminan por morir (Figura 1 y 2) o que producen un bulbo sin valor comercial (Figura 3). En muchos casos se observan fallas en el surco de plantación. Cuando se extrae la tierra que rodea al bulbo, se observan los signos de la enfermedad. Éstos consisten en presentar en las túnicas carnosas del bulbillo lesiones de color amarillento que se cubren de un moho extramatricial blancuzco. Este moho rápidamente se torna verde-azulado al esporular (Figura 2).



Figura 1: Planta con síntomas de ataque de *Penicillium allii*.  
Ajo colorado clon Fuego INTA, EEA La Consulta (INTA) 10 Agosto 2000.



Figura 2: Planta de Figura 1 a la que se le retiró la tierra que rodeaba al bulbo.  
Se evidencia la esporulación verde-azulada producida por *P. allii*. Ajo colorado clon Fuego INTA. EEA La Consulta (INTA) 10 Agosto 2000.



Figura 3: Bulbos que sobrevivieron a inoculaciones experimentales con el aislamiento LJC 119 de *Penicillium allii*.

Bulbos de la parte superior, clon Castaño INTA; bulbos de la parte inferior: clon Fuego INTA. Todos los bulbos de diámetro menor a la escala inserta (cada división equivale a 1 cm) se encuentran por debajo del valor comercial.

Hacia el final del período de almacenamiento, los bulbos se ablandan y los bulbillos presentan una masa verde-azulada típica del género *Penicillium*. En general las fructificaciones producidas quedan protegidas por las túnicas externas del bulbillo que pierde completamente su valor comercial.

#### *1.1.2.2 Manejo de la enfermedad*

El moho azul es una de las enfermedades más difundidas a través de la “semilla” de ajo, provocando pérdidas en la población inicial de plantas y en el almacenamiento. Se ha informado un 68% de sobrevivencia en plantas obtenidas de bulbillos inoculados artificialmente con 25.000 conidios de *Penicillium allii* (Valdez *et al.* 2006).

En situaciones normales el inóculo se propaga a los bulbillos cuando se prepara el material para plantación (Makuch *et al.* 1996). El hongo necesita una herida para penetrar (Smalley & Hansen 1962, D’Ercole 1972, Gatica & Oriolani 1984, Cruz & Wagermann 1994) y se ha indicado que las heridas naturales que se producen en la emisión de raíces es una vía de entrada (Gatica & Oriolani 1989), aunque esto se ha observado en lirios (*Iris × hollandica* cv ‘Wedgwood’) pero no en ajos (Saaltink 1967). También penetra por las microheridas producidas durante el “desgrane” de los bulbos, previo a la plantación (Bruna Vázquez & Fernandez 1991, Makuch *et al.* 1996). Se ha informado que heridas

causadas por nematodos y ácaros propagan el inóculo (Gatica & Oriolani 1989), asignándole un rol como patógeno de suelo. La capacidad de tres especies de ácaros de transmitir a un hongo identificado como *P. chrysogenum* obtenido de ajos en almacenamiento fue demostrada por Abdel Sater & Eraky (2002). Smalley y Hansen (1962) fallaron al intentar aislar al patógeno de suelos donde estuvo desarrollándose ajo infectado. La discusión en torno a si puede ser clasificado como patógeno de suelo no está concluída ya que el cultivo tipo FRR 1668 = IMI 192216 está indicado como aislado de suelo de Egipto (Vincent & Pitt 1989).

#### **I.1.2.2.1 Compuestos químicos utilizados para el control del moho azul del ajo.<sup>1</sup>**

Para evitar el desarrollo de la enfermedad los bulbillos de ajos son “curados” por la aplicación de fungicidas u otros productos. El uso de bicloruro de mercurio mostró buenos resultados (Urbieta & Paez 1978, del Toro & Larriqueta 1985), pero en la actualidad estos productos están prohibidos (SNSV 1971). El hipoclorito de sodio es muy eficaz en controlar el desarrollo de la enfermedad en bulbillos (Cruz & Wagermann 1994), pero el escalamiento de su

---

<sup>1</sup> El lector no familiarizado con productos químicos puede consultar el Anexo XII.2

uso y las discrepancias en los productos comercializados presenta graves inconvenientes.

Entre los fungicidas más empleados para controlar el moho azul en ajo se encuentran los benzimidazoles benomil y carbendazim (Tabla 3), aunque se aprecia resistencia en algunas cepas al uso de estos productos (Brammall 1989, Larreguy 1999). En combinaciones, las formulaciones más difundidas es cualquiera de los benzimidazoles mencionados con captan o mancozeb o tiram (Piccolo 1997, Bruna Vásquez 2001).

Iprodione e iprodione más carbendazim (86 y 80% de plantas sobrevivientes) fueron los fungicidas con mejor resultado observados por Gatica y Oriolani (1984) en pruebas de inmersión. Sin embargo, la acción de los fungicidas es variable dependiendo de la forma de aplicación (Piccolo 1997). En este sentido, el embarrado o "slurry" demostró ser más efectivo que la inmersión en el control de *Penicillium* spp. en ensayos con iprodione en ajo blanco, no así en ajo colorado (Piccolo 1997).

La inmersión muestra resultados contradictorios debido a que en ocasiones la incidencia es superior al testigo no sumergido. El inóculo es distribuido en el líquido donde se realiza la inmersión infectando bulbillos sanos.

Tabla 3: Clasificación de productos químicos usados para el control de hongos.

Productos en negrita están autorizados para control químico de ajo (CASAFE 2005). Clasificación basada en Agrios (1996)

Tipo de compuesto	Grupo químico	Molécula activa/Denominación
Compuestos de cobre	Sulfato de cobre e hidróxido de calcio	Pasta Bordelesa y "Caldo" bordelés.
	Compuestos fijos	Sulfato básico de cobre, Cloruro básico de cobre, Óxido de cobre, <b>Sulfato de Zinc</b>
Compuestos de azufre	Inorgánicos	Azufre como polvo, pasta, o líquido.
	Orgánicos (Ditiocarbamatos)	Tiram, <b>Ferbam, Ziram, Nadam, Zineb, Maneb, Mancozeb</b>
Compuestos aromáticos		Hexaclorobenceno, Pentaclorobenceno, <b>Diclorán</b> , Dinocap, <b>Clorotanol</b> , Bifenil
Compuestos heterocíclicos		Captán, <b>Folpet</b> , Captafol, Iprodione y Vinclozolin
Fungicidas sistémicos		
	Acilalaninas	<b>Metalaxyl</b>
	Benzimidazoles	<b>Benomil, Carbendazim, Tiabendazol</b> y Tiofanato
	Imidazoles	Imazalil, <b>Procloraz</b>
	Oxantinas	Carboxina, Oxicarboxina
	Triazoles	Triadimefon, Triadimenol, Bitertanol
	Otros	Morfolinas, Fosetyl-A1, Pirimidinas.

### I.1.2.3 Etiología

Se han citado diferentes especies de *Penicillium* como capaces de provocar la enfermedad. La primera especie asignada “tentativamente” fue *P. digitatum* (Smalley 1954). Esta misma autora citó luego a *P. corymbiferum* y *P. cyclopium* (Smalley & Hansen 1962) sin hacer referencia a la patogenicidad atribuida previamente a *P. digitatum*. Es muy probable entonces que su primera cita correspondiera a una identificación errónea, un común denominador en la taxonomía de *Penicillium* (Frisvad 1989). *P. corymbiferum* fue citado en otros trabajos (D’Ercole 1972, Leguizamón C. & Barriga O. 1976, Georgieva & Kotev 1977, López Camelo 1980, Bruna Vásquez 1985, Mazur 1990, Rivas 1999). Las especies *P. cyclopium*, *P. expansum* y *P. glandicola* también se informaron como aisladas de bulbos de ajo atacados por la enfermedad (Mazur 1990, Rivas 1999).

La especie *P. corymbiferum* fue considerada luego como una variedad de *P. verrucosum*: *P. verrucosum* var *corymbiferum* (Samson *et al.* 1976) y actualmente es aceptada como un sinónimo de *P. hirsutum* (Frisvad *et al.* 2000a). De esta especie original se tomó el nombre para constituir la Serie Corymbifera (Frisvad *et al.* 2000a), la que actualmente comprende siete especies principalmente patógenas en bulbos (Frisvad & Samson 2004). Para la descripción de la Serie, Frisvad *et al.* (2000a) se basaron en los huéspedes de los que se obtuvieron los aislamientos,

en la producción de metabolitos secundarios y en la micromorfología (Overy & Frisvad 2003).

*P. hirsutum* ha sido informada como patógeno en ajo (Cho *et al.* 1995, Bertolini & Tian 1996, Cavagnaro *et al.* 2005).

*P. allii* fue citada primeramente como aislada de ajos de origen egipcio afectados durante poscosecha (Vincent & Pitt 1989). En ese trabajo se describe la especie pero no se prueba la capacidad de los aislamientos de producir la enfermedad ni de esporular sobre dientes de ajo. La patogenicidad de la especie en ensayos de cámaras húmedas fue informada por Overy *et al.* (2005a). En ese trabajo, donde todas las especies de la *Serie Corymbifera* fueron inoculados sobre bulbillos de ajo, las lesiones causadas por *P. allii* fueron grandes mientras las de *P. hirsutum* y *P. venetum* fueron pequeñas.

Basados en identificaciones realizadas por el servicio de identificación del CABI Bioscience (Onions 1981), se citó a *P. viridicatum* como el causante de la enfermedad en Mendoza (Gatica & Oriolani 1984). Lamentablemente las cepas identificadas no se mantuvieron. Su descarte también se llevó la posibilidad de analizarlas según los nuevos métodos taxonómicos en el marco de la nueva taxonomía establecida para *Penicillium*.

*P. viridicatum* se identificó además en Japón (Saito & Tsuruta 1984) y Polonia (Machowicz-Stefaniak *et al.* 1998). Otras especies citadas como

patogénicas en ajo fueron *P. paxilli* (Roy *et al.* 1977), *P. citrinum* (El Shabrawy *et al.* 1987), *P. purpurogenum* (Gargi & Roy 1988), *P. funiculosum* (El Shabrawy *et al.* 1987, Abdel Sater & Eraky 2002) y *P. chrysogenum* (Abel Al *et al.* 1991, Ge *et al.* 2001), Tabla 4. En muchos de esos trabajos no se explicita la metodología empleada en la determinación.

Existen características macro y micromorfológicas similares entre varias de esas especies. *P. allii*, *P. cyclopium*, *P. hirsutum* y *P. viridicatum* presentan conidióforos terverticilados y estipes de paredes rugosas (Pitt & Hocking 1997, Samson *et al.* 2000). *P. glandicola* posee conidióforos terverticilados y produce estipes de paredes tuberculadas. Sin embargo, para diferenciar este tipo de pared de las rugosas del estipe, es necesario contar con un aislamiento tipo y comparar la ornamentación. *P. allii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. glandicola* y *P. viridicatum* producen exudados amarillentos en el medio CYA (Czapek Yeast Extract Agar, (Samson *et al.* 2000). *P. expansum* y *P. chrysogenum* son terverticilados pero presentan estipes de paredes lisas (Samson *et al.* 2000). Las identificaciones de las especies *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. paxilli* y *P. purpurogenum* citadas como patogénicas probablemente estuvieron mal asignadas. Todas estas especies presentan conidióforos biverticilados (Pitt & Hocking 1997) y se ha informado que no habría *Penicillia* biverticilados

patogénicos de plantas (Ramirez 1982). *P. purpurogenum* rara vez ha demostrado ser patogénico en casaba, maiz, arroz y trigo (Pitt & Hocking 1997).

Si se descartan los *Penicillia* biverticilados y terverticilados con paredes lisas; y los terverticilados rugosos y tuberculados que no producen exudados amarillos, el conjunto de especies informadas como patogénicas se reduce a *P. viridicatum*, *P. cyclopium* y *P. allii*.

En el punto I.2.2 de esta tesis, se presentan cuáles son los criterios de clasificación más comúnmente utilizados en la taxonomía de *Penicillium*. Por dos vías independientes, análisis morfológicos por hábito de crecimiento en extracto de ajo (Capítulo VI) y análisis de metabolitos secundarios (Capítulo VII) se llega a la conclusión que los criterios morfológicos observados en medios no diferenciales no son confiables para la correcta identificación de una especie.

Tabla 4: Especies citadas como patogénicas en ajo ordenadas según el número de verticilos

Nº vert.= número de verticilos; Subg. = Subgénero; (P) = *Penicillium*; (B) = *Biverticillium*; (F) = *Furcatum*

Nº vert. <sup>1</sup>	Subg.	Especie	Huésped	Tipo de pared del estipe	Ornamentación del conidio	Exudado en medio CYA	Referencia
3	(P)	<i>P. allii</i> Vincent & Pitt	Ajo.	Rugosa	Lisa	Amarillo	(Vincent & Pitt 1989, Overy <i>et al.</i> 2005a, Valdez <i>et al.</i> 2006)
3	(P)	<i>P. chrysogenum</i> Thom	Alimentos, ambiente	Lisa	Lisa	Amarillo	(Abel Al <i>et al.</i> 1991, Ge <i>et al.</i> 2001)
3	(P)	<i>P. corymbiferum</i> Westling <sup>2</sup>	Rábano rusticano	Rugosa	Lisa	Naranja con matices rojizos	(Smalley & Hansen 1962, D'Ercole 1972, Leguizamón C. & Barriga O. 1976, Georgieva & Kotev 1977, Greathead 1978, López Camelo 1980, Bruna Vásquez 1985, Mazur 1990, Rivas 1999)
3	(P)	<i>P. cyclopium</i> Westling	Cereales	Rugosa	Lisa	Transparentes o amarillento	(Smalley & Hansen 1962, Mazur 1990)
3	(P)	<i>P. expansum</i> Link	Manzanas, vid	Lisa	Lisa	Transparentes	(Mazur 1990)
3	(P)	<i>P. glandicola</i> (Oud.) Seifert & Samson	Robles, suelo	Tuberculadas	Lisa	Transparentes a amarillentas	(Mazur 1990)
3	(P)	<i>P. hirsutum</i> Dierckx	Rábano rusticano, bulbos de <i>Lilaceae</i> .	Rugosa	Lisa	Naranja oscuro a marrón rojizo	(Cho <i>et al.</i> 1995, Bertolini & Tian 1996, Cavagnaro <i>et al.</i> 2005)

(Continúa en la página siguiente)

Nº vert. <sup>1</sup>	Subg.	Especie	Huésped	Tipo de pared del estipe	Ornamentación del conidio	Exudado en medio CYA	Referencia
3	(P)	<i>P. viridicatum</i> Westling	Cereales	Rugosa	Finamente rugosos	Amarillo	(Gatica & Oriolani 1984, Saito & Tsuruta 1984, Pinto & Maffia 1995, Machowicz-Stefaniak <i>et al.</i> 1998)
2	(B)	<i>P. funiculosum</i> Thom	Nueces, cereales, cebolla	Lisa a finamente rugosa	Lisa	Transparente	(El Shabrawy <i>et al.</i> 1987, Abdel Sater & Eraky 2002)
2	(B)	<i>P. purpurogenum</i> Stoll	Alimentos, maiz, trigo, arroz.	Lisa	Lisa	Naranja a rojo	(Gargi & Roy 1988)
2	(F)	<i>P. citrinum</i> Thom	Suelo, ambiente	Lisa	Finamente rugosos	Amarillo pálido a marrón rojizo.	(Saito & Tsuruta 1984, El Shabrawy <i>et al.</i> 1987)
2	(F)	<i>P. fellutanum</i> Biourge	Porotos, nueces, harina.	Lisa	Finamente rugosos	Transparentes	(Dalcerro 2000)
2	(F)	<i>P. paxilli</i> Bainier	Suelo	Lisa	Lisa	Transparentes a marrón rojizo.	(Roy <i>et al.</i> 1977)

<sup>1</sup> La descripción de las especies terverticiladas (Nº vert. =3) tomadas de Frisvad y Samson (2004), salvo *P. corymbiferum*, cuya descripción se obtuvo de Raper y Thom (1949). La descripción de especies biverticiladas (Nº vert. =2) se obtuvo de Pitt y Hocking (1997).

<sup>2</sup> Aceptado en la nueva taxonomía como sinónimo de *P. hirsutum* (Frisvad *et al.* 2000a).

### I.1.3 Estudios realizados en base a medios con extractos de ajo

Al ajo se le conocen numerosas propiedades fungistáticas y fungicidas (Tansey & Appleton 1975, Moore & Atkins 1977, Bianchi *et al.* 1997, Shadkchan *et al.* 2004). Presenta también importante función bactericida (Fromtling & Bulmer 1978, Singh *et al.* 2001, Canizares *et al.* 2004) y nematocida (Singh *et al.* 2001). El extracto de ajo agregado a medios de cultivo para observar la capacidad de desarrollo de *Penicillia* patógenos de ajo se ha ensayado anteriormente (Smalley & Hansen 1962, Durbin & Uchytíl 1971). Muchos de estos estudios señalan que el efecto fungistático o fungicida del ajo es debido a la presencia de la enzima alliinasa que partiendo del sustrato allina produce allicina cuando el ajo es aplastado (Cavallito & Bailet 1944, Keusgen 2002). Llama la atención entonces que tantas especies de *Penicillium* aparezcan afectando un vegetal que presenta tan alta actividad fungicida.

Los compuestos activos presentes en extractos acuosos de ajo fueron responsables del colapso de hifas de *Pythium ultimum* y de daños causados a nivel celular en hongos de las especies *Fusarium solani* y *Colletotrichum lindemuthianum* cuando fueron observados al microscopio electrónico (Bianchi *et al.* 1997). Sin embargo, la concentración de allicina en el bulbillo no estaría relacionada con la tolerancia a la infección por *Penicillium* (Cavagnaro *et al.* 2005).

Durbin y Uchtyl (1971) encontraron que cepas de *Penicillium* patogénicas en ajo contenían una enzima tipo-allinasa capaz de utilizar la allicina y degradarla. No encontraron, sin embargo, correlaciones entre la actividad de la enzima y la patogenicidad de la cepa.

Puesto que la allicina estaría presente en extractos acuosos obtenidos a partir de polvo de ajo (Krest & Keusgen 1999b), el desarrollo en un medio con estas características podría ser indicador de la capacidad del hongo de desarrollarse en bulbillos de ajo. Es importante observar si el nivel de desarrollo de las colonias en medios suplementados con extracto de ajo se correlaciona con la agresividad del aislamiento.

En el Capítulo VI de esta tesis se presenta un medio semi-diferencial desarrollado a partir de extracto de ajo que puede ser de utilidad para la correcta identificación de *P. allii* y otros *Penicillia* de la *Serie Corymbifera* y en el Capítulo VIII se discute la utilidad de utilizar extracto de ajo para identificar aislamientos poco y muy agresivos de *Penicillium allii*.

#### *1.1.4 Distribución*

Todos los huéspedes presentados en la Tabla 4 (cuarta columna) se encuentran en la región. La actividad más importante y distribuida de la zona es la viticultura. En el Valle de Uco y en el oasis Sur de Mendoza se producen manzanas. Hay producción de maíz y otros cereales. En las ciudades y en el área

rural se encuentran robles ornamentales. Algunas de las especies citadas son posibles de aislar de suelo. Es decir que al encontrarse en la zona los huéspedes de *Penicillia* que han sido identificados además como patógenos de ajo, cobra importancia entonces realizar un muestreo de ajo en el área de cultivo para identificar zonas con mayor o menor presencia de inóculo y elaborar estrategias tendientes a mejorar el manejo de la enfermedad. De detectarse especies patógenas en ajo que a su vez lo sean en otros organismos, se esperaría que estén asociados con el segundo organismo. En otras palabras, si el patógeno de manzanas *P. expansum* es aislado de ajo, se espera que lo sea en áreas donde el cultivo de aquella fruta sea importante. A su vez, luego que la infección inicial se ha establecido, la dispersión dentro de una población de plantas huéspedes está determinado por el grado al cual los propágulos re infectan el mismo huésped (auto-infección) en relación a aquellos que infectan otras plantas huéspedes (alo-infección). La proporción de auto-alo infección influye en la intensidad de los parches en los cuales la enfermedad se presenta. La proporción de alo-infección determina cuan rápidamente el patógeno se distribuye de los sitios de infección primaria (Burdon *et al.* 1989). Considerando que las manzanas se cosechan durante el verano, pero quedan en la planta algunas que no presentaron los estándares adecuados, éstas pueden constituir focos de infección cuando se preparan los bulbillos de ajo para ser plantados a

comienzos del otoño, momento en que se produce la infección del ajo por causa de las heridas y microheridas producidas (Makuch *et al.* 1996). Estas asociaciones con patógenos de otros cultivos de la zona podría conducir a una distribución del/de los patógenos no aleatoria en la zona de muestreo. De Fina *et al.* (1962, 1963) definieron en la zona una serie de regiones agroclimáticas, basadas en la difusión de cultivos índices. Un análisis de asociación de aislamientos por región agroclimática será mucho más apropiado que una asociación entre divisiones políticas.

En el Capítulo V de esta tesis se estudia la distribución de los *Penicillia* patógenos, encontrándose que ésta no está relacionada a variables ambientales.

#### *1.1.5 Estudios fitopatológicos*

La patogenicidad de un aislamiento se comprueba ajustando los criterios necesarios para poder establecer la relación causal entre un organismo específico y una enfermedad específica. Estos criterios, conocidos como los postulados de Koch (1882), establecen que:

- 1.- El microorganismo debe estar presente en todos los casos de la enfermedad.
- 2.- El microorganismo debe ser aislado del hospedador enfermo y obtenerse en cultivo puro en el laboratorio.

- 3.- La enfermedad específica debe reproducirse cuando un cultivo puro del microorganismo se inocula a un hospedador susceptible sano.
- 4.- El microorganismo debe ser recuperable de nuevo a partir del hospedador inoculado experimentalmente.

Proceder a la identificación de los microorganismos es sin duda un paso muy importante, pero también lo es poder discriminar su habilidad de producir la enfermedad y detectar cepas con diferentes niveles de agresividad. Estas cepas podrían ser el material de partida para dilucidar el mecanismo genético y molecular de la enfermedad.

Hay una relación directa entre los niveles de dosis inoculados (o de inóculo presente) y el desarrollo de la enfermedad. *In vivo* el inóculo presenta diferentes respuestas según sea la característica del hongo patogénico. En aquellos de penetración directa el inóculo es muy importante. Chongo y Bernier (2000) observaron que el número de lesiones y la severidad se incrementaba linealmente con la concentración del inóculo en *Colletotrichum truncatum*. En *Phytophthora capsici* afectando zapallo calabaza, Lee *et al.* (2001) observaron que la severidad de la infección se incrementaba también con la concentración del inóculo. Lo mismo fue observado por otros autores para otros patosistemas: Hong y Hwang (1998) en *Colletotrichum coccodes* afectando pimiento; Chungu *et al.* (2001) en *Septoria tritici* afectando trigo. En peras se aprecia el mismo efecto

cuando se incrementa el inóculo de *Penicillium expansum* por litro de aire (Spotts & Cervantes 2001).

De esta manera, un organismo poco patogénico con alto nivel de inóculo, podría comportarse como de alta patogenicidad. Un estudio fitopatológico estricto demanda la cuantificación de la suspensión a inocularse. Normalmente, ésta se cuantifica por el uso de la cámara de Neubauer.

En el Capítulo V se presenta una metodología usada para medir de una manera rápida y eficaz la esporulación producida por *Penicillium* en ajo o para cuantificar las suspensiones de *Penicillium*. Esta metodología puede ser utilizada para la puesta a punto en otros patosistemas. En ese capítulo, además, se identifican los *Penicillia* posibles de aislar de ajo en las Provincias de Mendoza y San Juan y se analiza la patogenicidad de los mismos por medio de inoculaciones *in vitro*, en bulbillos incubados en cámara húmeda y en bulbillos llevados a situaciones de campo.

Finalmente en el Capítulo VIII, se estudia la patogenicidad en medios de cultivo con extracto fresco de ajo.

## 1.2 El género *Penicillium*

### 1.2.1 Antecedentes históricos e importancia del género.

El género fue creado por Link (1809) para mohos verdes o verde azulados que producían estructuras esporulantes tipo pincel (del latín: *Penicillium*). Es un género cosmopolita, de reproducción asexual que causa las pudriciones por los mohos azules o verdes. Pocas especies presentan un estadio perfecto del tipo ascospórico. En las plantas constituyen una de las enfermedades de poscosecha más comunes y destructivas, afectando cítricos, manzanas, peras, membrillos, uvas, melones, higos, cebollas, ajos y muchas otras frutas y hortalizas. El género produce también diferentes micotoxinas que pueden detectarse en jugos realizados a base de frutos contaminados y sanos y en otros alimentos (panificados, maíz, trigo, etc.). Las micotoxinas pueden producir degeneración en los riñones, intestinos, hígado, afectar al sistema nervioso central y producir tumores cancerosos (Hussein & Brasel 2001).

Las aplicaciones biotecnológicas son muchas y algunas conocidas desde hace años. Nuestro conocimiento de los tratamientos médicos del antiguo Egipto derivan de la información contenida en 7 papiros, escritos alrededor del 1700 AC pero que se creen son copias de textos más antiguos. De esos papiros, el papiro *Ebers* en particular contiene información de cerca de 900 reactivos y tratamientos específicos para distintas enfermedades (Smith 1974). Los médicos

egipcios, conocidos como “sounou”, conocían que el pan afectado por mohos eran uno de los mejores tratamientos para desórdenes intestinales, enfermedades de la vejiga y heridas purulentas. Parecería que el “sounou” reconocía los beneficios de los antibióticos producidos por los mohos contaminantes del pan sin entender su mecanismo de acción (Parkins 2001).

La capacidad bacteriostática de los hongos en las civilizaciones occidentales modernas no comenzó sino hasta 1928 cuando el Dr. Alexander Fleming descubriera la producción de una sustancia por el hongo *P. notatum* (sin *P. chrysogenum*), a la que llamó penicilina. El Dr. Fleming observó en su laboratorio del hospital Saint Mary en Londres, aparentemente al regreso de unas vacaciones, que colonias de *Staphylococcus aureus* rodeadas por un hongo verde no podían desarrollarse. Cuando el hongo se aisló en un cultivo puro, se demostró su capacidad de producir penicilina y se recomendó el uso de esta sustancia para obtener cultivos puros de *Bacillus influenzae* (Fleming 1929). El Dr Fleming predijo el uso biotecnológico, siempre y cuando se dispusieran de importantes cantidades. Esto comenzó a ocurrir a principios de los '40, pero desarrollado no por los británicos, que comenzaron su producción y trataron con penicillina al primer paciente en la historia llamado Albert Alexander (tratado en Radcliffe Infirmary, Oxford en 1941), sino por los norteamericanos que habían puesto a punto un sistema muy efectivo de fermentación para

obtener ácido cítrico (Moore 2001), el cual se produce en la actualidad a partir de fermentadores de azúcar de caña o melaza de caña con la presencia de hongos de la especie *Aspergillus niger* (Ali *et al.* 2002).

El ácido cítrico se usa como saborizante de bebidas y para mejorar la estabilidad de los alimentos, debido a que suprime la acción deletérea de las sales metálicas disueltas (Muller *et al.* 1995).

Desde su descubrimiento y aplicación, se han encontrado nuevos antibióticos en hongos del género *Penicillium* y se espera encontrar nuevos todavía (Frisvad *et al.* 2004).

La asociación entre el sabor de los quesos y hongos del género *Penicillium* es muy conocida (Revah & Lebeault 1989, Jollivet *et al.* 1993). Se cree que el queso Roquefort es uno de los más antiguos de los que se producen en la actualidad. Se fabrica en el sur de Francia, utilizando técnicas que ya se empleaban en el siglo I (Deepröse 1997).

Especies de este género le otorgan a los salames curados su particular sabor (Ludemann *et al.* 2004).

La importancia del género *Penicillium* para la humanidad es doble y contrapuesta, por un lado le brinda un gran servicio, como fuente de antibióticos, como fermentadores de alimentos y por otro, produce importantes

micotoxinas y enfermedades a las plantas, que producen anualmente pérdidas millonarias.

### *I.2.2 Clasificación*

Para la clasificación de cualquier hongo se debe visualizar su estado perfecto, el cual no se presenta en la mayoría de las especies de *Penicillium*. Es por ello que se clasificaban en el *Phylum* artificial *Deuteromycetes*.

Lo que caracteriza al género es la producción de conidios de color verde a partir de una célula especializada, la fiálide (conidiogénesis fialídica) en sucesión basipétala.

Actualmente, los hongos asexuales que comparten caracteres morfológicos o moleculares de ascomicetes sexuales se clasifican en el *Phylum Ascomycete* (Taylor *et al.* 1996); *Penicillium* se ubica en la Familia *Trichocomaceae*, Orden Eurotiales, uno de los grupos más estudiados de los Ascomicetos. Las secuencias utilizadas para la obtención de esta nueva clasificación corresponden a las que codifican para el ARNr y otros genes. Parte de esta secuencia está muy conservada (van de Peer *et al.* 1997) y se usa como punto de referencia para estudios de divergencia evolutiva, especialmente las secuencias de la subunidad 18S del ARNr (Bruns *et al.* 1992, Wilmotte *et al.* 1993)

Antes de contar con estas técnicas analíticas, la asociación entre *Penicillium* y los ascomicetos ya estaba planteada, debido al hecho que en la taxonomía del

género las estructuras conidiales se consideran generalmente como resultantes peritécicos indicando relaciones taxonómicas más amplias (Raper & Thom 1949).

Debido a que la mayoría de las especies del género no presenta estadio ascospórico, una alternativa fue usar el conidióforo o penicillio para clasificarlas. Ése fue el curso que siguieron las investigaciones desde que Link (Link 1809) estableciera el género.

Thom (1930) realizó la primera contribución importante a la taxonomía del género. Estableció ciertos criterios como el uso de Secciones y Series para el agrupamiento de las especies. Este sistema fue mejorado por Raper y Thom (1949) quienes basaron la separación del género en los tres criterios previamente establecidos por Thom (1930) reordenando algunas Series y especies en taxones más apropiados.

El primer criterio fue el patrón y complejidad del penicilio, estableciendo en él cuatro Secciones: *Monoverticillata*; *Asymmetrica*; *Biverticillate-Symmetrica* y *Polyverticillata*.

Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada: la fiálide. La parte que une la fiálide con los conidios puede tomar distintos aspectos y se denomina *collula*. El conidióforo está unido al

micelio mediante el estipe. Entre éste y las fiálides pueden aparecer diferentes células.

Estas células se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan. Aparte del de las fiálides, los puntos de ramificación son uno, dos o excepcionalmente, tres, a lo largo del conidióforo. Las características morfológicas referentes a los términos mono, bi y terverticilados se presentan en la Figura 4. Un detalle de un conidióforo terverticilado de la especie *P. allii* se presenta en la Figura 5. La célula de soporte de la fiálide se denomina métula y la célula de soporte de la métula se denomina rama, en las especies que las presentan. Estas ramas parten del estipe, aunque pueden partir, a su vez, de otras ramas. La Sección *Asymmetrica* incluía especies bi o terverticiladas en esta clasificación.

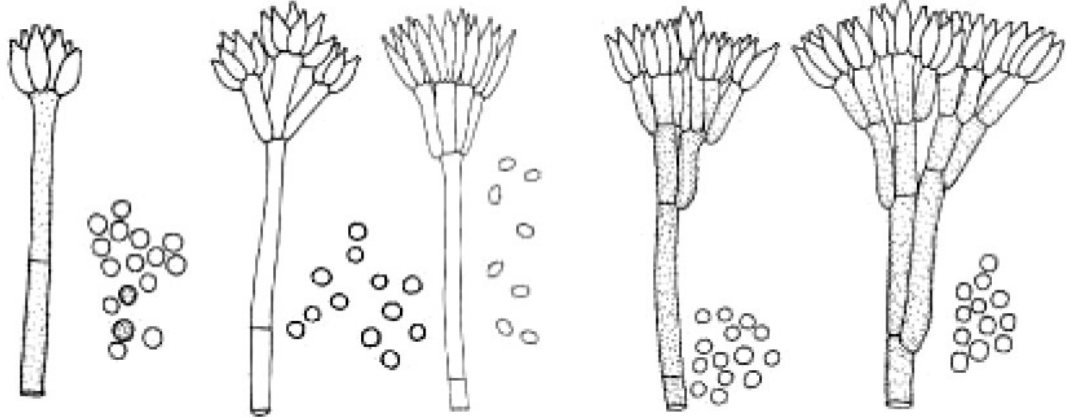
Un segundo criterio de separación se basaba en la producción o no de peritecios o esclerocios. Es de destacar que dentro de cada una de las tres secciones principales la formación de peritecios caracterizaba a una Serie. La producción de esclerocios fue también útil como carácter taxonómico. Al igual que los peritecios, los esclerocios también se desarrollaban en áreas separadas del género (Figura 6). Una tercera base de separación se debía a características de la colonia, estableciendo Subsecciones y Series según las colonias fueran velutinosas (Subsección *Velutina*), lanosas (Subsección *Lanata*), funiculosas

Monoverticilado

Biverticilados

Terverticilado

Cuaterverticilado



*Aspergilloides*

*Furcatum*

*Biverticillium*

*Penicillium*

Figura 4: Tipos de disposición del conidióforo de *Penicillium* y clasificación en subgéneros según Pitt (1979a).

Se observan las fiáldes ampuliformes en el Subgénero *Furcatum* y acerosas en el Subgénero *Biverticillium* de los *Penicillia* Biverticilados. Adaptado de Samson *et al.* (2000)

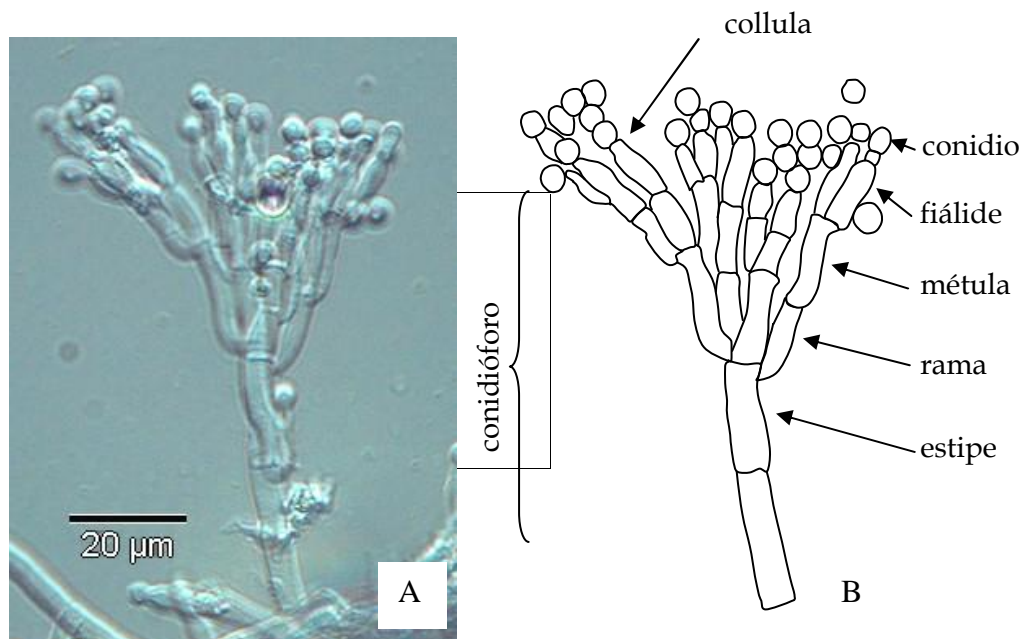


Figura 5: *Penicillium allii*, aislamiento LJC 542. Nombre de las estructuras del conidióforo, adaptado de Samson *et al.* (2000).

(A) Micrografía de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) de un conidioforo maduro sin tinción. (B) Dibujo de línea y términos empleados para diferenciar las estructuras en *Penicillia* terverticilados.

Conidióforos monoverticilados (Monoverticillate)	Conidióforos estrictamente monoverticilados	Producción de peritecios o esclerocios	Peritecios Esclerocios	Serie <i>P. javanicum</i> (5) Serie <i>P. thomii</i> (5)
		Peritecios o esclerocios no producidos	Colonias afelpadas, conidióforos mayormente emergidos del sustrato	Serie <i>P. frequentans</i> (3) (Conidios globosos a subglobosos) Serie <i>P. lividum</i> (3) (Conidios elípticos, reverso fuertemente pigmentado) Serie <i>P. implicatum</i> (3) (Conidios elípticos, reverso levemente pigmentado)
Colonias con apariencia afelpada, conidióforos cortos, emergidos de hifas aéreas	Serie <i>P. decumbens</i> (3)			
Colonias predominantemente flocosas	Serie <i>P. restrictum</i> (2)			
Conidióforos ramificados irregularmente		Colonias predominantemente funiculosas	Serie <i>P. odoetzi</i> (4)	
			Serie <i>Ramigena</i> (5)	

Continúa en la página siguiente

Conidióforos ramificados una o dos veces por debajo de la fiálide, asimétricos (Asymmetrica)	Conidióforos fuertemente divaricados (Divaricata)	Producción de peritecios o esclerocios	Peritecios	Serie <i>Carpentales</i> (3)
		Peritecios o esclerocios no producidos	Esclerocios	Serie <i>P. raistrickii</i> (4)
Conidios liláceos o color avellana	Serie <i>P. lilacinum</i> (3)			
Conidios verde-azul pálido o verde grisáceo	Serie <i>P. janthinellum</i> (7) (Collulas estrechos) Serie <i>P. canescens</i> (3) (Conidios en columnas)			
Conidios verde grisáceo oscuros	Serie <i>P. nigricans</i> (5)			
	Superficie de la colonia velutinosa (Velutina)	Conidióforo no ramificado debajo de la métula	Serie <i>P. citrinum</i> (3)	
		Conidióforo ramificado debajo de la métula	Serie <i>P. chrysogenum</i> (4) (Pigmentos amarillos brillantes) Serie <i>P. oxalicum</i> (2) (Escamas conidiales fuertes) Serie <i>P. digitatum</i> (1) (Pudrición verde de los cítricos) Serie <i>P. roquefortii</i> (2) (hongo tipo del queso Roquefort) Serie <i>P. brevicompactum</i> (3) (conidióforos atrapados fuertemente)	

Continúa en la página siguiente

Conidióforos no fuertemente divaricados	Superficie de la colonia lanosa (Lanata)	Conidios blancos o azul verdoso pálido	Serie <i>P. camemberti</i> (2) (hongo tipo del queso Camembert)
		Conidios azul verdoso fuerte o amarillo verdosos	Serie <i>P. commune</i> (7)
	Superficie de la colonia funiculosa (Funiculosa)	Conidios azul verdoso o amarillo verdoso	Serie <i>P. terrestre</i> (4)
		Conidios no verdes, colores varios	Serie <i>P. pallidum</i> (4)
			Serie <i>P. gladioli</i> (1) (Produce esclerocios)
			Serie <i>P. ochraceum</i> (2) (Marrón avellana)
		Serie <i>P. viridicatum</i> (3) (matices amarillo-brillante a verde)	
		Serie <i>P. cyclopium</i> (4) (matices azules verdosos)	
		Serie <i>P. expansum</i> (2) (Putridión azul de la manzana)	
Superficie de la colonia fasciculada o coremiforme (Fasciculata)	Superficie de la colonia fasciculada, pero conidióforos simples normalmente predominantes	Serie <i>P. italicum</i> (1) (Putridión azul de los cítricos)	
		Serie <i>P. urticae</i> (1) (fiálide no mayor a 6 mm)	
		Serie <i>P. granulatum</i> (2) (conidióforos rugosos)	
	Superficie de la colonia fuertemente fasciculada a coremiforme	Serie <i>P. claviforme</i> (2) (conidióforos lisos)	

Continúa en la página siguiente

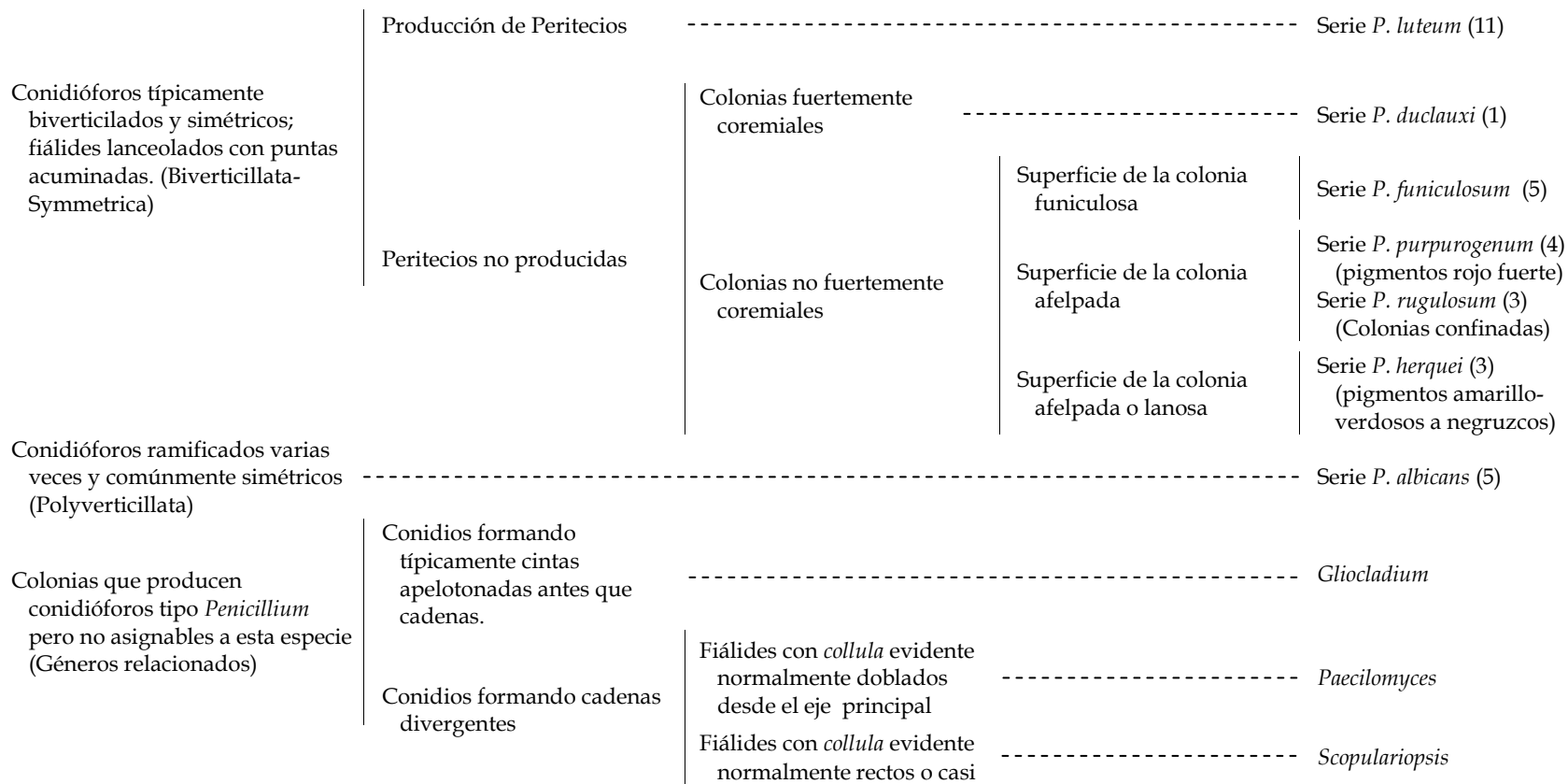


Figura 6: Diagrama de clasificación establecido por Raper y Thom (1949).

Clave a las mayores subdivisiones y series dentro del género *Penicillium*. Los números seguidos a los nombres de las series indican el número de especies incluídas en cada una.

(Subsección *Funiculosa*) o fasciculadas (Subsección *Fasciculata*).

La taxonomía de *Penicillium* fue revisada por Pitt (1979a) en su monografía y se exploró con considerable detalle en tres libros de conferencias de *Penicillium* y *Aspergillus* (Samson & Pitt 1985a, 1990, 2000).

Pitt (1979a), basado en el trabajo de Raper y Thom (1949), reconoció cuatro subgéneros en *Penicillium* (Tabla 5) según la cantidad de verticilos y el tipo de fiálide. Consideró que algunos rasgos macroscópicos, tales como olor y textura de las colonias eran altamente subjetivos y los reemplazó con el diámetro de la colonia en condiciones estandarizadas de crecimiento.

El concepto de especie aplicado por Stolk y Samson (1985) estaba basado principalmente en el tipo de conidióforo y en la forma de la fiálide. Como carácter adicional se consideraba la forma y ornamentación de los conidios y no consideraban al diámetro de las colonias como un carácter primario, aunque lo usaban a veces para distinguir especies y variedades. Estos autores aumentaron el número de secciones y disminuyeron el número de series con respecto a la taxonomía presentada por Raper y Thom (1949, Tabla 6).

Tabla 5: Clasificación de hongos del género *Penicillium* y relacionados (*Eupenicillium* y *Talaromyces*) en subgéneros (Pitt 1979a).

Género	Subgénero	Características
<i>Eupenicillium</i> {		Producción de Cleistotecios o Esclerocios
<i>Penicillium</i> {	<i>Aspergilloides</i>	Monoverticilados = Sección <i>Aspergilloides</i> ; = Sección <i>Exilicaulis</i>
	<i>Furcatum</i>	Biverticilados con fiálides ampuliformes. = Sección <i>Furcatum</i> = Sección <i>Divaricatum</i>
	<i>Biverticillium</i>	Biverticilados con fiálides acerosas. = Sección <i>Coremigena</i> = Sección <i>Simplicia</i>
	<i>Penicillium</i>	Terverticilados = Sección <i>Cylindrosporum</i> = Sección <i>Inordinate</i> = Sección <i>Coronatum</i> = Sección <i>Penicillium</i>
<i>Talaromyces</i> {		Producción de Gimnotecios

Tanto los estudios a nivel de ADN (LoBuglio *et al.* 1993, Berbee *et al.* 1995, Peterson 2000) como de perfiles de metabolitos secundarios (Frisvad & Filtenborg 1989, 1990) o combinados (Samson *et al.* 2004) muestran que el género *Penicillium* se relaciona con los géneros teleomórficos *Eupenicillium* y *Talaromyces* del filum Ascomicetos; los subgéneros *Aspergilloides* y *Furcatum* se relacionan

con la especie *Eupenicillium javanicum* y otras; mientras el subgénero *Penicillium* está relacionado con *Eupenicillium egyptiacum* (Figura 7). El subgénero *Biverticillium* es muy diferente de todos los demás y pertenece al ascomiceto *Talaromyces* (Pitt 1979a, LoBuglio *et al.* 1993). A su vez, este género teleomórfico también incluye anamórficos de la especie *Paecilomyces* (Samsom 1974). Pese a las evidencias moleculares solventadas en genes ribosomales (Skouboe *et al.* 1999), de la  $\beta$ -tubulina (Samson *et al.* 2004, Scott *et al.* 2004, Seifert & Levesque 2004) de la quitin-sintetasa (Park *et al.* 1997) y a la explicitación de la característica polifilética del género *Penicillium* (Berbee *et al.* 1995), éste continua clasificándose en los subgéneros polifiléticos *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* y *Penicillium* (Pitt 2000) ahondando la desconexión existente en el Reino *Fungi* entre las relaciones filogenéticas y la clasificación (Hibbett & Donoghue 1998), aunque se acepta la ausencia de la clase ficticia *Deuteromycetes* y la pertenencia de *Penicillium* en los *Ascomycetes* (Tabla 7).

El taxón terverticilado en *Penicillium* subg. *Penicillium* (Pitt 1979a) (= Sección *Asymmetrica*, subsección *Fasciculata* (Raper & Thom 1949) se caracteriza por la producción de penicilios terverticilados y en algunos casos cuatriververticilados. El *penicillus* presenta tres puntos de ramificación (Figura 5) entre las fiálides y el estipe de manera asimétrica, irregular donde las fiálides no presentan forma de aguja (Pitt & Hocking 1997). Este subgénero es de amplia

distribución y es económicamente importante al contener las especies de *Penicillium* fitopatógenas. La mayoría de éstas son especies asexuales, con conidios haploides de reproducción mitótica (Fjeld & Laane 1970).

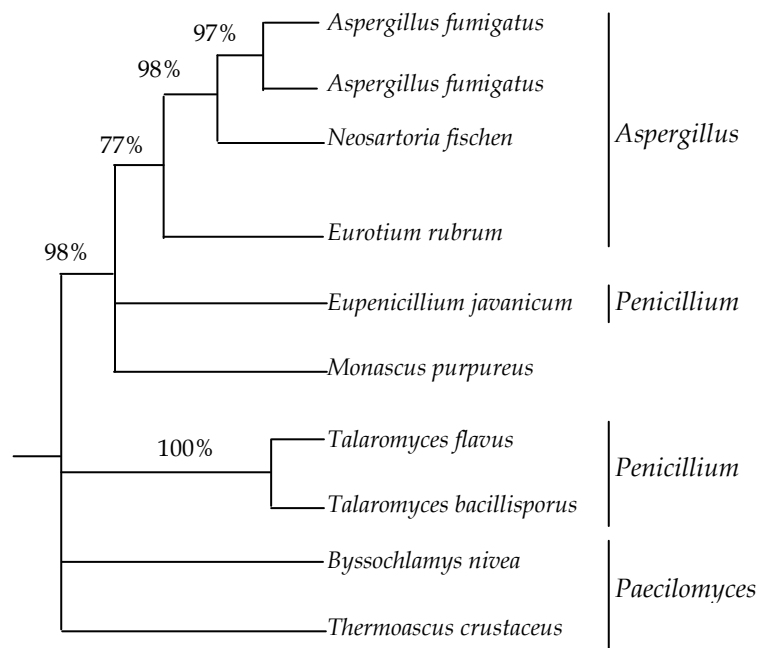


Figura 7: Relación filogenética de anamorfos de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Paecilomyces*. Adaptado de Berbee *et al.* (1995)

Tabla 6: Propuesta de clasificación de los anamorfos del género *Penicillium*.  
(Stolk & Samson 1985)

Sección	Series
A. <i>Torulomyces</i> (Delitsch) Stolk & Samson	
B. <i>Aspergilloides</i> (Dierckx) Pitt	
C. <i>Eladia</i> (G.Smith) Stolk & Samson	1. <i>Canescentia</i> Rapert & Thom ex Pitt
	2. <i>Inflata</i> Stolk & Samson
D. <i>Divaricatum</i> Raper & Thom ex Pitt	1. <i>Atrovenata</i> Stolk & Samson
	2. <i>Purpurea</i> Stolk & Samson
	3. <i>Oxalica</i> Rapert & Thom ex Pitt
	4. <i>Janthinella</i> Thom ex Pitt
	5. <i>Ochrosalmonea</i> Stolk & Samson
	6. <i>Dupontii</i> Stolk & Samson
E. <i>Inordinate</i> Pitt	
F. <i>Ramosum</i> Stolk & Samson	1. <i>Lanosa</i> Stolk & Samson
	2. <i>Chrysogena</i> Raper & Thom ex Stolk & Samson
	3. <i>Urticicola</i> Fassatióvá
G. <i>Penicillium</i>	1. <i>Digitata</i> Raper & Thom ex Stolk & Samson
	2. <i>Gladioli</i> Stolk & Samson
	3. <i>Italica</i> Raper & Thom ex Pitt
	4. <i>Expansa</i> Raper & Thom ex Fassatióvá
	5. <i>Olsonii</i> Pitt
H. <i>Coremigenum</i> (Biourge) Pitt	
I. <i>Biverticillium</i> (Dierckx) Stolk & Samson	<i>Miniolutea</i> Pitt
	<i>Verruculosa</i> Stolk & Samson
J. <i>Geosmithia</i> (Pitt) Stolk & Samson	

Tabla 7: Clasificación jerárquica aceptada del género *Penicillium* (Kirk *et al.* 2001)

<i>Taxa</i>	Denominación
Reino	<i>Fungi</i>
<i>Phylum</i>	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Eurotiomycetidae</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>

#### *1.2.2.1 Criterios culturales y morfológicos utilizados para la descripción de especies de Penicillium*

La taxonomía del género *Penicillium* se basa primeramente en las características culturales y morfológicas de colonias creciendo en medios sólidos estandarizados. Aplicando este procedimiento, Raper y Thom (1949) redujeron el número de especies asignadas al género de más de 700 a 99, con lo que consiguieron también que el método sea universalmente aceptado para la taxonomía del género. Basado en este sistema, Pitt (1979a) propuso identificar las especies cultivando los hongos en tres medios de identificación (CYA, MEA y G25N) a 25 °C y en el medio CYA además a 5 y 37 ° C, durante 7 días y luego registrando los diámetros alcanzados por las colonias y características macroscópicas como color en áreas conidiales y en el reverso, hábito de crecimiento, textura, tipo de margen, presencia o ausencia de exudado y de pigmentos en el medio. Para algunas especies además, el olor conduce a su

reconocimiento. Es necesario recalcar que la inhalación de conidios y compuestos volátiles puede ser riesgoso a la salud, aunque sólo *P. marneffe* es la especie de *Penicillium* patógeno en seres humanos inmunodeprimidos (Vanittanakom *et al.* 2002).

“La identificación de *Penicillium* no es fácil”, asegura Pitt (1973) para quien sólo algunos pocos en el mundo (“excepciones”) pueden identificar hongos de este género certeramente a partir de una caja de Petri. Por ello se consideran las características microscópicas del *penicillus* que permiten clasificar el subgénero de acuerdo al número de puntos de ramificación entre la fiálide y el estipe. Para el nivel de especie se observa tipo de fiálide, forma del conidio y textura del estipe. Estas características microscópicas asociadas a las macroscópicas indicadas, conducen a la identificación siguiendo la clave. Sin embargo, la identificación únicamente por métodos morfológicos continúa siendo difícil, al punto que el mismo Pitt (2000) considera a la identificación de *Penicillium* un “arte”.

Análisis comparativos han resultado en una verdadera “complicación” (Frisvad, comunicación personal). Por ejemplo, las especies citadas por Lund y Frisvad (1994) como componentes del complejo *P. aurantiogriseum* son muy difíciles de determinar. En un estudio de eficiencia entre diferentes laboratorios se realizó la identificación de cepas pertenecientes a 9 de estas especies por

expertos internacionales de *Penicillium* de 6 instituciones diferentes. Se identificaron cepas de *P. aurantiogriseum* como *P. cyclopium*, *P. crustosum*, *P. verrucosum*, *P. aurantiovirens*, *P. commune*, *P. solitum*, *P. polonicum* y un desconocido por estos taxónomos (Samsom *et al.* 1997).

En otro estudio comparativo para analizar la rugosidad del estipe y la forma del conidio (Frisvad *et al.* 2000b), 15 micólogos consultados (8 considerados expertos en taxonomía de *Penicillium*) no mostraron concordancia en la identificación de estos importantes caracteres taxonómicos (Figura 8 y Figura 9). Pequeñas variaciones en las condiciones de cultivo, llevan a cambios en el fenotipo observado (Okuda 1994).

Aunque se ha clamado que con las nuevas herramientas con que se cuentan “cualquiera puede identificar *Penicillium*” (Seifert 2004), la reticencia por parte de los taxónomos a la adopción de estas tecnologías lleva a que en la actualidad se sigan cometiendo errores groseros en la identificación de especies del género *Penicillium*.

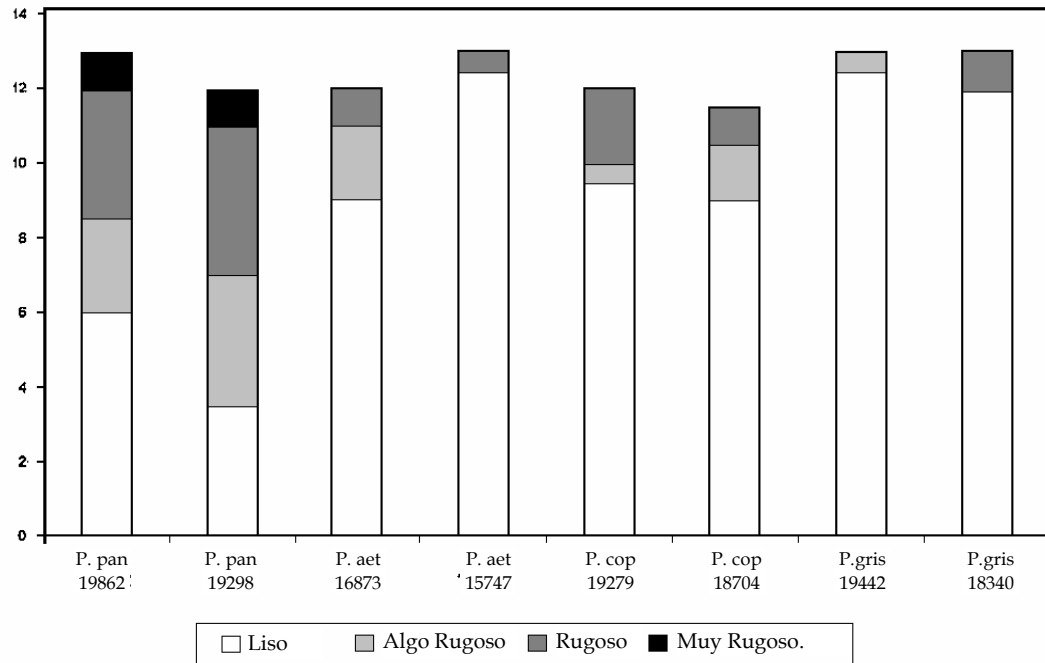


Figura 8: Informe de participantes de un ensayo de eficiencia para determinar el grado de rugosidad de los conidióforos observados en el medio CYA.

P.pan= *Penicillium paneum*; P. aet= *Penicillium aethiopicum*; P.cop = *P. coprophilum*; P.gris= *Penicillium griseofulvum*. Números correspondientes al número de accesión en la colección IBT, DTU, Lyngby, Dinamarca.

Tomado de Frisvad *et al.* (2000b)

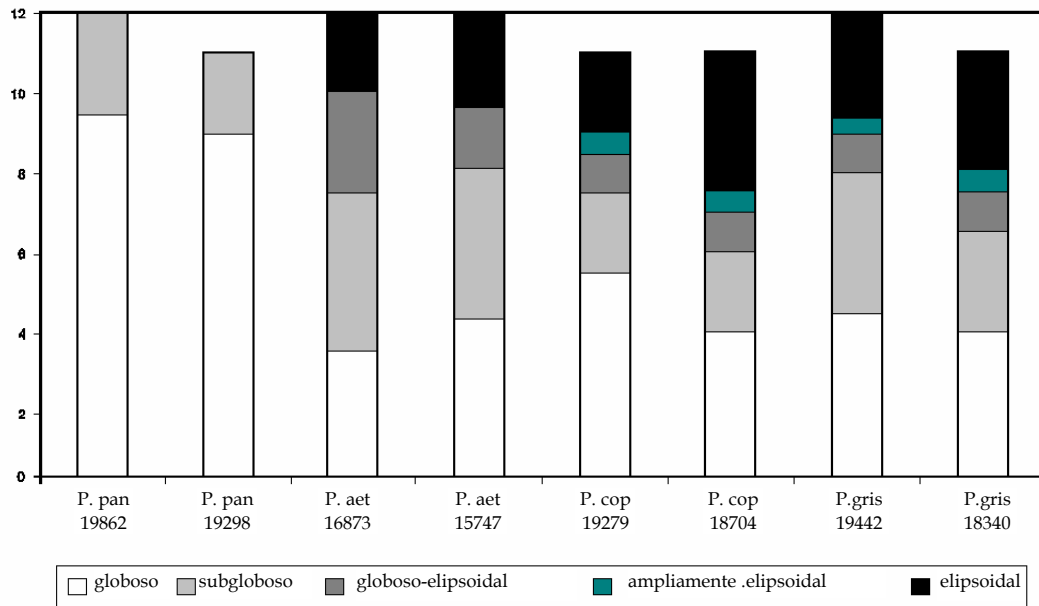


Figura 9: Informe de participantes de un ensayo de eficiencia para determinar la forma de conidios de *Penicillium*.

Idénticos aislamientos a los presentados en Figura 8. Tomado de Frisvad *et al.* (2000b)

### I.2.2.2 Criterios fisiológicos y bioquímicos

El crecimiento en cultivos diferenciales, donde se manifiestan características fisiológicas y bioquímicas, similar a lo que se realiza con bacterias fue explorado por Frisvad (1981). En ese trabajo se analiza el crecimiento de cepas en medios con diferentes fuentes de nitrógeno, fungicidas, en un medio para evaluar la producción de la enzima extracelular tricaproinasa y la producción de metabolitos secundarios. Como resultado de ese trabajo, algunas características fisiológicas, como el crecimiento en agar nitrito sacarosa (NSA), en agar creatina sacarosa (CREA), en agar extracto de levadura (GY) y con los fungicidas pentacloronitrobenzeno (PCNB) y ácido acético se podía llegar a una clasificación satisfactoria de las especies terverticiladas de *Penicillium*, aunque el perfil de metabolitos secundarios también era apropiado.

El medio de cultivo CREA (Frisvad 1985b) fue propuesto como medio diferencial para el desarrollo de algunas especies de *Penicillium*. Este medio contiene únicamente a la creatina como fuente de nitrógeno y púrpura de bromocresol como indicador de pH. El medio tiene un pH original de 8,0 y por consiguiente un fuerte color lila inicial. El viraje al ácido se presenta observando la presencia de color amarillo alrededor de las colonias. La composición del medio fue ligeramente modificada acidificando el pH y añadiendo algunos inhibidores (Frisvad 1993). Este medio fue modificado también por Pitt (1993)

en el medio CSN (Creatina Sacarosa Neutro). Este medio presenta creatina como única fuente de nitrógeno y también usa el púrpura de bromocresol como indicador de pH. Parte de un pH inicial entre 5,5 a 6,8. De esta manera, el pH inicial corresponde con el rango neutro del colorante dando al medio una coloración gris. Se ajustó la proporción de sacarosa y creatina de manera que se obtuviera una combinación que remarcara ambas reacciones en el medio, ampliando las diferencias entre especies.

Cuando se producen metabolitos ácidos el medio vira a amarillo, mientras que si se producen metabolitos alcalinos el medio vira a lila. Lo primero sucede cuando la sacarosa es usada como fuente de carbono (Pitt & Hocking 1997) mientras que el viraje a lila se produce cuando se libera amoníaco (Bridge 1985). Se ha propuesto que la liberación de amoníaco proviene de la desaminización de los aminoácidos (creatina) al utilizarlos como fuente de carbono (Adour *et al.* 2002).

El uso de "kits" comerciales como el sistema API (Analytab Products Inc. BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) ha sido utilizado para identificar hongos filamentosos (Wasfy *et al.* 1987, Espinel-Ingroff *et al.* 1989, Rath *et al.* 1995) aunque no se ha continuado su uso en la taxonomía de *Penicillium* (Bridge & Hawksworth 1984)

Una compilación de las técnicas fisiológicas usadas en la identificación de hongos filamentosos ha sido publicada por Paterson y Bridge (1994). Listan una variedad de métodos bioquímicos que van desde simples ensayos en cajas de Petri hasta técnicas cromatográficas o electroforéticas, muchas de las cuales no han sido adoptadas.

#### *1.2.2.3 Metabolitos secundarios*

El uso de metabolitos secundarios ha probado ser una técnica valiosa para la identificación y descripción de especies (Frisvad & Filtenborg 1983, Frisvad 1985a, Lund & Frisvad 1994, Frisvad *et al.* 1997).

Se conocen como metabolitos primarios a aquellos provenientes de reacciones catalizadas por enzimas como por ejemplo amino ácidos, acetil coenzima A, ácido mevalónico, azúcares y nucleótidos (Herbert 1989).

Los metabolitos secundarios se distinguen de los primarios porque tienen una distribución más restringida, encontrándoselos principalmente en plantas y microorganismos y son a menudo característicos de géneros individuales, especies o individuos o razas intraespecíficas. Se los llama también productos naturales (penicilina, tetraciclina) para distinguirlos de otros productos farmacéuticos sintéticos. Se forman a lo largo de rutas especializadas a partir de metabolitos primarios. Estos últimos tienen una distribución amplia en los seres

vivos y están íntimamente involucrados en los procesos esenciales para la vida, pero parecería que los metabolitos secundarios no son esenciales para procesos biológicos o metabólicos, aunque jugarían algún otro rol en la vida de los hongos (Williams *et al.* 1989, Calvo *et al.* 2002).

Se encuentran comúnmente como una mezcla de moléculas relacionadas con estructuras químicas complejas. Las más comunes son esteroides, terpenos, alcaloides, ciclopéptidos y cumarinas (Herbert 1989).

Aunque varios autores habían sugerido que el uso de metabolitos secundarios podía ser importante para estudios taxonómicos (Sankara Subramanian 1968, Ciegler *et al.* 1973, Pitt 1979b), no fue hasta el trabajo de (Filtenborg & Frisvad 1980) publicado en extenso por (Frisvad & Filtenborg 1983) en que se estableció la real importancia que presentan los metabolitos secundarios como caracteres taxonómicos. Ese trabajo podría considerarse como la piedra fundamental de la clasificación de *Penicillium* por metabolitos secundarios, puesto que se estudiaron más de 2400 aislamientos para clasificar a *Penicillia* del Subgénero *Penicillium* en 29 grupos. La hipótesis de Frisvad y Filtenborg (Frisvad & Filtenborg 1983) que los "*Penicillia* *terverticilados* pueden efectivamente ser definidos en perfiles específicos de metabolitos secundarios producidos consistentemente, cada uno de esos grupos de perfiles de metabolitos secundarios puede ser idealmente identificado independientemente usando criterios fisiológicos y

*morfológicos y preferiblemente ser especies conocidas o subgrupos de especies”,* ha sido la obra de estos investigadores por casi 30 años realizando innumerables aportes para afirmarla.

En los primeros trabajos se aplicó la técnica de cromatografía en placa delgada (TLC) desarrollándose un método rápido realizando la extracción directamente sobre la placa (Filtenborg & Frisvad 1980, Filtenborg *et al.* 1983, Thrane 1986). Posteriormente se usaron técnicas analíticas con mayor discriminación, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Frisvad 1987, Frisvad & Thrane 1987) para la identificación de metabolitos secundarios. Estos trabajos aportaron mucha información, pero fueron criticados por la complejidad de su interpretación (Pitt 1989) y porque la producción de metabolitos secundarios puede estar afectada por condiciones ambientales, como las fuentes de carbón y nitrógeno utilizadas, la temperatura ambiente, condiciones de iluminación y pH (Ehrlich *et al.* 2003, Mihlan *et al.* 2003, Yu & Keller 2005). Se ha criticado también que la técnica presenta el peligro de confiar demasiado en sus resultados sin buscar una correlación con las características morfológicas o de otro tipo que los apoyen (Martínez Benítez 2003) aunque una lectura más profunda de los artículos mencionados indica que el color y los exudados, que se han usado extensamente en la taxonomía de *Penicillium* (Raper & Thom 1949, Ramirez 1982, Pitt 2000), son producidos por metabolitos

secundarios (Frisvad & Filtenborg 1983) y que la creación de especies por su perfil de metabolitos secundarios debe estar correlacionada con la morfología (Frisvad 1985a). El olor, producido por la presencia de compuestos volátiles, también se ha usado para la caracterización de *Penicillium* (Raper & Thom 1949, Ramirez 1982, Pitt 2000). Muchos de estos compuestos pueden ahora identificarse por técnicas analíticas (Larsen & Frisvad 1994, 1995c, Nilsson *et al.* 1996a, Nilsson *et al.* 1996b). Dichos métodos pueden utilizarse para identificar aislamientos de *Penicillium* que son difíciles de identificar por otros medios (Larsen & Frisvad 1995a, Larsen & Frisvad 1995b). La técnica de cromatografía gaseosa de espectrometría de masa (GC-MS) permite separar *P. carneum* de *P. roquefortii*, dos especies muy similares, pero donde la primera produce geosmina y la segunda no (Frisvad & Samson 2004). Como se verá en el Capítulo VII, sólo el análisis de metabolitos secundarios permitió separar de manera confiable los aislamientos de la serie *Corymbifera*, serie que abarca a los *Penicillia* patógenos de bulbos.

#### 1.2.2.4 Taxonomía molecular

Los métodos basados en ADN permiten agrupar los organismos por criterios fenéticos y trazar su filogenia por criterios cladísticos. Los marcadores moleculares del tipo RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar) se han usado para describir (Hocking *et al.* 1998) y agrupar especies de *Penicillium*

(Yoon & Bae 1995). Marcadores RAPD y AFLP (Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados) se han usado para caracterizar diferentes quimiotipos de *Penicillium* (Castella *et al.* 2002, Lund *et al.* 2003, Pianzzola *et al.* 2004). La secuenciación de genes ribosomales y de ITS en general muestra que las especies terveticiladas presentan una gran homología como para discriminar especies (Skouboe *et al.* 1996, Skouboe *et al.* 1999, Castella *et al.* 2002, Samson *et al.* 2004) no presentando una solución estadísticamente robusta a la clasificación dentro del subgénero *Penicillium* (Skouboe *et al.* 1996). La secuenciación del gen de la  $\beta$ -tubulina ha provisto un apoyo importante al concepto de especie adoptado por Frisvad y Samson (2004) pero no ha logrado separar las especies *P. freii* de *P. neoechinulatum*, ni de estas dos la especie *P. viridicatum* (todas presentan idénticas secuencias), lo mismo ocurre entre *P. confertum* con *P. mononematosum* y entre *P. camemberty* con *P. caseifulvum* (Samson *et al.* 2004). Todas estas especies, sin embargo, son perfectamente identificables mediante sus perfiles de metabolitos secundarios (Frisvad *et al.* 2004). El uso de secuencias correspondientes a otros genes podría resultar útil para la separación de las especies problemáticas.

Otro problema serio de la secuenciación es la identificación previa del organismo secuenciado. La técnica de secuenciación es una herramienta muy valiosa, pero es posible que el organismo a secuenciar esté previamente mal

identificado, ya sea por contaminación y pérdida de la cadena original, por confusión en los rótulos utilizados, o por haberse identificado de manera errónea. Al ser accesible depositar secuencias en las bases de datos mundiales, éstas están atestadas de secuencias adjudicadas a especies mal identificadas, similar a lo que ocurre cuando se le asigna a determinada especie la capacidad de producir micotoxinas (Frisvad 1989).

#### *1.2.2.5 Clasificación de los *Penicillia* terverticilados*

La taxonomía del subgénero *Penicillium* fue recientemente revisada por Frisvad y Samson (2004) quienes propusieron una aproximación polifásica para la taxonomía de tan importante subgénero. Adoptaron un concepto fenotípico de especie con caracteres micromorfológicos, macromorfológicos, fisiológicos y de extrólitos combinados. En su trabajo sostienen que las clasificaciones basadas en cualquiera de esos tipos de caracteres por sí solos no han dado resultados satisfactorios debido a la diversidad de los taxa de *Penicillium*.

El número de secciones reconocidas dentro del subgénero se fijó en 6 con 17 series en total (Tabla 8).

Los hongos patógenos en bulbos (Serie *Corymbifera*) se clasificaron dentro de la sección *Viridicata*.

Tabla 8: Clasificación de hongos del género *Penicillium* Subgénero *Penicillium* en Secciones y Series (Frisvad & Samson 2004).

<i>Sección</i>	<i>Serie</i>
<i>Coronata</i>	<i>Olsonii</i>
<i>Roqueforti</i>	<i>Roqueforti</i>
<i>Chrysogena</i>	<i>Chrysogena</i> <i>Mononematosa</i> <i>Aethiopica</i> <i>Persicina</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Expansa</i> <i>Urticolae</i> <i>Claviformia</i> <i>Italica</i> <i>Gladioli</i>
<i>Digitata</i>	<i>Digitata</i>
<i>Viridicata</i>	<i>Viridicata</i> <i>Corymbifera</i> <i>Verrucosa</i> <i>Camemberti</i> <i>Solita</i>

## **II. Objetivos**

Se plantearon los siguientes objetivos generales:

### *II.1 Taxonómico*

Identificar las especies patogénicas de *Penicillium* spp. de cultivos de ajo de la región de Cuyo.

Determinar otras especies de *Penicillium* spp. aisladas de ajo y no patogénicas.

### *II.2 Fitopatológico*

Discriminar especies fitopatógenas de no fitopatógenas.

Determinar la presencia de aislamientos con distinto grado de patogenicidad.

Realizar una colección de las especies de *Penicillium* aisladas de ajo.

### *II.3 Ecológico*

Correlacionar la distribución de los grupos taxonómicos obtenidos con la zona de aislamiento.

### **III. Plan de trabajo**

El plan de trabajo que se siguió contempló los siguientes puntos:

### *III.1 Muestreo de ajo en la principal zona productora de Argentina.*

Realización de un muestreo de bulbos en el área Norte (8000 ha), Centro (4500 ha) y Sur (500 ha) de Mendoza y en áreas cultivadas de San Juan (2500 ha) tomando como criterio obtener una muestra por cada 100 ha cultivadas con ajo. Esto totalizó aproximadamente 150 muestras.

### *III.2 Obtención de cultivos de *Penicillium spp.**

Aplicación de la técnica del *blotter test* o cámara húmera para la realización de aislamientos de *Penicillium spp.*

Monosporización y almacenamiento de los aislamientos obtenidos.

### *III.3 Identificación de la colección*

Inoculación de los aislamientos obtenidos en medio CYA y en un medio con extracto de ajo.

Clasificación por similitud de aislamientos por técnicas de análisis multivariado.

Obtención de individuos representativos de cada grupo.

Identificación de estos individuos por características morfológicas en diferentes medios.

Corroboración de las identificaciones con las realizadas por un servicio de identificación reconocido internacionalmente.

#### *III.4 Realización de análisis de patogenicidad*

Toma de un número proporcional de individuos de cada grupo y realización de pruebas de patogenicidad inoculando bulbillos (cámara húmeda), e inoculando bulbillos y analizando el comportamiento de éstos en el campo.

## **IV. Material y Métodos**

En este capítulo se menciona la metodología utilizada en general en el trabajo; aunque la metodología específica se amplía en los capítulos correspondientes.

#### *IV.1 Muestreo de ajo en Mendoza y San Juan*

Las chacras a muestrear se obtuvieron de datos provistos por el Instituto de Desarrollo Rural (IDR) de la provincia de Mendoza y del censo nacional agropecuario de 1988 para la provincia de San Juan. En el caso de San Juan, el tamaño de la muestra se estimó siguiendo a Cochran (1972). De acuerdo a la varianza del tamaño de los departamentos de la provincia y del tamaño de las chacras, se estableció el tamaño de la muestra y se ajustó proporcionalmente al número de chacras existentes al momento del censo. Como resultado, se obtuvieron 147 muestras de 100 bulbos cosechados, una muestra cada 100 ha cultivadas. De cada muestra se registró nombre del propietario, dirección, procedencia de bulbillos utilizados como “semilla”, forma de almacenamiento y cantidad de ha cultivadas.

Las muestras se tomaron durante Diciembre de 1999 y Febrero de 2000. Si bien hay diferencias cuando se comparan la superficie de las chacras muestreadas con las superficies de los datos totales del censo nacional agropecuario de 2001 (datos no presentados), el número de muestras obtenido

no tuvo diferencias significativas con el número de muestras programadas para tomar y puede considerarse que es representativo de la cantidad de hectáreas cultivadas con ajo por zona y por tipo de ajo (Tabla 9). Las muestras se obtuvieron de cordones a campo (Figura 10), caballetes (Figura 11) o secaderos verticales (Figura 12).

Dos muestras adicionales de plantas en cultivo con síntomas de ataque de *Penicillium* se obtuvieron en el campo de la EEA La Consulta del INTA en Agosto de 2000, una perteneciente al cultivar Castaño INTA y otra al cultivar Fuego INTA. Ambos cultivares se habían informado como tolerante y sensible a la enfermedad respectivamente (Cavagnaro *et al.* 2000).

Tabla 9: Área cultivada, estimación de muestras a obtener (n-est) y muestras obtenidas (n-obs) en los oasis productivos de Mendoza y San Juan según el tipo de ajo.

Datos Provincia de Mendoza, IDR: Instituto de Desarrollo Rural (IDR 2002b), hectáreas cultivadas con ajo año 1999-2000; Datos Provincia de San Juan: CNA = Censo Nacional Agropecuario, ha cultivadas con ajo en San Juan durante 2001 (INDEC 2001).

Provincia	Zona	Tipo	hectáreas en cultivo	n-esp	n-obs
Mendoza	Centro	blanco	2.093,0	21	19
		colorado	1.291,0	13	13
		morado	434,0	4	3
	Este	blanco	470,0	5	13
		colorado	208,0	2	4
		morado	98,0	1	1
	Norte	blanco	1.148,0	11	5
		colorado	490,0	5	7
		morado	270,0	3	1
	Sur	blanco	154,0	2	3
		colorado	574,0	6	11
		morado	164,0	2	1
	Valle de Uco	blanco	335,0	3	12
colorado		3.672,0	37	23	
morado		252,0	3	2	
Subtotal			11.653,0	118	118
San Juan	Centro Sur	blanco	933,1	9	15
		colorado	112,2	1	1
		morado	342,0	3	5
		rosado	0,0	0	3
	Norte	blanco	20,3	0	1
		colorado	9,0	0	0
	Oeste	blanco	322,8	3	3
		colorado	7,5	0	2
		morado	0,0	0	1
Subtotal			1.746,9	16	31
Total			13.399,9	134	149

$$\chi^2_{\text{obs}} = 27,20; \chi^2_{\text{crit}} (22 \text{ gdl } \alpha=0,05) = 33,91$$



Figura 10: Muestra 103 obtenida de cordones a campo en la localidad de Ugarteche, Mendoza.

Los bulbos se atan y se colocan hacia adentro sobre palos. Las chalas quedan hacia afuera. Se coloca un plástico por encima y se cubre con malezas que le hacen sombra (normalmente *Chenopodium* spp. o *Amaranthus* spp. de gran tamaño). Es el sistema menos recomendado para la realización del “curado” del ajo.



Figura 11: Muestra 69 obtenida en Uspallata (Mendoza).

Ajos dispuestos en caballete. Los bulbos se disponen hacia el interior de la estructura y las chalas hacia la parte externa. Las chalas protegen de la incidencia del sol y el aire circula por el interior de la estructura, quitando la humedad de los bulbos. A veces se protegen por lonas o plásticos. Este método de “curado” es preferible al presentado en la Figura 10 , aunque presenta inconvenientes.



Figura 12: Muestra 104 obtenida en Agrelo (Mendoza) en secaderos verticales.

Tipo de estructura recomendada para obtener un buen proceso de “curado” del ajo. Los bulbos se ubican hacia dentro y las chalas hacia fuera.

## IV.2 Aislamiento de *Penicillium*

A partir de de Marzo de 2000, coincidente con la ruptura de dormición de los bulbillos, comenzó el aislamiento de las colonias de *Penicillium*. De cada una de las muestras se tomaron 20 a 25 bulbillos, uno por bulbo, que se colocaron sobre cuatro pliegues de papel absorbente humedecidos con 30 mL de agua corriente dispuestos en bandejas de 25 x 25 cm. Estas bandejas se introdujeron en bolsas plásticas y se incubaron durante 7 días a 20 °C con fotoperíodo de 12 horas. Se realizaron dos repeticiones por muestra. En el caso de las muestras 1; 2; 3; 4; 9; 10; 11; 13; 28; 38; 44; 67; 75; 76; 78; 106; 107; 125 y 126 se realizaron dos nuevas repeticiones, debido a que en las primeras dos no se observaron colonias de *Penicillium* (Tabla 10).

Al finalizar la incubación se identificaron las colonias de *Penicillium* y de otros géneros observados y se realizaron cuatro aislamientos de *Penicillium* spp por muestra. Con los datos del número de colonias se determinó la densidad de inóculo por área (datos presentados en el V.3 del Capítulo V). Se dio la nomenclatura "Mx Ay" a cada colonia aislada, en donde "M" indica muestra; "x" el número de la muestra correspondiente al muestreo; "A" indica aislamiento e "y" indica la primer, segunda, tercera, etc., colonia aislada en la cámara húmeda. Así los hongos quedaban relacionados con la zona donde se obtuvo la muestra. El primer aislamiento se realizó en cajas de Petri. Una vez

Tabla 10: Muestra; Provincia; Departamento y Paraje donde se tomó la Muestra.

Se presenta la longitud y la latitud de la georeferencia de la muestra. R. Agroc. = Región Agroclimática según propuso Defina *et. al.* (1962, 1963). ha cult.= Cantidad de hectáreas cultivadas; Bco; Col; Chi; Ros; Tipo de ajo cultivado: Blanco, Colorado, Morado (Chino), Rosado. Col. *Pe.* = Colonias de *Penicillium* spp.

Muestra	Provincia	Departamento	Paraje	R. Agroc.	ha cult.	Tipo	Bulbillos incubados	Col. <i>Pe.</i> spp. observadas	Col. <i>Pe.</i> spp. aisladas	Longitud	Latitud	
1	San Juan	Pocito	Villa Aberastain	53	2	Bco	100	5	4	-68.5833	-31.6500	
2	San Juan	Pocito	Villa Aberastain	53	2	Bco	65	4	4	-68.5833	-31.6500	
3	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Bco	96	8	5	-68.5833	-31.6911	
4	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Chi	85	12	3	-68.5833	-31.6911	
5	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Ros	49	37	3	-68.5833	-31.6911	
6	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Ros	47	38	3	-68.5833	-31.6911	
7	San Juan	Pocito	Villa Aberastain	53	2	Bco	41	28	6	-68.5899	-31.6459	
8	San Juan	Pocito	Villa Aberastain	53	2	Bco	42	19	2	-68.5899	-31.6459	
9	San Juan	Pocito	Villa Aberastain	53	2	Chi	90	23	2	-68.5899	-31.6459	
10	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Chi	91	31	5	-68.5764	-31.6833	
11	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Ros	100	76	5	-68.5764	-31.6833	
12	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Bco	52	33	2	-68.5764	-31.6833	
13	San Juan	San Martín	Villa San Martin	26	B	1	Chi	100	91	4	-68.3333	-31.5500
14	San Juan	Albardon	Albardon	26	B	1.5	Bco	18	15	3	-68.5255	-31.4372
15	San Juan	9 de Julio	9 de Julio	26	B	1	Bco	40	35	3	-68.4000	-31.6500
16	San Juan	Santa Lucia	Santa Lucia	26	B	1	Col	40	34	2	-68.4833	-31.5333
17	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Bco	52	21	2	-68.5833	-31.6755	
18	San Juan	San Martín	Angaco	26	B	1	Bco	38	32	2	-68.3000	-31.4833

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 10 Viene de la página anterior

Muestra	Provincia	Departamento	Paraje	R. Agroc.	ha cult.	Tipo	Bulbillos incubados	Col. Pe. spp. observadas	Col. Pe. spp. aisladas	Longitud	Latitud	
19	San Juan	Pocito	Pocito	53	2	Bco	36	31	4	-68.5899	-31.6792	
20	San Juan	Caucete	Caucete	26	B	1.5	Bco	35	25	5	-68.2852	-31.6541
21	San Juan	25 de Mayo	Las Casuarinas	24		1	Bco	38	11	2	-68.3261	-31.8166
22	San Juan	Valle Fertil	Santa Rosa	23		2.5	Bco	40	15	2	-67.4500	-30.7500
23	San Juan	25 de Mayo	Colonia Rawson	24		1	Bco	53	34	3	-68.2166	-31.8422
24	San Juan	25 de Mayo	Colonia Rawson	24		1	Chi	47	30	3	-68.2096	-31.8500
25	San Juan	25 de Mayo	Colonia Rawson	24		1	Bco	31	22	5	-68.2166	-31.8578
26	San Juan	Iglesia	Iglesia	106		0.75	Col	47	32	5	-69.2236	-30.4067
27	San Juan	Iglesia	Iglesia	106		0.75	Bco	40	24	4	-69.2167	-30.4144
28	San Juan	Iglesia	Iglesia	106		0.75	Chi	90	82	3	-69.2236	-30.4221
29	Mendoza	Lujan	Perdriel	80		20	Col	44	37	2	-68.9279	-33.0833
30	Mendoza	San Carlos	Puesto Cepillo Viejo	143	B	1	Bco	33	10	2	-69.0833	-33.8500
31	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		4	Col	44	9	2	-69.0300	-33.7352
32	Mendoza	San Carlos	Casas Viejas	117		5	Col	42	6	5	-69.0131	-33.8333
33	Mendoza	San Carlos	Casas Viejas	117		5	Bco	54	33	6	-69.0568	-33.8323
34	Mendoza	San Carlos	Casas Viejas	117		15	Col	41	24	3	-69.0254	-33.8333
35	Mendoza	San Carlos	Casas Viejas	117		10	Bco	46	8	4	-69.0431	-33.8337
36	Mendoza	San Carlos	Casas Viejas	117		15	Col	45	8	2	-69.0184	-33.8333
37	Mendoza	San Carlos	Casas Viejas	117		10	Bco	46	6	2	-69.0509	-33.8325
38	Mendoza	San Carlos	Chilecito	117		3	Col	100	25	1	-69.0281	-33.8833
39	Mendoza	San Carlos	Chilecito	117		0.5	Col	18	10	2	-69.0275	-33.8972
40	Mendoza	Lavalle	Ing Gustavo André	52	A	46	Bco	41	22	4	-68.3166	-32.7000
41	Mendoza	Lavalle	El Paramillo	52	A	80	Bco	41	15	2	-68.5500	-32.7833
42	Mendoza	San Rafael	Rincon del Atuel	75	A	4	Col	44	15	3	-68.3666	-34.7333
43	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	30	Col	54	22	3	-68.2500	-34.7938
44	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	70	Chi	89	40	4	-68.2500	-34.7938
45	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	10	Col	56	19	6	-68.2500	-34.7741

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 10 Viene de la página anterior

Muestra	Provincia	Departamento	Paraje	R. Agroc.		ha cult.	Tipo	Bulbillos incubados	Col. Pe. spp. observadas	Col. Pe. spp. aisladas	Longitud	Latitud
46	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	21	Col	41	26	6	-68.2500	-34.8629
47	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	8	Col	42	17	5	-68.2500	-34.8629
48	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	10	Bco	46	9	5	-68.2500	-34.8826
49	Mendoza	San Rafael	Las Malvinas	75	A	15	Col	45	13	5	-68.2500	-34.8826
50	Mendoza	San Rafael	Cuadro Benegas	109		2	Bco	38	10	3	-68.4666	-34.6166
51	Mendoza	San Rafael	Cuadro Benegas	109		1	Col	42	9	2	-68.3330	-34.6355
52	Mendoza	San Rafael	Cuadro Benegas	109		1	Bco	46	27	6	-68.5000	-34.6000
53	Mendoza	General Alvear	Bowen	50		0.5	Col	35	12	4	-67.4500	-34.9000
54	Mendoza	General Alvear	Bowen	50		1	Col	40	28	4	-67.5333	-34.9166
55	Mendoza	Malargue	Las Chacras	143	A	10	Col	47	21	4	-69.6653	-35.3196
56	Mendoza	Malargue	Calle Publica	143	A	2	Col	28	25	4	-69.5833	-35.2333
57	Mendoza	Lavalle	Col 3 de Mayo	52	A	2	Col	47	15	4	-68.6166	-32.6666
58	Mendoza	Lavalle	Col 3 de Mayo	52	A	40	Bco	41	22	5	-68.6166	-32.6471
59	Mendoza	Lavalle	Col 3 de Mayo	52	A	20	Col	43	26	3	-68.6166	-32.6471
60	Mendoza	Lavalle	Jocolí	52	A	60	Col	35	17	5	-68.5691	-32.7518
61	Mendoza	Lavalle	La Holanda	52	A	7	Col	46	37	3	-68.5528	-32.7166
62	Mendoza	Lavalle	La Holanda	52	A	20	Col	46	26	4	-68.5528	-32.7166
63	Mendoza	San Carlos	Pareditas	144		1	Col	36	14	3	-69.0568	-33.9329
64	Mendoza	San Carlos	Pareditas	144		5	Col	44	30	2	-69.0750	-33.9385
65	Mendoza	San Carlos	Pareditas	144		8	Bco	33	15	2	-69.0798	-33.9333
66	Mendoza	San Carlos	Pareditas	144		10	Col	38	14	4	-69.0798	-33.9333
67	Mendoza	San Carlos	Chilecito	117		15	Col	100	20	2	-69.0500	-33.9324
68	Mendoza	Las Heras	Uspallata	177	A	1	Chi	44	28	4	-69.3333	-32.5833
69	Mendoza	Las Heras	Uspallata	177	A	9	Bco	38	29	2	-69.3333	-32.6321
70	Mendoza	Las Heras	Uspallata	177	A	1	Col	49	36	2	-69.3333	-32.5833
71	San Juan	Calingasta	Barreal	114		160	Bco	33	33	6	-69.4666	-31.6333
72	San Juan	Calingasta	Tamberias	79		40	Bco	36	27	5	-69.4222	-31.4669

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 10 Viene de la página anterior

Muestra	Provincia	Departamento	Paraje	R. Agroc.	ha cult.	Tipo	Bulbillos incubados	Col. Pe. spp. observadas	Col. Pe. spp. aisladas	Longitud	Latitud
73	Mendoza	Tupungato	Ojo de Agua La Arboleda	109	10	Bco	39	6	2	-69.0666	-33.4166
74	Mendoza	Tupungato	Zampalito	109	5	Col	47	3	2	-69.1000	-33.4000
75	Mendoza	Tupungato	Anchoris	109	9	Bco	94	2	2	-68.9344	-33.3333
76	Mendoza	Tupungato	Ojo de Agua La Arboleda	109	7	Chi	88	43	4	-69.0666	-33.4166
77	Mendoza	Tupungato	Villa Bastía	109	8	Col	37	29	3	-69.1333	-33.3333
78	Mendoza	Tupungato	Dubois La Arboleda	109	12	Col	84	4	4	-69.0000	-33.4500
79	Mendoza	Tupungato	El Peral	109	11	Col	37	29	5	-69.1833	-33.3333
80	Mendoza	Tupungato	Cordon del Plata	109	5	Col	44	15	3	-69.1000	-33.4833
81	Mendoza	Tupungato	Las Carreras	143	A 5	Col	41	23	3	-69.2833	-33.1500
82	Mendoza	San Martin	Palmira	52	A 3.5	Bco	41	28	4	-68.5482	-33.0298
83	Mendoza	San Martin	Palmira	52	A 7.5	Bco	24	24	4	-68.4333	-32.9833
84	Mendoza	San Martin	El Central	52	A 9	Bco	37	20	2	-68.4101	-32.8333
85	Mendoza	San Martin	El Central	52	A 8	Bco	34	27	3	-68.4101	-32.8333
86	Mendoza	San Martin	El Central	52	A 2	Bco	39	28	4	-68.6044	-32.8379
87	Mendoza	Junin	Rod Peña	52	A 7	Bco	39	28	5	-68.5983	-33.1241
88	Mendoza	Junin	Medrano	52	A 3	Bco	33	19	4	-68.6086	-33.1816
89	Mendoza	Junin	Medrano	52	A 6	Col	38	7	2	-68.6086	-33.1816
90	Mendoza	Junin	Medrano	52	A 10	Bco	35	18	3	-68.6183	-33.1833
91	Mendoza	Rivadavia	Andrade	52	A 0.5	Bco	32	29	6	-68.5166	-33.1931
92	Mendoza	Rivadavia	Andrade	52	A 4	Col	38	14	4	-68.5166	-33.1931
93	Mendoza	Junin	La Colonia	52	A 16	Bco	33	32	5	-68.5216	-33.1467
94	Mendoza	Rivadavia	Andrade	52	A 1	Col	46	32	4	-68.5166	-33.1931
95	Mendoza	Rivadavia	Andrade	52	A 1	Bco	32	21	4	-68.5166	-33.1931
96	Mendoza	Junin	Los Barriales	52	A 3	Bco	33	20	4	-68.6000	-33.0833
97	Mendoza	Lujan	Ugarteche	80	2	Bco	43	28	3	-68.8696	-33.3333
98	Mendoza	Lujan	El Carrizal	80	4	Col	36	31	5	-68.8366	-33.2107
99	Mendoza	Maipu	Barrancas	52	A 2	Bco	35	22	3	-68.8076	-33.0807

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 10 Viene de la página anterior

Muestra	Provincia	Departamento	Paraje	R. Agroc.		ha cult.	Tipo	Bulbillos incubados	Col. Pe. spp. observadas	Col. Pe. spp. aisladas	Longitud	Latitud
100	Mendoza	Maipu	Barrancas	52	A	2	Bco	43	25	4	-68.6884	-33.1213
101	Mendoza	Lujan	El Carrizal	80		2	Bco	31	22	4	-68.6666	-33.2500
102	Mendoza	Lujan	El Carrizal	80		2	Col	35	26	4	-68.6666	-33.2500
103	Mendoza	Lujan	Ugarteche	80		2	Col	37	27	5	-68.8000	-33.2333
104	Mendoza	Lujan	Agrelo	80		22	Bco	38	22	3	-68.9104	-33.1166
105	Mendoza	Lujan	Agrelo	80		1	Col	38	25	3	-68.9104	-33.1166
106	Mendoza	Lujan	Perdriel	80		3	Chi	96	30	7	-68.9436	-33.0833
107	Mendoza	Lujan	Anchoris	80		1	Chi	87	40	4	-68.8200	-33.2557
108	Mendoza	Lujan	Anchoris	80		5	Bco	38	26	3	-68.8167	-33.2577
109	Mendoza	Lujan	Anchoris	80		2	Col	38	27	4	-68.8167	-33.2577
110	Mendoza	Lujan	Vistalba	80		3	Col	44	34	5	-68.8833	-33.0166
111	Mendoza	Lujan	Vistalba	80		1	Bco	31	25	4	-68.8833	-33.0166
112	Mendoza	Guaymallen	Rodeo de la Cruz	52	A	2	Bco	35	32	4	-68.6972	-32.9350
113	Mendoza	Guaymallen	La Primavera	52	A	12	Bco	33	25	5	-68.6666	-32.9166
114	Mendoza	Guaymallen	Los Corralitos	52	A	0.5	Col	44	20	3	-68.6857	-32.7992
115	Mendoza	Guaymallen	Los Corralitos	52	A	0.5	Col	38	27	4	-68.7146	-32.8839
116	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	10	Bco	28	23	3	-68.7194	-32.8310
117	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	4	Chi	51	34	3	-68.5936	-32.8784
118	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	3	Bco	33	29	4	-68.6019	-32.9567
119	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	3	Col	42	28	4	-68.6321	-32.9295
120	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	2	Bco	21	19	2	-68.6321	-32.9295
121	Mendoza	San Martin	Tres Porteñas	52	A	15	Bco	37	31	3	-68.4500	-32.8833
122	Mendoza	San Martin	Tres Porteñas	52	A	3	Chi	54	42	6	-68.4500	-32.8833
123	Mendoza	San Martin	Tres Porteñas	52	A	15	Col	31	24	5	-68.4500	-32.8833
124	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	0.5	Bco	37	19	4	-68.5442	-32.8926
125	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	6	Col	100	5	4	-68.6077	-32.8333
126	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	23	Bco	100	14	4	-68.6077	-32.8333

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 10 Viene de la página anterior

Muestra	Provincia	Departamento	Paraje	R. Agroc.		ha cult.	Tipo	Bulbillos incubados	Col. Pe. spp. observadas	Col. Pe. spp. aisladas	Longitud	Latitud
127	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	0.5	Bco	48	11	3	-68.6077	-32.8333
128	Mendoza	Maipu	Los Alamos	52	A	2	Bco	37	32	4	-68.6139	-32.8750
129	Mendoza	Maipu	San Roque	52	A	1	Col	39	33	6	-68.5920	-33.0000
130	Mendoza	Maipu	San Roque	52	A	2	Bco	34	25	4	-68.6282	-33.0556
131	Mendoza	Maipu	San Roque	52	A	2	Col	38	29	4	-68.6282	-33.0556
132	Mendoza	Maipu	La Blanca	52	A	1	Bco	39	16	4	-68.8242	-33.0866
133	Mendoza	Las Heras	El Borbollon	52	A	1	Bco	33	18	4	-68.7500	-32.8000
134	Mendoza	Las Heras	El Pastal	52	A	1	Col	42	28	4	-68.7166	-32.7666
135	Mendoza	Tunuyan	La Primavera	109		1	Col	40	34	3	-69.0000	-33.6000
136	Mendoza	Tunuyan	Las Pintadas	109		20	Col	47	27	4	-69.2151	-33.5534
137	Mendoza	Tunuyan	Vista Flores	109		1	Bco	34	17	4	-69.1166	-33.6500
138	Mendoza	Tunuyan	Vista Flores	109		2	Col	42	26	3	-69.1166	-33.6500
139	Mendoza	San Carlos	Pareditas	144		20	Col	37	20	4	-69.0582	-33.9281
140	Mendoza	Lujan	Perdriel	80		20	Bco	35	28	4	-68.9279	-33.0833
141	San Juan	Calingasta	Calingasta	79		3	Col	24	19	2	-69.4150	-31.3386
142	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Bco	32	22	3	-69.1188	-33.7193
143	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Chi	33	29	5	-69.1188	-33.7193
144	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Bco	36	9	2	-69.1188	-33.7193
145	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Col	31	21	3	-69.1188	-33.7193
146	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Col	36	28	4	-69.1188	-33.7193
147	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Bco	32	14	2	-69.1188	-33.7193
148	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Col	25	20	3	-69.1188	-33.7193
149	Mendoza	San Carlos	La Consulta	117		1	Bco	33	17	3	-69.1188	-33.7193

comprobada la pureza de las colonias, se hicieron repiques a tubos de ensayo de 15 mL cargados con 5 mL de medio PDA (Difco, Detroit, EEUU) en pico de flauta. Se incubaron 7 días y se almacenaron en heladera.

Con los cultivos puros se procedió a la monosporización de los mismos. El método utilizado se modificó del propuesto por Hansen y Smith (1932). Del margen de la colonia desarrollada en el medio PDA se tomó una muestra, que se suspendió en un microtubo conteniendo 200  $\mu$ L de agua destilada esterilizada y 3  $\mu$ L de Tween 20. De esta suspensión se tomaron 10  $\mu$ L, que se colocaron en el centro de una caja de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro. Se colocaron 3 mL de medio para suspensiones monospóricas (Anexo XII.1) y se incubaron por 48 h a 25 °C. Observando en microscopio estereoscópico con transiluminación y con una amplificación de 160 a 400X se tomaban los conidios germinados que estuvieran lo suficientemente aislados para asegurar la extracción de una sola colonia. El pequeño bloque de agar conteniendo la colonia en formación se colocaba en un nuevo tubo de ensayo. Se realizaron dos cultivos monospóricos por aislamiento. La eficiencia total del método fue del 86 %.

Para corroborar el método se mezclaron dos hongos del género *Penicillium* (LJC 202 y LJC 317) de diferente fenotipo en un microtubo y se sometió la mezcla a monosporización, tal como se describió antes. No se observaron

colonias resultantes de la mezcla de ambos aislamientos después de realizar la monosporización (Figura 13).

Como resultado de este trabajo se obtuvieron 540 aislamientos monospóricos de *Penicillium* spp.

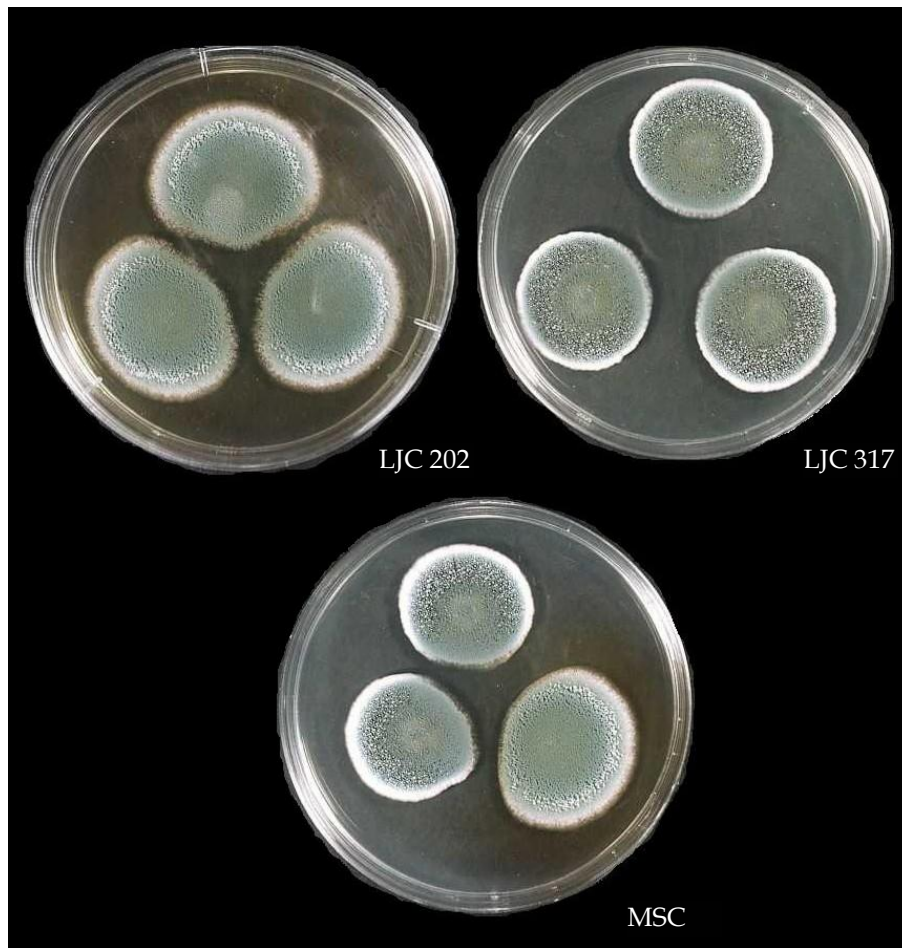


Figura 13: Obtención de cultivos puros a partir de suspensiones combinadas de dos hongos del género *Penicillium*: LJC 202 y LJC 317.

MSC= Monospóricos de Suspensiones Combinadas

### *IV.3 Identificación*

#### *IV.3.1 Identificación morfológica*

Para facilitar el trabajo de identificación, primeramente se simplificó la nomenclatura utilizada ( $MxAy$ ) otorgando a cada colonia un número correlativo a partir del 1. Se le agregó el prefijo LJC (por Laboratorio José Crnko) a los hongos así definidos.

Se sortearon los 540 aislamientos en 12 tandas de 45 hongos cada una más tres testigos que se repetían por tanda (Figura 14). Los testigos seleccionados fueron el aislamiento LJC 541 *P. implicatum* (Monoverticilado, no patogénico en plantas, identificado en el Dpto. de Microbiología e Inmunología; Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto) y los aislamientos LJC 542 y LJC 543 provenientes de plantas sintomáticas a campo de los clones Castaño INTA y Fuego INTA, respectivamente. Dichas plantas pertenecían a la colección activa del banco de germoplasma de la EEA La Consulta, INTA y fueron muestreadas en agosto de 2000.

Para preparar el inóculo, se tomó una porción de colonia de cada cultivo monospórico que se diluyó en 200  $\mu\text{L}$  de medio Agar Detergente (Pitt 1973). Se colocaron 3 puntos de inóculo de 3  $\mu\text{L}$  en el medio CYA por aislamiento, sin

cita

mientras el grupo de Frisvad realiza inoculaciones con aguja (citado en Frisvad 2000), lo que lleva a ambos grupos a presentar diámetros finales diferentes. En esta tesis se optó por inocular 3  $\mu\text{L}$  con un doble objetivo: 1: estandarizar el volumen inoculado para hacerlo referente a otros investigadores y 2: ganar tiempo evitando esterilizar un ansa ya que se reemplaza por una punta de micropipeta previamente esterilizada. Se optó por el medio CYA por ser uno de los más importantes en lo que respecta a la taxonomía de *Penicillium* (Pitt 1973).

Además del medio CYA, se realizaron tres inoculaciones de cada aislamiento en un medio formulado en base a extracto acuoso de ajo. El medio se denominó GSA (por *Garlic Sucrose Agar*) y en esta tesis se propone como medio diferencial para la identificación de *Penicillium allii* (Capítulo VI). El medio GSA contiene 60  $\text{mL.L}^{-1}$  de extracto de ajo 1/10 obtenido de polvo de ajo e incorporado por filtración al medio de cultivo. Este medio presenta propiedades fungicidas y fungistáticas para muchas especies de *Penicillium*. Se utilizó bajo la hipótesis que sólo aquellas especies patogénicas podrían desarrollarse. Para poder considerar a cada inoculación una verdadera repetición, se aleatorizó la posición de siembra en cada caja de Petri.

La metodología empleada se resume en la Figura 15.

En la Figura 16 se presenta la metodología general de diluciones del inóculo para pruebas de patogenicidad.

Con respecto a la dosis inoculada, Ramirez (1982) observó que el número de conidios en el inóculo presenta poco efecto en los resultados al momento de hacer la identificación; mientras Pitt y Hockings (1997) no lo tuvieron en cuenta. Para decidir cuán diferentes eran las colonias cuando no se ajustaba la dosis, antes de comenzar con el proceso de identificación de 12 tandas se realizó una prueba preliminar. La misma consistía en determinar la incidencia de la concentración de inóculo en el diámetro y fenotipo final de la colonia desarrolladas en medio GSA y CYA.

Se eligió el aislamiento 402 y se hizo crecer en CYA durante 7 días a 25 °C. Se extrajo un disco de 5 mm del borde de la colonia que se agitó en 1000 µL de agar detergente durante 5 minutos. Se hicieron 3 diluciones seriadas 1/10 y se determinó la concentración de las suspensiones en cámara de Neubauer. Luego se colocaron 200 mL de cada suspensión en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, se agregó agar agua tibio, se mezcló con hisopo estéril y se dejó solidificar. Se extrajeron discos de 5 mm diámetro que se inocularon, tres por caja de Petri; seis repeticiones, en los medios CYA y GSA. Las concentraciones de las diluciones y el consiguiente número estimado de conidios por disco fueron:  $2,32 \times 10^7$  (14.321 conidios -D4);  $3,36 \times 10^6$  (2.074 conidios -D3);  $4,56 \times 10^5$  (281 conidios -D2) y

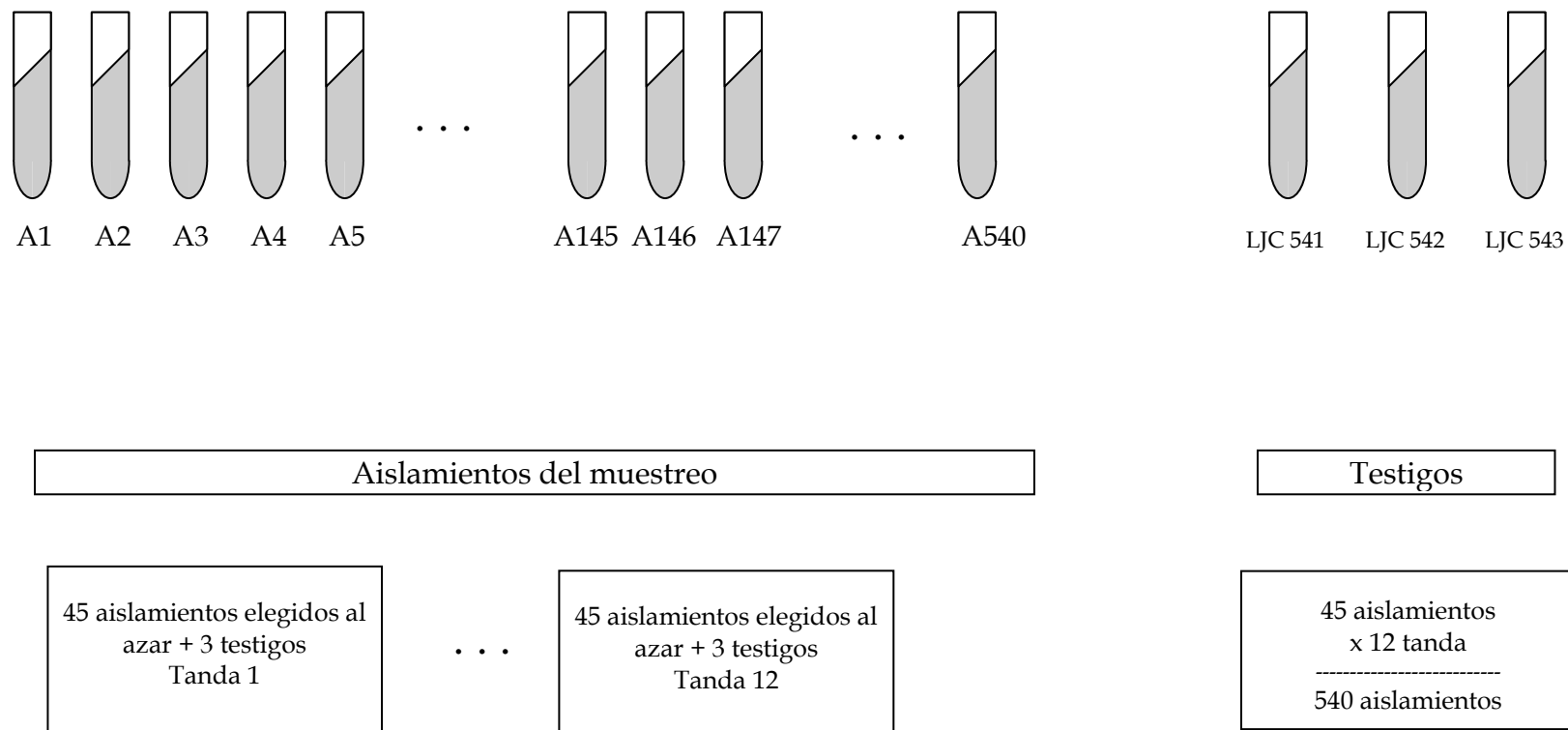
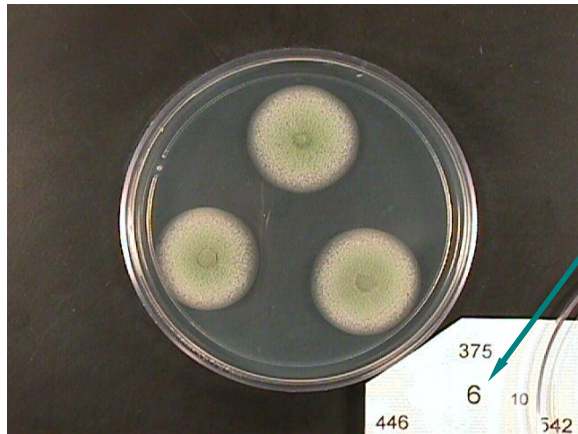
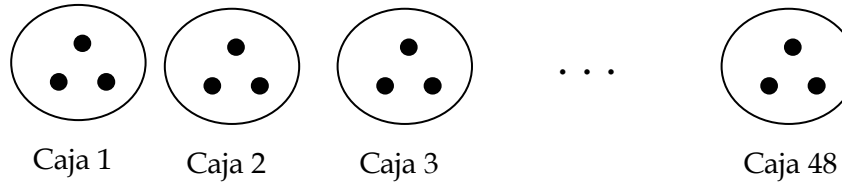


Figura 14: Esquema de selección aleatoria de los aislamientos en 12 grupos (Tandas) de 45 aislamientos cada uno

Tanda 1
45 aislamientos 3 testigos
48 aislamientos para inocular 3 repeticiones / aislamiento



Placa N° 6 Tanda 10

Tda 10	Pto 1	Pto 2	Pto 3
Caja 1	173	334	160
Caja 2	475	183	183
Caja 3	285	385	444
Caja 4	435	265	381
Caja 5	8	285	<b>543</b>
Caja 6	375	<b>542</b>	446
Caja 7	208	437	417
Caja 8	<b>541</b>	444	231
	94	13	485
		63	285
		417	25
		104	104

Planilla correspondiente a la tanda 10, con 3 inoculaciones por aislamiento en posiciones elegidas al azar.

Testigos en color azul

Figura 15: Esquema de la metodología utilizada para la inoculación aleatoria de los aislamientos en medio GSA correspondientes a la Tanda 10

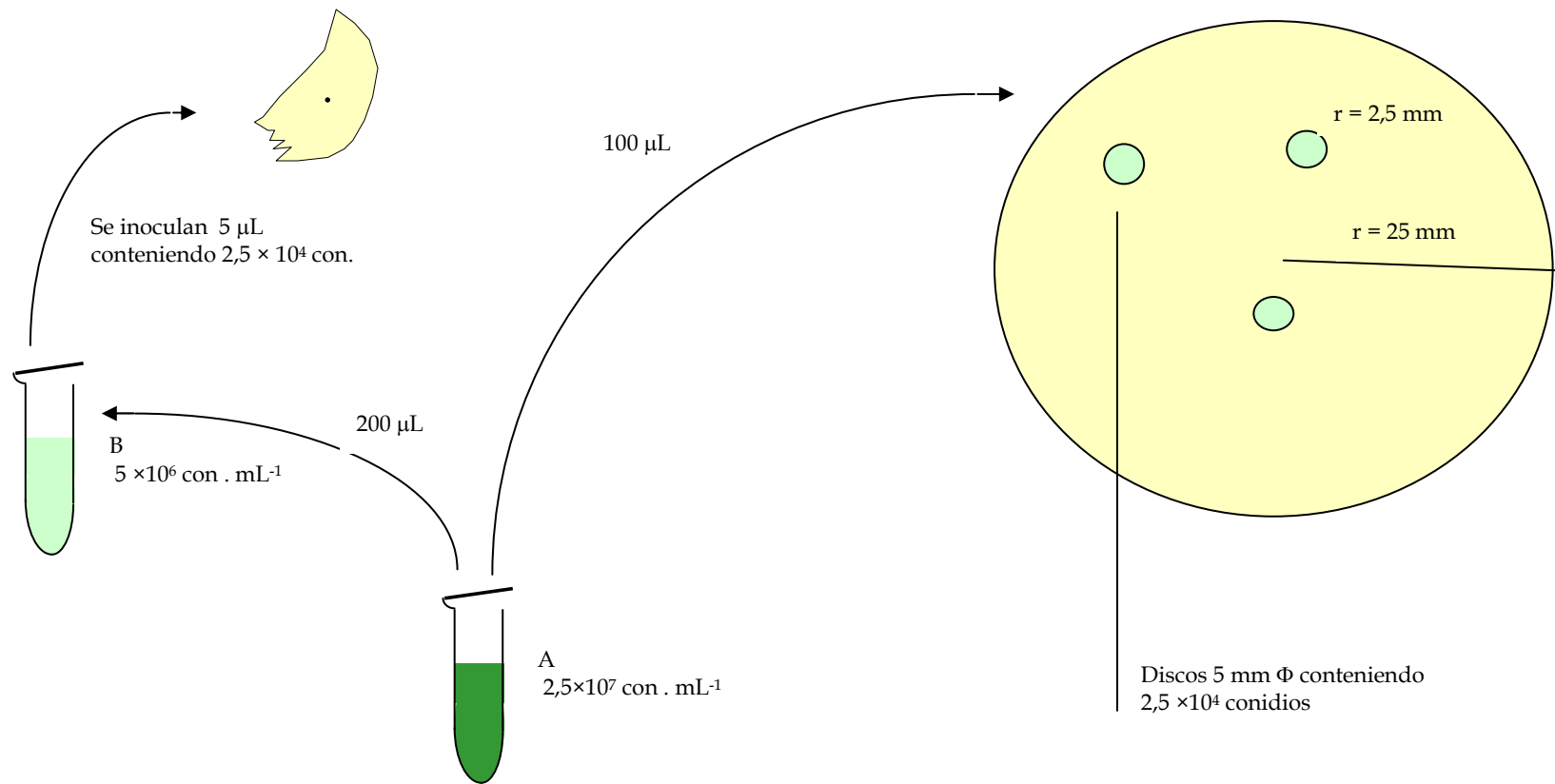


Figura 16: Ajuste del inóculo utilizado en pruebas de patogenicidad.

La suspensión A se ajustó en Cámara de Neubauer. La suspensión B es una dilución 1/5; los discos de 5 mm se obtuvieron con sacabocados y se inocularon en CYA y GSA.

$5,25 \times 10^4$  (32 conidios -D1). Los resultados mostraron que hay diferencias significativas según la dosis inoculada en el diámetro de la colonia (Tabla 11), no habiéndolas en el fenotipo de la misma (Figura 17). Sin embargo, la relación entre el diámetro alcanzado en CYA y el del medio GSA, a igual concentración de inóculo, no fue significativa (Tabla 12). Dado que la dosis inoculada era importante en el diámetro final de la colonia, pero por otro lado, ajustar 540 aislamientos era una tarea de mucho trabajo manual, se optó por no ajustar las dosis a inocular y por incorporar además en las características de la colonia, la relación GSA/CYA.

Los aislamientos inoculados se incubaron de forma invertida por 7 días a 25 °C en oscuridad. Luego de este periodo, de cada colonia se registraron los caracteres presentados en la Tabla 13. Además de la caracterización *in vitro*, todos los aislamientos se fotografiaron con una cámara digital Mavica 8x (Sony), por el frente y por el revés, ubicada en banco de reproducción con la lente situada a 27 cm del piso del banco y con dos lámparas de fotografía de 200 W ubicadas en ángulo de 45 ° y a 33 cm del sitio de enfoque. Se utilizó fondo negro neutro para evitar reflejos. Esta colección de fotografías de los aislamientos, resultó ideal para comparar rápidamente los aislamientos obtenidos.

Las relaciones de afinidad entre éstos se analizaron con métodos multivariados. Se construyó una matriz básica de datos considerando los

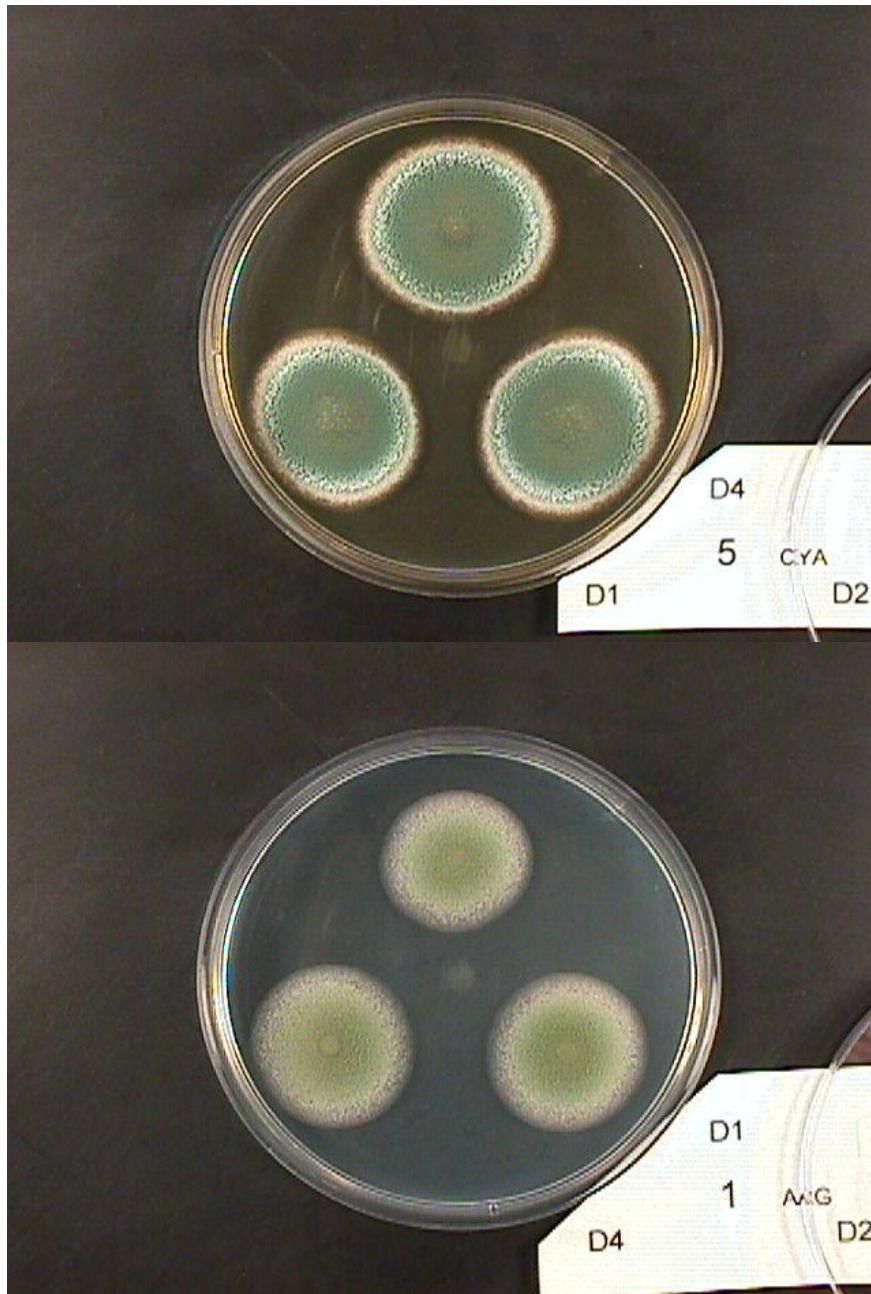


Figura 17: Efecto de la concentración del inóculo *in vitro*, medio GSA. Aunque no aparente, se observan diferencias significativas en los diámetros finales de las colonias. No se aprecian diferencias en el fenotipo.

Tabla 11: Diámetro alcanzado por el aislamiento LJC 402 en los medios de cultivos CYA y GSA según la dosis inoculada.

D1, 2, etc.= Dosis 1, 2, etc. expresada en cantidad de conidos por disco agar agua de 5 mm de diámetro; Letras diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey,  $P=0.05$ .

Medio	Repetición	D1 3x10 <sup>1</sup>	D2 2x10 <sup>2</sup>	D3 2x10 <sup>3</sup>	D4 1.5x10 <sup>4</sup>
CYA	R1	26,0	28,0	30,0	30,0
	R2	26,0	27,0	28,0	30,0
	R3	24,0	26,0	29,0	30,0
	R4	26,0	27,0	27,0	30,0
	R5	25,0	26,0	26,0	30,0
	R6	sd	28,0	28,0	30,0
	Promedio	25,4a	27,0b	28,0b	30,0c
CV	3,52	3,31	5,05	0	
GSA	R1	20,0	22,0	22,0	25,0
	R2	20,0	23,0	23,0	25,0
	R3	14,0	20,0	22,0	25,0
	R4	14,0	22,0	21,0	25,5
	R5	sd	23,0	21,0	24,0
	R6	sd	sd	25,0	24,5
	Promedio	17,0a	22,0b	22,3b	24,8b
CV	20.38	5.57	6.74	2.08	

Tabla 12: Relación GSA/CYA según la concentración del inóculo

D1, 2, etc.= Dosis 1, 2, etc. expresada en cantidad de conidos por disco agar agua de 5 mm de diámetro; Letras iguales indican no diferencia en las proporciones según la Regla del Arcoseno ( $P=0.05$ ).

Medio	D1 3x10 <sup>1</sup>	D2 2x10 <sup>2</sup>	D3 2x10 <sup>3</sup>	D4 1.5x10 <sup>4</sup>
CYA	25,40	27,00	28,00	30,00
GSA	17,00	22,00	22,33	24,83
Relación	0,67a	0,81a	0,80a	0,83a

Tabla 13: Caracteres considerados para clasificar las colonias según su fenotipo en el medio de cultivo CYA y su diámetro en el medio GSA.

Carácter	Estado	Cod.	
1	diámetro de la colonia en CYA	-	
2	diámetro de la colonia en GSA	-	
3	Relación GSA/ CYA	-	
4	Forma de la colonia	arrugada plana plana y surcada surcada	1 2 3 4
5	cantidad de surcos	-	-
6	profundidad surco	ausentes poca media pronunciada	1 2 3 4
7	Posición de los surcos	ausentes toda la colonia en sector circular sólo en borde sólo en el centro	0 1 2 3 4
8	Forma del borde	regular definido irregular no definido ondulado con trozos sobresalientes	1 2 3 4
9	color del borde	blanco rosado blanco	1 2
10	longitud del borde de conidios inmaduros	-	-
11	Densidad del borde de conidios inmaduros	nula media, Borde blanco con conidios verdes alta, borde blanco	1 2 3
12	Zona de hifas inmersas.	-	-
13	Textura colonia sector circular	aterciopelada granular velluda aterciopelada y granular	1 2 3 4

*Continúa en la página siguiente*

Tabla 13 Viene de la página anterior

	Carácter	Estado	Cod.
14	Centro de colonia arrugado	presente	1
		ausente	2
15	Centro de colonia lanoso	presente	1
		ausente	2
16	Centro de colonia umbonado	presente	1
		ausente	2
17	Centro de colonia deprimido	presente	1
		ausente	2
18	Elevación del centro de colonia	plano	1
		apenas elevado	2
		elevado	3
		muy elevado	4
19	Exudado	ausente	1
		escaso	2
		abundante	3
20	Tamaño de gotas	ausente	1
		pequeña	2
		mediano	3
		grande	4
21	Color del Exudado	ausente	1
		crystalino	2
		amarillo	3
22	Reverso Centro Color Intensidad	claro	1
		oscuro	2
23	Reverso Centro Color	blanco	0
		amarillo	1
		blanco amarillento	2
		naranja	3
		rojizo-violáceo	4
		rojizo	5
		verdoso	6
		amarillo rojizo	7
24	Reverso Centro Color Gris	ausente	0
		claro	1
		oscuro	2
25	Reverso Centro Color Marrón	presente	1
		ausente	2
26	Reverso Sector Circular Color Intensidad	claro	1
		oscuro	2

Continúa en la página siguiente

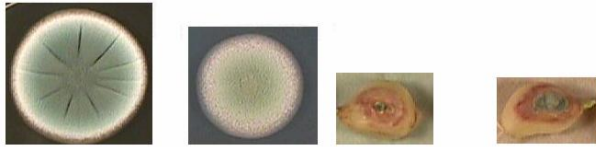
Tabla 13 Viene de la página anterior

Carácter	Estado	Cod.
27 Reverso Sector Circular Color	blanco amarillento	1
	amarillo	2
	celeste	3
	celeste-naranja	4
	rojizo-violáceo	5
	violáceo	6
	beige	7
	verdoso	8
	amarillo marrón rojizo	9
28 Reverso Sector Circular Gris	ausente	0
	claro	1
	pardo-claro	2
	oscuro	3
	pardo-oscuro	4
29 Reverso Borde Color	blanco	1
	amarillo	2
	blanco-amarillento	3
	blanco -rojizo	4
	blanco- pardo amarillento	5
30 Pigmento	ausente	0
	ambarino	1
	marrón	2
	ambar-amarronado	3

543 aislamientos como OTUs (540 obtenidos más los 3 testigos) y los 30 caracteres (atributos) de los aislamientos. Para el análisis multivariado se utilizó el software NTSyS ver. 2.1t (Rohlf 2000). Se optó por utilizar el coeficiente de distancia propuesto por Escofier (1979) ya que los datos son mixtos. En el Capítulo V (Punto V.3) se presenta la forma de calcular y se amplía sobre el uso de este coeficiente.

La matriz de distancia obtenida se utilizó para agrupar los aislamientos por el método de ligamiento de promedios no ponderados (UPGMA) que es el que distorsiona menos la matriz de similitud de la cual deriva (Crisci & López Armengol 1983).

En la Figura 18 se presenta el fenograma final obtenido. El número de individuos presentados no corresponde a 543, sino a 538, debido a que los aislamientos 34; 127; 131 y 471 se descartaron por los siguientes motivos: los aislamientos 34 y 127 pertenecen al género *Aspergillus* spp.; el aislamiento 131 estaba contaminado con *Fusarium* spp. y no se pudo purificar y el aislamiento 471 no se desarrolló. Además, se quitó del análisis el aislamiento 541 por no haber sido obtenido de ajo.



LJC 517 *P. allii*

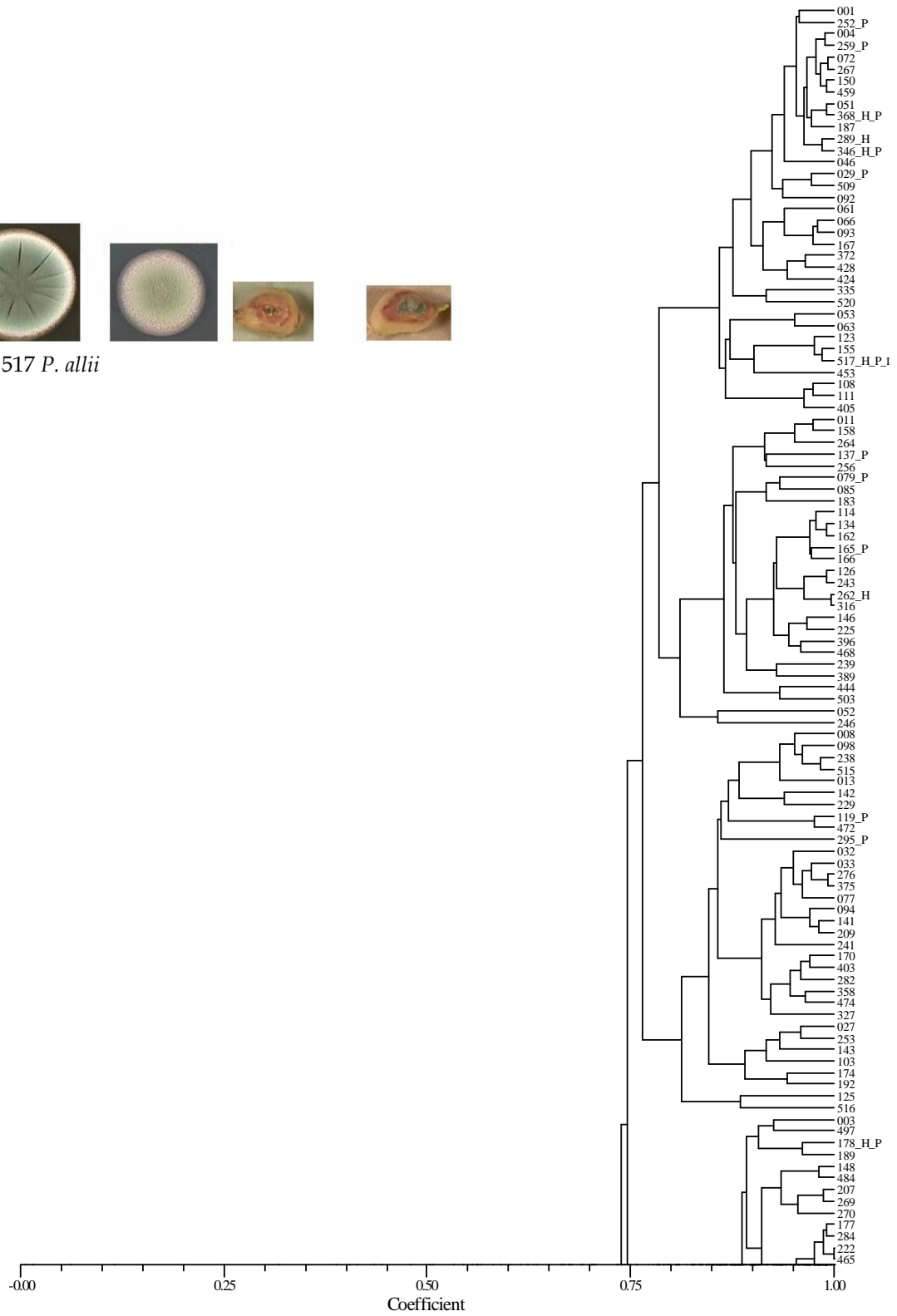
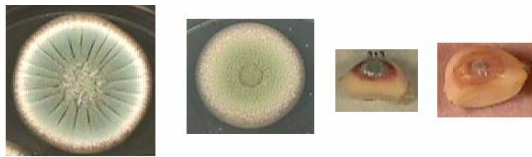
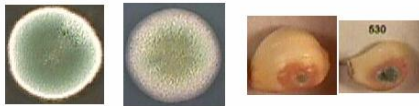


Figura 18 (continuación)



LJC 313 *P. allii*



LJC 530 *P. allii*

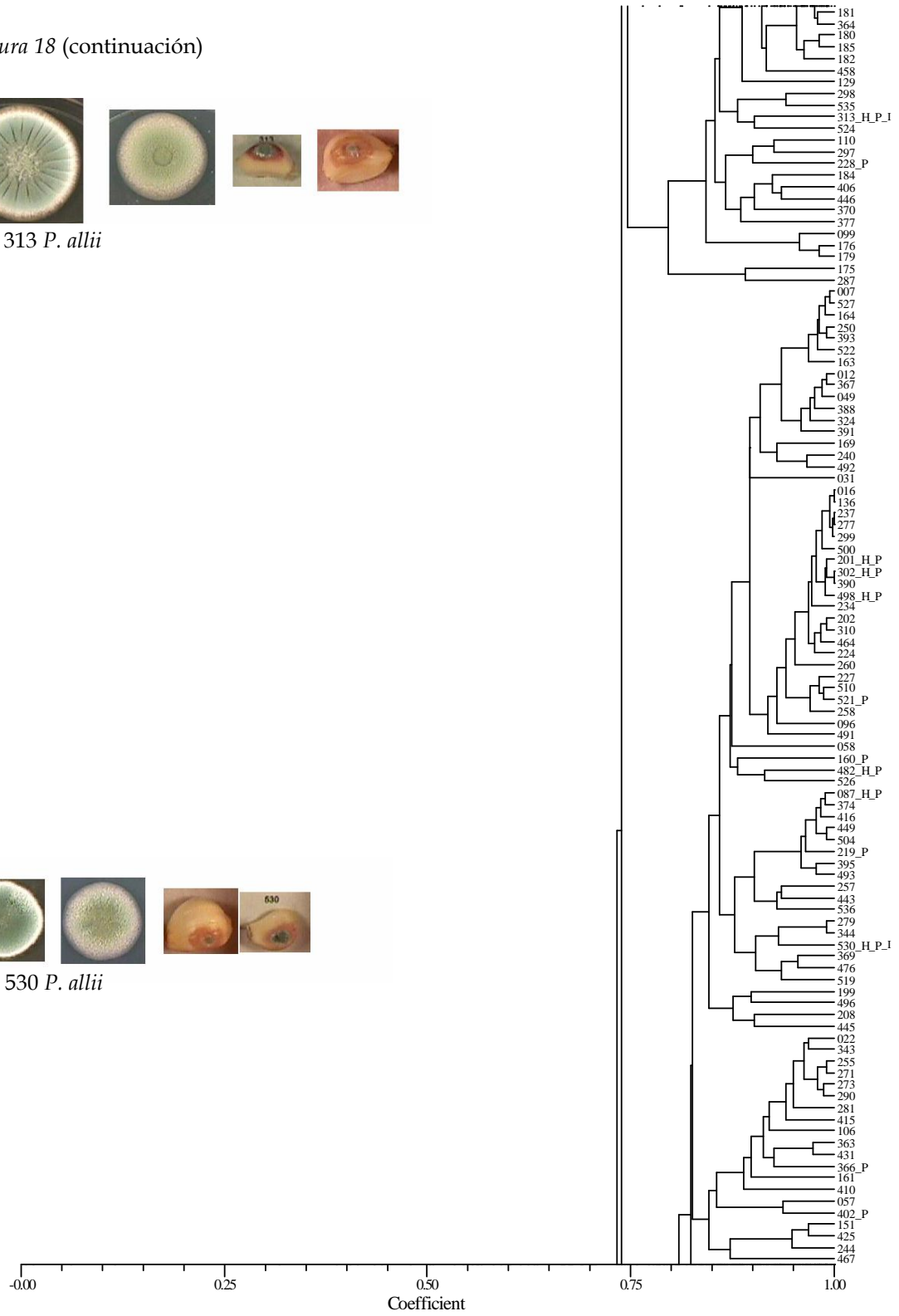
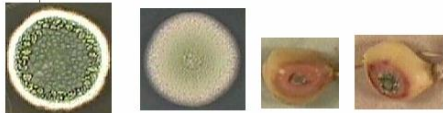


Figura 18 (continuación)



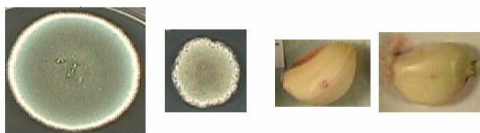
Figura 18 (continuación)



LJC 319 *P. allii*



LJC 419 *P. allii*



LJC 206 *P. chrysogenum*

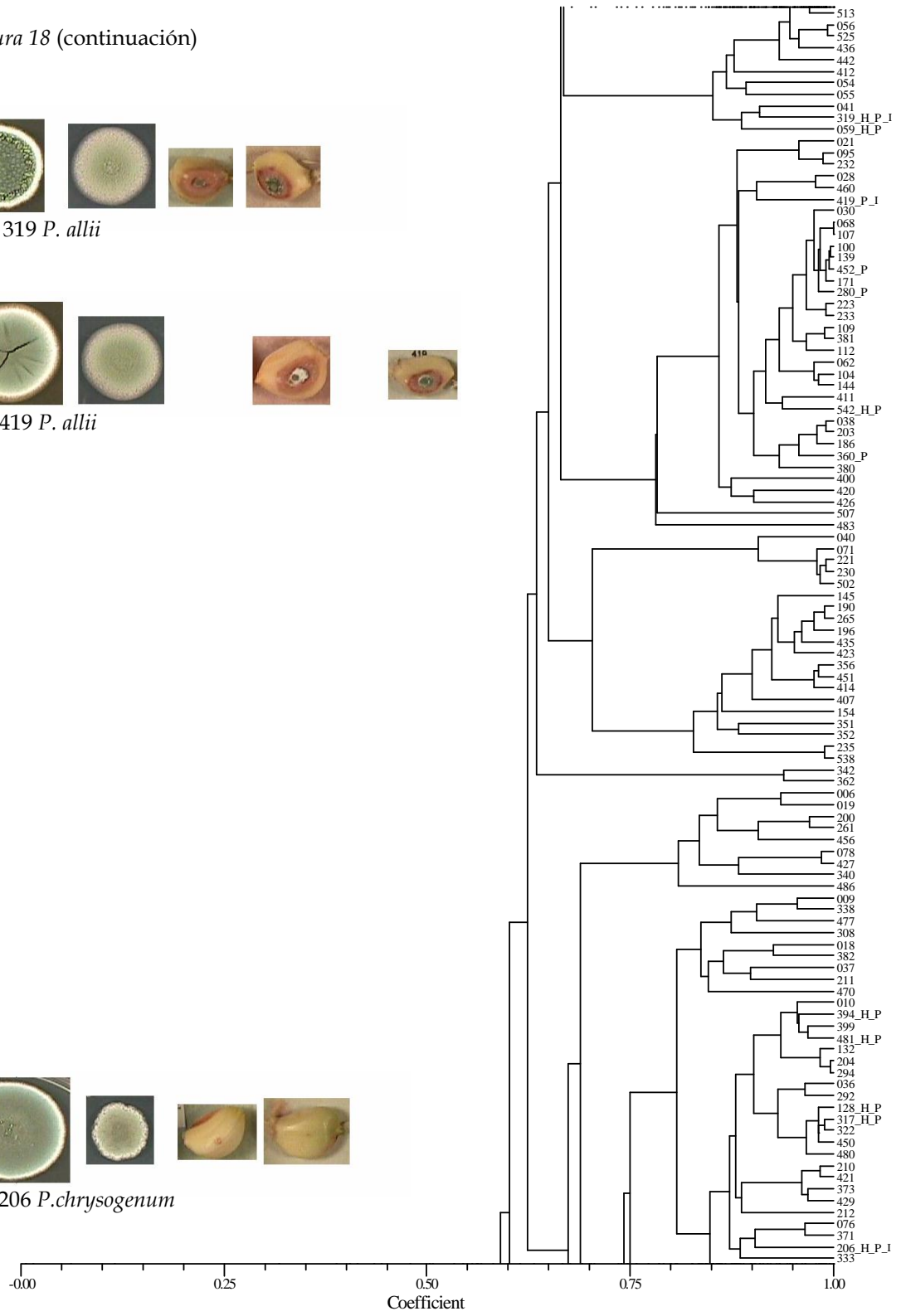
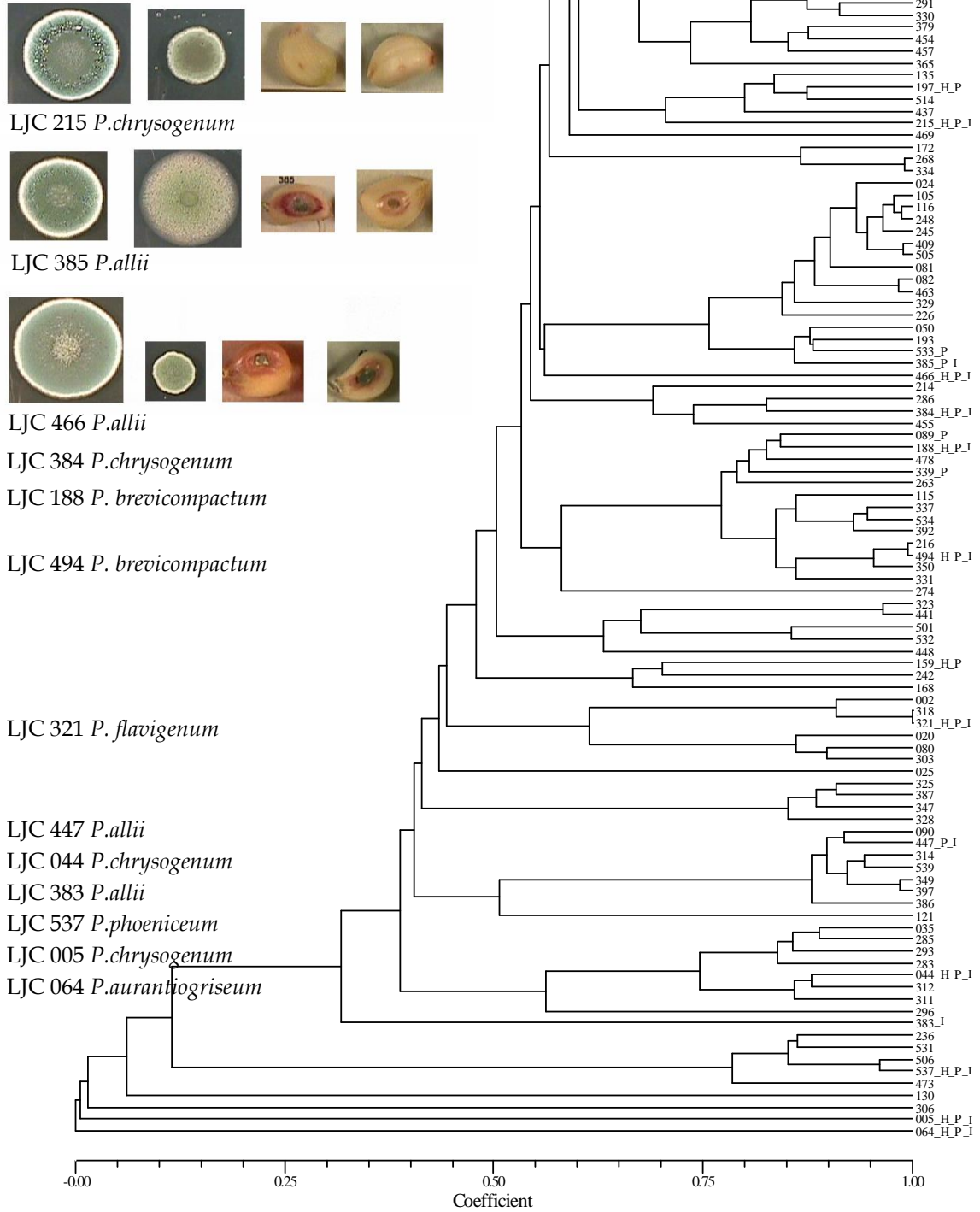


Figura 18 (continuación)



(Páginas anteriores)

Figura 18: Análisis de cluster de 538 aislamientos de *Penicillium* obtenidos de ajo en las provincias de Mendoza y San Juan.

H= HPLC. Aislamiento identificado por metabolitos secundarios; P= Patogenicidad. Aislamiento al que se le realizaron pruebas de patogenicidad en cámara húmeda e inoculando bulbillos que se plantaron en el campo; I = IMI. Aislamientos que fueron remitidos al CABI Bioscience para identificación. En las fotografías insertas se observa el aspecto de una colonia desarrollándose en medio CYA, en medio GSA y la esporulación observada en bulbillos de los clones Castaño INTA o Fuego INTA. Las identificaciones corresponden a las realizadas en Lyngby, Dinamarca.

Del agrupamiento por caracteres morfológicos de los 538 aislamientos bajo estudio, se seleccionaron individuos de cada *cluster* que fueron representativos del mismo (marcados con una I en la Figura 18) o que estuvieran contenidos en el *cluster* pero fueran morfológicamente diferentes. Se seleccionaron en total 21 aislamientos que se enviaron para que el servicio de identificación de microorganismos (*Microbial Identification Service*) del CABI Biosciences los identificara.

Para la elección de este instituto se consultó la bibliografía. En los estudios de Bruna Vásquez (1985) y de Bertolini y Tian (1996) se enviaron aislamientos de *Penicillium* obtenidos de ajo para identificar o se compararon con aislamientos tipo mantenidos en la colección IMI del CABI Bioscience (ex CMI). Además, en esta institución se identificó a la especie *P. viridicatum* en muestras de ajo de Argentina en el estudio de Gatica y Oriolani (1984), Anexo XII.3.1.

La ausencia en el informe de este servicio de identificación (Anexo, XII.3.2) de la especie *Penicillium allii* citada como patogénica en ajo (Vincent & Pitt 1989, Pitt & Hocking 1997) nos llevó a consultar al grupo que había descrito a la especie. Criterios más estrictos de clasificación ubicaron a especímenes de *P. hirsutum* en la especie *P. allii* (Anexo, XII.3.3). Además, también era un interrogante porqué no se había detectado a la especie *Penicillium viridicatum*, identificada por esta institución en 1984. Se optó por realizar las identificaciones utilizando un método no subjetivo, seleccionándose el de los metabolitos secundarios.

#### *IV.3.2 Identificación por metabolitos secundarios*

Los aislamientos (marcados con una H en la Figura 18) se incubaron durante 14 d a 25 °C en YES, un medio rico en carbohidratos y adecuado para la producción de metabolitos secundarios (Samson *et al.* 2000) y en CYA. La técnica utilizada para la extracción de metabolitos secundarios fue la propuesta por Smedsgaard (1997) que se detalla brevemente. Tres discos de 6 mm de diámetro se extrajeron y colocaron en un microtubo de 1000 µL con 500 µL de solvente en solución conteniendo metanol-diclorometano-etilacetato (1:2:3) adicionado con un 1% de ácido fórmico. Los microtubos se colocaron en un sonicador durante una hora. Luego se trasvasó la fase líquida a otro microtubo, que se colocó en un

evaporador rotatorio con vacío hasta la evaporación del solvente. El residuo sólido se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de metanol hasta su total disolución, se pasó a una jeringa, se filtró (0,4  $\mu\text{m}$ ) a un tubo de cromatografía que se etiquetó para someterse a análisis por HPLC. El equipo utilizado fue un integrador ("chemstation") HP 1090M HPLC (Hewlett-Packard, Alemania). Las separaciones se hicieron en una columna Hypersil BDS 5 $\mu\text{m}$  -C<sub>18</sub> (Hewlett-Packard, EEUU) conteniendo partículas de 3  $\mu\text{m}$  e incluyendo una pre-columna protectora de 4×4 mm.

La columna se mantuvo a 40 °C. Se utilizó un gradiente lineal comenzando con agua (A) 85% y acetonitrilo (B) 15%, hasta un 100% de acetonitrilo en 40 minutos; luego se mantuvo 100 % acetonitrilo por 3 minutos, a una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Ambos eluentes contenían ácido trifluoro-acético 0.005% v/v.

La identificación de cada compuesto es posible cuando un detector de cadena dioica registra el espectro UV en la columna. El equipo utilizado estaba equipado con este tipo de detector.

La metodología está publicada en Samson *et al.* (2000) y en Smedsgaard (1997).

#### IV.4 Caracterización patogénica de los aislamientos

Se eligió al azar el 10% de los individuos contenidos en cada uno de los grupos morfológicos determinados en el análisis de cluster (marcados con una P en la Figura 18). En los grupos donde el número de OTUs era menor a 10, se eligió un representante del grupo. Se constituyó una muestra de 60 aislamientos (57 elegidos del análisis de *cluster* y los tres testigos LJC 541, LJC 542 y LJC 543).

Se determinó la capacidad de desarrollo en medio de cultivo suplementado con extracto de ajo (GSA) de los aislamientos seleccionados y la patogenicidad en dos situaciones: bulbillos inoculados y sometidos a cámara húmeda y bulbillos inoculados y plantados en el campo. Esto último se realizó en 2003 y se repitió en 2004.

Se inocularon bulbillos de Fuego INTA y de Castaño INTA por considerarse estos cultivares como más sensible y más tolerante a *Penicillium* spp. según la determinación de Cavagnaro *et al.* (2000).

En la caracterización morfológica de todos los aislamientos no se tuvo en cuenta la dosis inoculada. Sin embargo, en el punto I.1.5 se discute la importancia de controlar la dosis a inocular. Ésta se estableció en 25.000 conidios. La metodología utilizada se esquematiza en la Figura 16.

El inóculo se obtuvo a partir de cultivos de 7 días desarrollándose en medio CYA. Se ajustó una suspensión a  $2,5 \times 10^7$  con.mL<sup>-1</sup> (suspensión A) y a

partir de allí se realizaron 2 diluciones. La primera de 1/5 para obtener una suspensión de  $5 \times 10^6$  con.mL<sup>-1</sup> (suspensión B). De esta, 5  $\mu$ L (25.000 con) se inoculaban directamente en heridas sobre bulbillos esterilizados. La segunda fue una dilución 1/50 en agar agua fundido, el cual se volcó sobre cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Lo que interesaba en este punto era la distribución homogénea de los conidios en la caja de Petri. De ésta se cortaron discos de 5 mm de diámetro estimando que cada uno llevaba 25.000 conidios.

#### *IV.4.1 Desarrollo in vitro*

Los discos se dispusieron equidistantes de los bordes y del centro, tres por caja de Petri en los medios de cultivo GSA y CYA. Se realizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Se midió el diámetro de la colonia a los 7 días (Figura 19)

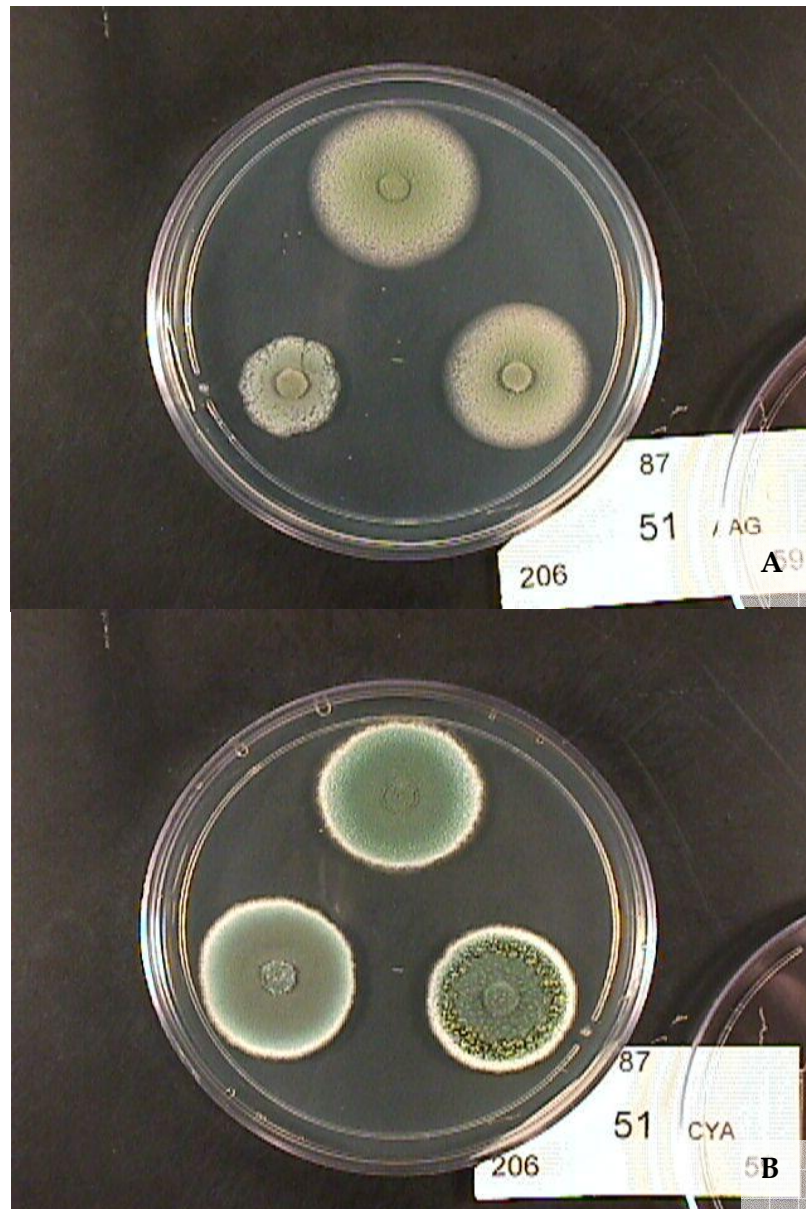


Figura 19: Ensayo de Desarrollo *in vitro*.

Los discos conteniendo conidios se disponían sobre el medio de cultivo GSA (A) o CYA (B). Se realizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Se midió el diámetro de la colonia a los 7 días. 51: N° de caja de Petri del ensayo (de un total de 60); AAG= GSA; 87; 59 y 206= LJC 87 (*P. allii*); LJC 59 (*P. allii*) y LJC 206 (*P. chrysogenum*) respectivamente.

#### *IV.4.2 Patogenicidad in vivo 1: Cámara húmeda*

Se seleccionaron bulbos de calibre comercial 4 o 5 con un IVD (Índice Visual de Dormición, Burba *et al.* 1983) del 75 %. Se tomaron 10 bulbos que se “desgranaron” para obtener el peso de cada bulbillo. Se obtuvieron valores de media, mediana y moda. Se establecieron límites con una variación del 20% en más y en menos del valor central calculado. Se calcularon cuántos bulbillos abarcaba cada categoría. El promedio fue para ambos clones (Fuego INTA y Castaño INTA) el que mayor cantidad de bulbillos utilizables daba.

A estos bulbillos se les extrajo la hoja de protección y se esterilizaron con alcohol al 70 %, 1 min e hipoclorito de sodio comercial al 20 %, 20 min. Se colocaron sobre papel absorbente estéril durante 15 min bajo el aire de una cámara de flujo laminar. La herida se realizó con aguja esterilizada cuyo extremo presenta un reborde con el objeto de estandarizar la profundidad a un milímetro. Se incubó por 12 días en cámara húmeda a 25 °C que es la temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad (Bertolini & Tian 1996).

Se trabajó en un diseño completamente aleatorizado con 10 repeticiones y 60 tratamientos (Figura 20).

Se evaluó diámetro de la colonia y esporulación, ésta última por espectrofotometría (V.2.2).

El análisis estadístico se presenta en el capítulo V.

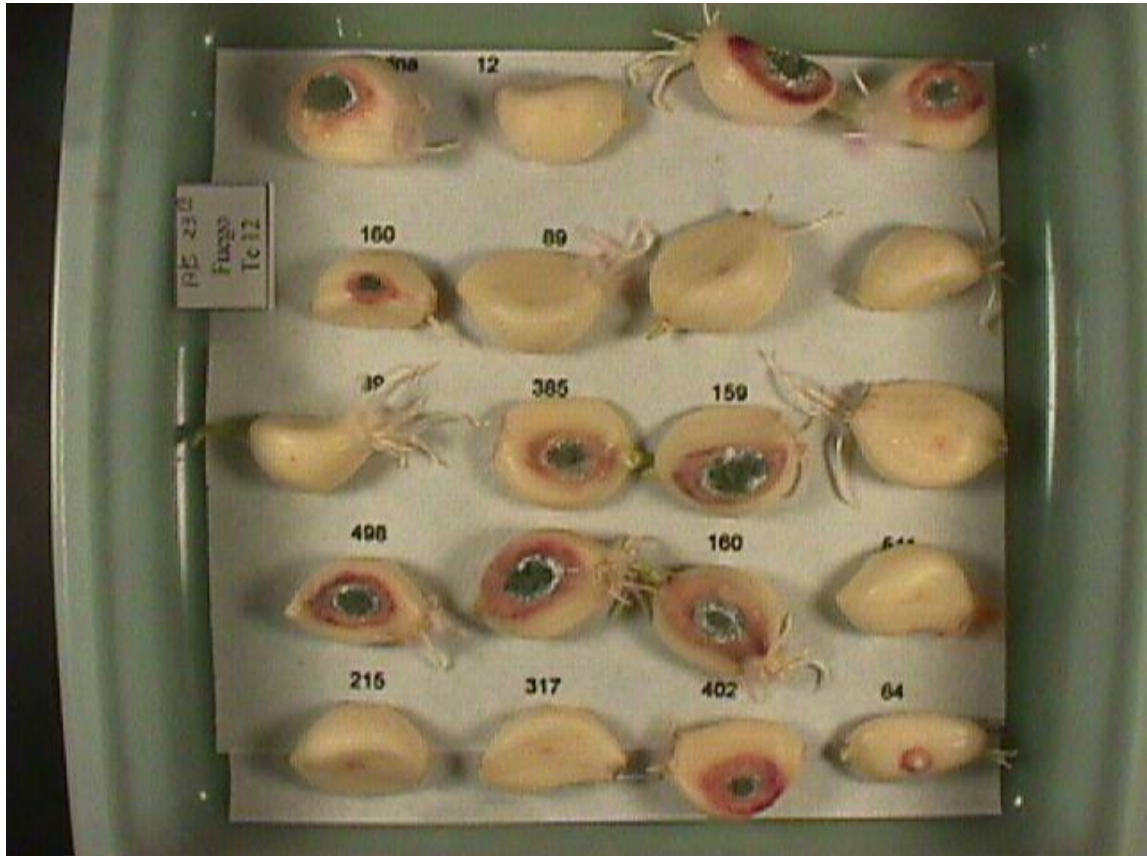


Figura 20: Ensayo de Patogenicidad *in vivo*. Cámara húmeda, correspondiente a la caja N° 12 del clon Fuego INTA.

Los bulbillos esterilizados, heridos e inoculados se dispusieron sobre papel estéril, donde previamente se habían impreso las posiciones de cada bulbillo. Se incubaron 20 bulbillos por cámara húmeda. El diseño utilizado fue completamente aleatorizado, con 10 repeticiones y 60 tratamientos, por cada clon ensayado (Fuego INTA y Castaño INTA). La unidad de análisis fue cada uno de los bulbillos. Se midió el diámetro de la colonia a los 12 días. Los bulbillos se envasaron individualmente en bolsas plásticas rotuladas, las que se almacenaron en freezer. La esporulación se midió por espectrofotometría en los siguientes seis meses.

#### *IV.4.3 Patogenicidad in vivo 2: Ensayo a campo*

El ensayo se realizó en el campo experimental de la EEA La Consulta (INTA) durante 2003, repitiéndose en 2004. El diseño utilizado fue de bloques completamente aleatorizados. Las mangueras de riego fueron el factor que bloqueaba el diseño (4 bloques), mientras los hongos inoculados fueron el tratamiento (60 aislamientos) según cada clon (Fuego INTA y Castaño INTA). La unidad de evaluación fue una parcela conteniendo 5 bulbillos inoculados (Figura 21). El control negativo consistió en inocular con el aislamiento LJC 541 y los controles positivos la inoculación de los aislamientos LJC 542 y LJC 543.

El inóculo se preparó de la manera descripta anteriormente. La herida se practicó con un dispositivo de dos mm de diámetro (mayor que en el caso del ensayo para cámara húmeda). Se hicieron pruebas previas para observar que la herida practicada no afectaba la hoja de brotación (Figura 22)

Se efectuaron recuentos semanales de las plantas emergidas; y en el segundo año, además, se tomó un valor categorizado con respecto a la altura de las plantas en bajas, medias y altas en cada parcela.

Otros datos medidos fueron diámetro de la planta a término; diámetro del bulbo cosechado y peso del bulbo cosechado.



Figura 21: Vista general del ensayo de patogenicidad a campo.

Cada cuchara plástica blanca indica una parcela. Se aprecia la manguera de riego entre las líneas de ajo. Clon Fuego INTA. Fotografía tomada 27 Agosto 2003.

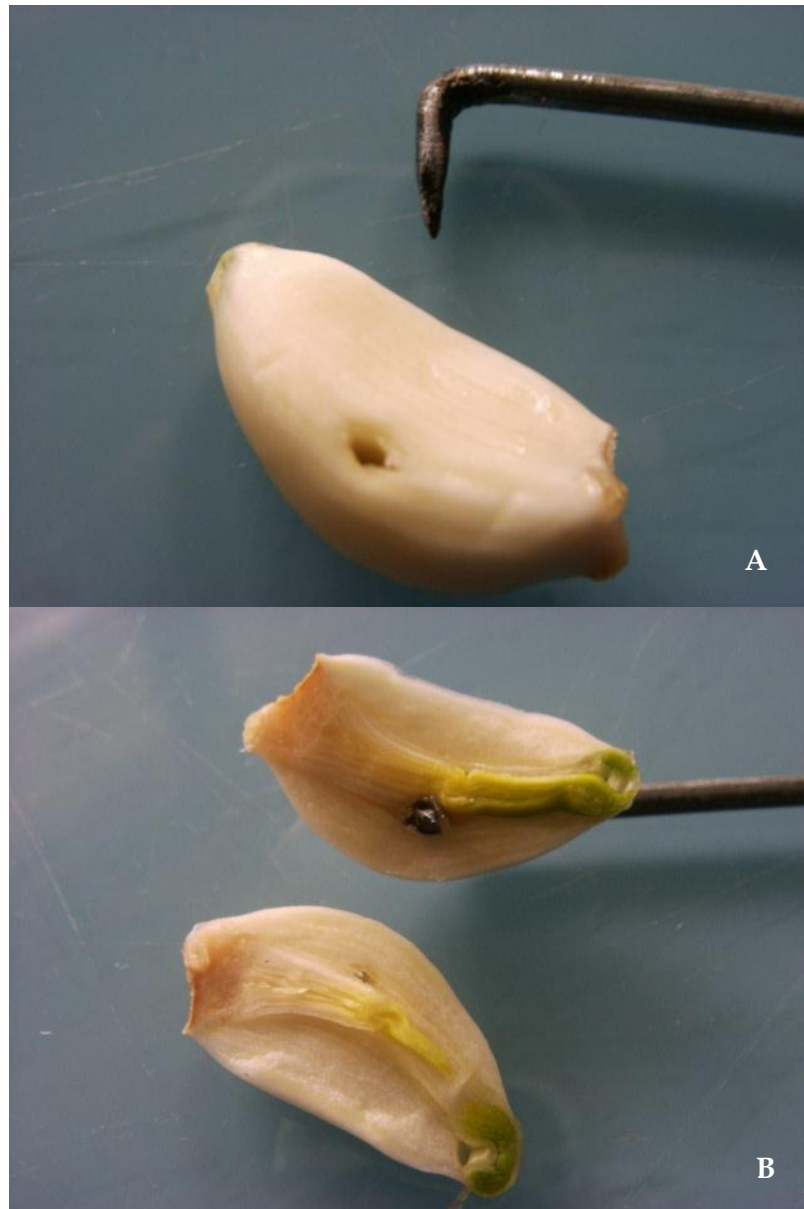


Figura 22: Elemento punzante y herida generada en bulbillos a inocular.

A: herida practicada en los bulbillos que se llevaron a campo. B: se observa que el instrumento punzante no afecta el normal desarrollo del brote.

En el primer año se condujeron 5 bloques, de los que uno se destinó para la observación de síntomas y signos en el campo y para el aislamiento del agente patógeno desde plantas enfermas (Figura 23).

Las plantas se cosecharon, etiquetaron y almacenaron en condiciones en las que era posible la contaminación con conidios de otras fuentes (Figura 24). Esta observación es importante al momento de discutir la dispersión del inóculo.

Datos adicionales de este ensayo, el desarrollo de los postulados de Koch y los análisis estadísticos se presentan en el Capítulo V.



Figura 23: Planta de ajo del clon Fuego INTA inoculada con el aislamiento LJC 517 mostrando el signo de la enfermedad.

Fotografía tomada el 23 de Junio de 2003 en el campo de la EEA La Consulta, INTA.



Figura 24: Vista general del área donde se produjo el “curado” de los bulbos. Éstos se encuentran atados y rotulados sobre las zarandas. Fotografía tomada 19 de Diciembre de 2003.

## V. Identificación, Distribución y Patogenicidad de *Penicillia* aislados de ajo en Mendoza y San Juan

### V.1 Hipótesis de Trabajo

Con respecto a la identificación de las especies

#### Hipótesis nula 1

Existen varias especies de *Penicillium* infectando el cultivo de ajo en la región de Cuyo y son responsables de la enfermedad llamada podredumbre verde.

#### Hipótesis alternativa 1.1

La enfermedad llamada podredumbre verde en el cultivo de ajo es causada por la especie *Penicillium viridicatum* en la región de Cuyo.

#### Hipótesis alternativa 1.2

La enfermedad llamada podredumbre verde en el cultivo de ajo es causada por otra especie de *Penicillium* diferente a *P. viridicatum* en la región de Cuyo.

Con respecto a la distribución en la región:

Hipótesis nula 2

La distribución de las especies patógenicas es homogénea.

Hipótesis alternativa 2

La distribución de las especies patógenicas en ajo se encuentra asociada a variables ambientales.

Con respecto a la patogenicidad de los aislamientos:

Hipótesis nula 3

Los aislamientos de la especie/s patógenica/s presenta/n el mismo nivel de patogenicidad.

Hipótesis alternativa 3

Los aislamientos de la especie/s patógenica/s presenta/n diferentes niveles de patogenicidad.

## V.2 *Penicillium viridicatum* no es el agente causal del moho azul<sup>2</sup>

Llamó la atención la ausencia de *P. viridicatum* en los aislamientos identificados por el CABI (Anexo, XII.3.2). Sin embargo, cuando se consultó el informe presentado por la Dra. Onions (Anexo XII.3.1) y de la correspondencia que mantuvo con la Ing. Gatica (Anexo XII.4.1) se observó que la experta tenía dudas entre la asignación del espécimen a la especie *P. hirsutum* o a la especie *P. viridicatum*. Es particularmente importante la última oración de su misiva: “Unless your isolates are now producing bright maroon drops I would suggest you call them *P. viridicatum* Westling.”. El hecho que el aislamiento enviado por la Ing. Gatica produjera exudado amarillo, fue el determinante para emplazar al aislamiento en la especie *P. viridicatum* (Onions 1981). Sin saberlo, la Dra. Onions probablemente tenía en sus manos un espécimen de la especie *Penicillium allii* Vincent et Pitt, descripta 8 años más tarde.

*P. allii* es un hongo terverticilado (Figura 25) de la *Series Corymbifera* que presenta un exudado amarillo, mientras *P. hirsutum* presenta un exudado marrón. Lamentablemente, la cepa original no se mantuvo y no se pudo identificar por las nuevas técnicas taxonómicas.

Para demostrar que *P. viridicatum* no es patógeno en ajo, se inocularon los aislamientos IBT 16939 e IBT 15053 en bulbillos de ajo esterilizados

---

<sup>2</sup> El presente apartado se publicó en Plant Pathology 55, 583 y se incluye en el Anexo XII.5.2

superficialmente y se incubaron por 12 días. Como control se utilizaron los aislamientos LJC 542 y LJC 543. Estos aislamientos se habían obtenido de plantas con síntomas de infección de *Penicillium*. Bulbillos de ajo fueron también inoculados con estas cepas (5  $\mu$ L de suspensiones ajustadas a  $2,5 \times 10^6$  con.mL<sup>-1</sup>) y llevados a campo. Las cepas de *P. viridicatum* no pudieron esporular. Estos resultados constituyeron el primer informe acerca de la patogenicidad en condiciones de campo de *Penicillium allii* como patógeno en ajo (Valdez *et al.* 2006).

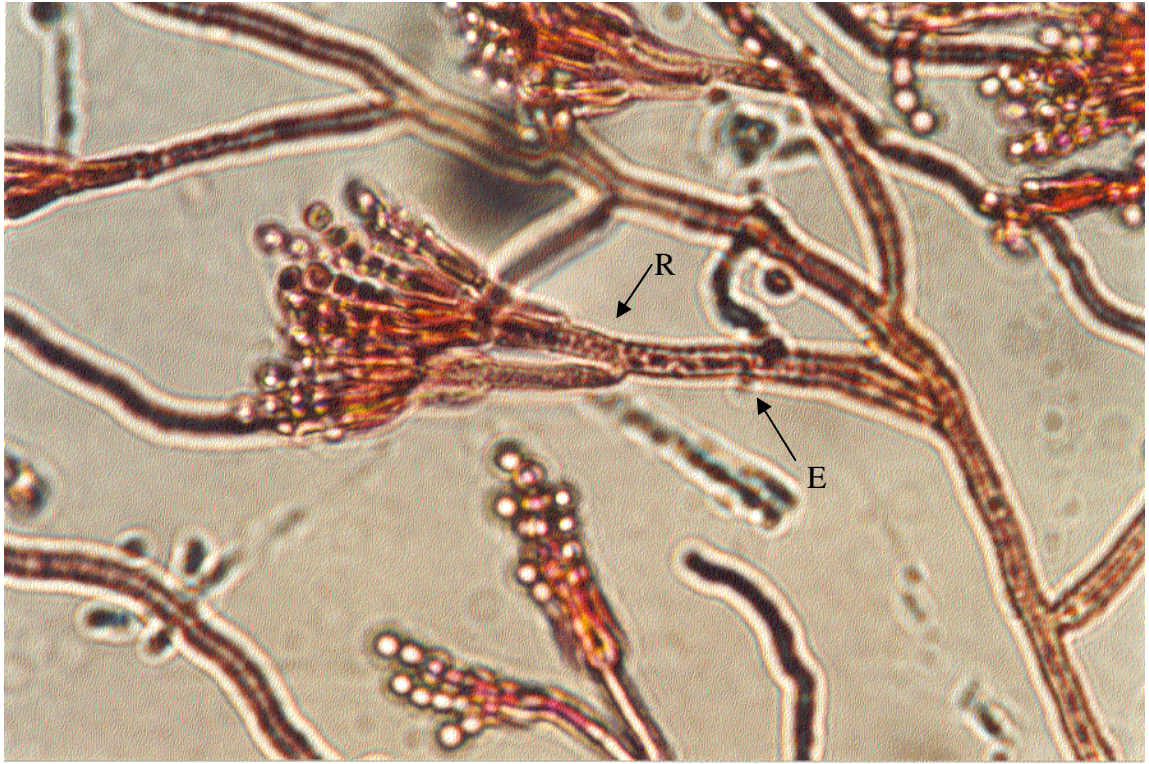


Figura 25: LJC 517, hongo terverticilado, identificado como *Penicillium allii*.

Hongo patógeno de ajo en Mendoza y San Juan. R= Ramus; E= Estipe; ambos rugosos.

### *V.3 Penicillium allii es el agente causal de la enfermedad conocida como podredumbre verde en las provincias argentinas de Mendoza y San Juan<sup>3</sup>*

Como se presentó en el capítulo 1, esta enfermedad es responsable de importantes pérdidas de ajo en Mendoza y San Juan y no existe además un consenso sobre el agente causal de la misma. Entre las especies informadas como agentes causales (Tabla 4), se encuentran varias que podrían estar presentes en la zona afectando otros cultivos: *P. expansum* asociado a vides, peras y manzanas (La Guerche *et al.* 2004) que se ubican en toda el área y tienen una mayor preponderancia en el Valle de Uco en Mendoza; *P. glandicola* asociado a nueces y almendras (Overy *et al.* 2003), cultivos que se ubican en el norte de Mendoza y sur de San Juan; *P. cyclopium* y *P. viridicatum* asociado a cereales (Samson *et al.* 2000) que se cultivan en invierno como cobertura en los oasis productivos de Mendoza; *P. allii* que afecta a ajos y cebollas y *P. hirsutum* que afecta también a otros bulbos (Overy *et al.* 2005a). La distribución de las especies debería estar asociada a los cultivos realizados en cada zona, los que se distribuyen a su vez de acuerdo a su área agroecológica apta.

---

<sup>3</sup> El presente apartado se encuentra en prensa en la revista Plant Pathology (Anexo XII.4.2)

### V.3.1 Materiales y Métodos

El muestreo, aislamiento y modos de realizar las pruebas de patogenicidad se presentaron en el Capítulo IV. Los aislamientos seleccionados para las pruebas de patogenicidad se presentan en la Tabla 14. Los análisis estadísticos para la agrupación taxonómica se presentan con mayor detalle aquí y se indica la metodología utilizada para estudiar la distribución de los aislamientos.

Se realizó análisis de *cluster* con los datos codificados según se presentaron en la Tabla 13. Las variables cuantitativas se estandarizaron por el desvío estándar y luego se transformaron según Escofier (1979):  $(1-stv)/2$  y  $(1+stv)/2$ , donde *stv* es la variable estandarizada. Se obtuvieron así dos datos por cada variable. Se calculó una matriz de similaridad utilizando el coeficiente SM, y el análisis de *clusters* se realizó según la media aritmética (UPGMA) utilizando el software NTSyS v 2.1 (Exeter Software). Se obtuvieron 32 grupos morfológicos (Figura 18) de los cuales se seleccionaron 32 aislamientos para identificación por metabolitos secundarios (marcados con una H en la Figura 18 y presentados en negrita en la Tabla 14). Se utilizó el software Cowtool v.1 (IBT, DTU, Lyngby) para alinear los cromatogramas (Nielsen *et al.* 1998). Se seleccionó la absorvancia a una longitud de onda de 280 nm para construir una matriz de 32 OTUs x 1800 filas. Se obtuvo una matriz de distancia a partir de la distancia Euclidea, y con ésta se realizó el análisis de *clusters* (UPGMA).

El área de estudio se ubicó entre los 65 y los 71 ° de latitud sur y entre los 28 y 38 ° de longitud oeste. Se estableció una celda de 30´ por 30´ para dividir el área en 12 columnas y 20 filas, estableciendo 19 *grids* en los oasis cultivados.

Para estimar el inóculo relativo de *P. allii* por grid ( $R_{P.allii(g)}$ ), la muestra dentro del *grid* (*i*), el número de bulbillos afectados en la muestra *i* (*ba*), el número total de bulbillos incubados por muestra (normalmente 50, *bt*) y el área de la finca de donde se obtuvo la muestra (*A*) se relacionan en la siguiente fórmula:

$$R_{P.allii(g)} = \frac{\sum_{i=1} \frac{ba_i}{bt_i} A_i \times 0.82}{\sum_{i=1} A_i}$$

La constante 0,82 representa la frecuencia de *P. allii* en la muestra (ver más adelante). El número de especies por *grid* (Riqueza) y el inóculo relativo de *P. allii* por grid se representaron utilizando el software DIVA GIS v 4.2 (CIP, Lima). Los distritos agroclimáticos (De Fina *et al.* 1962, 1963) son áreas basadas en la habilidad de crecer de diferentes cultivos índices. Se consideran además las siguientes variables ambientales para su caracterización: altitud, temperatura en enero, temperatura en julio, precipitación en diciembre, enero y febrero (el trimestre más lluvioso), precipitación en junio, julio y agosto (el trimestre más seco), y precipitación total (Tabla 15). Los datos correspondientes a variables ambientales fueron tomados de New *et al.* (2002) y transformados siguiendo a

Escofier (1979) según se indicó antes. La distribución de fenotipos de *Penicillium allii* se estudió por análisis de correspondencia (CA). El análisis de correspondencia produce ejes ortogonales que maximizan la dispersión proyectada tanto de los distritos agroclimáticos (filas) y los fenotipos de *P. allii* como de las variables ambientales (columnas).

Las diferencias entre años de los experimentos a campo se estudiaron por análisis de componentes principales (PCA) y análisis de procrustes (Gower 1975). El PCA se realizó con una matriz de correlación calculada con datos estandarizados de las variables emergencia a 65 y 191 días, diametro del tallo y peso de los bulbos en poscosecha de cada cultivar en cada año (2003 y 2004). La interacción entre año y aislamiento se estudió por análisis de procrustes. Este análisis puede centrar, rotar y escalar una configuración multivariada de tal manera que los puntos pueden corresponder con los puntos de otra configuración. Al no detectarse diferencias entre años (Figura 27) se realizó un nuevo PCA con las variables promediadas de los datos obtenidos a campo, en cámaras húmedas y en ensayos de crecimiento *in vitro*.

Tabla 14: Aislamientos usados en ensayos de patogenicidad (Aislamientos en negrita se utilizaron también en análisis de metabolitos secundarios).

LJC: Laboratorio José Crnko, La Consulta, Argentina; IBT: Biocentrum DTU, Lyngby, Dinamarca; FFR: CSIRO, New South Wales, Australia. Todos los aislamientos se obtuvieron de bulbos de ajo con la excepción de *P. tulipae* (aislado de un bulbo de tulipán con síntomas de ataque de *Penicillium* spp.) y *P. implicatum* (aislado de alimento para aves). Todos los aislamientos obtenidos de ajo se aislaron de bulbos incubados en cámara húmeda con la excepción de las cepas LJC# 542 y 543 que fueron aisladas de plantas de ajo a campo con síntomas de ataque de *Penicillium* spp.

Especie	Fenotipo	Cepa
<i>P. allii</i>	Pal 1	<b>LJC 087 = IBT 26453</b> , LJC 097, LJC 119, LJC 138, LJC 160, <b>LJC 197 = IBT 26456</b> , <b>LJC 201 = IBT 26457</b> , LJC 219, LJC 295 <b>LJC 302 = IBT 26458</b> , LJC 366, LJC 385, LJC 402, LJC 447, <b>LJC 482 = IBT 26464</b> , <b>LJC 498 = IBT 26465</b> , LJC 521, <b>LJC 530 = IBT 26467 = FFR 5534</b> , LJC 533, <b>LJC 543 = IBT 26512</b>
	Pal 2	LJC 029, LJC 079, LJC 137, LJC 157, <b>LJC 159 = IBT 26454</b> , LJC 165, <b>LJC 178 = IBT 26455</b> , LJC 228, LJC 252, LJC 280, <b>LJC 313 = IBT</b> <b>26459</b> , <b>LJC 346 = IBT 26461</b> , LJC 360, <b>LJC 368 = IBT 26462</b> , LJC 419, LJC 452, <b>LJC 517 = IBT 26466 = FFR 5533</b> , <b>LJC 542 = IBT 26511</b>
	Pal 3	<b>LJC 059 = IBT 26452</b> , <b>LJC 319 = IBT 26460</b>
	Pal 4	<b>LJC 466 = IBT 26463</b>
<i>P. aurantiogriseum</i>	Pau 1	<b>LJC 064 = IBT 26509</b>
<i>P. brevicompactum</i>	Pb 1	LJC 089
	Pb 2	<b>LJC 188 = IBT 26501</b> , LJC 339, <b>LJC 494 = IBT 26502</b>
<i>P. chrysogenum</i>	Pch 1	<b>LJC 005 = IBT 26517</b> , <b>LJC 044 = IBT 26506</b> , <b>LJC 128 = IBT 26518</b> <b>LJC 206 = IBT 26507</b> , <b>LJC 317 = IBT 26516</b> , <b>LJC 394 = IBT 26515</b> <b>LJC 481 = IBT 26514</b> , <b>LJC 215 = IBT 26505</b> , <b>LJC 384 = IBT 26504</b>
<i>P. flavigenum</i>	Pfl 1	<b>LJC 321 = IBT 26508</b>
<i>P. implicatum</i>	Pimp	LJC 541
<i>P. phoeniceum</i>	Pph 1	<b>LJC 537 = IBT 26513</b>
<i>P. tulipae</i>	Ptu 1	<b>LJC 560 = IBT 26510</b>

Tabla 15: Distribución de especies de *Penicillium* aisladas de bulbos de ajo en 17 distritos agroclimáticos.

Pal = *P. allii*; F1-2-3-4 = Fenotipo 1, 2, 3 y 4 de *P. allii*; Pch = *P. chrysogenum*; Pbr = *P. brevicompactum*; Pph = *P. phoeniceum*; Pfl = *P. flavigenum*; Pau = *P. aurantiogriseum*. T. Ene; T. Jul = Temperatura en Enero y Julio respectivamente; Tot Pr = Precipitación Total; Pr DEF = Precipitación en Diciembre, Enero y Febrero (trimestre más lluvioso); Pr JJA = Precipitación en Junio, Julio y Agosto (trimestre más seco).

Distrito Agroclimático	Pal	F1-2-3-4	Pch	Pbr	Pph	Pfl	Pau	Altitud (m)	T_Ene (° C)	T_Jul (° C)	Tot Pr (mm)	Pr DEF (mm)	Pr JJA (mm)
[52A] Guanacache	126	75-44-6-1	48	7	1	2	0	610	24.4	7.8	57	28	5
[117] La Consulta	51	28-21-2-0	0	2	2	0	0	1006	19.1	4.6	128	29	39
[80] Represa Las Vizcacheras	49	32-16-1-0	10	1	0	0	0	1067	21.6	6.2	105	40	16
[109] Cacheuta	45	27-15-3-0	2	3	0	0	0	1981	16.15	2.6	120	22	41
[75A] Alg. del Aguila	37	20-15-2-0	0	0	0	0	0	457	23.75	6.65	91	33	7
[53] Pocito	35	17-16-2-0	12	0	0	1	1	762	23.25	7.05	48	23	5
[26B] Villa Colón	19	8-7-4-0	0	0	0	0	0	610	25.45	8.05	47	26	2
[144] Bol. La Antena	14	5-9-0-0	0	0	1	0	0	1067	21.6	6.2	105	40	16
[143A] Boliche Delgado	11	9-2-0-0	0	0	0	0	0	1981	15.8	2.1	151	18	73
[106] Angualasto	11	6-5-0-0	0	1	0	0	0	1981	16.5	4.6	47	16	13
[24] Las Casuarinas	11	6-5-0-0	2	0	0	0	0	579	25.8	8.15	47	26	2
[177C] Pto. San Alberto	7	6-1-0-0	0	0	1	0	0	2438	11.65	-0.65	99	17	34
[79] Tamberías	7	5-2-0-0	0	0	0	0	0	1524	13.85	1.8	67	14	22
[50] Alto Pencoso	7	0-7-0-0	0	1	0	0	0	427	25.4	9.05	138	65	9
[114] Barreal	6	3-3-0-0	0	0	0	0	0	2134	13.7	1.5	75	14	25
[23] Chepes	2	1-1-0-0	0	0	0	0	0	914	25.55	9.3	86	52	2
[143B] Los Alamitos	2	0-2-0-0	0	0	0	0	0	1219	18.3	3.95	138	30	47
Total		440	74	15	5	3	1						
Porcentaje		81.8	13.7	2.8	0.9	0.6	0.2						

Se calculó una matriz de distancia euclídea con las coordenadas cartesianas de los dos primeros *eigen* vectores y con esa matriz, se realizó un análisis de *clusters* (UPGMA). Las variables según cada grupo obtenido se compararon con análisis de la varianza (AVAVA) usando el software StatSoft (Tulsa, OK) y la homogeneidad entre estos grupos se analizó con test de Tukey ( $\alpha= 0,05$ , gl 56).

Para confirmar los postulados de Koch, se hicieron comparaciones morfológicas entre el inóculo original, aislamientos obtenidos de bulbillos inoculados e incubados en cámaras húmedas, aislamientos obtenidos de plantas con síntomas a campo y aislamientos obtenidos luego de incubar bulbos cosechados (sólo los del año 2003). Se realizaron cultivos monospóricos de los individuos aislados que luego se compararon en CYA.

### V.3.2 Resultados y Discusión

La especie aislada más frecuentemente fue *P. allii* (81,8 %; 440 aislamientos, Tabla 15). Se identificaron también las especies *P. chrysogenum* (13,7%, 74 aislamientos); *P. brevicompactum* (2,8%, 15 aislamientos); *P. phoeniceum* (0,9%, 5 aislamientos); *P. flavigenum* (0,6%, 3 aislamientos) y *P. aurantiogriseum* (0,2%, 1 aislamiento). Se observaron además cuatro fenotipos de la especie *P. allii* y dos de las especies *P. chrysogenum* y *P. brevicompactum*. El resto de las especies presentaron sólo un fenotipo. Las especies *P. flavigenum* y *P. chrysogenum* están relacionadas con suelos de desiertos y hábitats secos respectivamente (Frisvad &

Samson 2004). *P. phoeniceum* (Teleomorfo= *Eupenicillium cinnamopurpureum*) se ha aislado en todo el mundo de arroz, porotos y comida deshidratada (Pitt & Hocking 1997) mientras *P. brevicompactum* tiene distribución mundial, especialmente por su naturaleza xerofílica en comidas secas (Pitt & Hocking 1997). *P. aurantiogriseum* se asocia normalmente a cereales (Pitt & Hocking 1997). Todas estas especies tienen sentido de encontrarse en el área de estudio, por corresponder ésta a un área desértica (provincia fitogeográfica del monte) y por la metodología de obtención de *Penicillium* spp. , que fue incubando los bulbos cosechados.

El fenotipo 1 de *P. allii* totalizó 239 aislamientos y se caracteriza por tener una apariencia granular con centro umbonado. Produce gotas pequeñas de exudados amarillos y un pigmento amarillo que difunde en el medio de cultivo (Figura 26 a y b). El fenotipo 2 (179 aislamientos) difiere por presentar una apariencia aterciopelada en la periferia y flocosa al centro antes que granular, presenta surcos radiales y no presenta exudados (Figura 26 c y d). El fenotipo 3 (21 aislamientos) presenta hacia la periferia un anillo de exudado amarillo de tamaño mediano (Figura 26 e y f). Este fenotipo es similar al que presenta *P. viridicatum* en CYA (Figura 27) y se encontró presente en la zona más densamente cultivada con ajo, coincidente con el área que fue muestreada por Gatica y Oriolani en su trabajo (1984). El fenotipo 4 está representado por sólo

un aislamiento. Presenta un reverso marrón naranja y exudado amarillo (Figura 26 g y h). En el medio GSA este fenotipo presenta un reverso amarillo debido a la producción del antibiótico TAN-1612 (Capítulo VI).

La comparación del perfil de metabolitos secundarios produjo 6 clusters a una similitud del 45% (Figura 28), cada uno coincidente con las seis especies obtenidas. No se observó correlación entre los fenotipos 1-4 de *P. allii* y los subclusters obtenidos del análisis de metabolitos secundarios ( $R^2 = 0.31$ ).

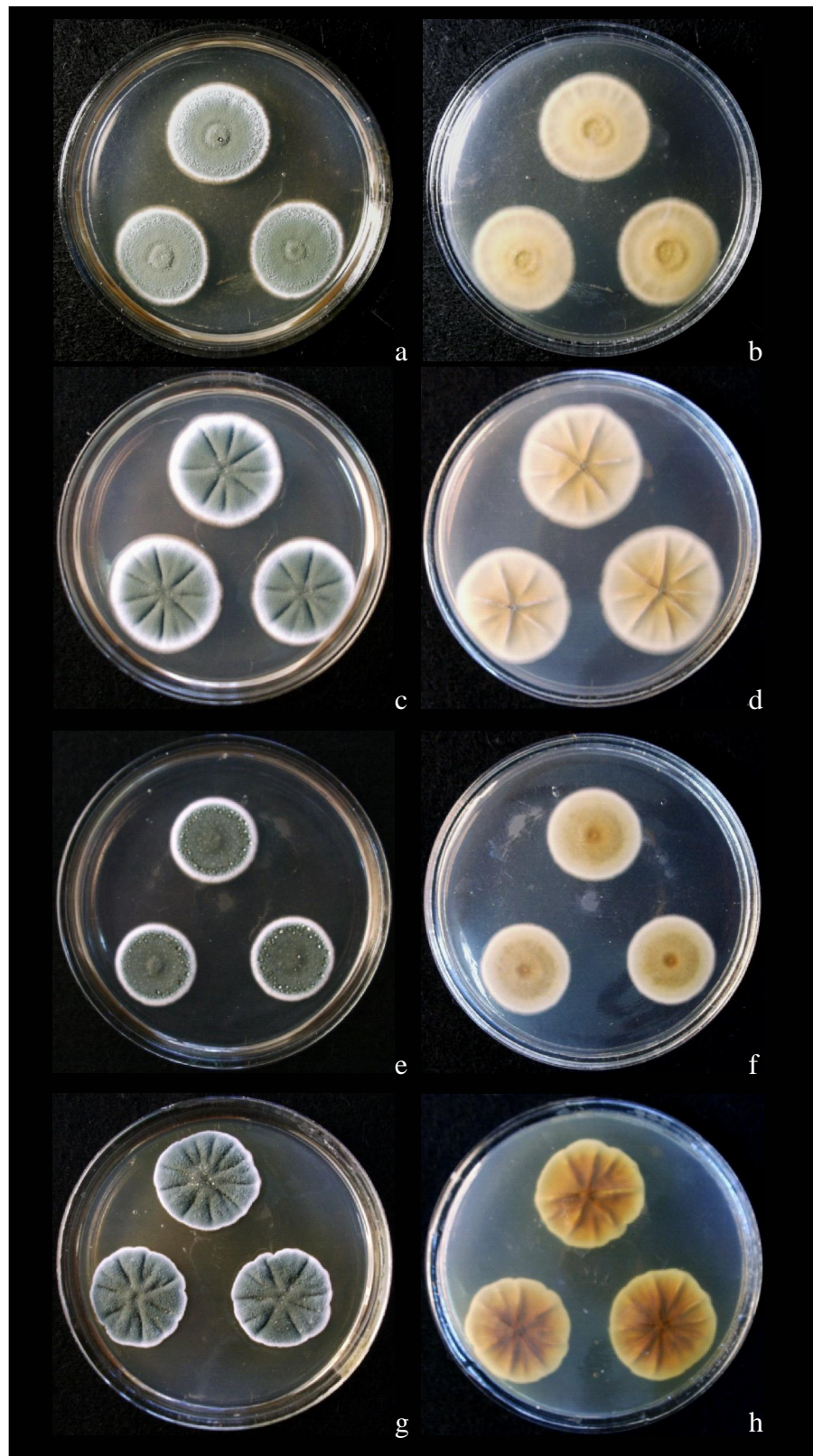


Figura 26: Fenotipos de *P. allii* afectando ajo en Mendoza y San Juan observados en CYA, 7d 25°C (frente y reverso).

Fenotipo 1 (a, b, LJC 530); 2 (c, d, LJC 517), 3 (e, f, LJC 319) y 4 (g, h, LJC 466)

El área localizada en el oasis norte de Mendoza fue la que mayor riqueza presentó (Figura 29a). La representación del inóculo relativo de *P. allii* por *grid* mostró que en Mendoza había menos inóculo que en San Juan (Figura 29b). El análisis de correspondencia utilizado para establecer relaciones entre los fenotipos de *P. allii* y los distritos agroclimáticos no presentó correlación ( $P=0.0057$ ), por lo que se estima que otros factores antes que los ambientales podrían estar involucrados en la dispersión del patógeno. Analizando el origen de los bulbillos utilizados como semilla, se observó que el 27% fueron adquiridos en áreas diferentes de las que se sembraron. Por ello se estima que la influencia antrópica es importante.

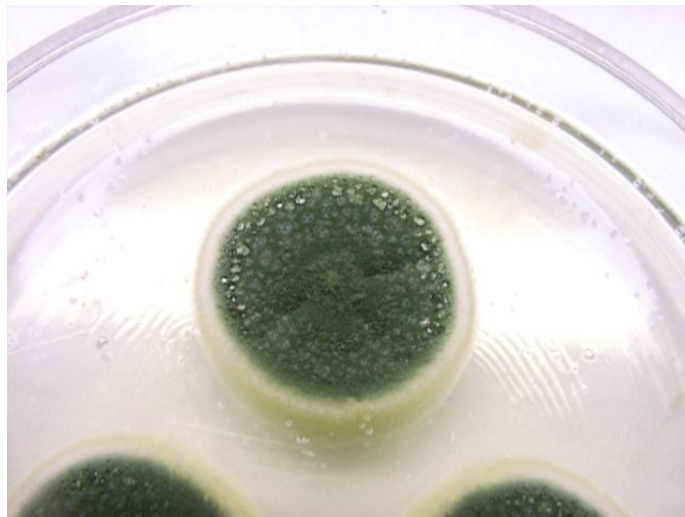


Figura 27: *P. viridicatum* IBT 15039. Fenotipo observado en CYA, 21 °C 7d. Detalle de exudado amarillo en anillo periférico.

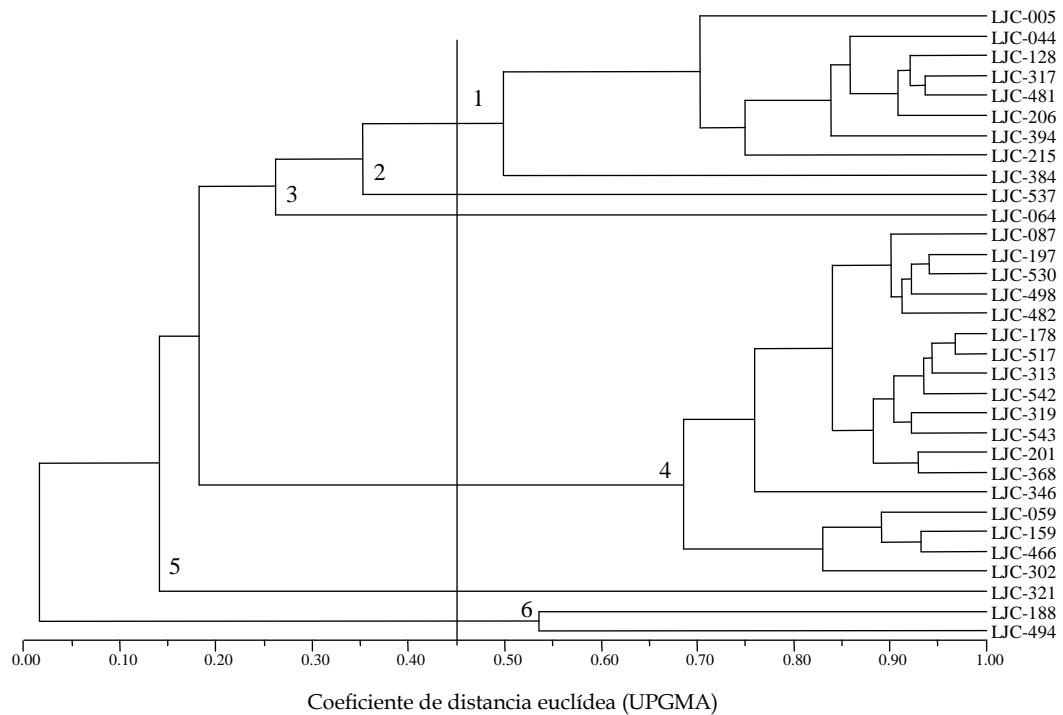


Figura 28: Agrupamiento de 32 aislamientos de *Penicillium* spp. obtenidos de bulbos de ajo según su perfil de metabolitos secundarios

La absorbancia registrada a una longitud de onda de 280 nm se alineó y usó para estimar una matriz de distancia euclídea a partir de la cual se realizó el análisis de *clusters* (UPGMA). Se trazó una línea a una similitud del 45% que separa seis grupos correspondientes con las seis diferentes especies de *Penicillium* aisladas: 1 = *P. chrysogenum*; 2 = *P. phoeniceum*; 3 = *P. aurantiogriseum*; 4 = *P. allii*; 5 = *P. flavigenum* y 6 = *P. brevicompactum*.

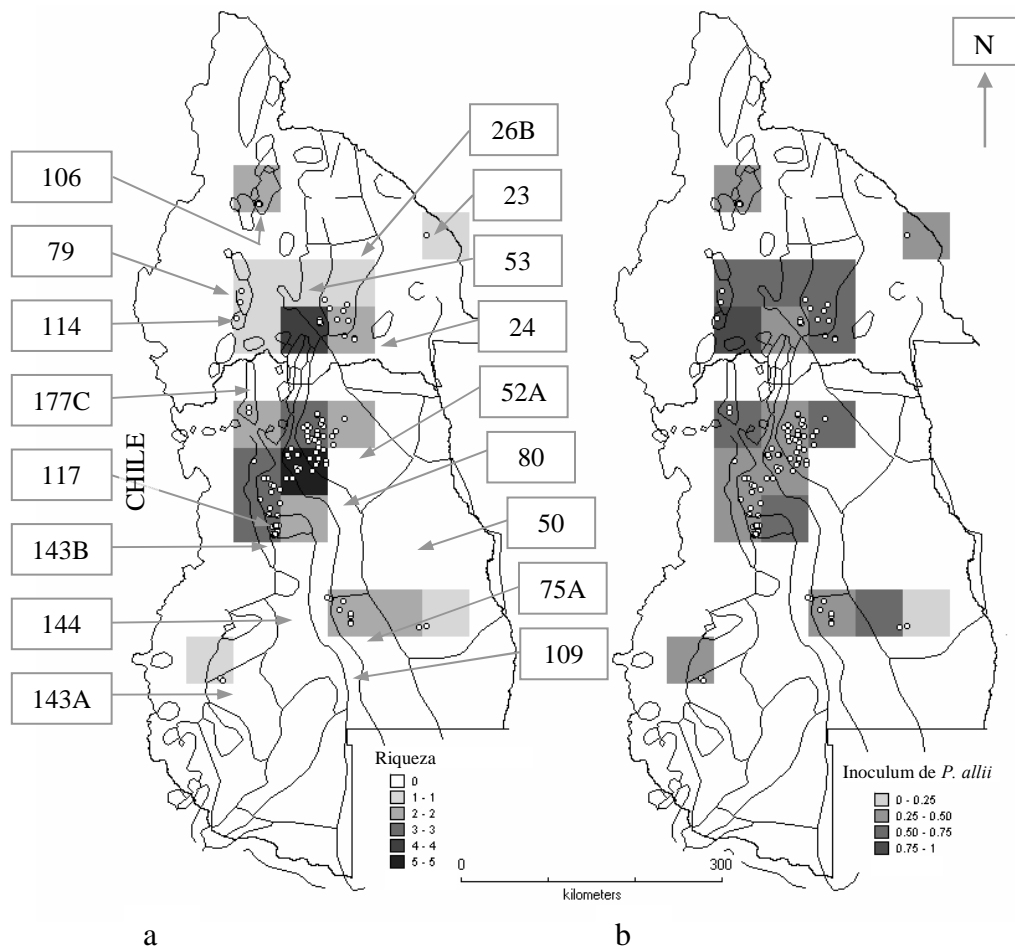


Figura 29: (a) Riqueza de especies de *Penicillium*, (b) Inóculo relativo de *P. allii* por *grid* en San Juan y Mendoza.

Los puntos blancos indican las fincas donde se detectó *P. allii*. Los distritos agroclimáticos de cada provincia se presentan como (106) Angualasto, (79) Tamberías, (114) Barreal, (177C) Puesto San Alberto, (117) La Consulta, (143B) Los Alamos, (144) Boliche La Antena, (143A) Boliche Delgado, (26B) Villa Colón, (23) Chepes, (53) Pocito, (24) Las Casuarinas, (52A) Guanacache, (80) Represa Las Vizcacheras, (50) Alto Pencoso, (75A) Algarrobo del Aguila, (109) Cacheuta.

En las pruebas de cámaras húmedas, las especies *P. aurantiogriseum* (2.50 mm diámetro en bulbillos inoculados) y *P. chrysogenum* (0.40 mm diámetro) pudieron esporular en los bulbillos de Fuego INTA, pero no en los de Castaño INTA. El diámetro alcanzado por las colonias sobre los bulbillos, sin embargo, no se compara con el diámetro alcanzado por *P. allii* (7,80 mm en Fuego INTA y 4.00 en Castaño INTA). Esta situación puso en evidencia dos aspectos. El primero es que el cv. Fuego INTA es más sensible a la enfermedad que el cv. Castaño INTA, reafirmando lo observado por Cavagnaro *et al.* (2005). El segundo es no se puede limitar a una prueba de infección sobre bulbillos en cámaras húmedas para asignarle la categoría de patogénica a una especie o un aislamiento. Es necesario observar en condiciones de campo el comportamiento de los diferentes aislamientos para que se les asigne a éstos su actividad patogénica. *P. brevicompactum* pudo esporular en ambos cultivares, con un diámetro promedio de 0,15 y 0,25 mm en Fuego INTA y en Castaño INTA respectivamente. Un tejido de consistencia corchosa rodeó la lesión producida por estas especies no patogénicas. La lesión producida por los aislamientos de *P. allii* eran blandas, indicando que se produce una digestión de las células del ajo a medida que avanza el micelio del hongo a través de los tejidos de los bulbillos.

La configuración consenso derivada del análisis de procrustes demostró un efecto debido al año de muestreo (Figura 30) que no afectó el análisis global realizado.

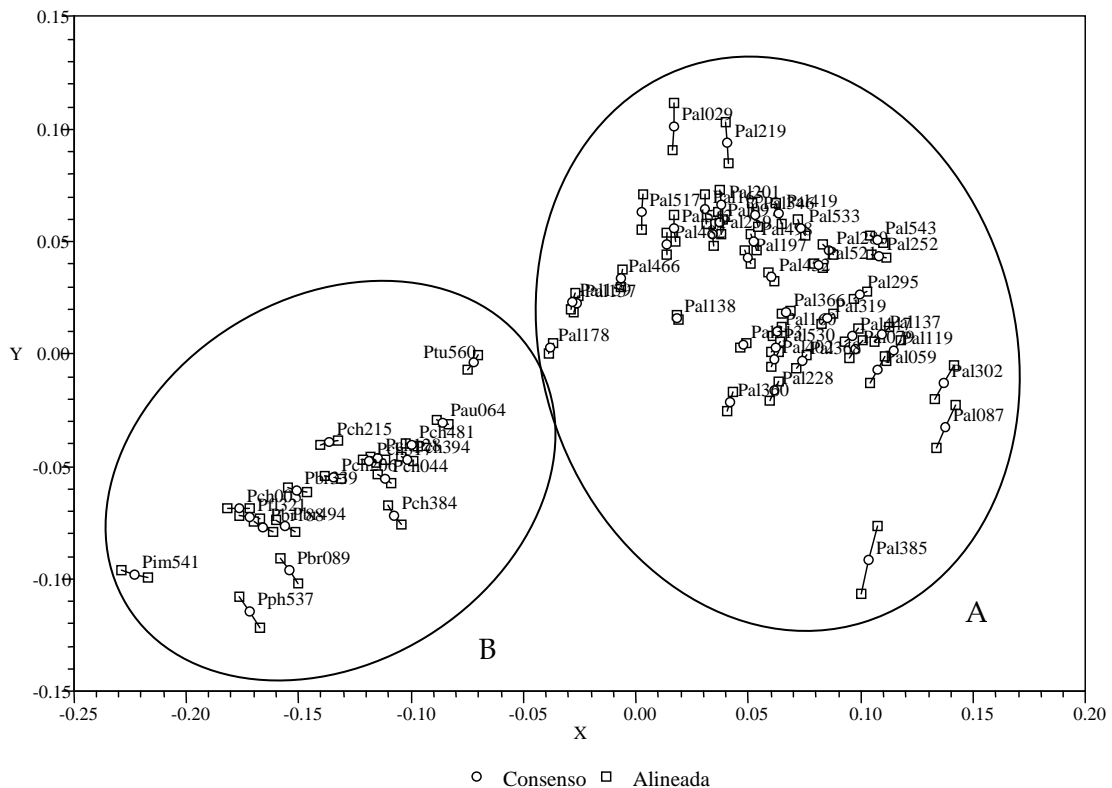


Figura 30: Análisis de procrustes mostrando la interacción entre años de muestreo y aislamientos.

Los aislamientos corresponden a los puntos consenso (círculos) y los años a los puntos alineados (cuadrados). Se observó interacción en cuatro aislamientos de *P. allii*: LJC 019; LJC 087; LJC 219 y LJC 385. Los grupos se pueden definir como patogénicos (A), incluyendo todos los aislamientos de *P. allii* y no patogénicos (B) incluyendo el resto de las especies analizadas.

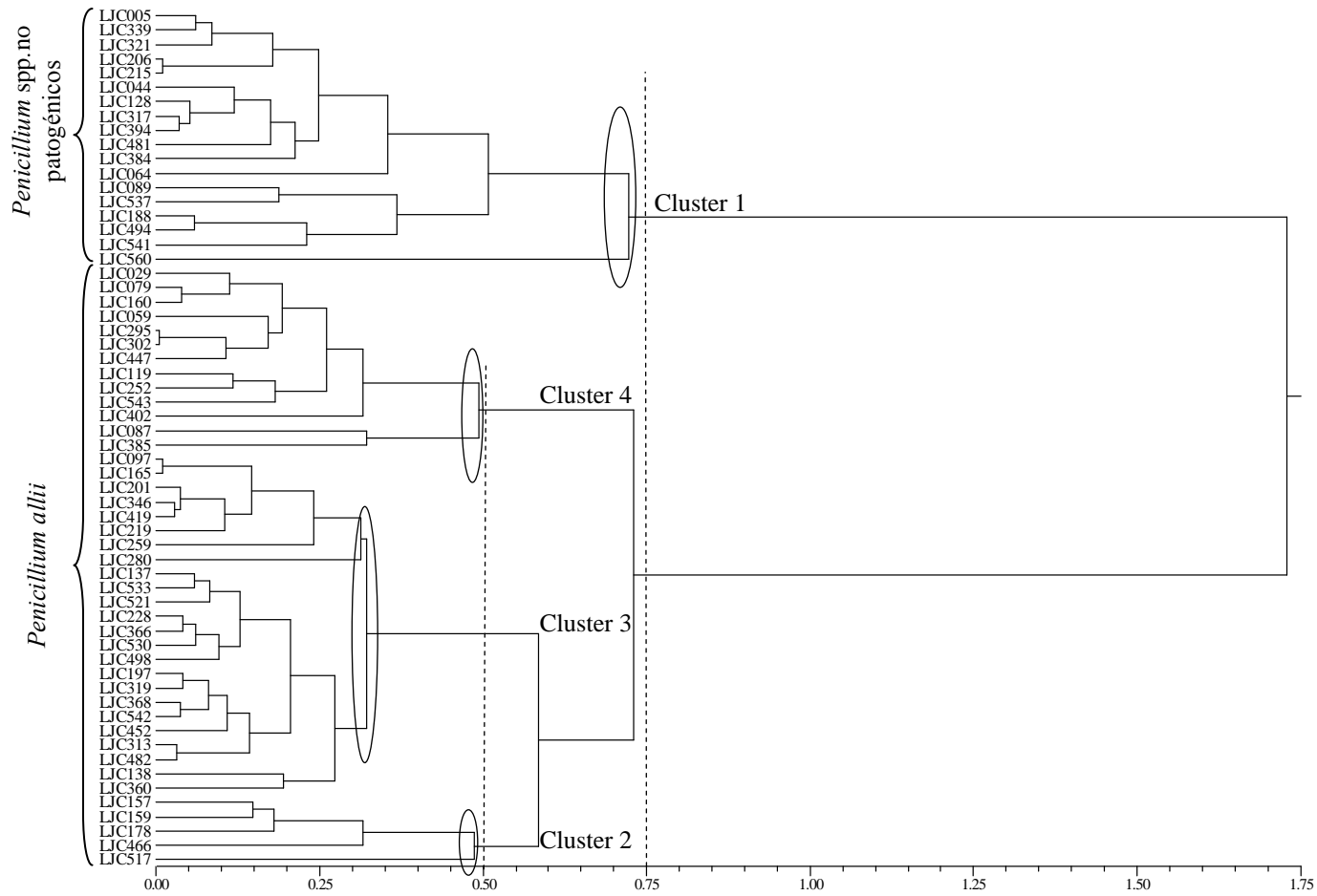


Figura 31: Análisis de *cluster* realizado sobre los dos primeros componentes principales de análisis de patogenicidad. La línea punteada a una distancia de 0,75 define el cluster 1 (especies no patógenas) y la línea punteada a 0,75 define tres razas patógenas: Cluster 2, raza poco agresiva; Cluster 3, raza de mediana agresividad y Cluster 4, raza de alta agresividad.

Del análisis de componentes principales realizado en el total de datos, los dos primeros *eigen* vectores acumularon una variabilidad total del 76,06% con un notable predominio del primero sobre el segundo (68,87 % PC1 y 7,18 % PC2 respectivamente). Se constituyeron cuatro grupos con el análisis de *clusters* realizado sobre los dos primeros ejes, uno no patógeno y tres que agrupan los aislamientos de *P. allii* (Figura 31). El *cluster* no patogénico se separó de *P. allii* a una distancia de 0,75. Una segunda línea trazada a una distancia de 0,50 delimita los restantes tres grupos de *P. allii*.

El análisis de la varianza realizado sobre las diferentes variables registradas en cada aislamiento y ahora agrupadas por *clusters*, mostró diferencias significativas en aquellas que más explican la agresividad de un agente patógeno: el número de plantas muertas y el peso final de los bulbos obtenidos (Tabla 16)

Tabla 16: Análisis de la varianza de variables de patogenicidad agrupadas por raza.

Cluster 1: Especies no patógenas. Cluster 2, 3 y 4: Razas de baja, media y alta agresividad de *P. allii*.

	Variables	Cluster			
		1	2	3	4
<i>In vitro</i>	GSA (mm)	17.22a <sup>1</sup>	24.28b	29.1 b	28.82b
	CYA (mm)	27.93a	31.13ab	33.92 b	31.9ab
	GSA/CYA	0.62a	0.78ab	0.86 b	0.9b
Cámara húmeda	FSb (con. x 10 <sup>6</sup> )	11.1 a	225.2b	275.6 b	273.0b
	FDb (mm)	0.45a	7.14b	7.95 b	7.75b
	CSb (con. x 10 <sup>6</sup> )	1.0a	80.7b	98.8 bc	124.9c
	CDb (mm)	0.13a	3.4b	3.97 bc	4.35c
Campo	FE65 (pl)	4.97a	4.95a	4.97 a	4.69b
	FE191 (pl)	4.93a	3.98b	3.19 c	1.67d
	CE65 (pl)	4.85a	4.58ab	4.48 b	4.12c
	CE191 (pl)	4.88a	4.43a	3.69 b	2.63c
	FDf (mm)	13.42a	11.25b	9.46 c	8.3d
	FWf (g)	28.53a	20.58b	15.75 c	12.5d
	CDf (mm)	14.66a	12.72b	11.29 c	9.32d
	CWf (g)	33.13a	27.68b	21.72 c	14.3d
	FHf (cm)	28.47a	16b	12.29 c	10.77c
CHf (cm)	19.58a	14.5b	11.35 c	10.58c	

<sup>1</sup> Letras diferentes en filas (*ie.* a, b, b, b en cluster 1, 2, 3 y 4 en la primer fila) indican diferencias significativas (Tukey test;  $\alpha = 0,05$ .  $df = 56$ ). con = conidios; pl = plantas sobrevivientes de una parcela de 5 plantas. F=Fuego INTA; C= Castaño INTA. Sb: Esporulación en cámara húmeda; Db= Diámetro de área esporulante en cámara húmeda; E65, E191: Emergencia a 65 y 191 d respectivamente; Df: Diámetro en cuello medido a campo; Wf: Peso de bulbos cosechados; Hf: Altura de plantas a campo.

Estas diferencias en agresividad registradas en cada *cluster* permite asignar la categoría de razas que no interactúan diferencialmente con variedades del huésped (Van der Plank 1968).

Cuando el PCA se representa en un gráfico biplot, los aislamientos se separan en cuatro grupos (Figura 32). El primer grupo consiste en los

aislamientos no patogénicos previamente designados en el análisis de procrustes y distinguidos luego en el análisis de *cluster*. En el primer componente principal las variables emergencia a 191 d en Fuego INTA y Castaño INTA (FE191, CE191), diámetro del pseudotallo (FDf, CDf), peso del bulbo (FWf, CWf) y altura de planta (FHf, CHf) presentaron una correlación negativa mientras las variables diámetro y esporulación del área esporulante (en cámara húmeda: (FSb, FDb, CSb, CDb) y diámetro de la colonia en GSA presentaron una correlación positiva. De este análisis, se establece un gradiente de patogenicidad que se dirige de izquierda a derecha a lo largo del primer componente principal. Todas las especies no patogénicas se pueden separar del patógeno *P. allii* por el diámetro alcanzado en el medio GSA (Tabla 16); sin embargo, las razas intraespecíficas de agresividad de *P. allii* no se pueden distinguir con ese dato. Los aislamientos que exhiben una mayor conidiación en cámaras húmedas, con menos plantas sobrevivientes, bulbos cosechados más pequeños y plantas de menor altura se ubican en la derecha (raza más agresiva), mientras que los aislamientos asociados con plantas más sanas, bulbos más grandes y menor mortandad se ubican en la izquierda. La variación observada en CYA no está relacionada con la patogenicidad. El número de plantas emergidas de Fuego INTA a los 65d no está correlacionado con la sobrevivencia a los 191 d ( $R^2= 0.37$ ).

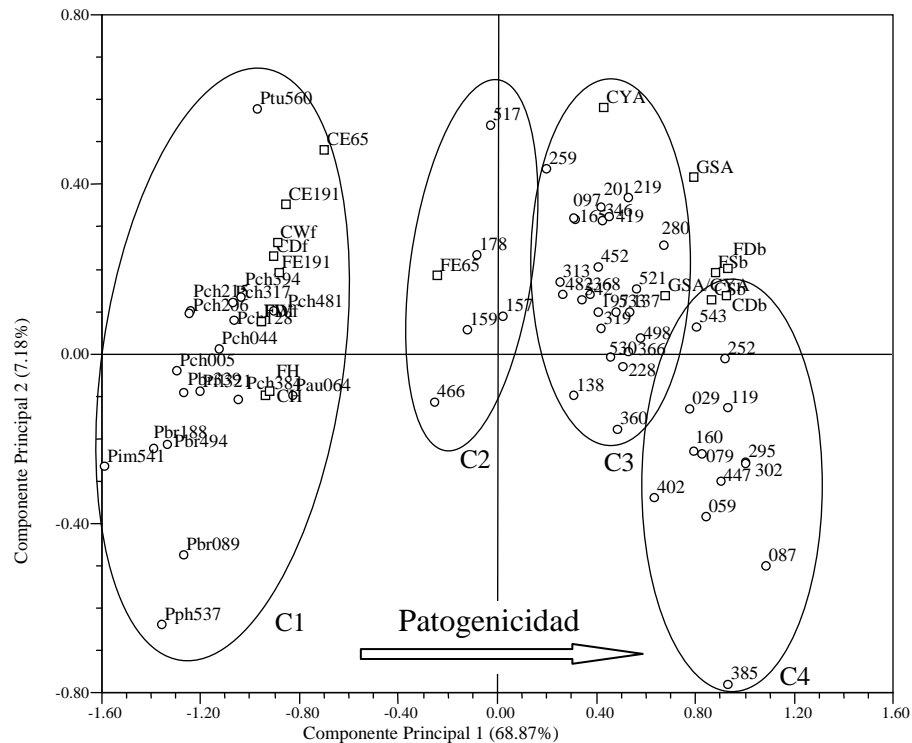


Figura 32: Análisis de Componentes Principales de variables de patogenicidad.

C1: Aislamientos no patogénicos; C2, C3 y C4: Razas agresivas de baja, media, y alta agresividad. F=Fuego INTA; C= Castaño INTA. Sb: Esporulación en cámara húmeda; Db= Diámetro de área esporulante en cámara húmeda; E65, E191: Emergencia a 65 y 191 d respectivamente; Df: Diámetro en cuello medido a campo; Wf: Peso de bulbos cosechados; Hf: Altura de plantas a campo.

*P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. phoeniceum* y *P. tulipae* pudieron esporular en bulbillos de ajo heridos en el ensayo de cámara húmeda, pero no mostraron los síntomas de la enfermedad a campo y no pudieron ser re-aislados en poscosecha. *P. chrysogenum* es una especie que había sido previamente reportada como patogénica en ajo (Ge *et al.* 2001) pero que se identificó como no patógena en este trabajo. Pese a que se presentan rasgos comunes importantes

entre *P. chrysogenum* y *P. allii* que pueden llevar a una potencial mala identificación, estas especies se clasificaron en grupos diferentes según su perfil de metabolitos secundarios (Figura 28).

El cv. Fuego INTA fue más susceptible a la enfermedad para todas las razas comparado con el cv. Castaño INTA. La curva de progresión de la enfermedad de Castaño INTA tiende a estabilizarse alrededor de los 120 d, con un promedio de 2,7 plantas sobrevivientes en la raza 4, mientras ésta continúa por más tiempo en el cv. Fuego INTA, donde se estabiliza alrededor de los 150 d, presentando un promedio de plantas sobrevivientes de 1,9 para la raza 4 (Figura 33).

Todos los aislamientos de *P. allii* se recuperaron de plantas sintomáticas a campo, de los bulbillos infectados en cámaras húmedas, de los bulbos cosechados que sobrevivieron a campo y que se incubaron en cámaras húmedas en poscosecha, con la excepción de los aislamientos LJC 178 y LJC 517 de bulbos del cv Castaño INTA. Estos dos últimos aislamientos pertenecen a la raza menos agresiva de las observadas en *P. allii*.

En todos los casos, los aislamientos recuperados mostraron el mismo fenotipo que el original cuando se incubaron en CYA en condiciones estándares. (Figura 34)

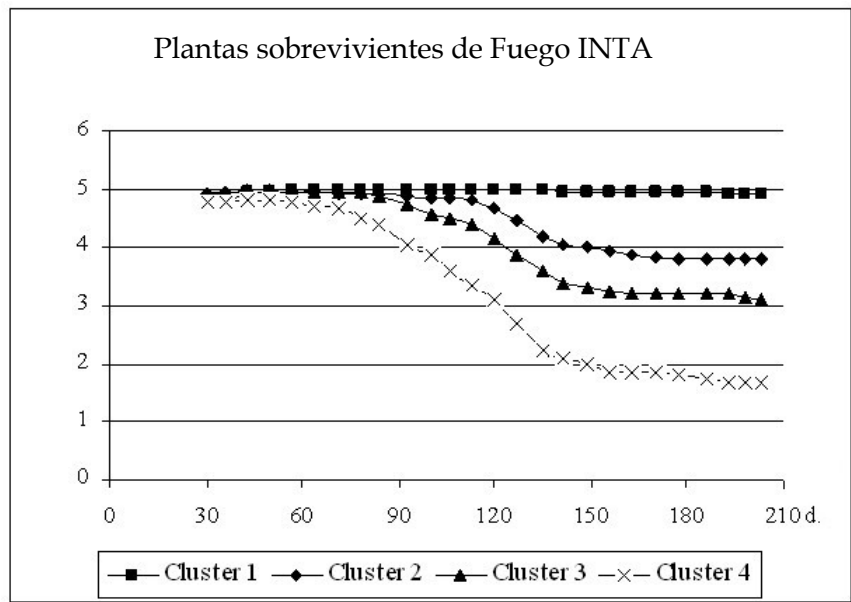
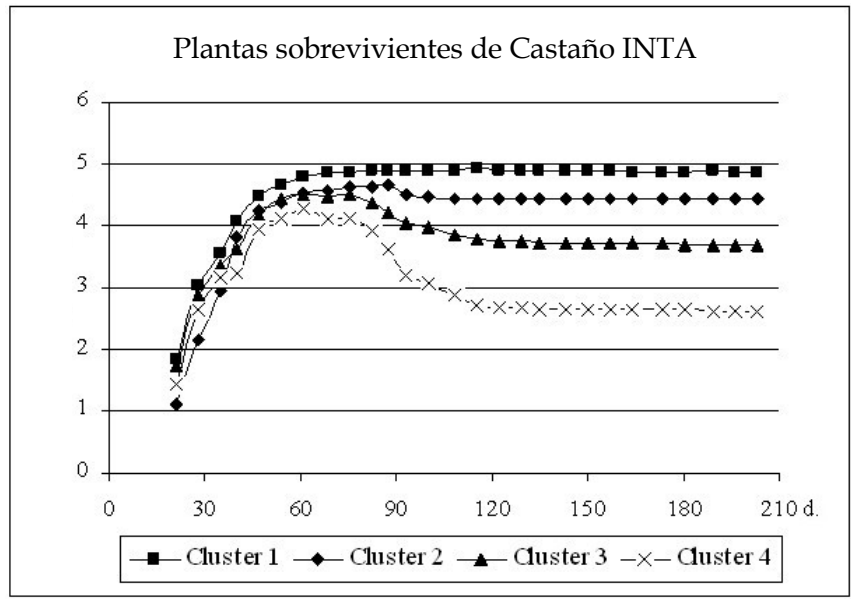


Figura 33: Emergencia y sobrevivencia de plantas de acuerdo a cada raza en los cvs. Fuego INTA y Castaño INTA

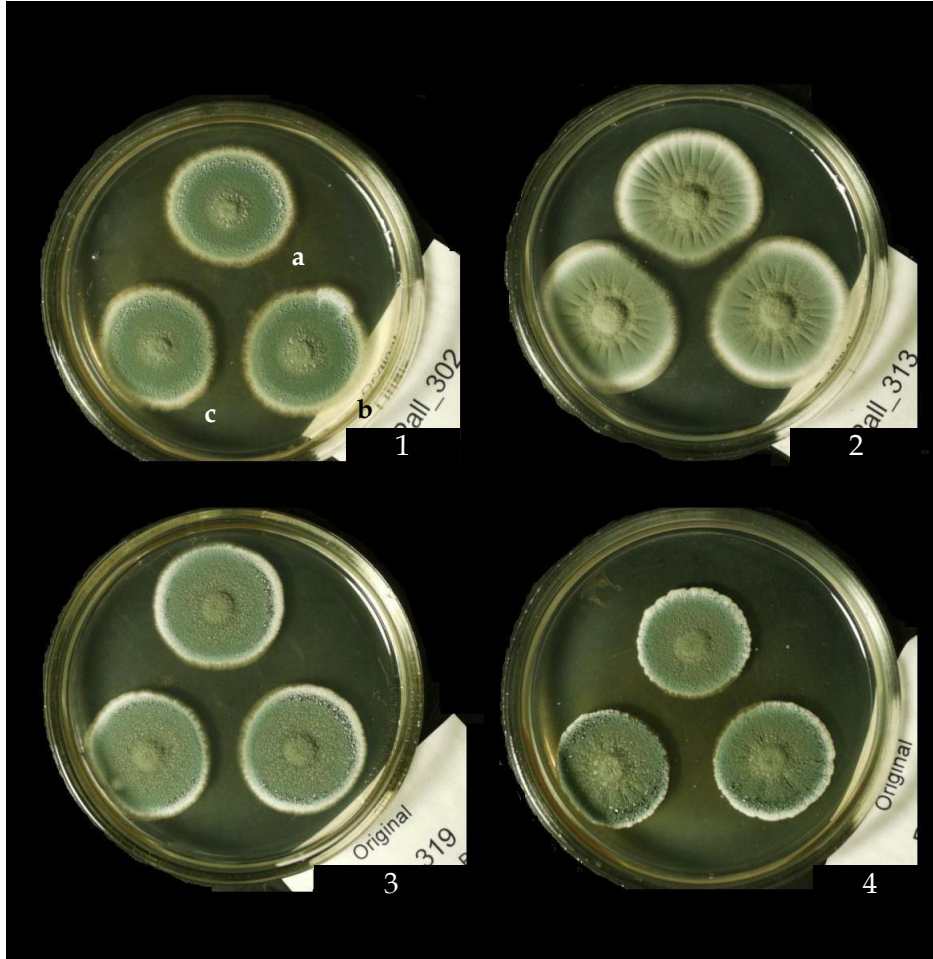


Figura 34: Reaislamiento de hongos de la especie *Penicillium allii* inoculados.

Comparaciones entre (a) los aislamientos obtenidos originalmente, (b) los reaislados de ensayos de inoculación en cámara húmeda y (c) los reaislados de inoculaciones a campo. Cada caja de Petri contiene tres colonias (a, b y c) con orígenes de inóculo distintos. 1: LJC 302, fenotipo 1; 2: LJC 313, fenotipo 2; 3: LJC 319, fenotipo 3 y 4: LJC 466, fenotipo 4.

#### *V.4 Uso de espectrofotometría como una herramienta para cuantificar la esporulación de *Penicillium allii* en lesiones de ajo<sup>4</sup>*

La espectrofotometría es ampliamente utilizada para referir la concentración de UFC en suspensiones bacterianas (Zhou *et al.* 1998, Jones *et al.* 2004). Otras escalas, basadas también en la turbidez presentada en un medio de cultivo líquido, como la escala de McFarland, son también empleadas para ajustar suspensiones de bacterias (Király *et al.* 1974). En patología de plantas la dosis inoculada es importante puesto que condiciona el tamaño de la lesión (Hong & Hwang 1998, Chongo & Bernier 2000). Normalmente se cita el empleo de la cámara de Neubauer en los trabajos donde se ajustan dosis (Schreuder *et al.* 2000, Islam *et al.* 2005, Gevens *et al.* 2007), aunque el uso de espectrofotometría para relacionar la concentración en suspensiones de hongos con la turbidez presentada por la suspensión ha sido abordado (Espinel Ingroff & Kerkering 1991, Autrey *et al.* 1996, Rodríguez Tudela *et al.* 2001).

El uso de cámara de Neubauer demanda una gran cantidad de tiempo y conduce a errores, que se incrementan con el aumento del número de células contadas en cada retícula (Berkson *et al.* 1935).

---

<sup>4</sup> El siguiente apartado se publicó en *Fitopatologia Brasileira* 31(6), 583-585 y se incluye en el Anexo XII.5.3

El objetivo de este trabajo fue cuantificar por medio de espectrofotometría, la cantidad de conidios producidos por cepas de *P. allii* inoculado en bulbillos de ajo.

#### *V.4.1 Materiales y Método*

El material de trabajo consistió en bulbillos inoculados con cepas de *P. allii*. Se extrajo con bisturí el área necrosada y se suspendió en un microtubo conteniendo 1 mL de agua estéril adicionada con Tween 20 1%. Se homogeneizó en un vórtex durante 30 segundos, se extrajo el tejido con pinzas y se homogeneizó nuevamente en vórtex por 3 min. Se trasvasaron 200  $\mu\text{L}$  a un nuevo microtubo, para hacer el análisis por espectrofotometría.

Para evitar la decantación de conidios durante la lectura, (Foote 1972, Harbo 1975), la solución blanco se preparó con 0,5 g de agar  $\text{L}^{-1}$  (Autrey *et al.* 1996). La turbidez óptica de las suspensiones se midió con la Transmitancia en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy, Rochester) a una longitud de onda de 340 nm. El equipo se calibró con una solución blanco (0,5 g agar  $\text{L}^{-1}$ ) donde se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de conidios previamente obtenida. Se mezcló por inversión cuidando de no generar burbujas. Se tomaba la transmitancia de la solución, y si ésta era menor a 80%, se agregaban 30  $\mu\text{L}$  extras; si era menor a 40%, se repetía el procedimiento, ésta vez partiendo de 25  $\mu\text{L}$ .

Para comparar con la cámara de Neubauer, se hacían dos lecturas, depositando 10  $\mu\text{L}$  obtenidos de la celda de lectura del espectrofotómetro en dos cámaras independientes. Se contaban entre 10 y 20 divisiones de la cámara y se obtenía el promedio para estimar la concentración de conidios. Se determinó asimismo el coeficiente de variación (CV) de la cámara de Neubauer. El CV del espectrofotómetro se obtuvo con 5 lecturas de 10 microtubos conteniendo conidios.

Las determinaciones en cámara de Neubauer con un CV menor a 20% se seleccionaron para realizar un análisis de regresión linear simple entre la concentración de conidios (variable dependiente) y la Transmitancia (variable independiente). Ambas estimaciones se compararon por *test* de Student.

#### V.4.2 Resultados y Discusión

El CV de las lecturas en cámara de Neubauer fue de 35.04% mientras que el CV de las medidas realizadas por espectrofotómetro fue del 2.73%.

Las lecturas de la transmitancia y recuentos en cámara de Neubauer de 117 suspensiones de conidios se presentan en la Figura 35. La ecuación que estima la regresión linear entre transmitancia y concentración de conidios fue  $y = 9,3 \cdot 10^6 - 86497 T$ , donde  $y$  representa la concentración de conidios [ $\text{conidios.mL}^{-1}$ ] y  $T$  el valor de la transmitancia registrado en el espectrofotómetro.

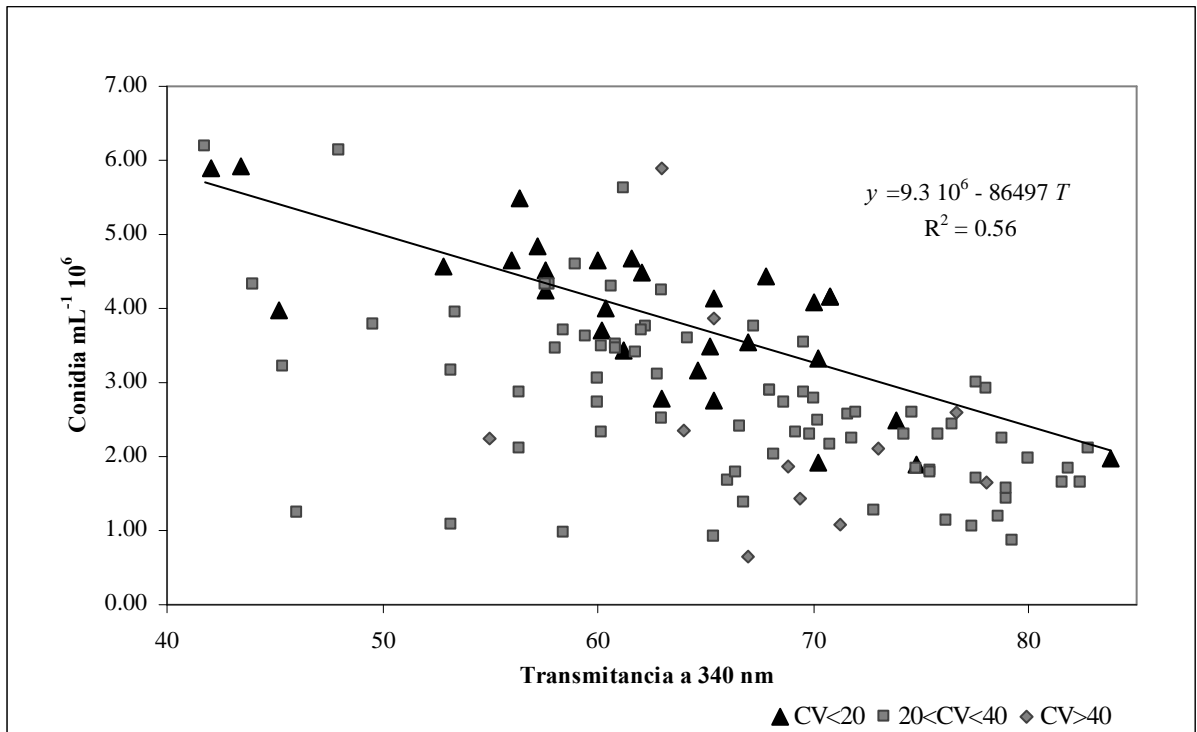


Figura 35: Relación entre la transmitancia registrada en un espectrofotómetro y la concentración de conidios de *P. allii* estimada con cámara de Neubauer.

La línea sólida es la línea de regresión y se estimó a partir de lecturas de cámara de Neubauer con un CV menor a 20 % (n=30, representados en triángulos negros). Los cuadros grises representan medidas con una CV entre 20 y 40% (n= 76) y los rombos grises representan medidas con un CV mayor a 40 % (n=11).

La concentración de conidios por espectrofotometría y por cámara de Neubauer es bastante similar (Tabla 17).

Otros autores usaron la absorbancia en vez de la transmitancia. Expresada en términos de absorbancia la ecuación es positiva:  $y = 672220 + 86497 A$ . La ecuación obtenida por Harbo (1975),  $y = 16000 + 1634000 A$  no es aplicable, probablemente por haberse obtenido a partir de esperma de zánganos (*Apis mellifera*). Las ecuaciones de Autrey *et al.* (1996),  $y = 170000 A$  y de Johnson y Bowyer (1974),  $y = 358593 + 137746 A$  sobreestiman la concentración de conidios comparadas con la ecuación presentada en este trabajo.

Tabla 17: Conteos de conidios y su coeficiente de variación (CV)

	CV<20	20<CV<40	CV>40	Total
Total de lecturas	30	76	11	117
Total de coincidencias	11	37	4	52
% de coincidencia	36.7%	48.7%	36.4%	44.4%

Las medidas obtenidas por espectrofotometría son más rápidas y fáciles de realizar que la técnica tradicional de contar conidios con cámara de Neubauer. Además, las medidas espectrofotométricas son menos variables que la técnica tradicional (CV 2,73 vs CV 35,04). Esto significa que un método menos variable fue calibrado con un método de mayor variación.

En los casos donde la transmitancia fue mayor al 80%, la adición de un volumen extra de la suspensión de conidios hizo decrecer la transmitancia de manera lineal; sin embargo, en medidas menores a un 40% de transmitancia, la relación era más exponencial que lineal, por lo que se optó por aumentar la transmitancia (disminuyendo la concentración de conidios) a un rango entre 40 y 80%.

### *V.5 Supervivencia de *Penicillia* en bulbillos de ajo inoculados*

En los trabajos precedentes se ha observado que la patogenicidad de *P. allii* está relacionada al clon que se ensaya y también al aislamiento que se inocula. Este nivel de patogenicidad se pudo determinar cuando los aislamientos se ensayaron en el campo. En estas pruebas, sin embargo, el inóculo se depositó dentro de una herida realizada sobre dientes estériles (Figura 22).

La herida generada es desproporcionada con respecto a heridas naturales mencionadas, como aquellas que se producen en el momento de la emisión de las raíces (Saaltink 1971).

Las plantas que “escaparon” a desarrollar la enfermedad mantuvieron la cepa inoculada (V.3), que fue detectada en poscosecha, indicando que el mismo aislamiento inoculado sobrevive y es posible de reaislar.

El objetivo para la realización de este ensayo fue evaluar si el aislamiento inoculado perdura hasta el ciclo siguiente cuando se plantan los bulbillos de los bulbos que “escaparon” a la enfermedad.

#### *V.5.1 Materiales y Métodos*

Los bulbos cosechados en Diciembre de 2004, que se habían inoculado en Abril de ese mismo año, se “curaron” en zarandas, en un área propensa a infecciones cruzadas por el viento, aunque protegida de la lluvia (Figura 24). Luego de las tareas y evaluaciones a las que se sometieron (descolado, peso,

toma de diámetro), los bulbos remanentes se introdujeron en bolsas de papel rotuladas con el número de aislamiento que se había inoculado. Se seleccionaron 15 bulbos, a los que se le extrajeron los bulbillos, uno por bulbo (cuando el número de bulbos sobrevivientes lo permitió) de los clones Fuego INTA y Castaño INTA. Los bulbillos se plantaron en un ensayo completamente aleatorizado de 23 tratamientos y 3 repeticiones en parcelas de 5 plantas cada una, sin aplicaciones de fungicidas. Agrupados según la raza agresiva a la que fueron asignadas (V.3) se tenían 4 tratamientos de la raza 1; 5 de la raza 2 y 7 de las razas 3 y 4 (Tabla 18). La plantación se realizó el 11 de Abril de 2005 en un predio no cultivado con ajo el año anterior. Los tratamientos se identificaron con el aislamiento que previamente se había inoculado.

Durante el cultivo se realizaron desmalezados manuales y riegos por goteo periódicos. Se evaluó emergencia (100%) que no mostró diferencias entre los tratamientos. La cosecha se realizó el 20 Diciembre de 2005 y las tareas de descolado y calibrado comenzaron en Marzo de 2006. Los bulbos se colocaron en bolsas de papel rotuladas. Se realizaron cámaras húmedas de bulbillos pertenecientes a doce bulbos, al menos un bulbillo de cada bulbo cosechado. Se realizaron aislamientos de las colonias de *Penicillium* spp emergentes. Los datos se analizaron estadísticamente con el software Infostat (v 1.1) por ANAVA

Tabla 18: Supervivencia de *Penicillium allii* en bulbillos de ajo.

R = Raza agresiva asignada al aislamiento que se inoculó en la temporada anterior a la realización del ensayo. Plantas sobrevivientes (n), peso de los bulbos cosechados (PB); colonias de *Penicillium* observadas en 12 bulbillos (Pe.) y resultado de estas observaciones: FCol = Fenotipo de la colonia (Inoc= Inoculado, mismo fenotipo que cepa original; Cont= Contaminado con *Fusarium sp.* y que no pudo purificarse; Otro = Colonia de *Penicillium sp.* de especie diferente a la inoculada); LSD= Comparaciones de la variable PB del clon Fuego INTA, letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ , según Fisher)

Aislamiento	R	Castaño INTA				Fuego INTA				
		n	PB	Pe.	FCol	n	PB	LSD	Pe.	FCol
LJC 005		13	329	0		15	492		0	
LJC 188	1	12	247	0		15	443	A	0	
LJC 321		10	252	0		13	515		0	
LJC 541		13	350	0		14	416		0	
LJC 157		14	393	0		15	433		3	Otro
LJC 159		15	354	1	Inoc.	15	341		1	Inoc.
LJC 178	2	14	316	1	Otro	15	400	AB	0	
LJC 466		14	566	2	Otro	15	346		0	
LJC 517		12	393	1	Cont.	15	353		2	Inoc.
LJC 197		11	366	0		7	136		0	
LJC 201		14	457	0		13	326		1	Otro
LJC 313		15	497	0		15	359		1	Inoc.
LJC 346	3	14	314	1	Otro	15	311	BC	2	Cont.
LJC 482		12	138	1	Inoc.	15	384		2	Inoc.
LJC 530		13	262	4	Inoc.	14	255		1	Inoc.
LJC 542		15	352	0		15	449		1	Inoc.
LJC 029		13	289	1	Cont.	15	336		3	Inoc.
LJC 059		11	203	0		13	198		1	Otro
LJC 087		14	241	0		14	256		0	
LJC 252	4	14	350	1	Otro	6	146	C	2	Otro
LJC 385		6	90	3	Inoc.	8	167		4	Cont.
LJC 447		15	313	3	Cont.	14	390		3	Inoc.
LJC 543		14	216	2	Otro	13	256		5	Otro

(paramétrica para la variable peso de bulbos cosechados y no paramétrica para las variables número de bulbos cosechados y colonias de *Penicillium allii* del mismo fenotipo inoculado). Cuando se observaron diferencias significativas al 5% se realizaron comparaciones múltiples aplicando el test LSD de Fisher.

#### V.5.2 Resultados y Discusión

No se observaron diferencias significativas en el número de colonias de *Penicillium allii* recuperadas del mismo fenotipo que el inoculado dos años antes (colonias positivas de ahora en adelante). Es preciso aclarar que el análisis de cámara húmeda se realizó en abril del 2006 y los hongos se habían inoculado el 20 de abril 2004 en Fuego INTA y el 6 de mayo de 2004 en Castaño INTA. Las otras colonias de *Penicillium* spp. aisladas (designada "Otro" en columna FCol de Tabla 18) no correspondieron a otros morfotipos de la especie *Penicillium allii* sino a especímenes de las especies *P. chrysogenum* y otra sin identificar. Se esperaba que otras cepas de *Penicillium allii* pudieran infectar debido a que los bulbos se almacenaron durante dos meses en condiciones de semi-intemperie. Castaño INTA presenta un número menor no significativo de colonias de *Penicillium* positivas que Fuego INTA (3 contra 8). Sin embargo, cuando se analiza el peso final de los bulbos obtenidos clasificados según la raza agresiva, se observan diferencias únicamente en este último clon. No se observaron

diferencias en las variables emergencia ni *Penicillium* positivos (para ambos clones) ni en la variable peso de los bulbos para Castaño INTA.

Con los datos obtenidos es difícil de asignar al nivel de inóculo observado en los bulbillos después de dos años de inoculación una relación directa con la patogenicidad manifestada por los aislamientos previamente inoculados. Sin embargo, esto es así cuando se comparan los bulbos cosechados de la raza 4 de Fuego INTA, que fueron significativamente más livianos que los de las razas 1 y 2. Asimismo, los bulbos de la raza 3 lo fueron más livianos que los de la raza 1 (Tabla 18). En un clon muy sensible a la infección por *Penicillium* se observó que el inóculo perdura en los tejidos del bulbillo y que no se detectan nuevas contaminaciones producidas desde el suelo o por vía aérea. Muchas referencias indican que la infección de ajos por nuevas cepas de *Penicillium* se producen durante el desgranado (Messiaen & Lafon 1968, Bruna Vásquez & Fernandez 1991, Makuch & Herrera 1993). Se ha observado también que el extracto de ajo inhibe completamente la germinación de *Penicillia* patógenos en ajo cuando los conidios de éstos están en baja concentración (Smalley & Hansen 1962). Sin embargo, otros ensayos han mostrado que el extracto de ajo favorece el desarrollo de los conidios cuando es aplicado sobre la hoja de reserva, aunque con mayores niveles de inóculo (Valdez *et al.* 2001). Se podría inferir en función a los resultados observados que el inóculo sobrevive en el bulbo, probablemente

subsistiendo entre los tejidos, evidenciándose en las hojas estériles cuando se realizan cámaras húmedas (Makuch & Herrera 1993). Cuando se producen heridas en el desgrane, o en la emisión de raíces, se liberan pequeñas cantidades de compuestos sulfurados propios del ajo, que están presentes en los extractos frescos y que inducen el desarrollo del micelio hacia la fuente de origen de estos compuestos. Para la fecha en que los bulbillos son plantados, la hoja de brotación se encuentra activada y alrededor de los haces vasculares, principalmente el floema, se acumula la aliin liasa (Ellmore & Feldberg 1994), enzima responsable de la conversión de aliina en allicina (Cavallito & Bailet 1944). Este es el momento propicio para que *Penicillium allii* afecte el desarrollo de la nueva planta, invadiendo los tejidos de reserva. Cuando la herida o el nivel de inóculo son grandes, puede llegar a afectar el desarrollo vegetativo, matando la planta. Esto no siempre es así, puesto que hasta los aislamientos más agresivos en inoculaciones controladas, permiten la sobrevivencia de las plantas, aunque sin valor comercial (V.3).

Si durante la cosecha se producen lesiones en los bulbos, ya sea por quebraduras internas por presión, daños con herramientas u otros factores, se producirá la liberación de compuestos sulfurados que podrán, en el primer caso, favorecer el desarrollo del inóculo presente en las catáfilas no fértiles. Posteriormente la infección migraría desde las catáfilas hacia el bulbillo dañado,

explicando entonces la presencia algunas veces de bulbos con sólo un bulbillio afectado por *Penicillium*. En el segundo caso, además de la propia carga de inóculo, se podrán producir contaminaciones cruzadas por aire. Cuando un bulbo conteniendo bulbillos completamente cubiertos de conidios es sumergido en productos químicos no eficaces, generalmente en base a benzimidazoles, se puede producir una importante dispersión de inóculo, como ya se comentó en I.1.2.2.2.

## **VI. Aislamiento e identificación de *P. allii* en un medio semiselectivo basado en extracto de ajo<sup>5</sup>**

### *VI.1 Introducción.*

El uso del ajo en medicina popular era ya conocido por los antiguos egipcios, griegos y romanos. En el papiro *Ebers* se describen cerca de 22 usos distintos del ajo para medicar afecciones cardíacas, dolores de cabeza, parásitos, y tumores (Sendl 1995).

En el ajo se encuentran típicamente compuestos organosulfurados, siendo uno de los principales la aliina, llegando a concentraciones de hasta el 1,4% del peso fresco (Keusgen 2002). La capacidad bactericida, nematocida, fungistática y fungicida del extracto de ajo ha sido ampliamente estudiada (Tansey & Appleton 1975, Cammue *et al.* 1995, Arora & Kaur 1999, Singh *et al.* 2001). En aislamientos de *Penicillium* obtenidos de ajo y de otras fuentes, el extracto fresco de ajo se ha usado para medir el área de inhibición a las 48, 96 y 144 horas (Smalley & Hansen 1962). Un análisis digital de los datos presentados por estos autores permitió determinar dos grupos con diferencias significativas en los diámetros alcanzados (ANAVA,  $P < 0,05$ , Tabla 19). Se observó que aquellos aislamientos obtenidos de ajo (identificadas como *P. corymbiferum* y *P. cyclopium*)

---

<sup>5</sup> El presente apartado se encuentra en prensa en la revista *Journal of Phytopathology*. (Anexo XII.4.3)

Tabla 19: Inhibición a la germinación de conidios.

Datos obtenidos digitalmente de la Tabla 4 de Smalley & Hansen (1962) y analizados por análisis de conglomerado. *Clusters* definidos por similitud de 0,50.

Especie <sup>a</sup>	Origen	48 h	96 h	144 h	Grupo
<i>P. corymbiferum</i>	Garlic Isolate 1	21.2	12.9	12.6	1
<i>P. corymbiferum</i>	Garlic Isolate 111	26.8	14.8	12.5	
<i>P. corymbiferum</i>	Garlic Isolate 186	26.0	14.8	12.9	
<i>P. corymbiferum</i>	NRRL 2032 <sup>b</sup>	26.9	16.7	14.3	
<i>P. cyclopium</i>	Garlic Isolate 133	35.4	25.0	20.7	
<i>P. cyclopium</i>	NRRL 1899 <sup>b</sup>	32.8	23.7	15.8	
$X_{(cl1)}$ <sup>e</sup>		28.2 a	18.0 a	14.8 a	
<i>P. digitatum</i>	Orange Isolate 220	60.4	57.3	53.8	2
<i>P. expansum</i>	Plum Isolate 152	65.3	56.2	53.2	
<i>P. granulatum</i>	NRRL 2036 <sup>b</sup>	60.5	56.5	54.3	
<i>P. italicum</i>	Orange Isolate 260	61.1	56.2	49.5	
<i>P. claviforme</i>	NRRL 2031 <sup>b</sup>	52.7	48.4	42.4	
<i>P. oxalicum</i>	NRRL 790 <sup>c</sup>	57.5	47.5	40.8	
<i>P. palitans</i>	NRRL 2033 <sup>c</sup>	60.0	54.9	42.2	
<i>P. urticae</i>		50.5	42.4	36.8	
<i>P. viridicatum</i>	NRRL 9635 <sup>d</sup>	55.3	42.4	34.2	
$X_{(cl3)}$		58.1 b	51.3 b	45.2 b	

<sup>a</sup> Identificación de la especie según Smalley y Hansen (1962)

<sup>b</sup> NRRL 1899 = *P. polonicum*; NRRL 2031 = *P. vulpinum*; NRRL 2032 = *P. hirsutum*; NRRL 2036 = *P. glandicola*, según figura en la base de datos de la colección de cultivos tipo CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/data-bases/>).

<sup>c</sup> = Coincidente con identificación actual.

<sup>d</sup> = Aislamiento no preservado.

<sup>e</sup> = Valores promedios para el *cluster* 1 de acuerdo a la inhibición alcanzada a las 48, 96 o 144 h. Comparaciones significativas según ANAVA ( $P < 0.05$ , en columnas).

constituían un grupo, que las especies *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. granulatum* (= *P. glandicola*), *P. italicum*, *P. claviforme* (= *P. vulpinum*), *P. oxalicum*, *P. palitans*, *P. urticae* y *P. viridicatum* constituyeron otro. Los hongos aislados de ajo presentaron menor inhibición que los de otros huéspedes.

Otros autores también han mostrado que el extracto de ajo inhibe el desarrollo de otras especies de *Penicillium* (Tansey & Appleton 1975, Muhsin *et al.* 2000, Obagwu & Korsten 2003). Hay cierta evidencia (presentada en I.1.3) que el compuesto responsable de la inhibición al desarrollo de los microorganismos sería la allicina (Figura 36).

En todos los trabajos consultados donde el medio de cultivo se complementa con filtrados estériles de extracto de ajo siempre se hizo referencia a la inhibición que se producía, pero no se hizo referencia al fenotipo que presentan las especies que pueden desarrollarse en presencia de extracto de ajo.

Los morfotipos presentados por estas especies son únicos, y cuando se incrementa el extracto en el medio de cultivo, el desarrollo puede inhibirse completamente.

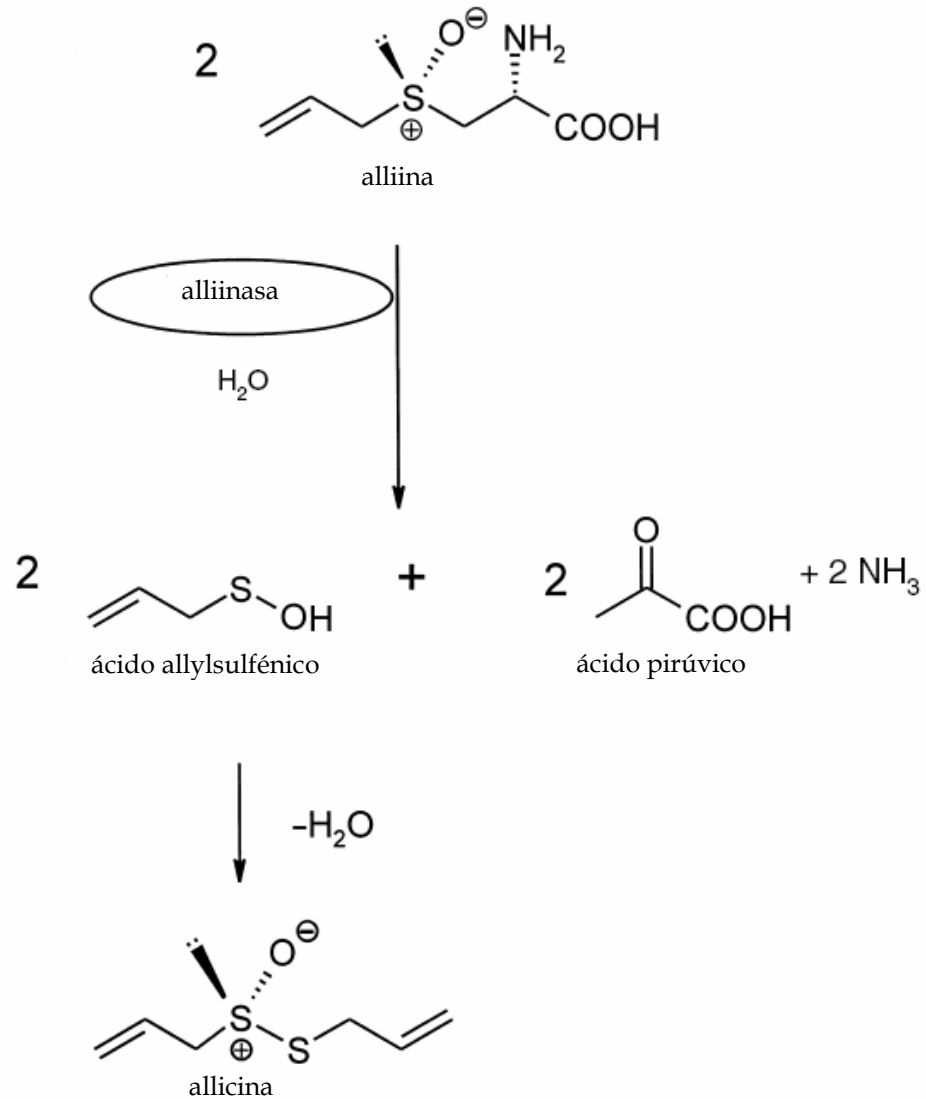


Figura 36: Clivado de allina catalizado por la enzima allinasa en ácido allyl sulfénico, ácido pirúvico y amoniaco.

Se necesita que reaccionen dos moléculas de ácido allyl sulfénico para formar allicina (Tomado de Keusgen, 2002).

Además de este aspecto, es necesario considerar que los patógenos deben ser aislados de especímenes afectados y cultivados en cultivos puros para ser identificados. La esporulación de estos patógenos normalmente se produce en cámaras húmedas, lo cual también, induce la proliferación de saprófitos. La mayoría de los saprófitos más comunes encontrados en ajo, fueron inhibidos en agar malta adicionado con extracto de ajo (Tansey & Appleton 1975).

En este capítulo se presenta una propuesta para utilizar extracto de polvo de ajo en un medio semiselectivo para el aislamiento y la identificación de *Penicillium allii*.

## VI.2 Hipótesis de trabajo

### Hipótesis nula

Puesto que los medios con extractos acuosos de ajo presentan allicina, y la allicina está citada como uno de los principales compuestos fungistáticos y fungicidas del ajo, las colonias inoculadas en medios suplementados con extracto de ajo no desarrollarán.

### Hipótesis alternativa

Los hongos patogénicos de ajo, al haber coevolucionado con su sustrato, desarrollaron la capacidad enzimática de desdoblar los compuestos responsables de la actividad fungicida o fungistática. Esto indicaría que

sólo los hongos fitopatogénicos del ajo o especies cercanas serían capaces de desarrollarse en medios suplementados con extracto de ajo.

### *VI.3 Materiales y método*

#### *VI.3.1 Polvo y extracto acuoso de ajo*

Se utilizó polvo de ajo de origen comercial de tres fuentes diferentes. Los polvos identificados como A1 y A2 se obtuvieron en Mendoza por una empresa local a partir de bulbos de descarte por tamaño con un calibre de 2-3 cm. La materia prima se procesa seca; se “desgrana” y limpia con zarandas y ventiladores. Se lava y selecciona de manera manual y luego se corta en trozos que se secan en un horno a 70-80 °C durante tres horas. Posteriormente se muele hasta un tamaño final de partícula menor a 420 µm. El producto identificado como C1 se originó de polvo de ajo chino importado en Argentina. Se adquirieron 5 paquetes de 100 g que se combinaron. El polvo identificado como D1 se adquirió en Dinamarca, como fragmentos secos que se molieron a mano en un mortero. También se obtuvo polvo de ajo de los cvs. Fuego INTA y Castaño INTA a partir de bulbillos sanos y sin catáfilas cortados en rebanadas de 2-3 mm con un bisturí de hoja de acero. Se realizó un secado en estufa a 50 °C durante 24-48 h y se realizó un molido a mano en mortero.

Todos los polvos se almacenaron en bolsas de aluminio en una cámara ambientada a 17-20 °C con una humedad relativa del 30-50 %.

Para obtener el extracto acuoso de ajo, el polvo se embibió, agitó y mantuvo en heladera por 18-24 h. La suspensión fue agitada nuevamente y centrifugada a 15 °C por 20 min a 8512 g. El sobrenadante se esterilizó por filtración con membranas seriadas de 0,8 a 0,2  $\mu\text{m}$ .

Se preparó también extracto fresco de ajo de los cvs. Fuego INTA y Castaño INTA. Para comparar los análisis, se hicieron los cálculos estequiométricos necesarios para que ambos extractos quedaran con el mismo contenido de materia seca que los medios en base a extracto acuoso (5,69 gms.L<sup>-1</sup>). Las hojas de reserva de los bulbillos fueron separadas y lavadas con agua corriente. Se tomaron 65 g que se maceraron con 90 mL de agua destilada preenfriada. Se licuó a alta velocidad por 2 min hasta hacer una pasta (Imwidthaya *et al.* 1979). La misma fue filtrada con gasa y el jugo centrifugado a 15 °C por 20 min a 8512 g. El sobrenadante se esterilizó por filtración al vacío con membranas seriadas de 0,8 a 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius 16510).

### VI.3.2 Preparación de medios de cultivo

El medio GSA (*Garlic Sucrose Agar*) se preparó combinando agua destilada en cantidad suficiente para 1 L de medio, 13,5 g de agar y 20 g de sacarosa. Se autoclavó 121 °C 15 min y mantuvo a 50 °C. Se agregaron los extractos de ajo

asepticamente al medio tibio para hacer una dilución de 15, 30, 60, 120 y 240 mL L<sup>-1</sup> (extracto de ajo/medio v/v). Se volcaron con dosificador, 10 mL en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Se preparó extracto de ajo sin sacarosa (GA) a una concentración de 60 mL L<sup>-1</sup> en una manera similar. Se usaron 33,6 mL del extracto fresco de ajo de los cvs Fuego INTA y Castaño INTA independientemente combinados con 13,5 g agar para alcanzar un volumen final de un litro de medio de cultivo. Se prepararon con fines comparativos los medios CYA, MEA y G25N.

### VI.3.3 Selección de microorganismos y preparación del inóculo

Se utilizaron especímenes de *Penicillium* aislados de cámaras húmedas de muestras de ajo y otras especies previamente informadas como aisladas o relacionadas con ajo: *P. allii* Vincent & Pitt LJC 313= IBT 26459; LJC 319 = IBT 26460; LJC 383; LJC 385; LJC 419; LJC 447; LJC 466 = IBT 26463; LJC 517 = IBT 26466 = FFR 5533; LJC 530 = IBT 26467 = FFR 5534; LJC 542 IBT = 26511; LJC 543 IBT = 26512; IBT 5553; IBT 14490; *P. aurantiogriseum* Dierckx LJC 064 = IBT 26509; IBT 11402; *P. brevicompactum* Dierckx LJC 188 = IBT 26501; LJC 306; LJC 339; LJC 494 = IBT 26502; *P. chrysogenum* Thom LJC 206 = IBT 26507; LJC 215 = IBT 26505; LJC 384 = IBT 26504; IBT 5233 ; *P. expansum* Link LJC561; IBT 3487; *P. flavigenum* Frisvad & Samson LJC 321 = IBT 26508; IBT 16864; *P. hirsutum* Dierckx IBT 3061;

IBT 3096; IBT 10702; IBT 19340; IBT 21531; *P. implicatum* Biourge LJC 541; IBT 21467 y *P. phoeniceum* Beyma LJC 537= IBT 26513.

El inóculo se preparó suspendiendo una porción de cultivos frescos (7 d a 25 °C) en 200 µL de agar detergente (Pitt 1973). Se realizaron siembras de tres puntos en los medios estándares y basados en extractos de ajo, incubándose a la oscuridad a 25 °C por 7 d. Las siembras se hicieron en tres repeticiones en un diseño completamente aleatorizado.

#### *VI.3.4 Registro de características de la colonia*

Los diámetros de las colonias se realizaron usando un calibre digital (Sylvac, Crissier) y la cuantificación de la esporulación usando un espectrofotómetro (Valdez & Piccolo 2006). La pigmentación de las colonias se aproximó con el manual de colores Methuen (Kornerup & Wanscher 1978) comparando las colonias y el manual bajo iluminación solar indirecta.

Los colores se digitalizaron con un escáner Hewlett Packard 5300 y se registró la composición en RGB usando el software Microsoft Paint. Las colonias se caracterizaron por altura (bajas, medias y altas), tipo (planas, arrugadas o surcadas y de apariencia sedosa, lanosa, funiculosa o fasciculadas), profundidad de los surcos, color del micelio, del área conidiogénica y del reverso. También se registró la cantidad (ausente, poco, mucho) y el color de los exudados.

### VI.3.5 Análisis estadísticos

Debido a la naturaleza de las variables analizadas (cuantitativas, pseudocuantitativas y cualitativas), se optó por realizar análisis de coordenadas principales (Gower 1966) usando el software NTSys ver 2.1 (Rohlf 2000). Se contruyó una matriz de similitud según el coeficiente de Gower (1971). Se incluyó un árbol del recorrido mínimo (MST) para detectar distorsiones locales en las configuraciones obtenidas en medios estándares y en los medios GA y GSA (60 mL L<sup>-1</sup>). Se realizó un análisis de procrustes para obtener la configuración consenso según las observaciones hechas en medios de cultivo estándares. Se midieron las distancias entre aislamientos de *P. allii* para cuantificar la dispersión observada en cada configuración.

### VI.3.6 Aislamiento de *Penicillium allii* en medios estándares y GSA.

Se hicieron cámaras húmedas, 20 bulbillos cada una, en tres réplicas, 12 d a 20 °C. Además, se tomaron a campo 13 plantas con síntomas de ataque de *Penicillium* spp. que se incubaron por 24 hs. Tres colonias desarrolladas en cada réplica de cámara húmeda y una colonia de cada planta sintomática se removieron bajo microscopio estereoscópico y se realizaron rayados en medio PDA acidulado y en el medio GSA. Se identificaron las colonias de *Penicillium* spp. y se registró el número de colonias contaminantes.

## VI.4 Resultados y Discusión

### VI.4.1 Agrupamiento de *Penicillium* spp. según medios estándares

Los aislamientos desarrollados en el medio CYA se pueden asociar en 4 grupos (Figura 37).

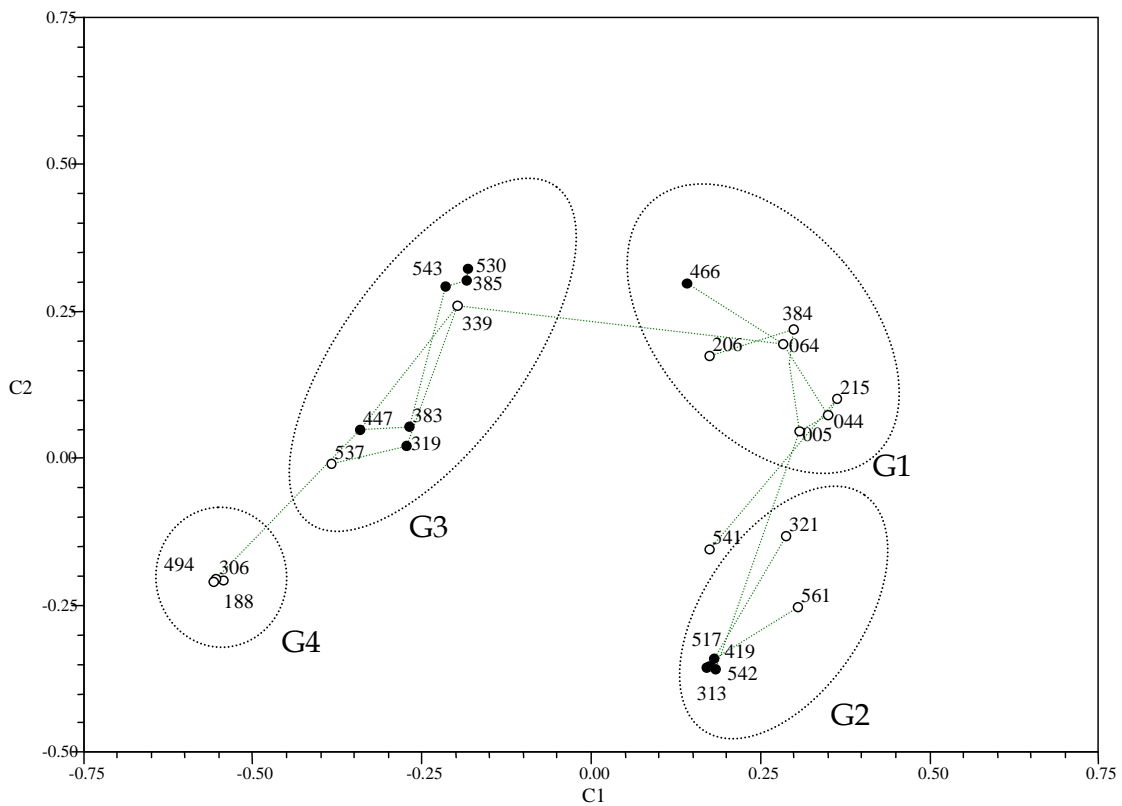


Figura 37: Gráfico biplot y MST de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de aislamientos de *Penicillium* en CYA.

Los aislamientos de *P. allii* se representan con círculos negros llenos. Otros aislamientos indicados por su número LJC. G1, G2, G3 y G4 representan los grupos observados.

El 44,5 % de la variabilidad se explica con los dos primeros ejes (27,8 y 16,7) respectivamente. El grupo 1 incluye aislamientos de las especies *P.*

*chrysogenum*, *P. aurantiogriseum* y el aislamiento *P. allii* LJC 466. El grupo 2 incluye aislamientos de *P. allii*, *P. expansum* y *P. flavigenum*. El grupo 3 incluye aislamientos de *P. allii*, *P. brevicompactum* LJC 339 y *P. phoeniceum* LJC 537. El grupo 4 contiene el resto de los aislamientos de *P. brevicompactum*.

La representación en el medio MEA se presenta en la Figura 38. Los dos primeros ejes de coordenadas explicaron el 38,7 y 14,6 % respectivamente.

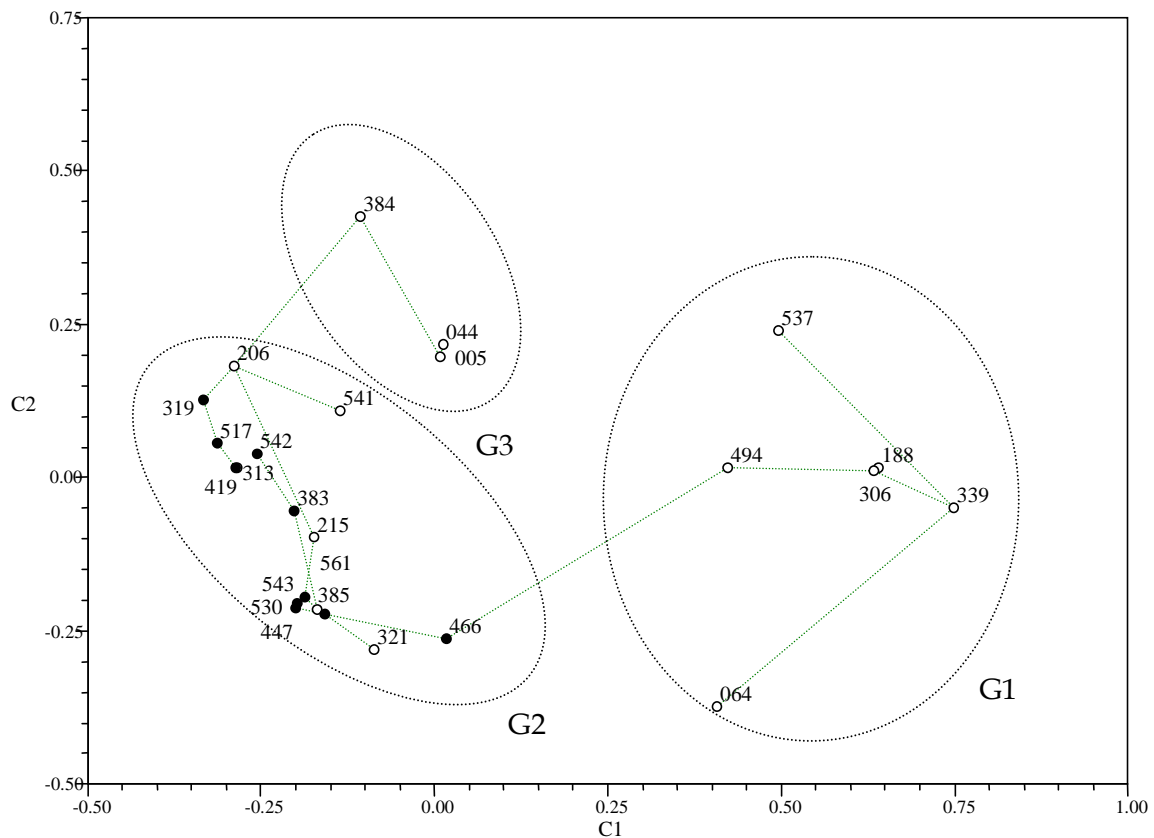


Figura 38: Gráfico biplot y MST de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de aislamientos de *Penicillium* en MEA.

Los aislamientos de *P. allii* se representan con círculos negros llenos. Otros aislamientos indicados por su número LJC. G1, G2 y G3 representan los grupos observados.

Se detectaron tres grupos. El grupo 1 asocia a los miembros de las especies *P. brevicompactum*, *P. phoeniceum* y *P. aurantiogriseum*. *P. allii* se ubica en el grupo 2, aunque asociado a aislamientos de las especies *P. expansum*, *P. flavigenum*, *P. implicatum* y *P. chrysogenum* (LJC 206 y LJC 215).) El grupo 3 incluye a *P. chrysogenum*. El MST permitiría incluir en este grupo a los aislamientos LJC 206, LJC 215 (*P. chrysogenum*) y LJC 541 (*P. implicatum*).

Cuando se evaluó el medio G25N, la mayoría de los aislamientos pertenecientes a *P. allii* (excluyendo a LJC 517) se agruparon juntos (PCoord 1: 24.2 %; Pcoord 2: 17.2 %, Figura 39). Sin embargo, aislamientos de las especies *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. aurantiogriseum* y *P. expansum* se incluyeron en el grupo de *P. allii*. Además, *P. chrysogenum* y *P. flavigenum* se relacionaron con LJC 517 (*P. allii*), G3, Figura 39.

El análisis de correlación de matrices de Mantel (1967) entre las matrices originales de Gower y las matrices de distancia euclídea derivada de los dos primeros ejes del análisis de coordenadas principales fue 0,72; 0,92 y 0,87 para CYA, MEA y G25N, respectivamente. Como estas correlaciones son significativas (Lapointe & Legendre 1992), se pudo realizar un análisis de procrustes. La configuración consenso ortogonal de los medios estándares se presenta en la Figura 40.

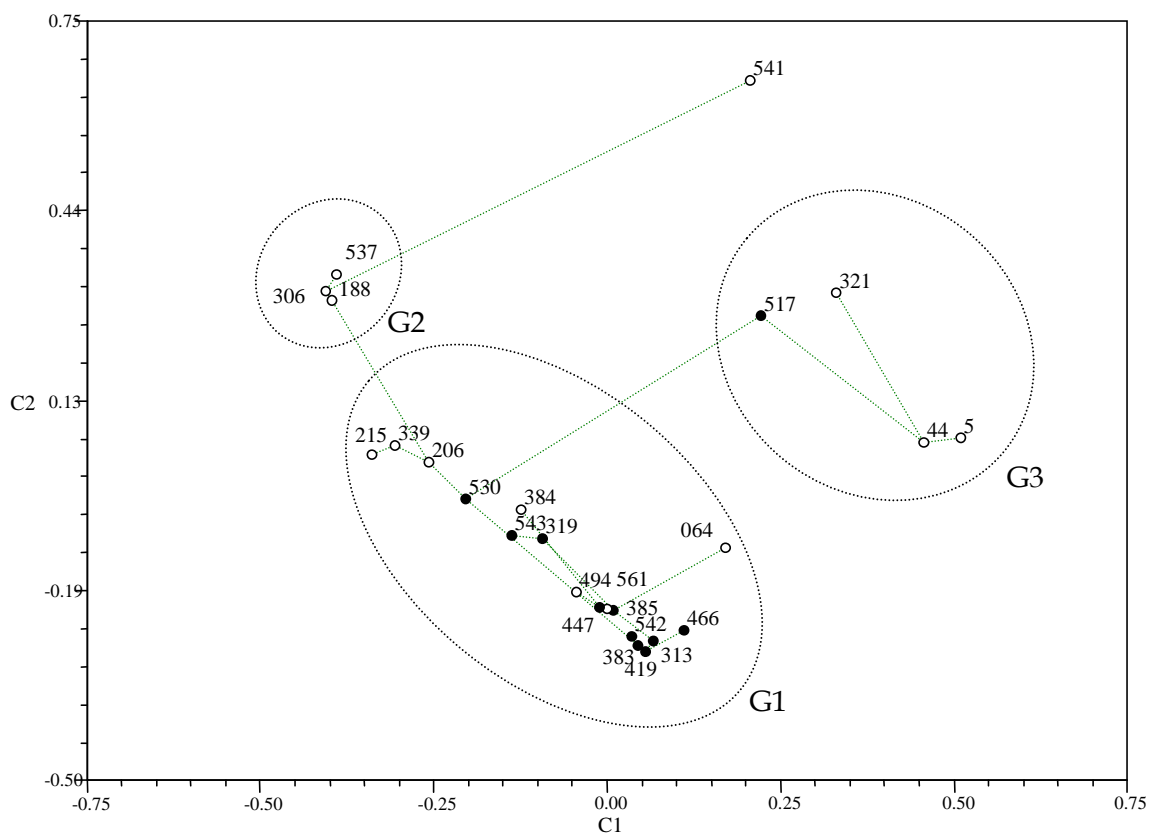


Figura 39: Gráfico biplot y MST de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de aislamientos de *Penicillium* spp. en G25N.

Los aislamientos de *P. allii* se representan con círculos negros llenos. Otros aislamientos indicados por su número LJC. G1, G2 y G3 representan los grupos observados.

*P. brevicompactum* y *P. phoeniceum* quedaron asociados en un grupo. No hubo una separación clara para las demás especies. De lo observado en medios estándares, se aprecia que *P. allii* presenta variabilidad fenotípica en todos los medios, especialmente en CYA, el más usado para la descripción de *Penicillium* spp. (Pitt 1973, Ramirez 1982, Pitt & Hocking 1997, Samson *et al.* 2000).

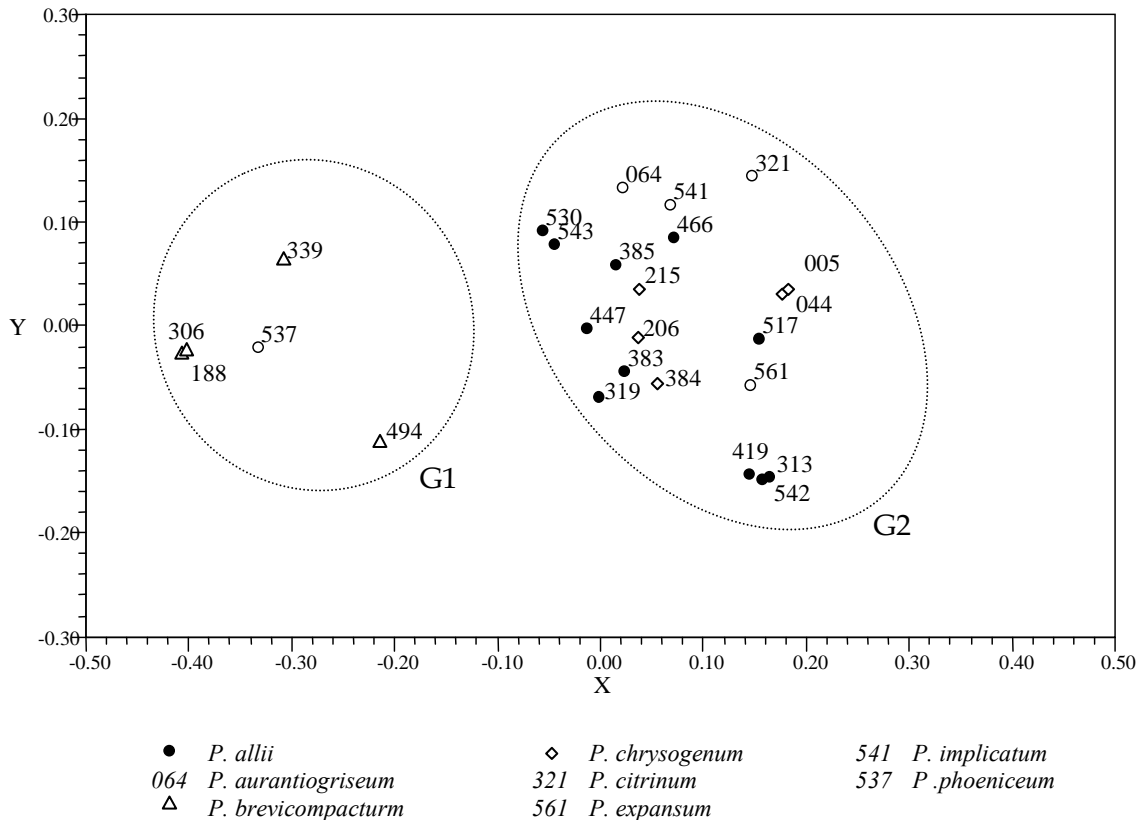


Figura 40: Gráfico biplot de la configuración consenso observada en los medios de cultivo CYA, MEA y G25N.

Se utilizaron los dos primeros ejes de coordenadas (44,5%; 53,3% y 41,4% de varianza explicada según medio CYA, MEA y G25N respectivamente) para realizar el análisis de procrustes.

#### VI.4.2 Agrupamiento de *Penicillium* spp. según medios basados en extracto de ajo

Las coordenadas xy alineadas de aislamientos de *P. allii* obtenidas del análisis de procrustes en medios estándares y en medios basados en ajo se utilizaron para estimar la dispersión de esta especie en cada medio de cultivo. La distancia presentada por *P. allii* en GSA y GA fue menos que aquella presentada en los medios estándares ( $t$  test,  $P= 1.22 \times 10^{-13}$ ).

La mayoría de los aislamientos de *P. allii* se agruparon juntos en un simple grupo compacto cuando crecieron en medios basados en extracto de ajo (Figuras 41 y 42). *P. allii* LJC 466 se agrupó con *P. flavigenum*, *P. phoeniceum* y dos aislamientos de *P. brevicompactum* en GSA (Figura 41). En ambos medios, los aislamientos de *P. flavigenum*, *P. phoeniceum*, *P. expansum* y *P. implicatum* fueron fuertemente inhibidos por el extracto de ajo (normalmente no prosperaban, a menos que la concentración del extracto fuera menor a 60 mL.L<sup>-1</sup>). Los aislamientos de *P. chrysogenum* se agruparon juntos en GSA y asociados a *P. brevicompactum* y *P. flavigenum* in GA.

El aislamiento LJC 466 presentó un fenotipo diferente a los demás *P. allii* en el medio GSA, exhibiendo una colonia de menor tamaño con un reverso amarillento (Figura 43 D), y por esta razón separada del grupo de *P. allii* (flecha en Figura 41). En GA, LJC 466 se agrupó juntos con los demás *P. allii* y no presentó el reverso amarillo, sugiriendo que éste fue el resultado de la interacción entre el hongo y la adición de sacarosa en el medio de cultivo. *P. flavigenum* (LJC 321 y IBT 16864) y *P. aurantiogriseum* (LJC 064 y IBT 11402) también producen un reverso amarillo en GSA, y un reverso gris con colonias de mayor diámetro en GA. La misma característica se observó cuando la sacarosa se agregó filtrada y no autoclavada.

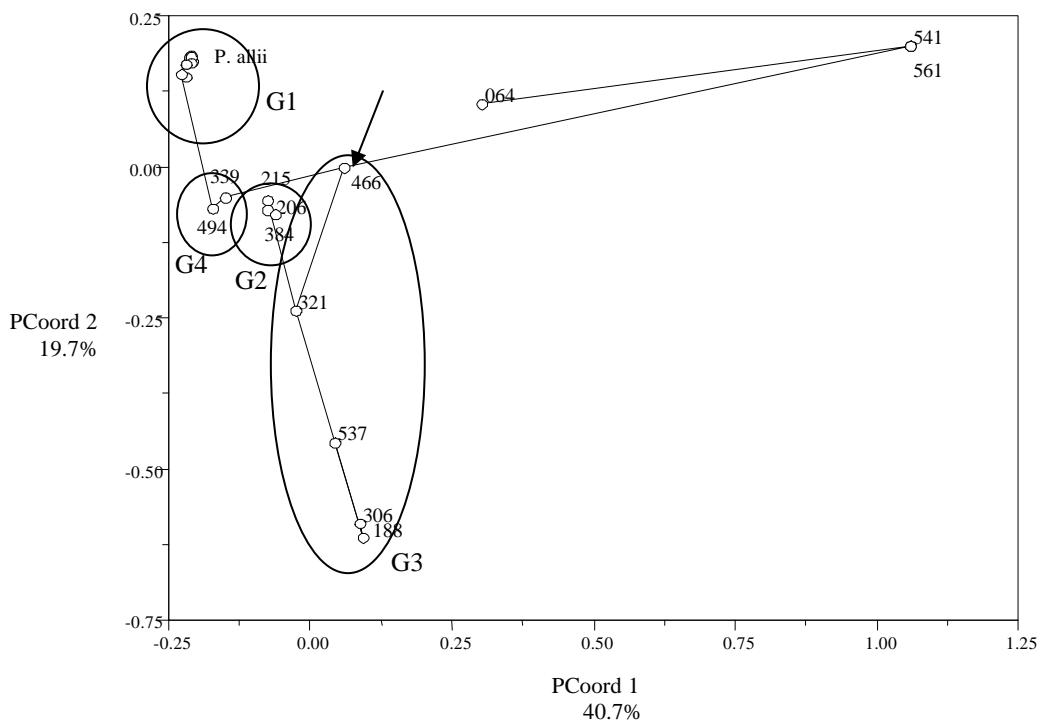


Figura 41: Gráfico biplot de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de *Penicillium* spp en GSA.

*P. allii* LJC 466 se marca con una flecha. El árbol del recorrido mínimo claramente separa a los grupos 2 (G2) y 4 (G4).

Creciendo en YES (agar extracto de levadura y sacarosa) con 150 g Sacarosa L<sup>-1</sup>, LJC 466 también produce un intenso pigmento amarillo en el reverso de la colonia. Un análisis por HPLC de LJC 466 desarrollado en YES confirmó la presencia del pigmento con un espectro UV distintivo caracterizado por picos a 228, 276, 322 y 410 nm.

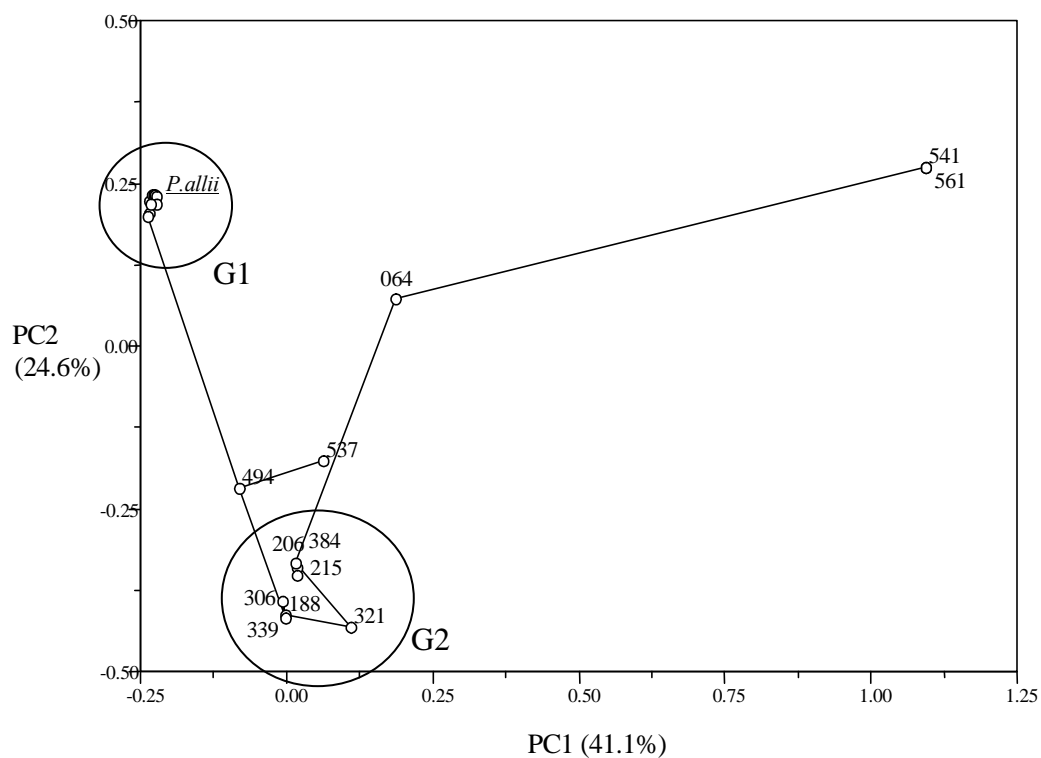


Figura 42: Gráfico biplot de los dos primeros ejes de coordenadas principales mostrando el agrupamiento de *Penicillium* spp en GA.

Análisis por LC-MS determinó la masa del compuesto en 415.1013 Da [M + H]<sup>+</sup>. La búsqueda en Antibase 2003 (Laatsch 2003), indicó que el único compuesto que mostró una masa y características similares es conocido como TAN-1612 (Ishimaru *et al.* 1994) y fue obtenido de un aislamiento de *Penicillium claviforme*. El análisis de UV corroboró la identificación de este compuesto de pigmento amarillo como TAN-1612 o un isómero relacionado.

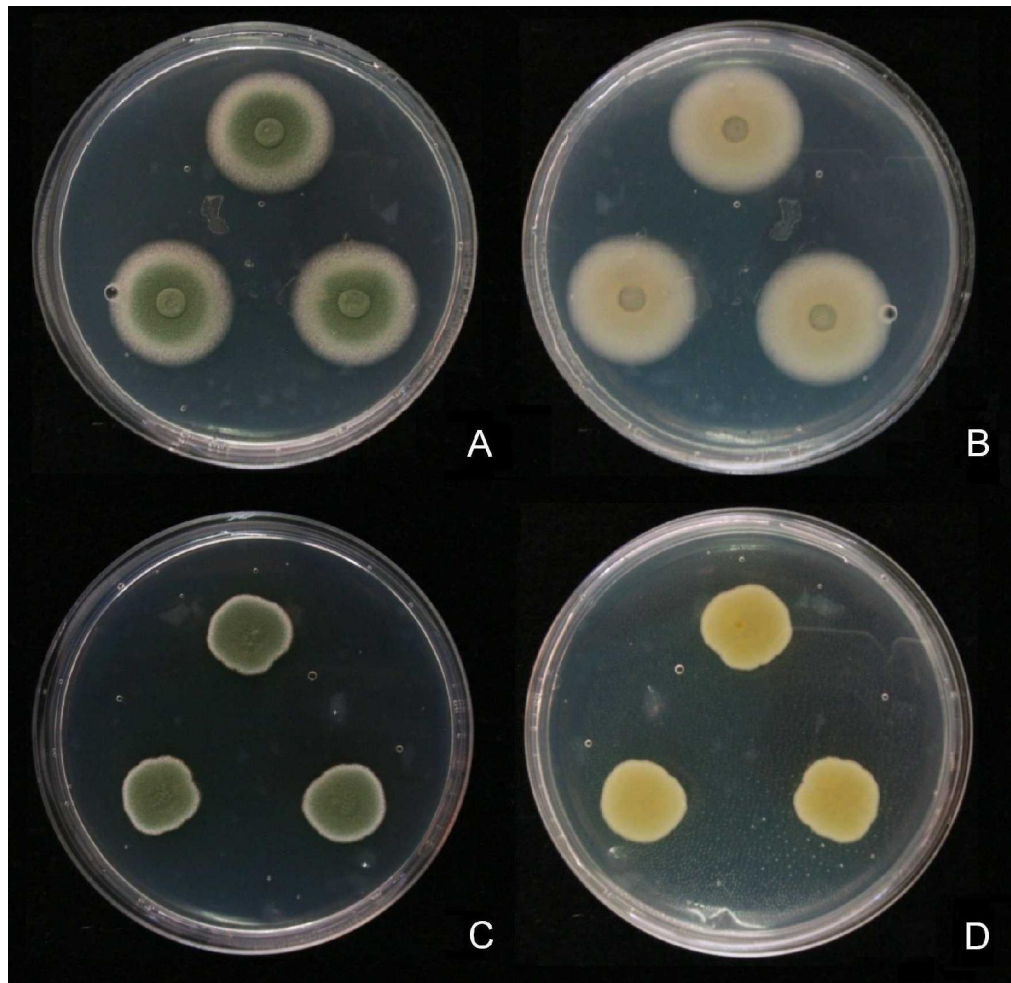


Figura 43: Fenotipo de *P. allii* en medio GSA.

A y B (Frente y Reverso) del fenotipo más común. C y D (Frente y Reverso) de *P. allii* LJC 466

Sin la adición de sacarosa en el medio, se observó una menor esporulación, exudado claro y un diámetro más grande presentado por todas las especies, caracteres que probablemente contribuyeron al agrupamiento conjunto de *P. chrysogenum* y *P. brevicompactum*.

#### *VI.4.3 Descripción fenotípica de *Penicillium allii* en los medios GSA y GA*

En el medio GSA, 25 °C, 7 d., las colonias son verde grisáceas (28D%) con una periferia blanca estrecha. Diámetro de 27-31 mm, plana, bajas, afelpadas a mínimamente coremial con márgenes sumergidos definidos. Esporulación moderada resultando en una apariencia pulverulenta (Figura 43 A y B). El reverso de la colonia es amarillo claro (3B4) en el centro cambiando a verde grisáceo (27B2) hacia la periferia (La coloración del reverso resulta principalmente del color transmitido a través del medio de cultivo). El aislamiento LJC 466 presentó un diámetro de 16 mm, pigmentos solubles amarillo pálido (3A3-3A4) y un reverso homogéneo amarillo chino (4B7) (Figura 43 C y D).

En GA, 25 °C, 7 d, las colonias son verde claro (28D4), 29-32 mm de diámetro, presentan una esporulación débil resultando en apariencia pulverulenta, produciendo gotitas de exudado transparente de pequeño tamaño. La coloración del reverso es gris verdoso (26B2) resultante principalmente del color transmitido a través del medio de cultivo.

#### *VI.4.4 Efecto del origen del extracto de ajo en el desarrollo de *P. allii* y otras especies de *Penicillium*.*

Se obtuvieron diferencias en el diámetro de las colonias de *P. allii* cuando se usaron polvos de ajo de diferente origen. Sin embargo, el fenotipo no cambió.

Los contenidos de alicina diferían entre los polvos de ajo, y éstos contenidos se correlacionan negativamente con el diámetro de la colonia (Tabla 20). En el medio realizado con extracto fresco de ajo cv. Castaño INTA, sólo el aislamiento LJC 543 (*P. allii*) pudo desarrollar (así como un punto de inoculación de LJC 188 *P. brevicompactum*). En el medio suplementado con extracto fresco de Fuego INTA, se desarrollaron aislamientos de *P. allii*, *P. chrysogenum* y *P. brevicompactum*). El aislamiento LJC 543 se clasificó dentro de la raza más agresiva de *P. allii* (Figura 32) a diferencia de lo observado con LJC 466 (raza poco agresiva) y LJC 542 (raza de agresividad media- Figura 31). Debido a que LJC 543 pudo crecer en el medio suplementado con extracto fresco de ajo cv. Castaño INTA, cv que ha sido informado como más tolerante a la infección por *Penicillium* (Cavagnaro *et al.* 2005), este medio podría ser interesante para detectar cepas virulentas de *P. allii*. Sin embargo, el valor taxonómico de medio de cultivo suplementado con extracto fresco es limitado, debido al efecto que presenta el cultivar utilizado.

Los fenotipos presentados por los aislamientos de *P. allii* en el medio GSA correspondieron a dos claramente reconocibles, que se mantuvieron con diferentes polvos de ajo (comerciales y obtenidos en laboratorio) y se observaron en dos laboratorios también diferentes.

Tabla 20: Desarrollo de *Penicillium* spp aislados y relacionados con ajo en medios suplementados con extracto de ajo.

Diámetro promedio (desvío estándar entre paréntesis) y contenido de allicina de cada polvo usado. Castaño: cv Castaño INTA; Fuego: cv Castaño INTA; A1 y A2: Polvo de ajo de origen Argentino, C1: Polvo de origen chino importado en Argentina. D1: Polvo de origen chino importado en Dinamarca. R<sup>2</sup>: Correlación entre el contenido de allicina y el diámetro final de la colonia.

Especie	Aislamiento	CYA	Extracto Fresco		Extracto acuoso de polvo de ajo.						R <sup>2</sup>
			Castaño	Fuego	Castaño	Fuego	A1	A2	C1	D1	
<i>P. allii</i>	LJC466	26.1 (1.63)	0	12.1 (0.71)	12.6 (1.06)	14.9 (0.35)	15.1 (0.59)	16.0 (0.72)	15.8 (0.57)	12.5 (0.55)	-0.85
<i>P. allii</i>	LJC542	32.6 (1.05)	0	25.8 (1.49)	23 (2.5)	28.1 (0.18)	27.2 (1.16)	29.7 (0.37)	29.7 (1.49)	27.0 (0.21)	-0.70
<i>P. allii</i>	LJC543	31.1 (1.97)	20.3 (0.77)	32.8 (1.13)	26.4 (0.61)	30.2 (1.51)	30 (0.71)	31.8 (1.06)	31.8 (1.09)	26.2 (0.32)	-0.67
<i>P. aurantiogriseum</i>	LJC064	22.0 (0.56)	0	0	0	19.1 (1.37)	24.1 (1.04)	24.0 (1.12)	25.1 (1.17)	0	-0.92
<i>P. brevicompactum</i>	LJC188	26.6 (1.56)	1.3 <sup>a</sup> (2.24)	13.4 (0.6)	13.9 (0.67)	14.6 (0.22)	15.3 (1.16)	13.9 (0.18)	14.5 (1.29)	8.8 (0.31)	-0.32
<i>P. chrysogenum</i>	LJC384	25.5 (1.77)	0	12.6 (5.45)	12.9 (0.96)	18.6 (0.26)	21.4 (0.85)	24.1 (0.55)	21.8 (0.49)	15.1 (0.53)	-0.91
<i>P. flavigenum</i>	LJC321	35.7 (1.19)	0	0	0	0	9.5 (1.59)	10.4 (0.07)	7.5 (1.19)	0	-0.76
<i>P. implicatum</i>	LJC541	29.7 (0.42)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
<i>P. phoeniceum</i>	LJC537	13.5 (0.18)	0	0	1.6 <sup>b</sup> (2.76)	1.5 <sup>b</sup> (2.59)	7.1 (0.46)	6.8 (0.78)	4.5 (4.05)	0	-0.83
Allicina <sup>c</sup>		0	-	-	18.7	12.9	5.3	7.9	6.3	9.3	

Los puntos donde se sembraron las colonias que no prosperaron, se cortaron y re sembraron en CYA, para detectar comportamiento fungistático o fungitóxico del extracto de ajo.

a. El efecto del extracto de ajo fresco fue fungistático en *P. brevicompactum* y fungitóxico en los otros casos.

b. Sólo una colonia de las tres réplicas desarrolló.

c. Las determinaciones de allicina las hizo Alejandra Camargo, Lab. Res. Tóxicos, FCA, UN Cuyo, usando el protocolo presentado en Cavagnaro *et al.* (2005).

Por otro lado, aislamientos de las especies *P. brevicompactum*, *P. flavigenum*, *P. phoeniceum*, *P. expansum* y *P. implicatum* estuvieron inhibidos por extracto de ajo y no prosperaron a menos que la concentración fuera menos de 60 mL L<sup>-1</sup>

(Figura 44). A esa concentración, las colonias de *P. brevicompactum* eran pequeñas y presentaban un fenotipo similar, a diferencia de lo observado en el medio CYA. El crecimiento de *P. expansum* y *P. implicatum* estaba inhibido a concentraciones mayores que 30 mL.L<sup>-1</sup>. Lo mismo ocurría para *P. flavigenum* y *P. phoeniceum* a 120 y 240 mL.L<sup>-1</sup>, respectivamente. El incremento en la esporulación de *P. allii* fue directamente proporcional al incremento de extracto de ajo en el medio de cultivo. Algunas colonias presentaron surcos y arrugas por encima de los 60 mL.L<sup>-1</sup>, lo que disminuye el valor taxonómico de la descripción de la colonia en este medio a esa concentración. La esporulación en GSA del aislamiento LJC 466 de *P. allii* fue similar a la de los demás aislamientos de esta especie.

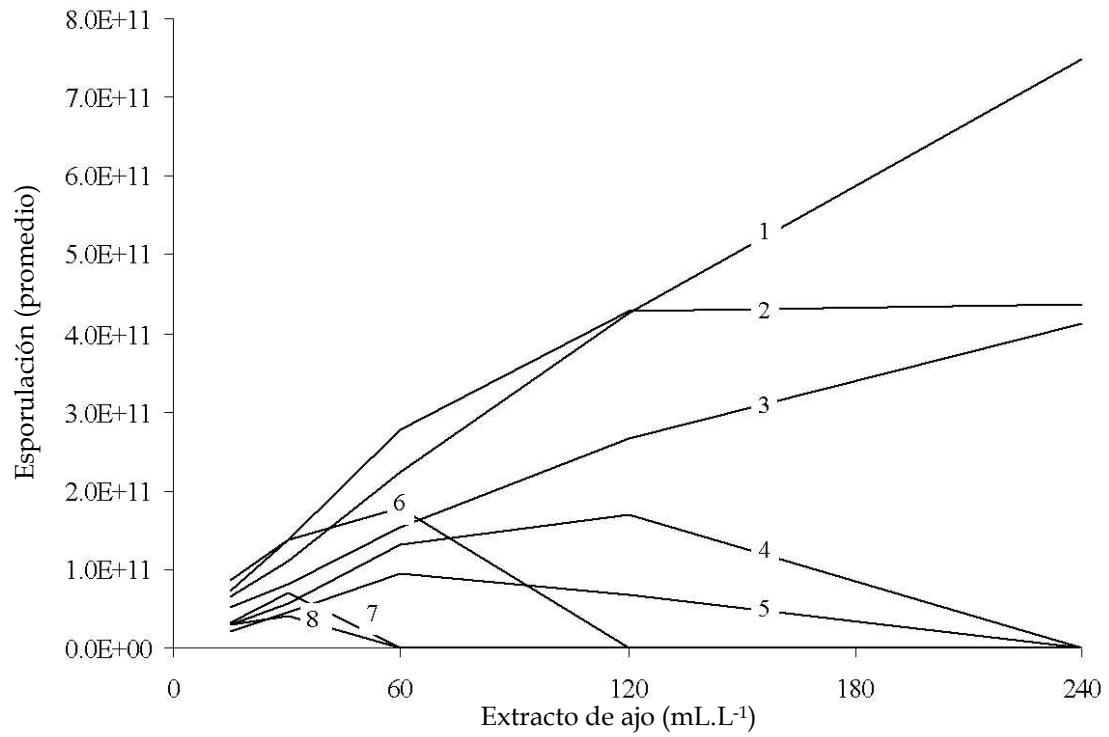


Figura 44: Esporulaci3n de *Penicillium* spp en el medio GSA

1 = *P. allii*; 2 = *P. brevicompactum*; 3 = *P. chrysogenum*; 4 = *P. phoeniceum*; 5 = *P. aurantiigriseum*; 6 = *P. flavigenum*; 7 = *P. implicatum*; 8 = *P. expansum*.

## **VII. Revisiones de la Serie *Corymbifera* del género *Penicillium*: agentes causales de moho azul en el almacenamiento de varios bulbos de flores y hortalizas.**

### *VII.1 Hipótesis de Trabajo*

#### Hipótesis nula

Las especies de *Penicillium* que constituyen la *Serie Corymbifera* son identificables por análisis morfológico y hábitos de crecimiento.

#### Hipótesis alternativa

Las especies de *Penicillium* que constituyen la *Serie Corymbifera* se identifican por análisis morfológico asociado a su perfil de metabolitos secundarios.

### *VII.2 Comparación macromorfología y por metabolitos secundarios de hongos del género *Penicillium* pertenecientes a la Serie *Corymbifera*.<sup>6</sup>*

Se compararon 15 representantes de cada taxa de hongos del género *Penicillium* clasificados en la *Serie Corymbifera* (Tabla 21) por medio de caracteres fenotípicos y por la producción de metabolitos secundarios. Las comparaciones se realizaron por análisis de *cluster* basados en un previo análisis de

---

<sup>6</sup> El siguiente apartado se publicó en el Canadian Journal of Botany 83(11), 1422-1433 y se incluye en el Anexo XII.5.1

coordenadas principales y por regresión discriminante. Se observó una gran variabilidad en la expresión fenotípica de las cepas dentro de las especies analizadas (Figura 45), resultando en una clasificación más fragmentada comparada con la expresión de metabolitos secundarios (Figura 46).

Pese a esto, fue posible clasificar aislamientos en grupos de especies basados sólo en unos pocos rasgos fenotípicos distintivos.

Los análisis de los perfiles de metabolitos secundarios fueron más confiables cuando se realizaron análisis en diferentes medios de cultivo (Tabla 22). El medio CYA produjo la mayor diversidad química, aunque varios metabolitos no se produjeron en este medio (ácido terréstrico, corymbiferona, lactones de corymbiferona y daldinina D sólo se produjeron en YES y OA (Tabla 3, Anexo XII.5.1).

En lo que respecta a caracteres distintivos de *P. allii* frente a los demás miembros de la Serie, se destaca la producción de los metabolitos secundarios meleagrina, andrastina A pero específicamente ácido fúlvico y compuestos familiarizados con este metabolito, no producidos por las otras especies de la serie *Corymbifera*.

Tabla 21: Cepas de *Penicillium* Serie *Corymbifera* usadas para comparación morfológica y molecular.

Especie	Número de cepa <sup>a</sup>
<i>P. albocoremium</i>	IBT 3457, IBT 3891, IBT 10672, IBT 10673, IBT 10683, IBT 10688, IBT 13001, IBT 16884 = CBS 320 97 = CBS 109586, IBT 19154 = CBS 109614, IBT 19397, IBT 20068 = 109582, IBT 21071 = CBS 109584, IBT 21502 = IBT 10682 = CBS 472 84 = IMI 285511, IBT 22521 = CBS 109585, IBT 22806 = CBS 109583.
<i>P. allii</i>	IBT 3772 = IBT 3056 = CBS 188 88, IBT 4112 = CBS 109581 = CCF 1875, IBT 5460, IBT 5553 = CBS 109580, IBT 5555, IBT 11735 = CBS 109579, IBT 13030 = CBS 411 92, IBT 14409 = CBS 109578, IBT 20212 = CBS 875 95, IBT 20213, IBT 21503 = CBS 131 89, IBT 24696 = IMI 389475, IBT 24768, IBT 26460 = LJC 319, IBT 26466 = LJC 517.
<i>P. hirsutum</i>	IBT 3061, IBT 3096, IBT 10623 = CBS 110101 = CCF 1445, IBT 10624 = CBS 110100 = NRRL 999, IBT 10702 = CCM F-240, IBT 12398 = CBS 349 75, IBT 13033 = CBS 437 92, IBT 18398 = CBS 110098 = CCRC 32022, IBT 19340 = CBS 110099 = FRR 3642, IBT 21531 = CBS 135 41, IBT 22221 = CBS 112318.
<i>P. hordei</i>	IBT 3083, IBT 3084 = CBS 473 48, IBT 3097, IBT 4154 = CCF 1884, IBT 4900 = CBS 559 90, IBT 11204 = CBS 112440, IBT 11478, IBT 12904 IBT 14379, IBT 15999 = CBS 110097, IBT 16374 = CBS 110122, IBT 21532 = CBS 560 90, IBT 23013, IBT 23023 = CBS 704 68, IBT 23024 = CBS 788 70.
<i>P. radicicola</i>	IBT 3489, IBT 3491, IBT 10629, IBT 10693, IBT 10695, IBT 10696, IBT 10698 = IMI 293206, IBT 10699, IBT 11646, IBT 12914, IBT 18894, IBT 22520, IBT 22522, IBT 22526, IBT 22536.
<i>P. tulipae</i>	IBT 3458 = CBS 109555, IBT 6173 = CBS 117.433, IBT 10631 = CBS 112431, IBT 10632, IBT 10674, IBT 10676 = CBS 111217, IBT 10677, IBT 10678, IBT 10681, IBT 10684, IBT 10686, IBT 10687 = CBS 109552, IBT 11648, IBT 13029 = CBS 407 92, IBT 23036 = CBS 734 74.
<i>P. venetum</i>	IBT 3053, IBT 10655 = IMI 068783, IBT 13026, IBT 14659, IBT 16215 = IBT 16127 = CBS 110096, IBT 16308, IBT 21549 = CBS 405 92, IBT 21748, IBT 22111, IBT 22504, IBT 22730, IBT 23039 = CBS 201 57, IBT 23040 = CBS 253 96, IBT 23814 = CBS 11244.

<sup>a</sup> IBT, IBT Culture Collection, Bio Centrum DTU, Lyngby, Dinamarca; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrech, Holanda; CCF, Culture Collection of Fungi, Praga, República Checa; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Tvrdeho, República Checa; CCRC, Culture Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan; FRR, Division of Food Research, CSIRO North Ryde, Australia; IMI, International Mycological Institute, Surrey, Reino Unido; NRRL, ARS Culture Collection, Northern Utilization Regional Research Center, Peoria, Illinois, EEUU; LJC. Colección de fitopatógenos hortícolas, INTA EEA La Consulta, Argentina.

Tabla 22: Análisis de *Cluster* fenotípico y quimotaxonómico de especies de *Penicillium* Serie *Corymbifera*.

CYA: Czapek yeast agar; YES: yeast extract sucrose; OA: oat agar; Comb. Los tres medios combinados.

Especie	Medio	Coef.	TSt (St/Aln/Out) <sup>a</sup>	Coef.	TSt (St/Aln/Out) <sup>a</sup>
<i>P. albocoremium</i>	CYA	0.79	15 (15/0/0)	0.87	10 (10/3/0)
	YES	0.835	15 (13/0/2)	0.938	10 (10/1/0)
	OAT	0.95	15 (13/0/2)	0.893	10 (10/3/0)
	Comb.	0.965	15 (13/7/2)	0.989	15 (15/0/0)
<i>P. allii</i>	CYA	0.88	15 (8/0/7)	0.937	10 (6/0/4)
	YES	0.815	15 (14/0/1)	0.894	10 (10/0/0)
	OAT	0.93	15 (12/0/3)	0.938	10 (7/0/0)
	Comb.	0.88	15 (15/17/0)	0.847	15 (15/0/0)
<i>P. hirsutum</i>	CYA	-	grupos pequeños	0.906	10 (10/0/0)
	YES	0.82	11 (10/0/1)	0.842	10 (10/0/0)
	OAT	0.72	11 (5/1/6)	0.966	10 (6/0/4)
	Comb.	0.947	11 (6/0/5)	0.898	11 (11/0/0)
<i>P. hordei</i>	CYA	0.7	15 (11/1/4)	0.988	10 (10/0/0)
	YES	0.9	15 (15/0/0)	0.978	10 (8/0/2)
	OAT	0.84	15 (12/0/3)	0.97	10 (6/1/4)
	Comb.	0.945	15 (9/1/6)	0.907	15 (15/0/0)
<i>P. radicicola</i>	CYA	0.89	15 (8/0/7)	0.978	10 (10/1/0)
	YES	0.915	15 (6/0/0)	0.962	10 (10/0/0)
	OAT	0.91	15 (13/0/2)	0.985	10 (10/0/0)
	Comb.	0.93	15 (14/16/1)	0.993	15 (15/0/0)
<i>P. tulipae</i>	CYA	0.91	15 (11/0/4)	0.98	10 (10/0/0)
	YES	0.826	15 (7/3/8)	1	10 (10/0/0)
	OAT	0.906	15 (14/0/1)	0.995	10 (10/0/0)
	Comb.	0.93	15 (15/15/0)	0.995	15 (15/0/0)
<i>P. venetum</i>	CYA	-	grupos pequeños	0.98	10 (7/0/3)
	YES	0.825	14 (13/1/1)	0.89	10 (9/2/1)
	OAT	0.904	14 (14/0/0)	0.94	10 (6/0/4)
	Comb.	0.88	14 (14/17/0)	0.97	14 (14/0/0)

<sup>a</sup> TSt: número total de aislamientos por especie; St: número de aislamiento por *cluster*; Aln: número de aislamientos extraños en el *cluster*; Out: número de aislamientos de especies consideradas *outliers* en el *cluster*.

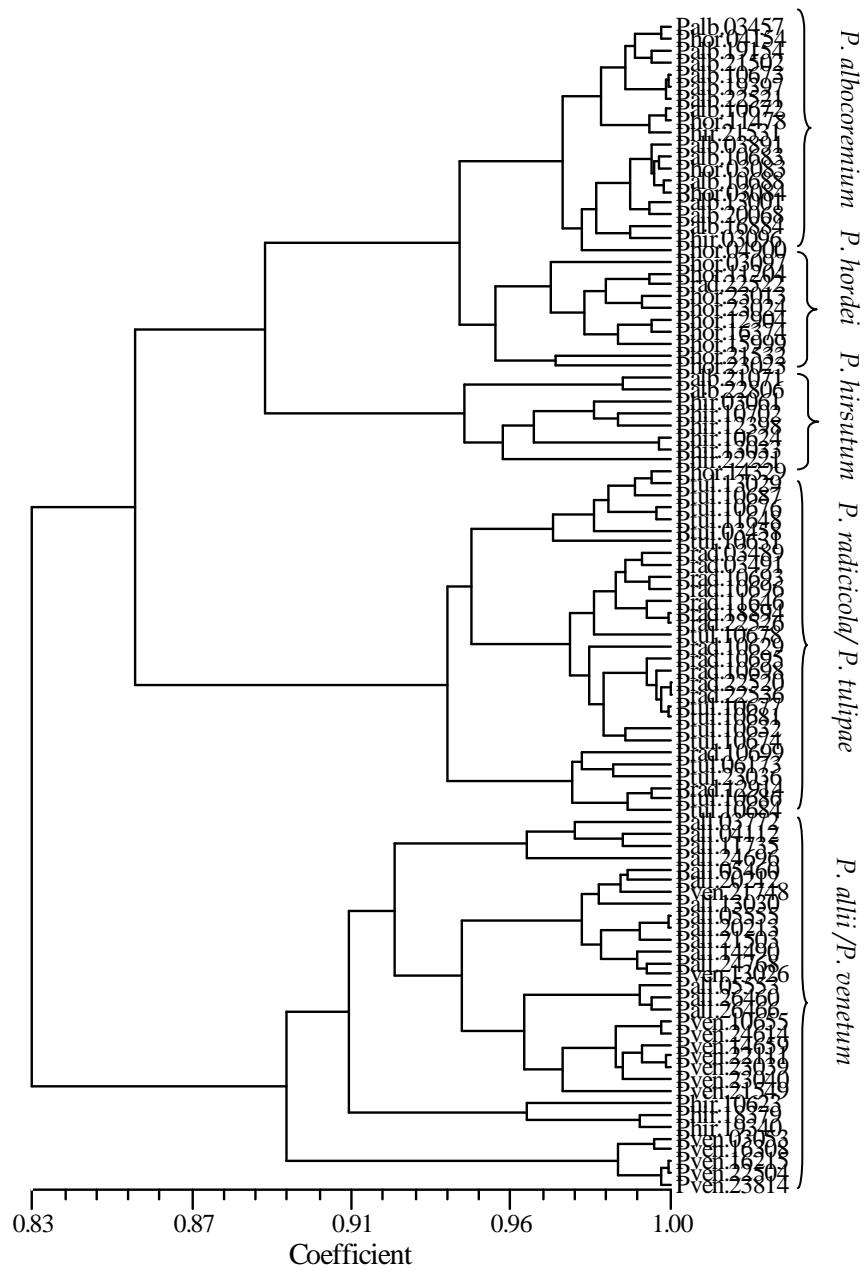


Figura 45: Clasificación de aislamientos de *Penicillium* Serie *Corymbifera* en medios de cultivo estándares.

El análisis de *cluster* se realizó sobre la distancia euclídea de la configuración consenso observada en análisis de procrustes a partir del análisis de coordenadas principales registradas en tres medios de cultivo: CYA, YES y OA.

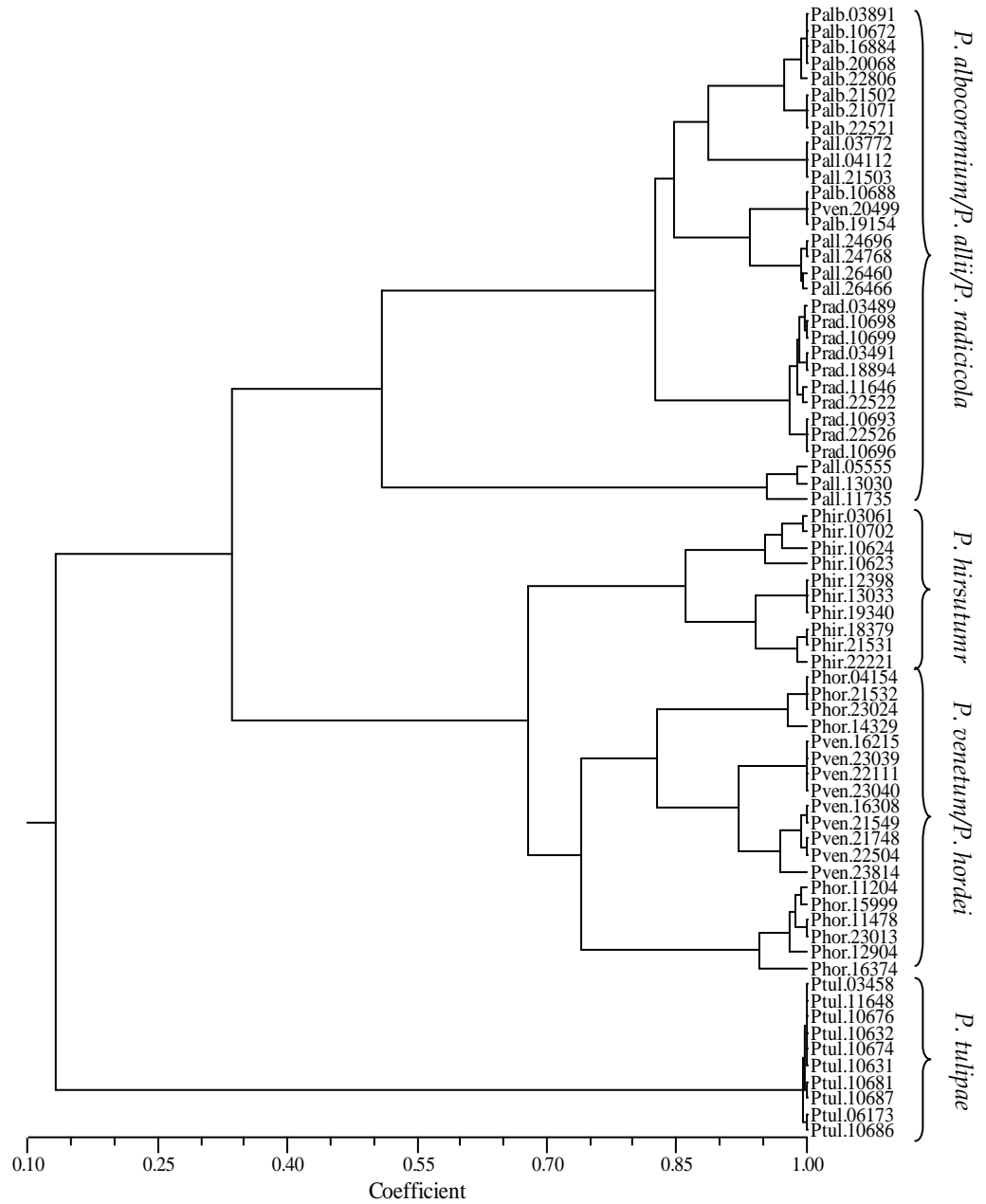


Figura 46: Clasificación de cepas de la Serie *Corymbifera* por análisis de cluster basados en producción de metabolitos secundarios en tres medios de cultivo (CYA, YES y OA). Se utilizó el coeficiente de Yule para la generación de la matriz de similitud.

La identificación de metabolitos secundarios por HPLC demanda de personal calificado y equipamiento costoso a diferencia del uso de TLC que permite obtener resultados satisfactorios. Todos los miembros de la serie *Corymbifera* presentaron un perfil diferente y distintivo empleando esta técnica (Figura 47).

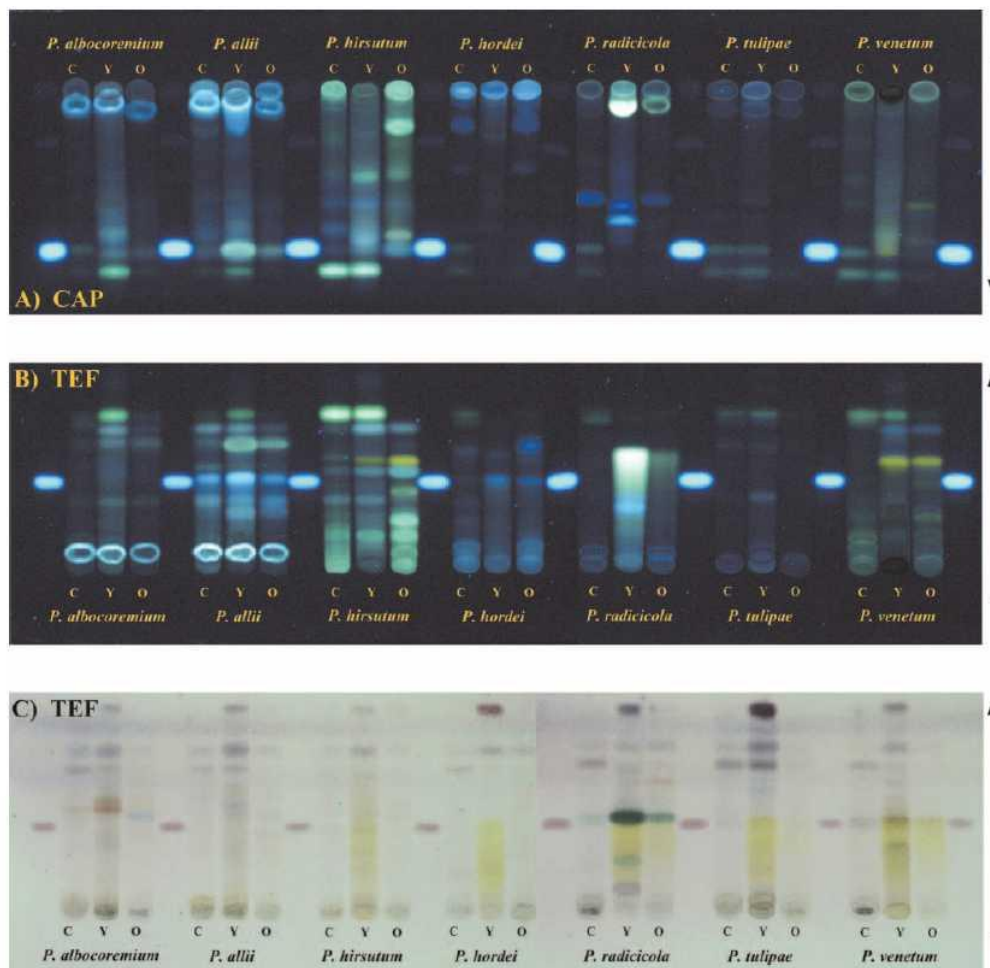


Figura 47: Perfil de metabolitos secundarios en TLC presentado por las especies de la Serie *Corymbifera* en diferentes medios de cultivo.

Se utilizó como referencia *Griseofulvina* (carril 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25 y 29). La flecha indica la dirección del flujo del solvente. A) Revelado en CAP (diclorometano-acetona-isopropanol; 85:15:20) y visto en UV (365 nm); B) Revelado en TEF (Tuoleno-Acetato de etilo-Ácido fórmico (90%); 5:3:2) y visto en UV (365 nm); C) Revelado en TEF y pulverizado con *p*-anisaldehído en etanol-ácido acético-ácido sulfúrico (17:2:1) y calentado por 10 min a 130 °C.

### VII.3 Clasificación de *Penicillium* spp. Serie *Corymbifera* por secuencias génicas.

Debido a que muy pocos genes están secuenciados, la información que se tiene es parcial para una clasificación detallada en organismos muy cercanos, como lo son los hongos del subgénero *Penicillium*, siendo más adecuada entonces la clasificación por metabolitos secundarios, perfiles que arrojan una gran cantidad de información. Con el objetivo de graficar este punto, se presentan en la Tabla 23 las secuencias obtenidas del gen de la beta tubulina de las siete especies de *Penicillium* incluídas en la Serie *Corymbifera*. Las secuencias fueron obtenidas del *genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se sometieron a alineamiento múltiple con el software ClustalW v1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/>). Todos los hongos de los cuales se obtuvieron las secuencias son de origen conocido, de cultivos depositados en la colección CBS y fueron publicadas por Samson *et al.* (2004).

De 408 nucleótidos analizados, hubo homología en 327 y diferencias en 81. Se calcularon las distancias genéticas entre las especies (Tabla 24) usando el coeficiente de Jukes & Cantor (1969) que usa nucleótidos codificados. Con esta matriz de distancia, se realizó un análisis de *clusters* usando el método *neighbour joining* (NJ) con el software NTSyS v 2.1. El método NJ ha mostrado en trabajos

Tabla 23: Secuencias del gen de la  $\beta$  tubulina de *Penicillium* Serie *Corymbifera*.

Alineamiento múltiple (ClustalW v1.83 - <http://www.ebi.ac.uk/>) de regiones parciales del gen de la  $\beta$ tubulina pertenecientes a las especies incluídas en la Series *Corymbifera*: *Penicillium albocoremium*, (CBS 109582, AY674327); *Penicillium allii*, (CBS 18888, AY674333); *Penicillium hirsutum*, (CBS 110100, AY674330); *Penicillium hordei*, (CBS 70468, AY674346); *Penicillium radicumicola*, (CBS 109551, AY674359); *Penicillium tulipae*, (CBS 111217, AY674343); *Penicillium venetum*, (CBS 20157, AY674335). AY6743## = Acceso en el *genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). \*: indica homología total en las siete especies. Todas las secuencias publicadas por Samson *et al.* (2004)

Especie	Secuencia
<i>P. albocoremium</i>	GCCGAGCTTTTTTTTTTTT--CGCGTGGGATCAATTGACAGGTTACTAACTGGA-TTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAG
<i>P. allii</i>	GCCGAGCTTTTTTTTTTTT---CGCGTGGGATCAATTGATAGGTTACTAACTG-A-TTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAG
<i>P. hirsutum</i>	GCCGAGCTTTTTTTCTT---CGCGTTGG-GATCAATTGACAGGTTACTAACTGGAGTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAG
<i>P. hordei</i>	GCTGAGCTTTTTTTTTTTTCCCGCGTGGGTATCAATTGACAGGTTGCTAACTGGA--TTCAGGCAAACCATCTCTGGCGAG
<i>P. radicumicola</i>	GCCGAGCTTTTTTTTTTTT---CGCGTGGGATCAATTGACAGGTTACTAACTG-A-TTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAG
<i>P. tulipae</i>	GCCGAGCTTTTTTTTTTTT--CGCGTGGGATCAATTGACAGGTTACTAACTGGA-TTACAG-CAAACCATCTCTGGCGAG
<i>P. venetum</i>	GCCGAGCTTTTTTTTTTTT---CGCGTGGG-TATCAATTGACAGGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAG
Homología	** ***** * **** *
<i>P. albocoremium</i>	CACGGTCTCGATGGCAATGGACAGTAAGTTTTAACTGTGATGGGAGTTTCCGGTGGATCACACGTCTGATATCTTGTCTAGGT
<i>P. allii</i>	CACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTA-CTGTGATGGAGGTTTCCGGTGGATCACACGTCTGATATCTTGTCTAGGT
<i>P. hirsutum</i>	CACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACTGTGATGGGAGTTTCCGGTGGATCACACGTCT-GTATCTTGTCTAGGT
<i>P. hordei</i>	CACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACTG-GATGGGAGTTTCCGGTGGATCACACGTCTGATATCTTGTCTAGGT
<i>P. radicumicola</i>	CACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTA-CTATGATGGGAGTTTCCGGTGGATCACACGTCTGATATCTTGTCTAGGT
<i>P. tulipae</i>	CACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACTGTGA-GGGGTTTCCGGTGGATCACACGTCTGATATCTTGTCTAGGT
<i>P. venetum</i>	CACGGCC-CGATGGTGGATGGACAGTAAGTTTTAACTGGTGGAGGTTTCCGGTGGATCACACGTCT-ATATCTTGTCTAGGT
Homología	**** * ***** ***** * * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
<i>P. albocoremium</i>	ACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGCTACTTCAACCATGTGAGTCCAATGACTGGAAACCGAATAAT
<i>P. allii</i>	ACAATGGTACC-CCGACCTCCAGCTCGAACGTAACGCTACTTCAACCATGTGAGTCCAATGACTGGAA-CCGAATAAT
<i>P. hirsutum</i>	ACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGCTACT-TAACCATGTGAGTCCAACGACTGGAAACCGAATAAT
<i>P. hordei</i>	ACAATGGTACCTCCG-CCCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGCTACTTCAACCATGTGAGTCCAACGACTGGAAACC-AATAAT
<i>P. radicumicola</i>	ACAATGGTACC-CCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGCTACTTCAACGAGGTGAGTCCAACGACTGGAA-CCGAATAAT
<i>P. tulipae</i>	ACAATGGTACC-TCCGACCCAGCTCGAGCGTATGAACGCTACTTCAACGAGGTGAGTCCAACGACTGGAA-ACCGAATAAT
<i>P. venetum</i>	ACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGCTACT-CAACCATGTGAGTCCAACGACTGGAAACCGAATAAT
Homología	***** * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
<i>P. albocoremium</i>	CGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCTTTGATAAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTTCGAT
<i>P. allii</i>	CGTGCATCATCTGATCAGATGTTTTCTTTGATAAATCTAGGCCAGTGGT-ACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTTCGAT
<i>P. hirsutum</i>	CGTGCATCATCTGATCGGATGTTTT-CTTTGATAAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTTCGAT
<i>P. hordei</i>	CGTGCATCATCTGATCGGATGCTT--CTC--ATAAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTA-GTTCCCGTGCCGTTCTCGTTCGAT
<i>P. radicumicola</i>	CGTGCATCATCTGATCGGAGTTTTCTTTGATAAATCTAGGCCAGCGGT-ACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTTCGAT
<i>P. tulipae</i>	CGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCTTTGATAAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGT-CGTTCCCGTTCCCGTTCTCGTTCGAT
<i>P. venetum</i>	CGTGCATCATCTGATCGGATGTTT--CTTTGATAAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTTCGAT
Homología	***** ***** * * * * * * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
<i>P. albocoremium</i>	TTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCAACTTCGTTTTCCGGTCA
<i>P. allii</i>	TTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTC-GTTCCGGTCCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCAACTTCGTTTTCCGGTCA
<i>P. hirsutum</i>	TTG-AGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCA-AACTTCGTTTCGGTCA
<i>P. hordei</i>	TTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGG-CCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCAACCTTCGTTTCGGTCA
<i>P. radicumicola</i>	TTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTC-GCTCCGGTCCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCAACTTCGTTTCGGTCA
<i>P. tulipae</i>	TTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTC-CGCTCCGGTCCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCAACTT-GTCTTCGGTCA
<i>P. venetum</i>	TTG-AGCCCGGTACCATGGATGCTGTCCGCTCCGGTCCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGCA-AACTTCGTTTCGGTCA
Homología	** ***** ***** ***** * * * * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Tabla 24: Distancia genética de *Penicillium* Serie *Corymbifera*

Matriz de distancia obtenida con el software NTSyS (v2.11) usando la distancia de Jukes & Cantor (1969) para secuencias del gen de la beta globulina. Esta distancia asume que las variables son secuencias de nucleótidos de ADN (con los tipos de bases codificados numéricamente según A=1, C=2, G=3 y T=4).

Palbo= *P. albocoremium*; Palli= *P. allii*; Phirs= *P. hirsutum*; Phord= *P. hordei*; Pradi= *P. radicina*; Ptuli= *P. tulipae*; Pvene= *P. venetum*; Pcycl= *P. cyclopium*. Mismos aislamientos de la Series *Corymbifera* que en Tabla 21; *P. cyclopium* NRRL 1888 (AY654874); secuencia publicada por Sholberg *et al.* (2005).

	Palbo	Palli	Phirs	Phord	Pradi	Ptuli	Pvene	Pcycl
Palbo	0.0000							
Palli	0.0435	0.0000						
Phirs	0.0560	0.0740	0.0000					
Phord	0.0510	0.0870	0.0897	0.0000				
Pradi	0.0535	0.0485	0.0844	0.0870	0.0000			
Ptuli	0.0485	0.0844	0.0870	0.0765	0.0560	0.0000		
Pvene	0.0535	0.0792	0.0410	0.0844	0.0844	0.0844	0.0000	
Pcycl	1.1772	1.1772	1.2237	1.2606	1.2237	1.2481	1.2001	0.0000

Tabla 25: Matriz de distancia genética según frecuencias de metabolitos

Distancia de Nei (Nei 1972) para frecuencias observadas (en este caso la frecuencia se tomó como la capacidad de cada especie de producir determinado metabolito) estimada con el software NTSyS (v2.11). Datos tomados de (Overy *et al.* 2005b). Palbo= *P. albocoremium*; Palli= *P. allii*; Phirs= *P. hirsutum*; Phord= *P. hordei*; Pradi= *P. radicina*; Ptuli= *P. tulipae*; Pvene= *P. venetum*; Pcycl= *P. cyclopium*.

	Palbo	Palli	Phirs	Phord	Pradi	Ptuli	Pvene
Palbo	0.0000						
Palli	0.3478	0.0000					
Phirs	0.7426	0.6181	0.0000				
Phord	1.4387	1.3432	0.5129	0.0000			
Pradi	0.4275	0.5841	0.7465	1.5164	0.0000		
Ptuli	1.9558	2.0674	2.2470	1.7371	1.2182	0.0000	
Pvene	0.9431	0.9191	0.4268	0.4039	0.9218	1.8195	0.0000

simulados que produce árboles filogenéticos más precisos que el método UPGMA (Kim *et al.* 1992).

Como *outgroup* se usó a la especie *P. cyclopium*, utilizando una secuencia publicada por (Sholberg *et al.* 2005). El resultado se presenta en la Figura 48.

Para comparar con datos producidos por metabolitos secundarios, se tomaron datos donde se evalúa la capacidad de cada especie de producir determinado metabolito y se calculó la frecuencia. Con este dato se estimó la distancia genética entre los miembros de la Serie *Corymbifera* (Tabla 25) para construir un dendograma basado en el método *Neighbour Joining* (Figura 49). Se observa en este caso un árbol de mayores diferencias, mayor poder discriminativo que aquél sólo basado en secuencias. Sin embargo, los datos presentados en las secuencias del gen de la beta globulina, muestran que es posible diseñar cebadores específicos para estas especies. Ello puede deberse a que no se encontraron parálogos de este gen en las secuencias analizadas (Samson *et al.* 2004). Sin embargo, al momento de la realización del trabajo presentado en este capítulo, el trabajo de Samson *et al.* (2004) se encontraba en prensa, contándose únicamente con datos de la región ITS. En esas secuencias no se observan prácticamente diferencias entre cinco diferentes individuos de la Serie *Corymbifera* (Tabla 26). En este análisis se observó que *P. hirsutum* es el que

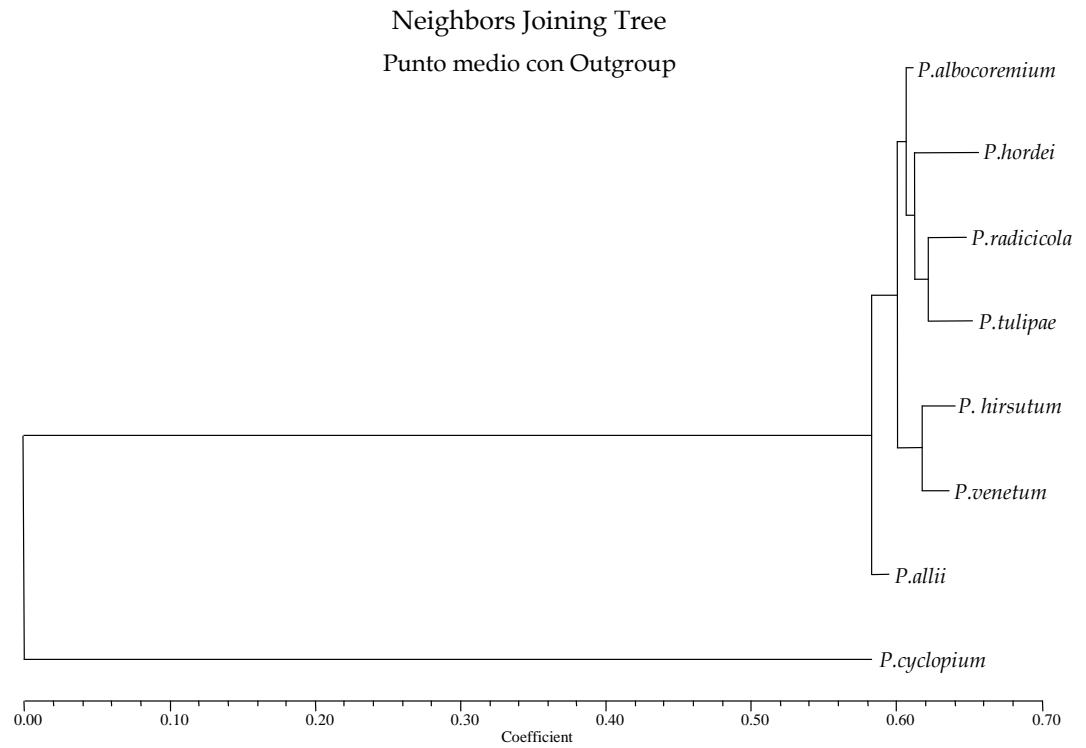


Figura 48: Dendograma mostrando las diferencias genéticas en *Penicillium* Serie *Corymbifera*.

### NJ según Metabolitos Secundarios.

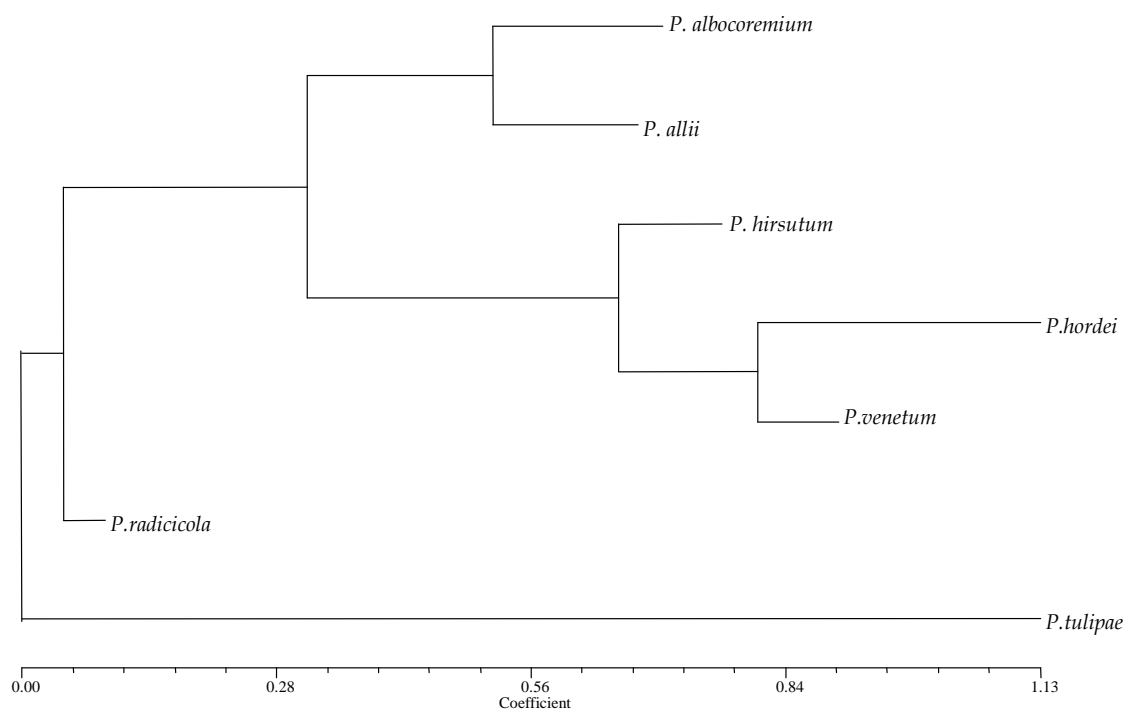


Figura 49: Dendrograma (*Neighbour joining method*) sólo de las especies de la Serie *Corymbifera* estimado por frecuencias de 43 metabolitos secundarios.

a mayor distancia se encuentra de las otras especies, no existiendo diferencias entre *P. allii* y *P. albocoremium*. *P. hordei* presenta un nucleótido distinto a este grupo (inserción en 378) y *P. venetum* una sustitución en 74 (marcados en Tabla 26). De los 528 nucleótidos de la secuencia analizados, *P. hirsutum* presenta 45 diferencias con el grupo formado por las otras cuatro especies.

El uso de secuencias de la beta tubulina parecería adecuado para la identificación de *Penicillia* Series *Corymbifera* pero no lo es en general para cualquier hongo del subgénero *Penicillium*, según se ha expresado en I.2.2.4 con respecto a la igualdad de secuencias entre las especies *P. freii*, *P. neoechinulatum* y *P. viridicatum*; *P. confertum* y *P. mononematosum*; y *P. camemberty* y *P. caseifulvum* (Samson *et al.* 2004). Asimismo, el árbol filogenético obtenido con las secuencias del gen de la beta tubulina no es adecuado. *Penicillium allii*, por ejemplo, queda separado de *P. albocoremium*, siendo que los dos son patógenos en *Allium sp.* (lo que sugiere un proceso coevolutivo, y por ende, un mayor parecido genético). El árbol obtenido por análisis de metabolitos secundarios tampoco es adecuado, porque se partió del supuesto que se analizaban frecuencias génicas, cuando esto no está demostrado, debido a que la codificación de metabolitos secundarios estaría dada por genes en *clusters* y la evolución de los genes en *clusters* tiene lugar a través de herencia vertical u horizontal (Sidhu 2002). Para la realización de una filogenia completamente resuelta en levaduras, se ha sugerido el análisis de al menos 30 genes (Rokas *et al.* 2003).

Tabla 26: Secuencias de ITS de *Penicillium* Serie *Corymbifera*.

Alineamiento múltiple (ClustalW v1.83 - <http://www.ebi.ac.uk/>) de regiones del ITS pertenecientes a especies incluidas en la Series *Corymbifera*: *Penicillium albocoremium*, [AJ004819]; *Penicillium allii*, [AJ005484]; *Penicillium hirsutum*, [FRR 2032, AY373918 (Haugland *et al.* 2004)]; *Penicillium hordei*, [U27453 (Bainbridge 1995)]; *Penicillium venetum*, (IBT 5464, AJ005485). Accesiones AJ00#### por Skouboe *et al.* (1999) Secuencias obtenidas de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. \*: indica homología total en las cinco especies.

```

P.albocoremium -----CATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA
P.hordei -----CCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA
P.allii GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA
P.venetum GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA
P.hirsutum -----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCA
*****

P.albocoremium ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTACTGGCCGCCGGGGGCTCACGCCCCCG
P.hordei ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTACTGGCCGCCGGGGGCTCACGCCCCCG
P.allii ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTACTGGCCGCCGGGGGCTCACGCCCCCG
P.venetum ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTACTGGCCGCCGGGGGCTCACGCCCCCG
P.hirsutum ACCTCCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCA-CGGCCGCCGGGGGCTCTGCCCTCT
*****

P.albocoremium GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACCTGTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAAATAAAATATTTTAAACT
P.hordei GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACCTGTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAAATAAAATATTTTAAACT
P.allii GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACCTGTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAAATAAAATATTTTAAACT
P.venetum GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACCTGTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAAATAAAATATTTTAAACT
P.hirsutum GGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCATTGAACGCTGTCTGAAGATTGAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAGTTAAACT
*****

P.albocoremium TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA-AATTC
P.hordei TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA-AATTC
P.allii TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA-AATTC
P.venetum TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA-AATTC
P.hirsutum TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAATTC
*****

P.albocoremium AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
P.hordei AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
P.allii AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
P.venetum AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
P.hirsutum AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
*****

P.albocoremium CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATTCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCCG
P.hordei CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATTCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCCG
P.allii CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATTCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCCG
P.venetum CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATTCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCCG
P.hirsutum CCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCCTGCTCC--TTCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCCG
*****

P.albocoremium GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCT-GTAGGCCCGCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
P.hordei GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCT-GTAGGCCCGCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
P.allii GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCT-GTAGGCCCGCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
P.venetum GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCT-GTAGGCCCGCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
P.hirsutum GTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTCTCCGCTTTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGATCAACCAATCAATCTTT
*****

P.albocoremium TATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
P.hordei TATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
P.allii TATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
P.venetum TATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
P.hirsutum TTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG-----
* * *****

```

## **VIII: Análisis de patogenicidad de cepas con agresividad diferencial de *Penicillium allii* en medios de cultivo con extracto fresco de ajo**

### *VIII.1 Introducción*

El ajo está afectado por cepas del hongo *P. allii* que produce importantes pérdidas si el diente “semilla” no se cura antes de plantar. Se han aislado y caracterizado patogénicamente cepas de diferente agresividad de *P. allii* (Capítulo V de esta tesis) en ensayos a campo. El análisis de los datos mostró que el medio GSA no fue adecuado para la separación de cepas de diferente agresividad (Tabla 16). En esa misma tabla, se observa, sin embargo, que se pudo discriminar entre aislamientos de las razas 2 y 4 (menos y más agresivo, respectivamente) cuando se inocularon bulbillos del clon Castaño INTA con un IVD del 70%. Para clasificar nuevas cepas de *P. allii* de acuerdo a su agresividad se debería entonces obtener bulbillos del clon Castaño INTA, medir el IVD y realizar la inoculación cuando éste llegue a un promedio del 70%. Esta aproximación demanda disponer de este cv. en la cantidad suficiente y en el momento justo, situación que no siempre es posible. Realizar un estudio a campo es costoso, pero presenta la ventaja de poder usar al menos cualquiera de los clones Fuego INTA o Castaño INTA.

En este sentido, el restringir el análisis a un ensayo *in vitro* presenta muchas ventajas: disponibilidad de realización en cualquier época del año; costo comparativamente menor; obtención de resultados en pocos días. La realización de ensayos con extracto fresco de ajo del clon Fuego INTA mostró diámetros asociados a la patogenicidad del aislamiento (LJC 543, Raza 4, 32.8 mm; LJC 542, Raza 3, 25.8 mm, Tabla 20), mientras en extracto fresco del clon Castaño INTA el aislamiento LJC 542, menos agresivo, no desarrolló. El clon Castaño INTA presenta mayor tolerancia a la infección por *Penicillium allii* que el clon Fuego INTA (Cavagnaro *et al.* 2005, Capítulo V de esta tesis). Esta observación presenta al menos dos conjeturas: 1) en extracto de ajo fresco se mantienen sustancias fungistáticas no presentes en extracto acuoso de ajo en polvo y 2) el diámetro alcanzado en medios de cultivo está en relación inversa a la agresividad de los aislamientos inoculados.

### VIII.3 Objetivo

- Relacionar el diámetro alcanzado en medios de cultivo con extracto fresco de ajo y la agresividad de aislamientos de *P. allii*.

#### *VIII.4 Hipótesis*

Los hongos de la especie *P. allii* comprendidos en el la raza más agresiva presentarán diámetros en medio de cultivo suplementados con extracto de ajo significativamente mayores a los alcanzados por especímenes de la raza menos agresiva.

#### *VIII.5 Materiales y métodos*

##### *VIII.5.1 Aislamientos utilizados*

Los aislamientos seleccionados fueron: LJC159, LJC178 y LJC517 de la raza agresiva 2; LJC280, LJC346 y LJC452 de la raza agresiva 3 y LJC029, LJC079 y LJC119 de la raza agresiva 4.

Estos aislamientos se seleccionaron debido a que presentaban valores en las variables peso de bulbos a cosecha y emergencia estrechamente cercanos al valor promedio de la raza.

##### *VIII.5.2 Obtención del inóculo*

Se realizaron cultivos frescos en medio CYA. Se obtuvieron suspensiones que se ajustaron a la solución de trabajo ( $2,5 \times 10^7$  con.mL<sup>-1</sup>) usando el método de Valdez y Piccolo (2006). Se colocaron 100 µL en cajas de Petri para obtener

discos conteniendo 25.000 conidios (según el procedimiento presentado en la Figura 16).

### VIII.5.3 Preparación del medio de cultivo e inoculación

Se preparó extracto fresco del clon Castaño INTA y del clon Fuego INTA según la metodología citada en VI.3. El extracto de ajo se obtuvo cuando los ajos cumplieron un IVD del 70% y se almacenó a -20 °C. El extracto de ajo así obtenido presentaba un color más claro que el obtenido de polvo de ajo pero un olor más fuerte (al finalizar el periodo de cultivo *in vitro*, todavía se apreciaba un fuerte olor a ajo en las cajas de Petri). Se hicieron tres inoculaciones por caja de Petri, con tres cajas de Petri por aislamiento. El experimento se realizó dos veces, una en 2005 y otra en 2006. Se llevó un control positivo (inoculaciones en CYA - 2005- y CYA y YES -2006) y un control negativo (inoculaciones con el vehículo donde se suspendieron las esporas -agar detergente-). Las cajas se incubaron a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  a la oscuridad e invertidas, durante 7 días. Se tomaron los diámetros con un calibre digital. Debido a que los datos no eran normales, éstos se analizaron por la prueba de rangos de Kruskal y Wallis (1952) con el software Infostat (v 1.1).

### VIII.6 Resultados y Discusión

Los datos de los diámetros de las colonias no permitieron distinguir a la raza 3 de las otras dos en ningún experimento (Tabla 29). Se observaron diferencias significativas en ambos años entre las razas 2 y 4 en el medio GfSA adicionado con extracto de ajo del clon Castaño INTA y en 2005 para las inoculaciones realizadas en el medio suplementado con extracto de ajo fresco del clon Fuego INTA.

Este experimento puso de manifiesto que el medio suplementado con extracto fresco de ajo discrimina aislamientos muy agresivos de poco agresivos por el diámetro alcanzado por la colonia, confirmando la hipótesis planteada. Estos resultados abren posibilidades para enfrentar estudios de nivel molecular usando un modelo *in vitro* en el patosistema *Penicillium allii* - ajo.

Tabla 27: Relación entre diámetros y razas agresivas

Diámetros alcanzados por discos conteniendo 25.000 conidios de los aislamientos LJC159, LJC178 y LJC517 de la raza agresiva 2 (R2); LJC280, LJC346 y LJC452 de la raza agresiva 3 (R3) y LJC029, LJC079 y LJC119 de la raza agresiva 4 (R4, entre paréntesis el desvío estándar). GfSAC y GfSAF: Medio de cultivo adicionado con extracto fresco de ajo de los clones Castaño INTA (C) y Fuego INTA (F). Prueba de rangos de (Kruskal & Wallis 1952) para comparar los diámetros alcanzados en los distintos medios de cultivo en cada experimento (comparaciones hechas en el sentido de las filas). Letras distintas indican diferencias significativas (\*,  $P \leq 0.05$ ); NS = No significativas.

Experimento	Medio	R2	R3	R4	P
1	GfSAC	15.9 (2.2) a	17.9 (1.8) ab	21.7 (1.8) b	*
	GfSAF	18.9 (2.4) a	23.7 (2.7) ab	25.9 (1.0) b	*
	CYA	27.4 (1.3)	32.2 (0.8)	30.1 (1.3)	NS
2	GfSAC	24.6 (3.8) a	25.9 (2.2) ab	27.8 (3.0) b	*
	GfSAF	25.4 (5.4)	27.9 (1.9)	27.7 (3.8)	NS
	CYA	29.6 (1.0) ab	32.0 (1.5) b	29.1 (1.1) a	*
	YES	30.7 (1.5)	30.8 (1.8)	30.5 (3.3)	NS

## **IX. Discusión General**

La taxonomía del género *Penicillium* continúa siendo complicada, pese a los numerosos esfuerzos que se han hecho para facilitarla. Después de tres grandes reuniones a nivel mundial de taxónomos especialistas en los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, (Samson & Pitt 1985b, 1990, 2000) y pese a que se piense que cualquiera puede identificar *Penicillium* con los nuevos métodos disponibles (Seifert 2004), llegar a la identificación al nivel de especie no resulta sencillo.

Es sin duda importante la observación de las características de las colonias en medios de cultivo, pero esta aproximación, por sí sola, lleva a confusiones en la identificación. La observación al microscopio muchas veces no soluciona el problema.

Como resultado del proceso de identificación de los hongos del género *Penicillium* aislados de ajo en las provincias de Mendoza y San Juan, y más allá de toda duda razonable, podemos decir que sólo *Penicillium allii* Vincent & Pitt es el agente causal del moho azul en esta región. La documentación referente a la especie *Penicillium viridicatum* Westling citada anteriormente como patógena en el área (Gatica & Oriolani 1984), se ajusta a la descripción de *P. allii*, sobre todo por la producción de un exudado amarillo. En esos momentos, el agente causal de la enfermedad era reconocido como *P. hirsutum* Dierckx, el que presenta un exudado rojo-amarronado y que la taxónoma del CABI descartó, justamente por no producir exudado de ese color. La identificación total de las

seis especies de *Penicillium* aisladas de ajo (*P. allii*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. flavigenum* y *P. phoeniceum*) se determinó finalmente por análisis morfológico corroborado por la producción de metabolitos secundarios propios de cada una (Figura 28). Si bien *P. chrysogenum* (Abel Al *et al.* 1991, Ge *et al.* 2001) y *P. aurantiogriseum* [citado como *P. cyclopium* en Smalley y Hansen (1962) y Mazur (1990), sinonimia aceptada en ese momento pero no en la actualidad (Frisvad & Samson 2004)], se han determinado como patógenos en ajo, la determinación en estos trabajos está basada únicamente en criterios morfológicos. La reciente asignación a *P. hirsutum* como patógeno en la zona (Cavagnaro *et al.* 2005) fue basada en una identificación morfológica del CABI Biosciences. Ese aislamiento está depositado en nuestra colección bajo el número LJC 545 y muestra las características propias de *P. allii*.

El empleo de un medio basado en extracto de ajo fue robusto desde un punto de vista estadístico para agrupar la especie *P. allii* frente a las otras especies en medios estándares (Figuras 41 y 42) y resumió el fenotipo de la misma. Agrupaciones fragmentadas desde un punto de vista estadístico se observaron también en los análisis basados en morfología de *Penicillium* Serie *Corymbifera* frente a aquellos basados en metabolitos secundarios (Figuras 45 y 46). Esta técnica mostró su confiabilidad para agrupar por su perfil metabólico

especies relacionadas, algo similar a lo ocurrido cuando se hicieron análisis de secuencias publicadas del gen de la  $\beta$ -globulina. Para esta Serie, ambas aproximaciones parecen adecuadas para la identificación a nivel de especie.

Por otro lado, la creación del medio GSA fue con la intención de asociar la patogenicidad del aislamiento con el diámetro alcanzado por la colonia, basado en un razonamiento evolutivo: debido a que al ajo se le conocen numerosas sustancias fungitóxicas que aún son activas en medios suplementados con extracto de ajo obtenido de polvo (Krest & Keusgen 1999a), sólo aquellas especies que posean la maquinaria genética adecuada serán capaz de romper con las numerosas sustancias inhibidoras o fungitoxicas que hacen a la defensa bioquímica preexistente o a la defensa metabólica inducida por el ataque de los patógenos en las relaciones huésped patógeno [para una revisión ver Nicholson & Hammerschmidt (1992), Hutcheson (1998), Martin *et al.* (2003)]. Estas relaciones son producto de un proceso coevolutivo entre los actores involucrados, planteado originalmente en el concepto de gen a gen de Flor (1942, 1955) y estudiado muy profundamente en algunos patosistemas (Guzmán *et al.* 1995, Geffroy *et al.* 1999, Bishop *et al.* 2000, Thrall & Burdon 2002). Los análisis de patogenicidad realizados mostraron que el uso de extracto obtenido de polvo de ajo no presentaba una alta correlación con lo observado a campo. Un resultado distinto se observó en medios suplementados con extracto

obtenido de ajos frescos con un IVD del 70-80%, lo que abre todo un nuevo panorama para la disección molecular del patosistema ajo-*Penicillium*. Sin embargo, el fenotipo presentado por *P. allii* en un medio de cultivo formulado a base de extracto acuoso filtrado de ajo, es único, tal vez producto de esa presión de selección ejercida por los factores fungistáticos y fungicidas del ajo. En este contexto, la afirmación de que en biología nada tiene sentido si no es bajo un prisma evolutivo (Dobzhansky 1973) cobra especial relevancia.

De manera tradicional, los datos más notables de esta tesis se obtuvieron cuando se realizó un ensayo a campo observando *in situ* el efecto del hongo. Tan lejos como sabemos, no hay referencias en *Penicillium* spp. de razas, patotipos o aislamientos con diferentes grados de patogenicidad. En nuestro caso, la existencia de tres razas de agresividad, o por lo menos dos, puede afirmarse con cierta autoridad. Datos obtenidos por otros investigadores, asignando únicamente la característica de patógeno a hongos del género *Penicillium* determinados en cámaras húmedas (Overy *et al.* 2005a) deberían ser tomados con precaución. En nuestro caso, la inoculación con el aislamiento LJC 064 no produjo bulbos con pesos distintos al testigo, aunque comenzó la infección y esporuló hasta cierto punto los bulbillos de ajo en condiciones controladas. La asignación de no patógeno a esta especie se pudo dilucidar únicamente en el ensayo a campo.

Es de esperar que las poblaciones de *Penicillium allii* incrementen sus niveles de resistencia a los fungicidas más utilizados en la actualidad, tal cual lo ya observado con benzimidazoles en una pequeña zona productora de Buenos Aires (Larreguy 1999). El carbendazim, uno de los benzimidazoles más utilizados para control en ajo, no produjo daños en el ADN de células de ovario de hamster en pruebas de genotoxicidad (Vigreux *et al.* 1998) aunque sí produjo aberraciones cromosómicas (Vigreux *et al.* 1998). Tal vez el uso indiscriminado de este fungicida induzca la producción de variantes genéticas del hongo. El disponer de una importante colección de *Penicillium allii* obtenido de diversas áreas agroclimáticas de la región podría facilitar la realización de estudios microevolutivos en un futuro, tomando nuevamente muestras en la zona de mayor abundancia de inóculo.

Aunque se conozca de la existencia de condicionamientos geográficos a la distribución de hongos (Collado *et al.* 1999), la distribución de *P. allii* en la zona parece tener una fuerte influencia antrópica, influida por el movimiento anual de ajo "semilla" entre regiones.

De los análisis realizados, se observa que los morfotipos de *Penicillium allii* permanecen en los ajos que sobrevivieron a la infección, incluso dos ciclos después que los bulbillos fueron inoculados, y almacenados bajo condiciones adversas que posibilitarían contaminaciones cruzadas. Esto lleva a asociar a

*Penicillium allii* como un patógeno transmitido por semilla, que es manipulada por agricultores, no mostrando diferencias entre zonas.

## **X. Conclusiones y perspectivas**

## X. Conclusiones y perspectivas

### *Taxonomía*

1. Las especies de *Penicillium* aisladas de ajo en las provincias argentinas de Mendoza y San Juan fueron *P. allii* Vincent et Pitt; *P. chrysogenum* Thom, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. phoeniceum* Beyma, *P. aurantiogriseum* Dierckx y *P. flavigenum* Frisvad et Samson.
2. La identificación por caracteres basados en morfología presentada en medios de cultivo estándares produce grupos heterogéneos.
3. El uso de extracto acuoso a partir de polvo de ajo presenta un fenotipo único en cada una de las especies identificadas, independientemente del número de morfotipos presentes en ellas.
4. La identificación por metabolitos secundarios produjo grupos homogéneos y separó certeramente todas las especies analizadas, tanto las encontradas en ajo como las de la Serie *Corymbifera*.

### *Fitopatología*

5. La especie *P. allii* fue la única encontrada en ajo en la región capaz de reproducir la enfermedad en el campo.

6. Deben ser realizados ensayos a campo para asignar la categoría de patógeno o no patógeno a un determinado aislamiento.
7. Las variables que mejor explican la agresividad de *P. allii* a campo son la emergencia después de los 90 d y el peso del bulbo cosechado.
8. *P. allii* se puede clasificar en tres razas de agresividad, presentándose individuos de baja, media y alta patogenicidad.
9. La agresividad de *P. allii* se puede determinar *in vitro*, usando medios de cultivo con extracto fresco de ajo.

### *Ecología*

10. La distribución de la especie *P. allii* en la región no está relacionada a variables ambientales, geográficas o agroclimáticas y tendría una fuerte influencia antrópica producida por el movimiento entre regiones de “ajo semilla” previo a la plantación.
11. El inóculo sobrevive en los tejidos de bulbos aparentemente sanos.

### *Posibles líneas de investigación derivadas de esta tesis*

- Utilizar aislamientos pertenecientes a las diferentes razas de agresividad de *Penicillium allii* para realizar estudios de expresión de metabolitos

secundarios, identificar los mismos, obtener purificados de éstos y realizar pruebas de toxicidad en ajo cultivado *in vitro* y analizar el daño tisular en hojas de reserva de ajo por microscopia electrónica de barrido.

- Una vez identificado y caracterizado el/los metabolito/s relacionados con la patogenicidad de *P. allii*, ensayar en plantas de diferentes familias botánicas cuáles pueden metabolizar este metabolito.
  - Identificar en estas plantas los genes responsables, a través de análisis de expresión diferencial para identificar transcriptos candidatos, clonarlos y secuenciarlos. Los genes que se caractericen se pueden usar para transformar ajo y obtener ajo transgénico resistente a *Penicillium allii*.
- Investigar el efecto de diferentes fungicidas en las cepas incluídas en la colección LJC en lo que hace a su distribución y niveles de resistencia. Tomar nuevamente muestras en la zona de mayor cultivo y abundancia de inóculo de *Penicillium allii* para evaluar posibles efectos microevolutivos procedentes del uso de fungicidas basados en benzimidazoles.
- Investigar en la especie *Allium ampeloprasum* var *holmense* (ajo elefante, ajo chilote) el agente causal de la podredumbre verde. Realizar aislamientos

y comparar con los conocidos de la Serie *Corymbifera*, por sus hábitos morfológicos y por la producción de metabolitos secundarios. Analizar a campo el efecto de representantes típicos de esta Serie y también de los aislados de ajo elefante. Esta es una especie de creciente interés en la región y entre los patógenos del género *Penicillium* informados se presentan *P. hirsutum*, *P. expansum* y *P. aurantiogriseum*, todas determinaciones basadas en caracteres morfológicos.

- Analizar la importancia del antibiótico TAN-1612 y la aplicación del aislamiento LJC 466 para la producción industrial del mismo.
- Evaluar el pigmento rojo oscuro producido por los aislamientos de la especie *P. phoeniceum* para su uso como colorante natural.

## XI. Bibliografía General

- Abdel Sater, M. A. & Eraky, S. A. 2002. Bulbs mycoflora and their relation with three stored product mites. *Mycopathologia* **153**(1), 33-39.
- Abel Al, H. R., Baraka, M. A., El Tobshy, Z. M. & El- Boghdady, M. M. 1991. Integrated control of postharvest garlic rot diseases. *Egyptian Journal of Agricultural Research* **69**(3), 723-734.
- Adour, L., Couriol, C., Amrane, A. & Prigent, Y. 2002. Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology* **31**(4), 533-542.
- Agrios, G. N. 1996. *Fitopatología 2da Ed.* Editorial Limusa, Mexico D.F.
- Ali, S., Ikram-ul-Haq, Qadeer, M. A. & Iqbal, J. 2002. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology* **5**(3).
- Arora, D. S. & Kaur, J. 1999. Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents* **12**(3), 257-262.
- Autrey, L. J. C., Moutia, Y. & Saumtally, S. 1996. Screening of seedlings against rust, inoculation treatment and assessment by video image analysis. *Sugar Cane* **1**, 4-10.
- Bainbridge, B. W. 1995. DNA sequence direct submission. Life Sciences Division, Kings College London, Campden Hill Road, London W8 7AH, United Kingdom. Submitted (22-MAY-1995).
- Berbee, M. L., Yoshimura, A., Sugiyama, J. & Taylor, J. W. 1995. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* **87**(2), 210-222.
- Berkson, J., Magath, T. B. & Hurn, M. 1935. Laboratory standards in relation to chance fluctuations of the erythrocyte count as estimated with the hemocytometer. *Journal of the American Statistical Association* **30**(190), 414-426.
- Bertolini, P. & Tian, S. P. 1996. Low temperature biology and pathogenicity of *Penicillium hirsutum* on garlic in storage. *Postharvest Biology and Technology* **7**(1-2), 83-89.
- Bianchi, A., Zambonelli, A., D'Aulerio, A. Z. & Bellesia, F. 1997. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. *Plant Disease* **81**(11), 1241-1246.

- Bishop, J. G., Dean, A. M. & Mitchell-Olds, T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academic of Science* **97**(10), 5322-5327.
- Böttcher, H. & Polhe, K. 1993. Die entwicklung der verschiedenen fäuleerreger während des langfristigen lagerns von knoblauch (*Allium sativum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **28**(3), 203-214.
- Brammall, R. A. 1989. Resistance to benomyl in isolates of *Penicillium* sp. causing clove decay of garlic. *Canadian Journal of Plant Pathology* **11**(4), 409-414.
- Bridge, P. D. 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterizarion of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata*. *Journal of General Microbiology* **131**, 1887-1895.
- Bridge, P. D. & Hawksworth, D. L. 1984. The API ZYM enzyme testing system as an aid to the rapid identification of *Penicillium* isolates. *Microbiological Sciences* **1**(9), 232-234.
- Bruna Vásquez, A. 1985. Identificación de *Penicillium corymbiferum* Westling causante del moho azul en ajo (*Allium sativum* L.). *Agricultura Técnica* **45**(4), 353-356.
- Bruna Vásquez, A. 2001. Ajos. 2. Técnicas de desinfección de semillas. In: *Informativo La Platina*. INIA Platina, Santiago de Chile, 2.
- Bruna Vásquez, A. & Fernandez, C. 1991. Enfermedades del ajo. In: *Primer Curso-Taller de Ajos* **28**. La Platina, 122-138.
- Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W. G. & Sogin, M. L. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of small subunit ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* **1**(3), 231-241.
- Burba, J. L. (<jburba@laconsulta.inta.gov.ar> [fecha: 07 Abril 2006]). Cuantificación pérdida por *Penicillium*. to
- Burba, J. L., Müller, J. J. V. & Casali, V. W. D. 1983. Relaciones entre el índice visual de superación de dormición (IVD) en ajo con el tamaño y posición de bulbillos. *Revista Ciencias Agropecuarias, Córdoba* **4**, 99-102.
- Burdon, J. J., Jarosz, A. M. & Kirby, G. C. 1989. Pattern and patchiness plant-pathogen interactions: Causes and Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**, 119-136.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Review* **66**(3), 447-459.
- Cammue, B. P. A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I. J., Proost, P., van Damme, E. J. M., Osborn, R. W., Guerbette, F., Kader, J. C. & Broekaert, W. F. 1995. A potent antimicrobial protein from onion seeds

- showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* **109**, 445-455.
- Canizares, P., Gracia, I., Gomez, L. A., Argila, C. M. d., Boixeda, D., Garcia, A. & Rafael, L. d. 2004. Allyl-thiosulfinates, the Bacteriostatic Compounds of Garlic against *Helicobacter pylori*. *Biotechnol. Prog.* **20**, 397-401.
- CASAFE. 2005. *Guía de productos fitosanitarios*. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, Argentina.
- Castella, G., Larsen, T. O., Cabanes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Farber, P. & Geisen, R. 2002. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology* **25**(1), 74-83.
- Cavagnaro, P. F., Camargo, A., Piccolo, R. J., Garcia Lampasona, S., Burba, J. L. & Masuelli, R. W. 2005. Resistance to *Penicillium hirsutum* Dierckx in garlic accessions. *European Journal of Plant Pathology* **112**(2), 195-199.
- Cavagnaro, P. F., Piccolo, R. J., García Lampasona, S., Masuelli, R. W. & Burba, J. L. 2000. Evaluación y caracterización de la resistencia a *Penicillium viridicatum* W. de doce monoclonos de ajo (*Allium sativum* L.). *Primeras actas. XXIII Congreso Argentino de Horticultura. 26-30 de Setiembre 2000. Mendoza. Argentina.*
- Cavallito, C. J. & Bailet, J. H. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* L. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society* **66**, 1950-1954.
- Cho, W. D., Kim, W. G. & Kim, H. M. 1995. Fungi associated with storage diseases of garlic. *RDA J. Agri Sci* **37**(2), 325-329.
- Chongo, G. & Bernier, C. C. 2000. Effects of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. *Plant Disease* **84**, 544-548.
- Chungu, C., Gilbert, J. & Townley Smith, F. 2001. *Septoria tritici* blotch development as affected by temperature, duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. *Plant Disease* **85**, 430-435.
- Ciegler, A., Fennell, D. I., Sansing, G. A., Detroy, R. W. & Bennett, G. A. 1973. Mycotoxin producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Applied Microbiology* **26**(3), 271-278.
- Cochran, W. 1972. *Técnicas de muestreo*. CECSA, Mexico.
- Collado, J., Platas, G., Gonzalez, I. & Pelaez, F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist* **144**(3), 525-532.
- Crews, D., Gore, A. C., Hsu, T. S., Dangleben, N. L., Spinetta, M., Schallert, T., Anway, M. D. & Skinner, M. K. 2007. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci* **104**(14), 5942-5946.

- Crisci, J. V. & López Armengol, M. F. 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. The General Secretariat of the Organization of the American States, Washington DC.
- Cruz, M. & Wagermann, H. 1994. Control del moho azul en ajo. *Ipa Quilamapu* **60**, 26-28.
- D'Ercole, N. 1972. Marciume dell'aglio da *Penicillium corymbiferum* Westling. *Informatore Fitopatologico* **9**, 5-7.
- Dalcerro, A. (adalcerro@exa.unrc.edu.ar). (2000, Agosto 08). Re: Fw: Mensaje de Sandra Garcia Lampasona. E-mail to Sandra Garcia Lampasona (masuelli@lanet.com.ar)
- De Fina, A. L., Giannetto, F., Richard, A. E. & Sabella, L. 1963. Difusión geográfica de cultivos índices en la provincia de Mendoza y sus causas. INTA. *Instituto de Suelos y Agrotecnia*, Publicación no. 83.
- De Fina, A. L., Giannetto, F. & Sabella, L. 1962. Difusión geográfica de cultivos índices en la provincia de San Juan y sus causas. INTA. *Instituto de Suelos y Agrotecnia*, Publicación Nro 80.
- Deeprise, J. 1997. Roquefort - the history and the mystery. *Dairy Industries International* **62**(7), 19-21.
- del Toro, M. S. & Larriqueta, J. E. 1985. Podredumbre verde o moho azul - *Penicillium viridicatum* W. *Therapia* **1**(1), 19-20.
- Dobzhansky, T. 1973. Nothing in biology makes sense except in the light of Evolution. *The American Biology Teacher* **35**, 125-129.
- Durbin, R. D. & Uchytel, T. F. 1971. The role of allicin in the resistance to *Penicillium* spp. *Phytopathologia Mediterranea* **10**, 227-230.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G. & Cotty, P. J. 2003. Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology* **38**(1), 63-74.
- El Shabrawy, A. M., Amein, A. M., Hussein, F. N. & Ali, A. A. 1987. Cultural practices in relation to garlic storage diseases. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* **18**(1), 5-16.
- Ellmore, G. S. & Feldberg, R. S. 1994. Alliin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *American Journal of Botany* **81**(1), 89-94.
- Escofier, B. 1979. Affinement d'une partition et stabilité en analyse factorielle. *Les cahiers de l'analyse des données* **4**, 137-146.
- Espinel Ingroff, A. & Kerkerling, T. M. 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* **29**(2), 393-394.
- Espinel-Ingroff, A., McGinnis, M. R., Pincus, D. H., Goldson, P. R. & Kerkerling, T. M. 1989. Evaluation of the API 20C yeast identification system for the

- differentiation of some dematiaceous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* **27**(11), 2565-9.
- FAO. 2004. *Production Yearbook 2003*, Rome.
- Filtborg, O. & Frisvad, J. C. 1980. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensm. Wiss. Technol.* **13**, 128-130.
- Filtborg, O., Frisvad, J. C. & Svendsen, A. 1983. Simple screening method for moulds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 581-585.
- Fjeld, A. & Laane, M. M. 1970. The nuclear division and parasexual cycle in *Penicillium*. *Genetica* **41**(1), 517-524.
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal Experimental Pathology* **10**, 226-236.
- Flor, H. H. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**, 653-669.
- Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**, 680-685.
- Foote, R. H. 1972. How to measure sperm cell concentration by turbidity (optical density). *Proceedings of the Fourth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. N.A.A.B., 57-61.
- Frisvad, J. C. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. *Applied and Environmental Microbiology* **41**(3), 568-579.
- Frisvad, J. C. 1985a. Classification of asymmetric penicillia using expression of differentiation. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.). *Life Sciences*. **Vol 102**. Plenum Press, New York, USA, 327-336.
- Frisvad, J. C. 1985b. Creatine sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Letters in Applied Microbiology* **1**, 109-113.
- Frisvad, J. C. 1987. High performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography* **392**, 333-347.
- Frisvad, J. C. 1989. The connection between the Penicillia and Aspergilli and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**(3), 452-467.
- Frisvad, J. C. 1993. Modifications on media based on creatine for use in *Penicillium* and *Aspergillus* taxonomy. *Letters in Applied Microbiology* **16**, 154-157.

- Frisvad, J. C. 2000. Identification of the common food and airborne fungi. *Penicillium*. In: *Introduction to food and airborne fungi* (edited by Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O.). CBS, Utrecht, The Netherlands, 174-243.
- Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(6), 1301-1310.
- Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. 1989. Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* **81**(6), 837-861.
- Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification* (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.). Plenum Press, New York, 373-384.
- Frisvad, J. C., Filtenborg, O., Lund, F. & Samson, R. A. 2000a. The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 265-283.
- Frisvad, J. C., Filtenborg, O., Thrane, U., Samson, R. A. & Seifert, K. A. 2000b. Collaborative study on stipe roughness and conidium form in some Terverticillate *Penicillia*. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.). Harwood Academic Publishers, 113-125.
- Frisvad, J. C. & Samson, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* **49**, 1-173.
- Frisvad, J. C., Samson, R. A., Rassing, B. R., Horst, M. I. v. d., Rijn, F. T. J. v. & Stark, J. 1997. *Penicillium* *discolor*, a new species from cheese, nuts and vegetables. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**(119-126).
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O. & Samson, R. A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* **49**, 201-241.
- Frisvad, J. C. & Thrane, U. 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *Journal of Chromatography* **404**(1), 195-214.
- Fromtling, R. A. & Bulmer, G. S. 1978. *In vitro* effect of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. **70**(2), 397-405.

- Gargi & Roy, A. N. 1988. Prevention and control of some post harvest fungal diseases of garlic bulbs. *Pesticides Bombay* **22**(2), 11-15.
- Gatica, M. & Oriolani, E. 1984. *Penicillium viridicatum* Westling, agente causal de la "podredumbre verde o moho azul" del ajo (*Allium sativum* L.) en Mendoza, República Argentina. *Informativo de Investigaciones Agrarias* **421/424**, 1-7.
- Gatica, M. & Oriolani, E. 1989. Importancia de la fungosis y bacteriosis en el ajo semilla. In: *Curso / Taller sobre Prod., Com. e Indust. de Ajo. 1° y 2°*. Agro de Cuyo, Jornadas, INTA, Centro Reg. Cuyo., 30-31.
- Ge, Y., Xu, Z., Ge, Y. Y. & Xu, Z. G. 2001. Identification on the pathogens of garlic bulb disease. *Plant Protection* **27**(3), 10-12.
- Geffroy, V., Sicard, D., de Oliveira, J. C., Sevignac, M., Cohen, S., Gepts, P., Neema, C., Langin, T. & Dron, M. 1999. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **12**(9), 774-84.
- Georgieva, M. & Kotev, S. 1977. *Penicillium* rot of garlic. *Gradinarska i Lozarska Nauka* **14**(8), 44-51.
- Gevens, A. J., Donahoo, R. S., Lamour, K. H. & Hausbeck, M. K. 2007. Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. *Phytopathology* **97**(4), 421-428.
- Gower, J. C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**, 325-338.
- Gower, J. C. 1975. Generalised procrustes analysis. *Psychometrika* **40**, 33-51.
- Grayson, M. 1985. *Concise encyclopedia of chemical technology, Third edition*. John Wiley & Sons, New York.
- Greathead, A. S. 1978. Control of *Penicillium* decay of garlic. *California Agriculture*, 18.
- Gullino, M. L., Romano, M. L. & Armato, B. 1983. Importazione in Italia di bulbi di iris infetti da *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* e con *Penicillium corymbiferum* resistenti ai benzimidazolici. *Informatore Fitopatologico* **33**(2), 110-111.
- Guzmán, P., Gilbertson, R. L., Nodari, R., Johnson, W. C., Temple, S. R., Mandala, D., Mkandawire, A. B. C. & Gepts, R. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeosariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* **85**, 600-607.
- Hansen, H. N. & Smith, R. 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **22**, 953-964.

- Harbo, J. R. 1975. Measuring the concentration of spermatozoa from honey bees (*Apis mellifera*) with spectrophotometry. *Annals Entomological Society of America* **68**(6), 1050-1052.
- Haugland, R. A., Varma, M., Wymer, L. J. & Vesper, S. J. 2004. Quantitative PCR Analysis of Selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species. *Systematic and Applied Microbiology* **27**(2), 198.
- Herbert, R. B. 1989. *The biosynthesis of secondary metabolites*. Springer.
- Hibbett, D. S. & Donoghue, M. J. 1998. Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi. *Mycologia* **90**(3), 347-356.
- Hocking, A. D., Whitelaw, M. & Harden, T. J. 1998. *Penicillium radicum* sp. nov. from the rhizosphere of Australian wheat. *Mycological Research* **102**(7), 801-806.
- Hong, J. K. & Hwang, B. K. 1998. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease* **82**, 1079-1083.
- Hussein, H. S. & Brasel, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**(2), 101-34.
- Hutcheson, S. W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 59-90.
- IDR. 2002a. Egreso de Ajo de la provincia de Mendoza (2001-2002). In: *Programa de Relevamiento Hortícola*. Inst. Desarrollo Rural, Mendoza, 20.
- IDR. 2002b. Informe 1999-2000. In: *Programa Relevamiento Hortícola Provincial*. Instituto de Desarrollo Rural, Mendoza, 90 p.
- IDR. 2002c. Síntesis cadena de ajo. Instituto de Desarrollo Rural, Mendoza, 60.
- IDR. 2003. Situación actual de ajo. Campaña 2003-2004. In: *Serie de informes de coyuntura*. Instituto de Desarrollo Rural, Mendoza, 54.
- IDR. 2005a. Informe de coyuntura de ajo de la provincia de Mendoza. Período Agrícola 2004 - 2005. In: *Serie de informes de coyuntura*. Instituto de Desarrollo Rural, Mendoza, 38.
- IDR. 2005b. Situación actual de ajo en Mendoza. Período Agrícola 2005 - 2006. Primeras Perspectivas. Instituto de Desarrollo Rural, Mendoza, 9.
- Imwidthaya, S., Plangpatanapanichya, A. & Thasnakorn, P. 1979. Antifungal activity of garlic extract to *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Epidermophyton floccosum*. *Annual Research Abstracts Mahidol Univ., Bangkok (Thailand)*, 29 p (Resumen).
- INDEC. 2001. Censo Nacional Agropecuario. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*, [www.indec.gov.ar](http://www.indec.gov.ar), consultado 2 de Agosto 2006.
- Ishimaru, T., Tsuboya, S. & Saijo, T. 1994. Tetracyclic compounds, their manufacture with *Penicillium* or *Metarrhizium*, and inflammation

- inhibitors containing the tetracyclic compounds, Patente Nro JP0640995A. Japan, Pat. JP0640995A. Japan.
- Islam, S. Z., Babadoost, M., Lambert, K. N. & Ndeme, A. 2005. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. *Plant Disease* **89**(2), 191-197.
- Johnson, R. & Bowyer, D. E. 1974. A rapid method for measuring production of yellow rust spores on single seedlings to assess differential interactions of wheat cultivars with *Puccinia striiformis*. *Ann. Appl. Biol* **77**, 251-258.
- Jollivet, N., Belin, J. M. & Vayssier, Y. 1993. Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* Thom. *Journal of Dairy Science* **76**(7), 1837-1844.
- Jones, T., Gill, C. O. & McMullen, L. M. 2004. The behaviour of log phase *Escherichia coli* at temperatures that fluctuate about the minimum for growth. *Letters in Applied Microbiology* **39**(3), 296-300.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. 1969. Evolution in protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism* (edited by Munro, H. N.). Academic Press, New York, 21-123.
- Keusgen, M. 2002. Health and Alliums. In: *Allium Crop Science: Recent Advances* (edited by Rabinowitch, H. D. & Currah, L.). CAB International, London, UK., 357-378.
- Kim, J., Rohlf, F. J. & Sokal, R. R. 1992. The accuracy of phylogenetic estimation using the neighbor-joining method. *Evolution* **47**, 471-486.
- Király, Z., Klement, Z., Solymosy, F. & Vörös, J. 1974. *Methods in plant pathology ; with special reference to breeding for disease resistance*. Elsevier Scientific, Amsterdam, Netherland.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. 2001. *Dictionary of the Fungi*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Koch, R. 1882. Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinischen Wochenschrift* **15**, 221-230.
- Kornerup, A. & Wanscher, J. H. 1978. *Methuen Handbook of Colour, 3rd edn*. Eyre Methuen, London.
- Krest, I. & Keusgen, M. 1999a. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*: differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic. *Planta Medica* **65**(2), 139-143.
- Krest, I. & Keusgen, M. 1999b. Stabilization and pharmaceutical use of alliinase. *Pharmazie* **54**(4), 289-93.
- Kruskal, W. H. & Wallis, W. A. 1952. Use of ranks on one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**, 583-621.
- La Guerche, S., Garcia, C., Darriet, P., Dubourdiou, D. & Labarere, J. 2004. Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by

- their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. *Current Microbiology* **48**(6), 405-11.
- Laatsch, H. 2003. AntiBase 2003, a Natural Products Database for Rapid Structure Determination. In: *Chemical Concepts*. Willey and Sons, Weinheim, Germany.
- Lapointe, F. J. & Legendre, P. 1992. Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Systematic Biology* **41**(3), 378-384.
- Larreguy, V. 1999. Control de *Penicillium* spp. en "ajo colorado". In: *Curso Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización del ajo* (edited by Burba, J. L.) **VI**. INTA EEA La Consulta, Mendoza, Argentina, 167.
- Larsen, T. O. & Frisvad, J. C. 1994. A simple method for collection of volatile metabolites from fungi based on diffusive sampling from Petri dishes. *Journal of Microbiological Methods* **19**(297-305).
- Larsen, T. O. & Frisvad, J. C. 1995a. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research* **99**(10), 1153-1166.
- Larsen, T. O. & Frisvad, J. C. 1995b. Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycological Research* **99**(10), 1167-1174.
- Larsen, T. O. & Frisvad, J. C. 1995c. Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. *Journal of Microbiological Methods* **25**, 135-144.
- Lee, B. K., Kim, B. S., Chang, S. W. & Hwang, B. K. 2001. Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pepper. *Plant Disease* **85**(5), 497-500.
- Leguizamón C., J. & Barriga O., R. 1976. Enfermedades del ajo (*Allium sativum* L.) en Cundinamarca y Boyacá. *Noticias Fitopatológicas* **5**(1), 4-19.
- Link, H. F. 1809. Observaciones in ordines plantarum naturales. *Gessellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* **3**.
- LoBuglio, K. F., Pitt, J. I. & Taylor, J. W. 1993. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among sexual *Penicillium* species in Subgenus *Biverticillium*. *Mycologia* **85**, 592-604.
- López Camelo, A. F. 1980. El decaimiento del ajo debido a *Penicillium corymbiferum* Westling (Mufa del ajo). Control. INTA EEA Hilario Ascasubi. *Informe Técnico*, **20**, 1-8.
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M. L. & Segura, J. 2004. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology* **96**(1), 13-18.

- Lund, F. & Frisvad, J. C. 1994. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycological Research* **98**(5), 481-492.
- Lund, F., Nielsen, A. B. & Skouboe, P. 2003. Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. *Food Microbiology* **20**(6), 725-734.
- Machowicz-Stefaniak, Z., Dyduch, J., Zalewska, E. & Nurzynska-Wierdak, R. 1998. Grzyby uszkodzające cebule czosnku (*Allium sativum* L.) w czasie przechowywania. *Annales Universitatis Mariae Curie Skodowska Sectio EEE, Horticultura* **6**, 27-37.
- Makuch, M., Ordovini, A. F., Piccolo, R. & Vignoni, C. 1996. Efecto del daño mecánico en los "dientes" destinados a plantación sobre el rendimiento del ajo colorado (*Allium sativum* L.). In: *Informe de Progresos* (edited by AJO/INTA., P.). EEA La Consulta, INTA, Mendoza, 33 pp.
- Makuch, M. A. & Herrera, C. 1993. Distribución espacial de hongos en bulbos de ajo (*Allium sativum* L.). In: *Curso Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de ajo* (edited by Burba, J. L.) **III**. INTA EEA La Consulta, Mendoza, Argentina, 77-91.
- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J. & Sessa, G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 23-61.
- Martínez Benítez, E. 2003. Estudio de especies micotóxicas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Mazur, S. 1990. Fungoid diseases of garlic (*Allium sativum* L) bulbs. *Folia Horticulturae* **1/2**, 77-87.
- Messiaen, C. M., Cohat, J., Leroux, J. P., Pichon, M. & Beyries, A. 1993. *Les Allium alimentaires reproduits par voie végétative*, Paris, France.
- Messiaen, C. M. & Lafon, R. 1968. *Enfermedades de las hortalizas*. Oikos-tau, Barcelona, España.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T. W. & Tudzynski, B. 2003. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Molecular Microbiology* **47**(4), 975-991.
- Moore, D. 2001. *Slayers, Saviors, Servants and Sex. An exposé of Kingdom Fungi*. Springer-Verlag, New York.
- Moore, G. S. & Atkins, R. D. 1977. The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia* **69**(2), 341-348.

- Muhsin, T. M., Al-Zubaidy, S. R. & Ali, E. T. 2000. Effect of garlic bulb extract on the growth and enzymatic activities of rhizosphere and rhizoplane fungi. *Mycopathologia* **152**, 143–146.
- Muller, B., Burgstaller, W., Strasser, H., Zanella, A. & Schinner, F. 1995. Leaching of zinc from an industrial filter dust with *Penicillium*, *Pseudomonas* and *Corynebacterium*: citric acid is the leaching agent rather than amino acids. *Journal of Industrial Microbiology* **14**(3/4), 208-212.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**, 283-292.
- New, M., Lister, D., Hulme, M. & Makin, I. 2002. A high-resolution data set of surface climate over global land areas. *Climate Research* **21**, 1-25.
- Nicholson, R. L. & Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**(1), 369-389.
- Nielsen, N. P. V., Carstensen, J. M. & Smedsgaard, J. 1998. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A* **805**, 17-35.
- Nilsson, T., Bassiani, M. R., Larsen, T. O. & Montanarella, L. 1996a. Classification of species in the genus *Penicillium* by Curie point pyrolysis/mass spectrometry followed by multivariate analysis and artificial neural networks. *Journal Mass Spectrometry* **31**, 1422-1428.
- Nilsson, T., Larsen, T. O., Montanarella, L. & Madsen, J. O. 1996b. Application of head space solid phase microextraction for the analysis of volatiles emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods* **25**(245-255).
- Obagwu, J. & Korsten, L. 2003. Control of citrus green and blue molds with garlic extracts. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 221–225.
- Okuda, T. 1994. Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variations in culture conditions. *Mycologia* **86**(2), 259-262.
- Onions, A. H. S. 1981. Report H576/81/YA2. In: *Identification services*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England., 1.
- Overy, D. P. & Frisvad, J. C. 2003. New *Penicillium* species associated with bulbs and root vegetables. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 631–639.
- Overy, D. P., Frisvad, J. C., Steinmeier, U. & Thrane, U. 2005a. Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biology and Technology* **35**, 217-221.
- Overy, D. P., Seifert, K. A., Savard, M. E. & Frisvad, J. C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 69– 77.

- Overy, D. P., Valdez, J. G. & Frisvad, J. C. 2005b. Revisions to *Penicillium* ser. *Corymbifera*: agents responsible for blue mould storage rot of various flower and vegetable bulbs. *Canadian Journal of Botany* **83**(11), 1422-1433.
- Park, B. C., Lee, D. H., Bae, K. S. & Park, H. M. 1997. Phylogenetic study of *Penicillium chrysogenum* based on the amino acid sequence analysis of chitin synthase. *The Journal of Microbiology* **35**(3), 159-164.
- Parkins, M. D. 2001. Pharmacological Practices of Ancient Egypt. In: *10th Annual History of Medicine Days* (edited by Whitelaw, W. A.). Faculty of Medicine, The University of Calgary, Canada, 5-11.
- Paterson, R. R. M. & Bridge, P. D. 1994. *Biochemical techniques for filamentous fungi*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Pereyra, M., Pérez Andreuccetti, C., Pappalardo, L. & Burba, J. L. 2006. Evolución del sector empacador de ajo de la provincia de Mendoza. *IDR-INTA*, 44.
- Peterson, S. W. 2000. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 163-178.
- Pianzola, M. J., Moscatelli, M. & Vero, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease* **88**(1), 23-28.
- Piccolo, R. 1997. Evaluación de productos químicos y técnicas de aplicación para el control de hongos transmitidos por la semilla de ajo (*Allium sativum* L.). In: *3-Ingeniería de Cultivo* (edited by J.L.Burba) **3**. EEA La Consulta INTA Centro Regional Cuyo, La Consulta-Mendoza, 58-80.
- Pinto, C. M. F. & Maffia, L. A. 1995. Diseases caused by fungi on garlic. *Informe Agropecuario Belo Horizonte* **17**(183), 5-11.
- Pitt, J. I. 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* **65**, 1135-1157.
- Pitt, J. I. 1979a. *The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, London, UK.
- Pitt, J. I. 1979b. *Penicillium crustosum* and *Penicillium simplicissimum*, the correct names for two common species producing tremorgenic mycotoxins. *Mycologia* **71**, 1166-1177.
- Pitt, J. I. 1989. Recent developments in the study of *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. *Journal of Applied Bacteriology*, 37S-45S.

- Pitt, J. I. 1993. A modified creatine sucrose medium for differentiation of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Journal of Applied Bacteriology* **75**(6), 559-563.
- Pitt, J. I. 2000. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species. Third Edition.* Food Science Australia, North Ryde, Australia.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. 1997. *Fungi and Food Spoilage.* Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Portela, J. (jportela@laconsulta.inta.gov.ar). (2006, Abril 04). Re: pregunta para entendidos. E-mail to Jorge Valdez (jvaldez@laconsulta.inta.gov.ar)
- Ramirez, C. 1982. *Manual and atlas of the Penicillia.* Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands.
- Raper, K. B. & Thom, C. 1949. *A manual of the Penicillia.* Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Rath, A. C., Carr, C. J. & Graham, B. R. 1995. Characterization of *Metarrhizium anisopliae* strains by carbohydrate utilization (API 50 CH). *Journal of Invertebrate Pathology* **65**, 152-161.
- Revah, S. & Lebeault, J. M. 1989. Accelerated production of Blue cheese flavors by fermentation on granular curds with lipase addition. *Lait Lyon* **69**(4), 281-289.
- Rivas, J. C. 1999. Efecto genotipo ambiente sobre la infección natural de mohos azul *P. corymbiferum* Westling en ajo colorado. In: *Curso Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de ajo* (edited by J.L.Burba) **VI.** INTA, Mendoza, Argentina, 71-72.
- Rodríguez Tudela, J. L., Cuenca Estrella, M., Díaz Guerra, T. M. & Mellado, E. 2001. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(7), 2513-2517.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSyS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver 2.1. In: *Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.* Exeter Software, Setauket, NY.
- Rokas, A., Williams, B. L. & Carroll, S. B. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**, 798-804.
- Roy, A. N., Sharma, R. B. & Gupta, K. C. 1977. Occurrence of three new rot diseases of stored garlic (*Allium sativum* L.). *Current Science* **46**(20), 716-717.
- Saaltink, G. J. 1967. *Penicillium corymbiferum* entering bulbous iris through wounds. *Neth. J. Pl. Path.* **74**, 85-93.
- Saaltink, G. J. 1971. The infection of bulbs by *Penicillium* sp. *International Society of Horticultural Sciences* **23**, 35-41.

- Saito, M. & Tsuruta, O. 1984. *Penicillium* decay of garlic bulb in market. *Report of the National Food Research Institute* **45**, 127-129.
- Samsom, R. A. 1974. Paecilomyces and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology* **6**.
- Samsom, R. A., Frisvad, J. C., Pitt, J. I., Hoekstra, E. S., Klich, M., Lawrence, Z., Seifert, K. A. & Okuda, M. 1997. Collaborative study of the *Penicillium aurantiogriseum* complex. In: *Third International Workshop on Penicillium and Aspergillus*. CBS, Baarn, Netherlands., 15-16.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. 2000. *Introduction to food and airborne fungi*. CBS, Utrecht, Netherlands.
- Samson, R. A. & Pitt, J. I. 1985a. Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. In: *Life Sciences. Vol 102*. Plenum Press, New York, USA, 483.
- Samson, R. A. & Pitt, J. I. 1985b. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Plenum Press, New York, USA.
- Samson, R. A. & Pitt, J. I. 1990. Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. In: *Life Sciences. Vol 185*. Plenum Press, New York, USA, 478.
- Samson, R. A. & Pitt, J. I. 2000. Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 510.
- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraken, J. A. M. P. & Frisvad, J. C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial B-tubulin sequences. *Studies in Mycology* **49**, 175-200.
- Samson, R. A., Stolk, A. C. & Hadlok, R. 1976. Revision of the subsection *Fasciculata* of *Penicillium* and some allied species. *Studies in Mycology* **11**, 1-47.
- Sankara Subramanian, S. 1968. Chemical differentiation of *Cassia tora* and *C. obtusifolia* as two distinct species. *Curr. Sci. (Mysore)* **37**, 493.
- Schreuder, W., Lamprecht, S. C. & Holz, G. 2000. Race determination and vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* from South Africa. *Plant Disease* **84**(3), 231-234.
- Scott, J. A., Untereiner, W. A., Wong, B., Straus, N. A. & Malloch, D. 2004. Genotypic variation in *Penicillium chysogenum* from indoor environments. *Mycologia* **96**(5), 1095-1105.
- Seifert, K. A. 2004. Anyone can identify *Penicillium*! In: *CBS Centenary: 100 years of Fungal Biodiversity and Ecology*, Amsterdam, Netherlands, 8.
- Seifert, K. A. & Levesque, C. A. 2004. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **110**(5/6), 449-471.

- Sendl, A. 1995. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1. Chemistry analysis, history, botany. *Phytomedicine* **1**, 323-339.
- Shadkchan, Y., Shemesh, E., Mirelman, D., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M. & Osherov, N. 2004. Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. in vitro, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**, 832-836.
- Sholberg, P. L., Harlton, C., Haag, P., Levesque, C. A., O'Gorman, D. & Seifert, K. A. 2005. Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using beta-tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology* **36**(1), 41-49.
- Sidhu, G. S. 2002. Mycotoxin genetics and gene clusters. *European Journal of Plant Pathology* **108**(7), 705-711.
- Singh, U. P., Prithiviraj, B., Sarma, B. K., Singh, M. & Ray, A. B. 2001. Role of garlic (*Allium sativum* L.) in human and plant diseases. *Indian Journal of Experimental Biology* **39**(4), 310-322.
- Skouboe, P., Boysen, M., Pedersen, L. H., J.C., F. & Rossen, L. 1996. Identification of *Penicillium* species using the internal transcribed spacer (ITS) regions. In: *Fungal identification techniques* (edited by Rossen, L., Rubio, V., Dawson, M. T. & Frisvad, J. C.). European Commission, Brussels, Belgium, 160-164.
- Skouboe, P., Frisvad, J. C., Taylor, J. W., Lauritsen, D., Boysen, M. & Rossen, L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research* **103**(7), 873-881.
- Smalley, E. B. 1954. *Penicillium* clove rot of garlic. *Phytopathology* **44**(9), 506.
- Smalley, E. B. & Hansen, H. N. 1962. *Penicillium* decay of garlic. *Phytopathology* **52**, 666-678.
- Smedsgaard, J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A* **760**(2), 264-270.
- Smith, G. 1949. The effect of adding trace elements to Czapek-Dox medium. *Transactions British Mycological Society* **32**, 280-283.
- Smith, G. E. 1974. *Papyrus Ebers. English translation*. Ares Publishers, Chicago, USA.
- SNSV. 1971. (Servicio Nacional de Sanidad Vegetal) Disposición 80/71. Buenos Aires, 21 de octubre de 1971.
- Spotts, R. A. & Cervantes, L. A. 2001. Disease incidence-inoculum dose relationships for *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* and decay of pear fruit using dry, airborne conidia. *Plant Disease* **85**(7), 755-759.

- Stolk, A. C. & Samsom, R. A. 1985. A new taxonomic scheme for *Penicillium* anamorphs. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (edited by Samson, R. A. & Pitt, J. I.). *Life Sciences*. Vol 102. Plenum Press, New York, USA, 163-192.
- Tansey, M. R. & Appleton, J. A. 1975. Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia* 67(2), 409-413.
- Taylor, J. W., Spatafora, J. & Berbee, M. L. 1996. Ascomycota. [en línea] <<http://phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/fungi/ascomycota/ascomycota.html>> [consulta: 22 Octubre 2001].
- Thom, C. 1930. *The Penicillia*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Thrall, P. H. & Burdon, J. J. 2002. Evolution of gene-for-gene systems in metapopulations: the effect of spatial scale of host and pathogen dispersal. *Plant Pathology* 51(2), 169-184.
- Thrane, U. 1986. Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thin layer chromatography. *Letters in Applied Microbiology* 3(5), 93-96.
- Urbietta, J. A. 1976. Control de hongos en ajo. In: *Instituto de Horticultura*. Facultad de Ciencias Agrarias. Univ. Nac. de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- Urbietta, J. A. & Paez, N. E. 1978. Sumersión de bulbos de ajo en bicloruro de mercurio. *Agropecuaria* 48, 140-143.
- Valdez, J. G., Makuch, M. A., Ordovini, A. F., Masuelli, R. W., Overy, D. P. & Piccolo, R. J. 2006. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology* 55, 583.
- Valdez, J. G., Makuch, M. A., Piccolo, R. J. & Masuelli, R. W. 2001. El extracto de ajo afecta el desarrollo superficial de *Penicillium viridicatum* West. en bulbillos. In: *Brazilian Phytopathology (Vol 26, Sup)*. *Actas del XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología*, San Pedro, Brasil, 5 - 11 de Agosto de 2001, 546.
- Valdez, J. G. & Piccolo, R. J. 2006. Use of spectrophotometry as a tool to quantify the sporulation of *Penicillium allii* in garlic lesions. *Fitopatologia Brasileira* 31(6), 583-585.
- van de Peer, Y., Jansen, J., Rijk, J. D. & Wachter, R. D. 1997. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Research* 25, 111-116.
- Van der Plank, J. E. 1968. *Disease Resistance in Plants*. Academic Press, New York and London.
- Vanittanakom, N., Vanittanakom, P. & Hay, R. J. 2002. Rapid identification of *Penicillium marneffe* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 40(5), 1739-1742.
- Vigreux, C., Deslandes, E., Godard, T. & Henry-Amar, M. 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay

- (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research* **419**(1-3), 79-90.
- Vincent, M. A. & Pitt, J. I. 1989. *Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic. *Mycologia* **81**(2), 300-303.
- von Schmeling, B. & Kulka, M. 1966. Systemic fungicidal activity of 1,4-Oxathiin derivatives. *Science* **152**(3722), 659-660.
- Wasfy, E. H., Bridge, P. D. & Brayford, D. 1987. Preliminary studies on the use of biochemical and physiological tests for the characterization of *Fusarium* isolates. *Mycopathologia* **99**, 9-13.
- Watkins, C. B. & Rosenberger, D. A. 2000. Postharvest pathogens create new problems for apple storage. *Cornell fruit handling and storage newsletter*, 3-4.
- Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R. & Rahman, S. K. 1989. Why are secondary metabolites (Natural Products) biosynthesized? *Journal of Natural Products* **52**(6), 1189-1208.
- Wilmotte, A., Peer, Y. v. d., Goris, A., Chapelle, S., Baere, R. D., Nelissen, B., Neefs, J. M., Hennebert, G. L. & Wachter, R. d. 1993. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, 436-444.
- Yoon, C. S. & Bae, K. S. 1995. Genetic relationships among *Penicillium* species by characterizing RAPD markers. *Journal of Microbiology* **33**(3), 171-177.
- Yu, J.-H. & Keller, N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review Phytopathology* **43**, 437-458.
- Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C. P. & Neufeld, R. J. 1998. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology* **84**(3), 342-348.

## **XII. Anexos**

### *XII.1: Medios de cultivo*

#### Czapek Yeast Extract Agar (CYA) (Pitt 1973)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Czapek concentrado	10 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

#### Concentrado Czapek (Smith 1949)

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0.05 g
Agua destilada	100 mL

Yeast Extract Agar (YES) (Samson *et al.* 2000)

Extracto de Levadura	20 g
Sacarosa	150 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Medio para monosporizar aislamientos (Valdez *et al.*, en prensa)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
Concentrado Czapek	2,5 mL
Agar	4 g
Agua destilada	1000 mL

Garlic Sucrose Agar (GSA) (Valdez *et al.*, en prensa)

Agar	13,5 g
Sacarosa	20 g
Extracto de ajo 1/10 filtrado	60 mL
Agua destilada	940 mL

El extracto de ajo se agrega luego de autoclavar el agar, la sacarosa y el agua.

Oatmeal Agar (OA) (Samson *et al.* 2000)

Avena arrollada	30 g
Agar	15 g
Solución con trazas de metales	1 mL
Agua destilada	1000 mL

Solución con trazas de metales

ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0.5 g
Agua destilada	100 mL

Agar Extracto de Malta (MEA) (Raper & Thom, 1949)

Extracto de Malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

### 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N) (Pitt 1973)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75 g
Czapek concentrado	7.5 mL
Extracto de levadura	3.7 g
Glicerol analítico	250 g
Agar	12 g
Agua destilada	750 mL

### Creatine Sucrose Agar (CREA) (Frisvad 1985b)

Creatina	3 g
Sacarosa	30 g
KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Bromocresol purpura	0.05 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Después de autoclavar el medio se ajusta a un pH final 8.0 +/- 0.2.

En lugar de 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, se puede usar 1,6 g de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O.

## *XII.2: Tipos de compuestos químicos que se utilizan para el control de enfermedades fúngicas en plantas*

Se han producido varios centenares de compuestos químicos para lograr una protección efectiva de los cultivos. A continuación se mencionan los compuestos más importantes, indicando algunas de sus propiedades y usos. El lector interesado puede remitirse a Agrios (1996) de donde fue obtenida la información. En la Tabla 3 se presenta un resumen de este anexo.

### *XII.2.1 Compuestos de cobre*

La pasta bordelesa y “caldo” bordelés: es el fungicida de cobre que más ampliamente se utiliza en todo el mundo. Se prepara mezclando 8 kg de sulfato de cobre; 8 kg de hidróxido de calcio (cal “apagada”) y 100 L de agua, en una proporción 8:8:100. Es algo fitotóxico y por esta causa no se aplica en el control de *Penicillium* en ajo.

Compuestos “fijos” o “insolubles”: Sólo el ión cobre es insoluble. Es menos fitotóxico que el caldo bordelés pero también menos efectivo en el control de hongos. Estos compuestos contienen sulfato básico de cobre (Basicop, Tribásico); cloruros básicos de cobre (C-O-C-S); óxidos de cobre (Cuprocide, Perenox) o hidróxido cúprico (Kocide). Se aplican como aspersiones o polvo.

### *XII.2.2 Compuestos de azufre*

Se encuentran productos inorgánicos formulados en base a azufre en forma de polvo o formulaciones orgánicas en base a ditiocarbamatos. Los

primeros se usan principalmente para controlar las oidios, royas, tizones foliares y pudriciones de frutos. Los productos comerciales conocidos son el Kolodust, Kolofofog y otros.

Los ditiocarbamatos constituyen el grupo más importante de fungicidas, de mayor versatilidad y de amplio uso. Derivan del ácido ditiocarbámico. La toxicidad reside en que las moléculas son metabolizadas hasta el radical isotiocianato ( $-N=C=S$ ) que inactiva los grupos sulfhidrilo de las proteínas.

Los ditiocarbamatos más conocidos son el Tiram (dos moléculas unidas de ácido ditiocarbámico); Ferbam (tres moléculas de ácido ditiocarbámico reaccionando con un átomo de hierro); Ziram (dos moléculas de ácido ditiocarbámico unidas a un átomo de zinc); y los compuestos nadam, zineb y maneb; donde las moléculas de ácido ditiocarbámico se combinan con sodio, zinc y manganeso respectivamente. El maneb es uno de los fungicidas que con mayor frecuencia se utiliza para controlar las enfermedades de hortalizas. Se le adiciona zinc para disminuir la fitotoxicidad del maneb y mejorar sus propiedades fungicidas. El producto obtenido se conoce como Maneb zinc y cuando se adiciona ión zinc, se conoce como maneb ión zinc o Mancozeb.

### *XII.2.3 Compuestos aromáticos*

Son compuestos tóxicos para los microorganismos, no relacionados entre sí pero que presentan un anillo aromático. Estos compuestos actúan inhibiendo la síntesis de aminoácidos y proteínas.

El hexaclorobenceno se usa para el tratamiento de semillas.

El pentacloronitrobenceno es de efecto prolongado. Se aplica sobre los suelos al momento de sembrar; el diclorán (Botrán, DCNA) se aplica como baño poscosecha para el control de *Rhizophus* y *Penicillium*; el dinocap (Karathane, Mildex) es específico para las oidios, pero también se usa para exterminar ácaros; el clorotalonil es de amplio espectro. Químicamente es un anillo con cuatro cloros expuestos. El bifenil se utiliza para controlar las enfermedades de poscosecha de los cítricos causadas por *Penicillium*. Es un compuesto volátil que se aplica impregnándolo en los materiales de empaque, y se volatiliza durante el almacenamiento (Grayson 1985).

#### *XII.2.4 Compuestos heterocíclicos*

Constituyen un grupo heterogéneo que abarca fungicidas que actúan en la inhibición de la síntesis de aminoácidos y proteínas. Entre los más conocidos se encuentran el captan, folpet, captafol, iprodione y vinclozolin.

El captan, folpet y captafol son químicamente muy similares y de espectro similar. Se usan para controlar manchas foliares, tizones, pudriciones del fruto, hortalizas y céspedes. El captafol tiene un importante poder residual en situaciones de intemperie, por lo que se lo usa en frutales y en enfermedades del follaje en tomates.

El iprodione es un fungicida de contacto y de amplio espectro, inhibiendo la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio. Presenta actividad más bien preventiva que curativa.

El vinclozólín es también un fungicida protector y de contacto, antes usado contra Ascomicetos que forman esclerocios. Su uso no está permitido en la actualidad debido a que produce esterilidad masculina por ser un químico disruptor endócrino y cambios epigenéticos debido a metilación del ADN (Crews *et al.* 2007).

#### *XII.2.5 Fungicidas sistémicos*

Son fungicidas que se absorben por el follaje de las plantas o por las raíces y son translocados generalmente en sentido ascendente a través del xilema. Muy pocos se translocan vía floema y no son translocados hacia nuevas zonas de crecimiento. La mayoría de ellos tienen una mejor efectividad cuando se los aplica como tratamiento de semillas, como humectante de raíces, en los surcos o en aspersiones al suelo en árboles.

Casi todos los fungicidas sistémicos muestran su acción al inhibir algunas o varias etapas metabólicas específicas. Por ello, al cabo de algunos años se seleccionan cepas de hongos resistentes.

Se tienen documentados casos sobre la selección de cepas de *Penicillium* resistentes a benzimidazoles. Bulbos de lirios importados a Italia desde Israel presentaban cepas de *P. corymbiferum* con resistencia a este tipo de fungicidas (Gullino *et al.* 1983).

Los benzimidazoles en manzanas almacenadas proveyeron un excelente control contra *P. expansum* desde los comienzos de los '70 hasta los comienzos de los '90 del siglo XX. Sin embargo, la mayoría de las cepas actuales de *P. expansum* que causan pudrición son completamente resistentes al tratamiento con benzimidazoles (Watkins & Rosenberger 2000). En ajo se ha mencionado la presencia de cepas resistentes a benzimidazoles en la zona de Medanos, en la provincia de Buenos Aires (Larreguy 1999).

Al seleccionarse cepas resistentes, ese tipo de fungicidas debe dejar de usarse. Para prevenir esta selección se los utiliza combinados con otros fungicidas de contacto de amplio espectro. Esta es la estrategia que se usa para controlar las enfermedades en ajo (Piccolo 1997).

#### *XII.2.5.1 Acilalaninas*

El más importante es el metalaxyl (Ridomil). Se puede utilizar en el suelo o en el follaje. Ampliamente recomendado para semillas para evitar el *damping off* o enfermedad de los almácigos. Es eficaz como tratamiento curativo por su rápida translocación desde las raíces a las partes aéreas.

#### *XII.2.5.2 Benzimidazoles*

Los benzimidazoles más importantes son el benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato. Interfieren en la división nuclear. El benomil (Benlate, Tersan 1991) es un fungicida seguro y de amplio espectro. Controla una gran variedad de pústulas, manchas foliares, tizones, pudriciones, roñas y

enfermedades de semillas. No tiene ningún efecto sobre los Oomicetos *Helminthosporium*, *Alternaria* y algunas bacterias. Con este fungicida se tratan semillas.

#### XII.2.5.3 Imadazoles

El imazalil es efectivo contra ascomicetos y contra *Penicillium italicum* y *P. digitatum* en cítricos (Obagwu & Korsten 2003). El procloraz es de acción preventiva, curativa y erradicante, también se usa contra mohos en cítricos. Actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol en las células del hongo patógeno y no le permite formar su membrana celular.

#### XII.2.5.4 Oxantinas

Fueron los primeros fungicidas sistémicos descubiertos (von Schmeling & Kulka 1966). Comprenden a la carboxina (Vitavax) y la oxicarboxina (Plantvax). El primero controla principalmente *Rhizoctonia* y carbones y el segundo se usa para tratar semillas y royas. Se concentran en las células de los hongos e inhiben enzimas de la respiración mitocondrial.

#### XII.2.5.5 Triazoles

Se conocen el triadimefon (Bayleton), triadimenol (Baytan), bitertanol (Baycor) entre otros. Presentan una actividad curativa y protectora duradera ante un gran espectro de enfermedades foliares, de plántulas y de raíces. Se aplican también para el tratamiento de semillas y de suelos.

#### *XII.2.5.6 Otros Fungicidas sistémicos*

Existe una gran cantidad de fungicidas sistémicos usados como preventivos foliares (morfolinas) y también de fosfatos orgánicos, entre ellos el fosetyl-A1, muy eficaz contra enfermedades foliares. Las pirimidinas se utilizan principalmente para el control de oidios.

XII.3: Informes servicios de identificación

XII.3.1 Informe H576/81/YA2. CAB



# Identification Services

## Commonwealth Mycological Institute

Ferry Lane  
Kew  
Surrey  
England TW9 3AF  
telephone: 01-940 4086

Report No. H576/81/YA2

Your reference

Report on Cultures sent by:

29th May 1981

Ing. M.G. de Mathey,  
Lab. Fitopatología,  
Lujan de Cuyo,  
R. Argentina.

Specimen number	Herb. IMI number	Identification
42 23	257764 } 257765 }	<p style="text-align: center;"><u>Report from Dr. A.H.S. Onions</u></p> <p><u>Penicillium viridicatum</u> Westling = <u>P. verrucosum</u> Dierckx</p> <p>These isolates are producing some yellowish exudate and were isolated from <u>Allium</u> and grow rather rapidly. I think therefore they must be tending towards <u>P. corymbiferum</u> Westling = <u>P. hirsutum</u> Dierckx but the general appearance fits <u>P. viridicatum</u>.</p> <p style="text-align: right;">cam</p>

## XII.3.2 Informe H199/01/YA2. CABI.

### CABI BIOSCIENCE IDENTIFICATION SERVICES

Report: H199/01/YA2

Your ref: GarlicPenicilliumArg

Your number	IMI number	Identification and comments
215 M61 A1	386508	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom. Description found in Pitt, J.I. (1980) <i>The genus Penicillium and its teleomorphic states Talaromyces and Eupenicillium</i> . Academic Press, 328-329 pp. One of the most ubiquitous of all penicillia, very common in indoor environments. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
313 M91 A1	386509	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. A species isolated frequently from bulbs, and other liliaceous specimens such as onions and garlic. Description found in Pitt, J.I. (1980) <i>The genus Aspergillus and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces</i> , pp. 347-349. Academic Press. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
319 M92 A1	386510	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
339 M96 A4	386511	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx. An ubiquitous species found on soil and decaying vegetation. Description found in Pitt, J.I. (1980) <i>The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces</i> . Academic Press, 375-376 pp. One of the most xerophilic of penicillia. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
383 M107 A3	386512	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
005 M2 A2	386513	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom. See my comments on IMI 386508. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
44 M12 A2	386514	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom. See my comments on IMI 386508. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
64 M19 A4	386515	<i>Penicillium expansum</i> Link. A common species on pomaceous fruits. Description found in Pitt, J.I. (1980) <i>The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces</i> pp. 326-327, Academic Press. Also found in soil. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
306 M88 A3	386516	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386511. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
188 M54 A3	386517	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386511. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
384 M107 A4	386518	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom. See my comments on IMI 386508. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.

**CABI BIOSCIENCE  
IDENTIFICATION SERVICES**

**Report:** H199/01/YA2  
**Your ref:** GarlicPenicilliumArg

Your number	IMI number	Identification and comments
385 M108 A1	386519	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
419 M116 A4	386520	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
447 M124 A1	386521	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
466 M129 A1	386522	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
494 M135 A3	386523	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
517 M142 A2	386524	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx. Description found in Pitt, J.I. (1980) <i>The genus Penicillium and its teleomorphic states Talaromyces and Eupenicillium</i> . Academic Press, 353-355 pp. A common contaminant. One of the most ubiquitous of penicillia. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
530 M146 A2	386525	<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386509. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
537 M148 A3	386526	<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll. Description found in Pitt, J.I. (1980) <i>The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces</i> . Academic Press, 436-438 pp. A soil species, and an active agent of decomposition in moist habitats. Distribution is world-wide. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
206 M58 A5	386527	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx. See my comments on IMI 386524. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.

May 22nd, 2002

Mr Jorge Valdez,  
Lab. de Análisis de Semilla José Crnko"  
ISTA ARDL02; CC 8 (5567)  
INTA La Consulta Mendoza,  
**Argentina**

Dear Mr Valdez,

**Identification of *Penicillium* isolates from garlic, received 14.05.02**

On Tuesday May 14th, 2002, we received from you four *Penicillium* isolates from garlic for identification. The isolates were numbered #064, 419, 517 and 530.

**Protocol:** The isolates were sub-cultured onto identification media comprising Czapek Yeast extract Agar (CYA), incubated at 5, 25 and 37°C, Malt Extract Agar (MEA), 25% Glycerol Nitrate (G25N) agar and Creatine Sucrose (CSN) agar incubated at 25°C. All plates were incubated for 7 days prior to microscopic examination and identification.

**Results**

- #064: *Penicillium aurantiogriseum*
- #419: *Penicillium allii*
- #517: *Penicillium allii*
- #530: *Penicillium allii*

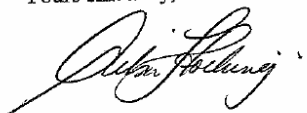
**Comments**

*Penicillium allii* (Vincent and Pitt) was described in 1989 from spoilage Egyptian garlic (Vincent, M.A. and Pitt, J.I. 1989. *Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic. *Mycologia* 81: 300-303). *Penicillium* rots in garlic are a well recognised and worldwide problem. There seem to be a few species involved, but the main one is *P. allii*. These types of rots have also been described in the literature as being due to *P. corymbiferum*, but *P. corymbiferum* is now considered a synonym of *P. hirsutum*, which causes black spot of refrigerated meat, and also spoilage of fresh asparagus. We have isolates of this species in our collection from Australia (onion seed, garlic, margarine), Egypt (soil, garlic), Japan (garlic), Indonesia (nuts, rice) and the Philippines (maize).

Your isolate of *P. aurantiogriseum* grew slowly on our CYA medium, but produced typical colonies on MEA and CSN media. *P. aurantiogriseum* is very common on drying crops, especially cereals, and has been reported to cause spoilage of a variety of fruit and vegetable crops.

We have kept two of your cultures of *P. allii* for our collection: # 517 has been accessioned as FFR 5533, and #530 is FFR 5534. These isolates differed slightly in their colony appearance on CYA, with #517 being slightly more floccose, and #530 producing more yellow exudate.

Yours sincerely,



Ailsa D. Hocking, Ph D  
Section Leader, Mycology & Mycotoxins

## XII.4: Correspondencia citada

### XII.4.1 Correspondencia Dr. Onions, 1ro Octubre 1981



#### COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE

Ferry Lane · Kew · Richmond  
Surrey TW9 3AF · UK

Telephone: (01) 940 4086/7

Our Ref. CC/81/YA2/485/AHSO/JFL

Your Ref.

Dr. M.G. de Mathey,  
INTA - E.E.R.A Mendoza,  
Fitopatología,  
5507 - Lujan De Cuyo,  
Mendoza,  
RCA Argentina.

1 October 1981

Dear Dr. Mathey,

Thank you for your letter of 21 September. It is most satisfactory if you write when faced with a doubt concerning a report.

As I examined your isolates last May I no longer have them. However, looking at my report.

Members of the fasciculate *Penicillia* all tend to be rather similar and there are few clear cut species as these tend to merge one into the other. In fact D.Fennell talked of them as a "continuum". To complicate the issue there are several experts working on *Penicillium* at the present time and they do not appear to entirely agree as to the species names or confines. It is therefore a matter of opinion. Your isolates were yellow green in colour, produced the typical conidial heads of the fasciculate group with rough conidiophores. The yellow green colour would place them in *P.viridicatum* Westling = *P. verrucosum* Dierckx (according to Samson et al). However, it grew slightly more rapidly than is usual for *P.viridicatum* and was isolated from onion. This host relationship suggested a tendency towards pathogenicity and the typical bulb pathogen of the group is *P.corymbiferum* = *P.verrucosum* var *corymbiferum* (Westling) Samson Stolk and Hadlock = *P.hirsutum* Dierckx. Samson as you see regards "corymbiferum" as a variety of *P.verrucosum*. Looking at my report I believe I was of the opinion that your isolate belonged in *P.viridicatum* = *P.verrucosum* Dierckx or whatever you like to call it, but I was also pointing out the possible relationship with the well known "bulb" pathogen. I expect you are now even more confused than before. So am I. Unless your isolates are now producing bright maroon drops I would suggest you call them *P.viridicatum* Westling.

Hope this is of some help,

Best wishes,

Yours sincerely,

Dr. Agnes H.S. Onions,  
Curator Culture Collection.

Director: A. Johnston, BSc, AICTA, FIBiol. Assistant Director: C. Booth, MSc, PhD.  
Consultant Director: J.P.M. Brennan, MA, BSc, FLS, FIBiol.

## Plant Pathology

### **Jorge Valdez**

---

**De:** <plantpath@lilyrose.plus.com>  
**Para:** <jvaldez@laconsulta.inta.gov.ar>  
**Enviado:** Viernes, 03 de Noviembre de 2006 06:53 a.m.  
**Adjuntar:** - BSPP PP-06-271 Valdez Penicillium.pdf; - Review comments PP-06-271.pdf  
**Asunto:** Plant Pathology - Decision on Manuscript ID PP-06-271

03-Nov-2006

Dear Mr. Valdez,

I am pleased to accept this manuscript following major revision as outlined below.

I agree with referee #2 and the editor that a major revision is required to make this manuscript acceptable. At present it is too long, unfocussed and contains too much detail and some unnecessary peripheral information. In concentrating on presenting essential elements to support your aims and objectives you should be able to reduce the overall length by one third.

Your revised R.1 version (see below) will return directly to the editor and at that time you should attach a letter detailing how you have dealt with each of the reviewers' and editor's comments and suggestion. Please consult with your co-authors when making your revision.

Revise your manuscript using a word processing programme and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or coloured text.

It is very important that you refer to our online guidelines for electronic artwork available at <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp> when preparing your figures.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Centre. To do this, log into <http://mc.manuscriptcentral.com/pp> and enter your Author Centre, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your original manuscript number will be appended to denote a revision (.R1).

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the referee(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the referee(s).

**IMPORTANT:** Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Plant Pathology, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to Plant Pathology and I look forward to receiving your revision.

Yours sincerely,

Dr. Richard Shattock  
Senior Editor, Plant Pathology  
[plantpath@lilyrose.plus.com](mailto:plantpath@lilyrose.plus.com)

Please note that if you have files attached to your decision letter, go to your Author Centre, click on the 'Manuscripts with Decision' queue and then on the right under 'Status' click on 'View Decision Letter'. The attachment is at the bottom of the decision letter. It will not be attached to this e-mail.

XII.4.4 Correo electrónico 07 de enero de 2008. Dr. Brigitte Mauch-Mani,

## Editor Journal of Phytopathology

### Jorge Valdez

---

**De:** <brigitte.mauch@unine.ch>  
**Para:** <jvaldez@laconsulta.inta.gov.ar>  
**Enviado:** Lunes, 07 de Enero de 2008 08:49 a.m.  
**Asunto:** Journal of Phytopathology - Decision on Manuscript ID JPHY-07-366

Dear Dr. Jorge Valdez:

Manuscript ID JPHY-07-366 entitled "Isolation and identification of the garlic blue mold rot agent *Penicillium allii* using a semi-selective garlic extract media" which you submitted to the Journal of Phytopathology, has been reviewed. The comments of the reviewer(s) are included at the bottom of this letter.

The reviewer(s) have recommended publication, but also suggest some revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log into <http://mc.manuscriptcentral.com/jphy> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

**IMPORTANT:** Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to the Journal of Phytopathology, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to the Journal of Phytopathology and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,  
Dr. Brigitte Mauch-Mani  
Editor, Journal of Phytopathology  
[brigitte.mauch@unine.ch](mailto:brigitte.mauch@unine.ch)

## *XII.5: Artículos publicados*

### XII.5.1 Canadian Journal of Botany 83, 1422-1433.

Overy, D. P., Valdez, J. G. & Frisvad, J. C. 2005. Revisions to *Penicillium* ser. *Corymbifera*: agents responsible for blue mould storage rot of various flower and vegetable bulbs. *Canadian Journal of Botany* **83**(11), 1422-1433.

# Revisions to *Penicillium* ser. *Corymbifera*: agents responsible for blue mould storage rot of various flower and vegetable bulbs

D.P. Overy, J.G. Valdez, and J.C. Frisvad

**Abstract:** Fifteen strains representing each *Penicillium* ser. *Corymbifera* taxa were compared using phenotypic and chemotaxonomic characters by cluster analysis and discriminant partial least squares regression. Variability in phenotypic expression of species strains resulted in a more fragmented classification compared with secondary metabolite expression. Although the observed phenotypic expression varied for strains cultured upon the same media, it was possible to classify strains into species groupings based only upon a few distinctive phenotypic traits. Data analysis of secondary metabolite profiles generated from HPLC-diode array detection analysis gave reliable strain classification when more than one media type was employed. Depending on the species, Czapek yeast autolysate agar typically yielded the greatest chemical diversity; however, several metabolites (terrestrial acid, corymbiferone, the corymbiferan lactones, and daldinin D) were only produced when strains were grown on either yeast extract sucrose or oatmeal agar. For the classification of strains based on a binary data matrix, application of the Yule coefficient gave the best clustering. Several secondary metabolites, of importance for the classification of ser. *Corymbifera* strains, were identified by discriminant-partial least squares regression analysis. A diagnostic key based on phenotypic, chemotaxonomic, and pathogenic traits is provided as an aid for species identification.

**Key words:** *Penicillium albocoremium*, *Penicillium allii*, *Penicillium hirsutum*, *Penicillium hordei*, *Penicillium radicola*, *Penicillium tulipae*, *Penicillium venetum*.

**Résumé :** Les auteurs ont comparé quinze souches représentant chacun des taxons du *Penicillium* ser. *Corymbifera*, sur la base de caractères phénotypiques et chémotaxonomiques, à l'aide de l'analyse par regroupements et la régression des moindres carrés partiellement discriminants. La variabilité de l'expression phénotypique des souches spécifiques aboutit à une classification plus fragmentée, comparativement à l'expression des métabolites secondaires. Bien que l'expression phénotypique varie chez les cultures cultivées sur les mêmes milieux, il est possible de classer les souches en regroupements d'espèces, mais seulement sur la base de quelques caractères phénotypiques distinctifs. L'analyse des données des métabolites secondaires, générées à partir d'analyses HPLC-DAD, conduit à une classification fiable des souches, lorsqu'on utilise plus d'un type de milieux. Selon l'espèce, la gélose de Czapek avec autolysat de levure donne généralement la plus grande diversité chimique; cependant, plusieurs métabolites (acide terrestre, corymbiferone, lactones corymbifériennes et daldine D) ne sont produits que lorsque les souches sont cultivées sur gélose à base de saccharose et extrait de levure, ou de farine d'avoine. Pour la classification des souches, basée sur une matrice de données binaires, l'application du coefficient de Yule donne le meilleur regroupement. Plusieurs métabolites secondaires, importants pour la classification des souches de la sér. *Corymbifera*, ont été identifiées par l'analyse D-PSLR. Les auteurs proposent une clé diagnostique d'identification des espèces, basée sur des caractères, phénotypiques, chémotaxonomiques, et pathogéniques.

**Mots clés :** *Penicillium albocoremium*, *Penicillium allii*, *Penicillium hirsutum*, *Penicillium hordei*, *Penicillium radicola*, *Penicillium tulipae*, *Penicillium venetum*.

[Traduit par la Rédaction]

Received 5 March 2005. Published on the NRC Research Press Web site at <http://canjbot.nrc.ca> on 30 January 2006.

D.P. Overy,<sup>1,2</sup> J.G. Valdez,<sup>3</sup> and J.C. Frisvad. Center for Microbial Biotechnology, Biocentrum-DTU, Building 221, Technical University of Denmark, DK-2800 Kings Lyngby, Denmark.

<sup>1</sup>Corresponding author (e-mail: [dao@aber.ac.uk](mailto:dao@aber.ac.uk)).

<sup>2</sup>Present address: Institute of Biological Sciences, Edward Llwyd Building, University of Wales, Aberystwyth, Ceredigion, SY23 3DA, UK.

<sup>3</sup>Present address: Estacin Experimental Agropecuaria, La Consulta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Mendoza, Argentina.

## Introduction

When Frisvad et al. (2000) created *Penicillium* ser. *Corymbifera*, they elevated the comprising taxa from a variety status of *Penicillium hirsutum* (Frisvad and Filtenborg 1989) to full species status. The taxon *P. hirsutum* Dierckx originated as a brief description in 1901 and was later re-described in more detail by Biourge (1923). However, prior to Biourge's redescription (Biourge 1923), Westling (1911) provided a complete description of the species under the name *P. corymbiferium* Westling. Raper and Thom (1949) later recognized *P. hirsutum* Dierckx as a synonym of *P. corymbiferium* Westling on the basis that Westling's description antedated Biourge's redescription.

In 1969, Stolk characterized the species *P. hordei* as unique within the genus *Penicillium*, placing the description in Raper and Thom's (1949) *P. granulatum* series closest to *P. corymbiferum* (Stolk 1969). When Samson et al. (1976) later revised subsection *Fasciculata*, they considered *P. corymbiferum* Westling and *P. hirsutum* Dierckx as synonyms of one variable species under the name *P. verrucosum* Dierckx var. *corymbiferum* (Westling) because of insignificant differences in morphology. Following this, in his monograph of the genus *Penicillium*, Pitt (1979) once again gave priority to the name *P. hirsutum* Dierckx (as Dierckx's (1901) description superceded that of *P. corymbiferum* Westling). Pitt also believed that Stolk's characterization of *P. hordei* was based on differences of degree that were considered too minor to warrant recognition of *P. hordei* and characterized *P. hordei* as a synonym of *P. hirsutum* Dierckx. *Penicillium allii* was described by Vincent and Pitt (1989) and later the same year, Frisvad and Filtenborg reclassified the taxon *P. hirsutum* Dierckx into the varieties *P. hirsutum* var. *hirsutum*, *P. hirsutum* var. *allii* (Vincent & Pitt) Frisvad, and *P. hirsutum* var. *hordei* (Stolk) Frisvad and introduced the varieties *P. hirsutum* var. *albocoremium* Frisvad and *P. hirsutum* var. *venetum* Frisvad (Frisvad and Filtenborg 1989). These five varieties were later elevated to species status when Frisvad et al. (2000) created *Penicillium* ser. *Corymbifera*. Characterization of ser. *Corymbifera* was based upon habitat, micromorphological, and secondary metabolic similarities of the comprising taxa (Frisvad et al. 2000). Further revisions to ser. *Corymbifera* by Overy and Frisvad (2003) saw the addition of two more species (characterizations based on a uniqueness in phenotype and secondary metabolite expression), raising the number of accepted species to a total of seven: *P. albocoremium* Frisvad (Frisvad), *P. allii* Vincent & Pitt, *P. hirsutum* Dierckx, *P. hordei* Stolk, *P. radicola* Overy & Frisvad, *P. tulipae* Overy & Frisvad, and *P. venetum* Frisvad (Frisvad).

Relatedness of species within ser. *Corymbifera* and uniqueness of the series within subgenus *Penicillium* has been demonstrated using extracellular enzymatic activity and temperature tolerance profiling (Overy et al. 2005b). Although being morphologically similar at the microscopic level, *Corymbifera* species can be distinguished from each other by their distinctive differences in secondary metabolite production and variations in colony morphology and growth rate on various media (Frisvad and Filtenborg 1989; Overy and Frisvad 2003). Series *Corymbifera* taxa are closely associated with the rhizosphere of various flowers and vegetables (especially bulbs) with the exception of *P. hordei*, which has been associated primarily with barley (Overy et al. 2005a; Stolk 1969). Volatility of the taxonomic nomenclature within ser. *Corymbifera* has left a mark upon the plant pathological literature, where crop losses are often associated with the blue mold agent *P. corymbiferum* Westling (Chauhan and Saaltink 1969; Doss et al. 1989; Hill 1977; Nicholson and Ingram 1989; Prince et al. 1988; Saaltink 1971; Cappelli et al. 1991). Recent work by Overy and collaborators has clarified some of the existing misconceptions regarding the pathological association of ser. *Corymbifera* species with *Allium sativum*, *Allium cepa* (yellow onion), *Allium cepa* (red onion), *Tulipa gesneriana* cultivars, and *Gladiolus* sp. (Overy et al. 2005a).

In this manuscript, ser. *Corymbifera* strains were evaluated by growth rates, colony morphology, and secondary metabolite production on three media. These results were compiled into data matrices and compared using cluster analysis and discriminant-partial least squares regression (D-PLSR) to determine if the strains could be separated into representative species characterizations and to judge the effectiveness of the measured characteristics for their ability to group the surveyed strains into species groupings. Additionally, the results generated from the D-PLSR analysis were used to identify relevant secondary metabolite species descriptors. TLC profiles of *Corymbifera* culture extracts grown separately on three different media are provided along with a descriptive table and a diagnostic key for rapid species identification.

## Materials and methods

An average of 15 strains of each taxa representative of *Penicillium* ser. *Corymbifera* (Table 1; with the exception of 11 strains of *P. hirsutum*), present in the IBT culture collection (BioCentrum-DTU, Lyngby, Denmark), were revived and streaked on Czapek yeast autolysate agar (CYA; for all media formulations refer to (Samson et al. 2002)) to ensure culture purity. Spore suspensions were prepared, and all strains were individually inoculated onto CYA, yeast extract sucrose (YES), and oatmeal agar (OA) and incubated in the dark at 25 °C. After 7 d, colony diameters were measured, and colony morphology was described. Cultures were returned to the previous incubation conditions and subsequently removed after 14 d and extracted according to Smedsgaard (1997). Culture extracts were profiled by TLC according to Overy and Frisvad (2003) and by reverse phase (RP)-HPLC according to Smedsgaard (1997). For strains analysed by RP-HPLC, 10 strains from each species were profiled for each medium type, while extracts from CYA, OAT, and YES were combined for each of the five remaining strains prior to analysis. Metabolite identification was confirmed by comparison against metabolite standards, both by retention time and UV absorption spectrum (200–600 nm). The metabolite expression of each species strain was combined for each medium and represented in a binary form (1, detected; 0, not detected) in a data matrix (100 (strains) × 40 (metabolites)).

Colony macromorphology on CYA, OAT, and YES was evaluated based on the following characteristics: colony diameter (mm); central, median, and periphery colony margin colour; reverse coloration; production and colour of exudates; production and colour of diffusible pigments; both central and peripheral colony texture (1, velvety; 2, lanose; 3, funiculose; 4, fasciculate; 5, densely fasciculate); both central and peripheral colony sporulation (0, absent; 1, minimal; 2, moderate; 3, dense); presence of sulcations (0, absent; 1, minimal; 2, moderate; 3, dense). Colours were approximated using the Methuen handbook of colour (Kornerup and Wanscher 1978). The corresponding colour from the book was then digitized, and each colour was given a unique value based upon the pixel red–blue–green content. All of the quantitative and qualitative values were entered into a data matrix (100 (strains) × 93 (31 phenotypic characteristics × 3 media)).

**Table 1.** *Corymbifera* strains used from the IBT culture collection.

Species	Strain No. <sup>a</sup>
<i>P. albocoremium</i>	IBT 3457, IBT 3891, IBT 10672, IBT 10673, IBT 10683, IBT 10688, IBT 13001, IBT 16884 = CBS 320.97 = CBS 109586, IBT 19154 = CBS 109614, IBT 19397, IBT 20068 = 109582, IBT 21071 = CBS 109584, IBT 21502 = IBT 10682 = CBS 472.84 = IMI 285511, IBT 22521 = CBS 109585, IBT 22806 = CBS 109583
<i>P. allii</i>	IBT 3772 = IBT 3056 = CBS 188.88, IBT 4112 = CBS 109581 = CCF 1875, IBT 5460, IBT 5553 = CBS 109580, IBT 5555, IBT 11735 = CBS 109579, IBT 13030 = CBS 411.92, IBT 14490 = CBS 109578, IBT 20212 = CBS 875.95, IBT 20213, IBT 21503 = CBS 131.89, IBT 24696 = IMI 389475, IBT 24768, IBT 26460, IBT 26466
<i>P. hirsutum</i>	IBT 3061, IBT 3096, IBT 10623 = CBS 110101 = CCF 1445, IBT 10624 = CBS 110100 = NRRL 999, IBT 10702 = CCM F-240, IBT 12398 = CBS 349.75, IBT 13033 = CBS 437.92, IBT 18398 = CBS 110098 = CCRC 32022, IBT 19340 = CBS 110099 = FRR 3642, IBT 21531 = CBS 135.41, IBT 22221 = CBS 112318
<i>P. hordei</i>	IBT 3083, IBT 3084 = CBS 473.48, IBT 3097, IBT 4154 = CCF 1884, IBT 4900 = CBS 559.90, IBT 11204 = CBS 112440, IBT 11478, IBT 12904, IBT 14329, IBT 15999 = CBS 110097, IBT 16374 = CBS 110122, IBT 21532 = CBS 560.90, IBT 23013, IBT 23023 = CBS 704.68, IBT 23024 = CBS 788.70
<i>P. radicola</i>	IBT 3489, IBT 3491, IBT 10629, IBT 10693, IBT 10695, IBT 10696, IBT 10698 = IMI 293206, IBT 10699, IBT 11646, IBT 12914, IBT 18894, IBT 22520, IBT 22522, IBT 22526, IBT 22536
<i>P. tulipae</i>	IBT 3458 = CBS 109555, IBT 6173 = CBS 112433, IBT 10631 = CBS 112431, IBT 10632, IBT 10674, IBT 10676 = CBS 111217, IBT 10677, IBT 10678, IBT 10681, IBT 10684, IBT 10686, IBT 10687 = CBS 109552, IBT 11648, IBT 13029 = CBS 407.92, IBT 23036 = CBS 734.74
<i>P. venetum</i>	IBT 3053, IBT 10655 = IMI 068783, IBT 13026, IBT 14659, IBT 16215 = IBT 16127 = CBS 110096, IBT 16308, IBT 21549 = CBS 405.92, IBT 21748, IBT 22111, IBT 22504, IBT 22730, IBT 23039 = CBS 201.57, IBT 23040 = CBS 253.96, IBT 23814 = CBS 11244

<sup>a</sup>IBT, IBT culture collection at the Centre for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Kgs. Lyngby, Denmark; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; CCF, Culture Collection of Fungi, Prague, Czech Republic; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Tvrdeho, Czech Republic; CCRC, Culture Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan; FRR, Division of Food Research, CSIRO, North Ryde, Australia; IMI, International Mycological Institute, Surrey, UK; NRRL, ARS Culture Collection, Northern Utilization Regional Research Center, Peoria, Illinois, USA.

Because of the presence of quantitative and qualitative variables within the phenotypic matrices, principal coordinates analysis (PCoordA) (Gower 1966) were performed using the software NTSYS (Rohlf 2002) to classify the isolates on CYA, OAT, YES, and all three media combined. The first two axes from each independent PCoord analysis were combined to create a procrustes consensus matrix (Gower 1966), and subsequent sequential agglomerative hierarchical nested (SAHN) cluster analysis was performed. For the binary secondary metabolite data matrix of the combined media, similarity matrices were constructed using Jaccard, simple matching, and Yule coefficients, and subsequent SAHN clustering was performed. Additionally, species were recorded as a category variable and split to create a dummy Y matrix, and D-PLSR was performed using the Unscrambler version 7.6 (CAMO, Oslo)(Esbensen et al. 2000) to confirm classification of species by secondary metabolite production and to ascertain distinctive metabolites responsible for the classification of the *Corymbifera* strains. Full cross-validation was employed during D-PLSR calculations. As the Yule coefficient was judged to be the most effective, it was applied to construct the similarity matrices and subsequent cluster analysis of the CYA, YES, and OAT secondary metabolite data.

## Results

Results from the cluster analyses are summarized in Table 2. Species groupings were evaluated by the number of species strains clustered, the number of additional alien strains present within the cluster, and the number of species strains remaining as outliers to the cluster. Cluster analyses of strain phenotype characters exhibited on the three individual media (CYA, OAT, and YES) yielded different degrees of species separation. Results from colony phenotype ex-

pressed upon CYA were relatively inconclusive, and only *P. albocoremium* and *P. hordei* strains clustered into species groupings containing more than 70% of their respective strains. Results from both YES and OAT media were remarkably improved in comparison. From phenotypic expression on YES media, *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. hirsutum*, *P. hordei*, and *P. venetum* strains clustered into species groupings containing 87% species strains or greater, with only *P. venetum* having one alien strain in its cluster. *Penicillium allii* and *P. venetum*; *P. hirsutum* and *P. albocoremium*; and *P. radicola*, *P. tulipae*, and *P. hordei* clustered together and then separated into distinct species groupings, with the exception of *P. tulipae* and *P. radicola*, whose strains were thoroughly intermixed. Six of the *P. radicola* strains produced white colonies on YES and, following cluster analysis, were the first to separate from the remaining *Corymbifera* strains, forming an outgroup. From the OAT agar results, species separation was possible for all ser. *Corymbifera* species, except for *P. hirsutum*. Strains of *P. venetum* clustered out first, forming a distinct species grouping, followed by strains of *P. hordei*. From the remaining strains, *P. albocoremium* strains separated from *P. tulipae*, *P. radicola*, and *P. allii*, all of which formed distinct clusters. Cluster analysis on the procrustes consensus configuration of the phenotypic expression on the standard media (Fig. 1) did not provide as adequate a species grouping as YES and OAT media did on their own. The number of alien strains within the species clusters increased significantly. Definitive species groupings were not possible for *P. allii* and *P. venetum* or *P. tulipae* and *P. radicola*, as too many small, intermixed strain clusters formed.

Cluster analysis of the combined media secondary metabolite expression gave consistent classification of all of the strains into their respective species groupings using the Jac-

**Table 2.** *Corymbifera* phenotypic and chemotaxonomic cluster analysis results from strains grown on Czapek yeast autolysate agar (CYA), yeast extract sucrose (YES), and oatmeal agar (OAT), and all three media combined.

Species	Media	Phenotype		Secondary metabolism	
		Coefficient	TSt (St/Aln/Out) <sup>a</sup>	Coefficient	TSt (St/Aln/Out) <sup>a</sup>
<i>P. albocoremium</i>	CYA	0.79	15 (15/0/0)	0.87	10 (10/3/0)
<i>P. albocoremium</i>	YES	0.835	15 (13/0/2)	0.938	10 (10/1/0)
<i>P. albocoremium</i>	OAT	0.95	15 (13/0/2)	0.893	10 (10/3/0)
<i>P. albocoremium</i>	Combined	0.965	15 (13/7/2)	0.989	15 (15/0/0)
<i>P. allii</i>	CYA	0.88	15 (8/0/7)	0.937	10 (6/0/4)
<i>P. allii</i>	YES	0.815	15 (14/0/1)	0.894	10 (10/0/0)
<i>P. allii</i>	OAT	0.93	15 (12/0/3)	0.938	10 (7/0/0)
<i>P. allii</i>	Combined	0.88	15 (15/17/0)	0.847	15 (15/0/0)
<i>P. hirsutum</i>	CYA	—	Many small clusters	0.906	10 (10/0/0)
<i>P. hirsutum</i>	YES	0.82	11 (10/0/1)	0.842	10 (10/0/0)
<i>P. hirsutum</i>	OAT	0.72	11 (5/1/6)	0.966	10 (6/0/4)
<i>P. hirsutum</i>	Combined	0.947	11 (6/0/5)	0.898	11 (11/0/0)
<i>P. hordei</i>	CYA	0.7	15 (11/1/4)	0.988	10 (10/0/0)
<i>P. hordei</i>	YES	0.9	15 (15/0/0)	0.978	10 (8/0/2)
<i>P. hordei</i>	OAT	0.84	15 (12/0/3)	0.97	10 (6/1/4)
<i>P. hordei</i>	Combined	0.945	15 (9/1/6)	0.907	15 (15/0/0)
<i>P. radicicola</i>	CYA	0.89	15 (8/0/7)	0.978	10 (10/1/0)
<i>P. radicicola</i>	YES	0.915	15 (6/0/0)	0.962	10 (10/0/0)
<i>P. radicicola</i>	OAT	0.91	15 (13/0/2)	0.985	10 (10/0/0)
<i>P. radicicola</i>	Combined	0.93	15 (14/16/1)	0.993	15 (15/0/0)
<i>P. tulipae</i>	CYA	0.91	15 (11/0/4)	0.98	10 (10/0/0)
<i>P. tulipae</i>	YES	0.826	15 (7/3/8)	1	10 (10/0/0)
<i>P. tulipae</i>	OAT	0.906	15 (14/0/1)	0.995	10 (10/0/0)
<i>P. tulipae</i>	Combined	0.93	15 (15/15/0)	0.995	15 (15/0/0)
<i>P. venetum</i>	CYA	—	Many small clusters	0.98	10 (7/0/3)
<i>P. venetum</i>	YES	0.825	14 (13/1/1)	0.89	10 (9/2/1)
<i>P. venetum</i>	OAT	0.904	14 (14/0/0)	0.94	10 (6/0/4)
<i>P. venetum</i>	Combined	0.88	14 (14/17/0)	0.97	14 (14/0/0)

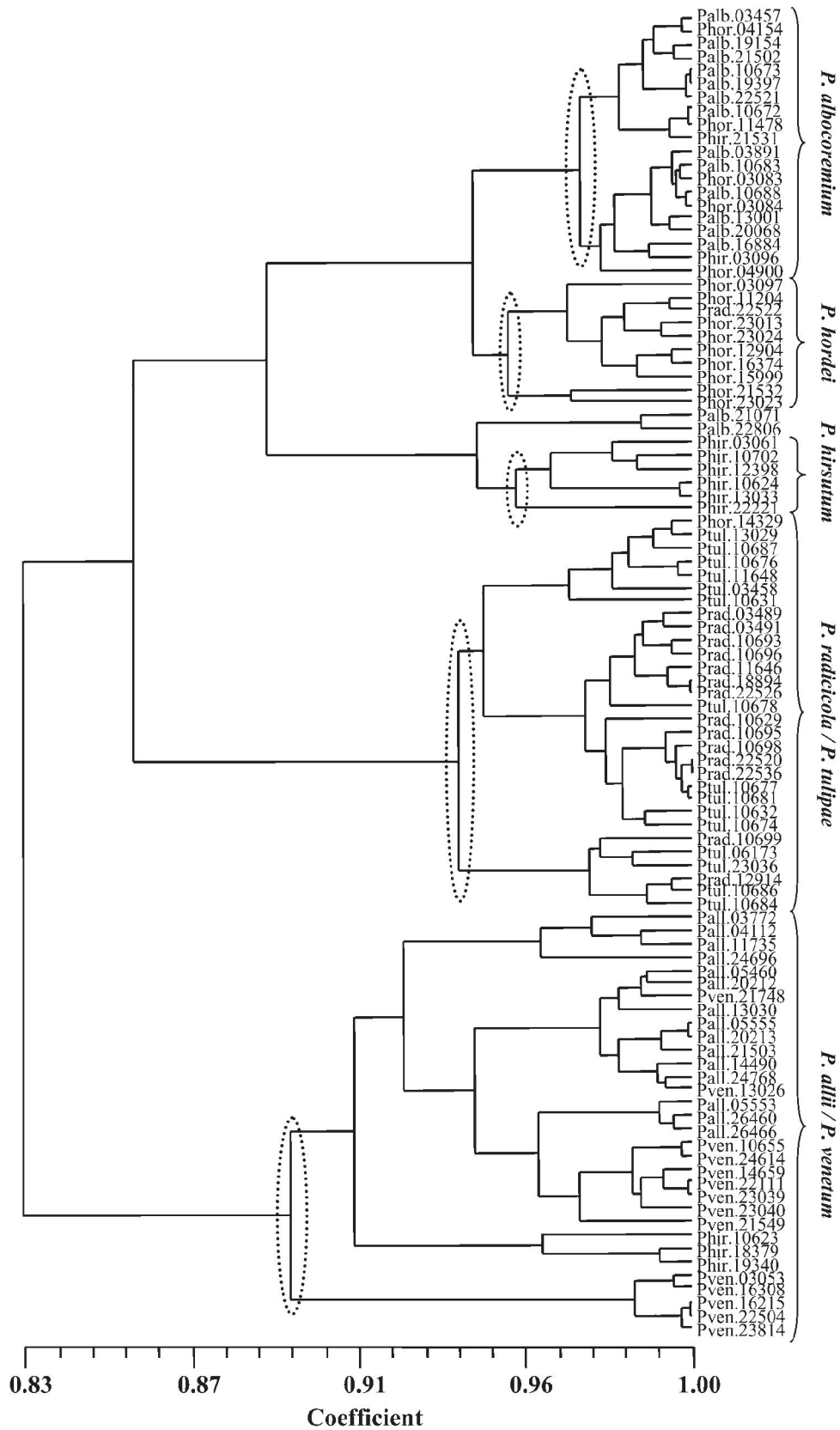
<sup>a</sup>TSt, total number of species strains; St, number of strains in cluster; Aln, number of alien strains in cluster; Out, number of strains present as outliers from species cluster.

card, simple matching, and Yule coefficients. Cluster analysis using the three different coefficients each separated *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicicola*, and *P. tulipae* away from *P. hirsutum*, *P. venetum*, and *P. hordei*; where *P. hirsutum* later clustered away from *P. venetum* and *P. hordei*. Results from the three different coefficients did produce different clustering with regards to the separation of *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicicola*, and *P. tulipae*. Both Jaccard and simple matching coefficients caused *P. radicicola* and *P. tulipae* to separate from *P. albocoremium* and *P. allii*. The Yule coefficient caused *P. tulipae* to separate from *P. radicicola*, *P. allii*, and *P. albocoremium*; of which *P. allii* later separated from *P. albocoremium* and *P. radicicola*. However, use of the Yule coefficient during cluster analysis gave the highest co-phenetic correlation between the dendrogram and the similarity matrix, placing the strains into compact species clusters (Fig. 2) as compared with results using the Jaccard and simple matching coefficients (not shown). The Yule coefficient was therefore used for the cluster analysis of the secondary metabolite production data on the individual media.

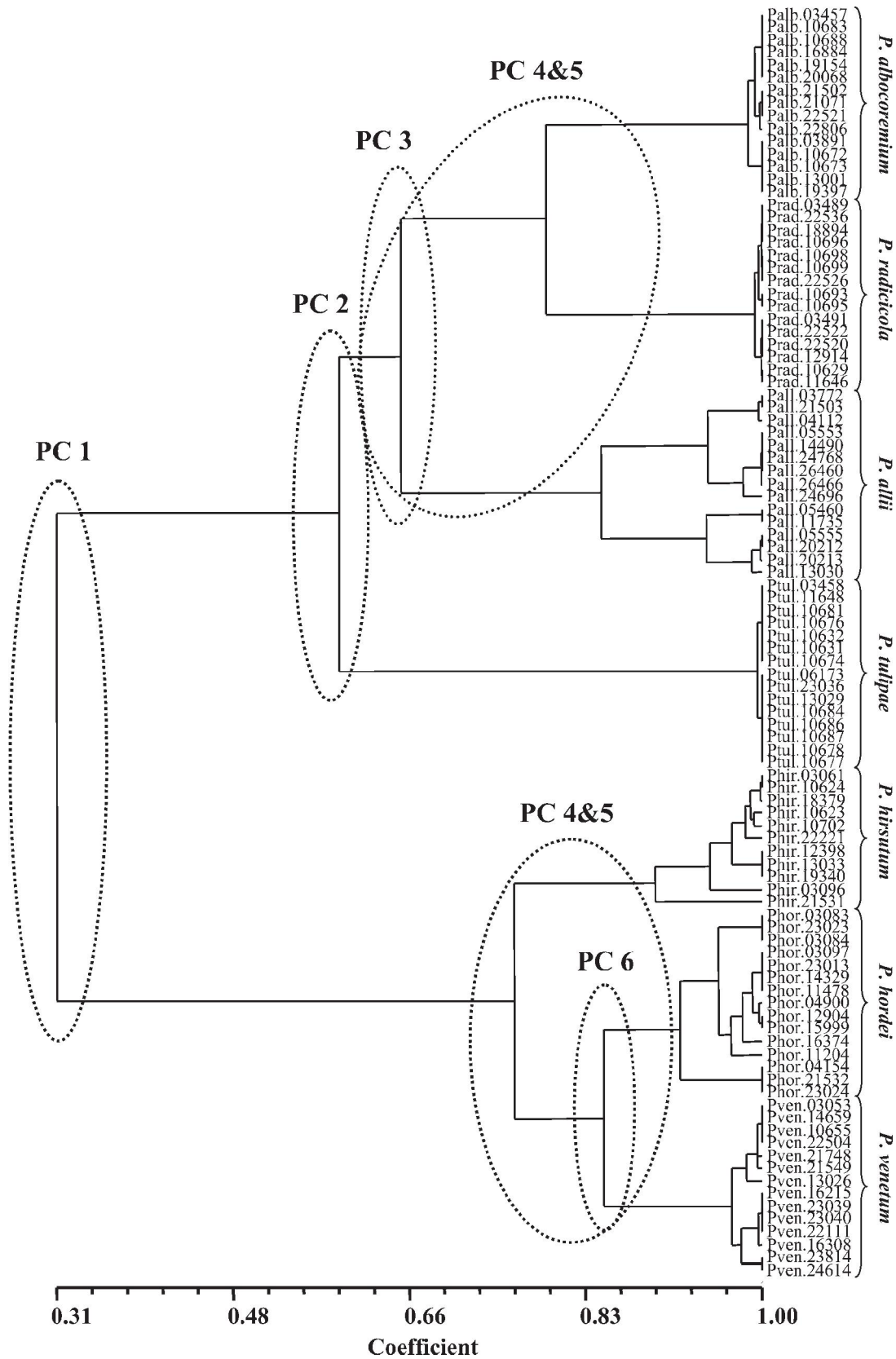
D-PLSR analysis of the strain secondary metabolite production (combined media) corroborated the dendrogram pro-

duced using the Yule coefficient (Fig. 2). The analysis required six principal components (PCs) (explaining 76% and 91% of the variance in X and Y matrices, respectively) to separate the strains into species groupings. Further PCs only described strain variation within a species group and were therefore excluded. The first PC described 25% of the X matrix and 16% of the Y matrix, separating strains of *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicicola*, and *P. tulipae* away from *P. hirsutum*, *P. hordei*, and *P. venetum* because of the production of meleagrins and andrastin A. PC 2 subsequently described 19% of the X matrix and 16% of the Y matrix, separating *P. tulipae* away from *P. albocoremium*, *P. allii*, and *P. radicicola* because of the production of chrysogins, *epi*-neoxalins, and penitrem A. PC 3 described 12% of the X matrix and 15% of the Y matrix, separating *P. allii* away from *P. albocoremium* and *P. radicicola* because of the production of fulvic acid and metabolites with a fulvic acid family chromophore. PC 4 and PC 5 described 16% of the X matrix and 30% of the Y matrix; separating *P. hirsutum* from *P. hordei* and *P. venetum* because of the production of compactin, cyclophenol, glandicolins A and B, and viridicatol, and separating *P. albocoremium* from *P. allii* and *P. radicicola* by the production of barceloneic acids A and B, barceloneic lactone, and methyl barcelo-

**Fig. 1.** Classification of *Corymbifera* strains following cluster analysis of strains using Euclidian distance coefficient of procrustes consensus configuration of phenotypic expression on Czapek yeast autolysate agar (CYA), yeast extract sucrose (YES), and oatmeal agar (OAT).



**Fig. 2.** Classification of *Corymbifera* strains following cluster analysis using the Yule coefficient of the combined secondary metabolite production matrix from Czapek yeast autolysate agar (CYA), yeast extract sucrose (YES), and oatmeal agar (OAT) media.



**Table 3.** Identified secondary metabolites produced by *Corymbifera* strains on Czapek yeast autolysate agar (CYA), yeast extract sucrose (YES), and oatmeal agar (OAT) agar.

Species	CYA	YES	OAT
<i>P. albocoremium</i>	Andrastin A 4/10	Andrastin A 10/10	Andrastin A 8/10
	Atrovenetin 5/10	Atrovenetin 9/10	Atrovenetin 7/10
	Barceloneic acid A 10/10	Barceloneic acid A 10/10	Barceloneic acid A 10/10
	Barceloneic acid B 10/10	Barceloneic acid B 10/10	Barceloneic acid B 10/10
	Barceloneic lactone 10/10	Barceloneic lactone 10/10	Barceloneic lactone 10/10
	Corymbiferan lactone A 1/10	Corymbiferan lactone A 1/10	Corymbiferan lactone A 5/10
	Chrysogine 5/10	Chrysogine 1/10	
	Cyclopeptin 10/10	Cyclopeptin 10/10	Cyclopeptin 10/10
	Cyclopenin 10/10	Cyclopenin 10/10	Cyclopenin 10/10
	Cyclophenol 9/10	Cyclophenol 9/10	Cyclophenol 10/10
	Dehydrocyclopenin 10/10	Dehydrocyclopenin 10/10	Dehydrocyclopenin 10/10
	Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10
	Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10
	Meleagrins 10/10	Meleagrins 10/10	Meleagrins 10/10
	Methyl barceloneate 5/10	Methyl barceloneate 10/10	Methyl barceloneate 10/10
	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10
	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10
	Viridicatin 1/10	Viridicatin 6/10	
	Viridicatol 1/10	Viridicatol 5/10	Viridicatol 1/10
	<i>P. allii</i>	Andrastin A 8/10	Andrastin A 10/10
Atrovenetin 4/10		Atrovenetin 10/10	Atrovenetin 10/10
Barceloneic acid A 4/10			Barceloneic acid A 1/10
Barceloneic acid B 1/10			Barceloneic acid B 1/10
Barceloneic lactone 2/10			Barceloneic lactone 1/10
Chrysogine 1/10			
Corymbiferan lactone A 3/10		Corymbiferan lactone A 7/10	Corymbiferan lactone A 10/10
Cyclopeptin 5/10		Cyclopeptin 7/10	Cyclopeptin 8/10
Cyclopenin 5/10		Cyclopenin 7/10	Cyclopenin 8/10
Cyclophenol 5/10		Cyclophenol 6/10	Cyclophenol 8/10
Dehydrocyclopenin 5/10		Dehydrocyclopenin 7/10	Dehydrocyclopenin 8/10
Fulvic acid 2/10		Fulvic acid 6/10	Fulvic acid 8/10
Fulvic acid family 8/10		Fulvic acid family 9/10	Fulvic acid family 10/10
Glandicoline A 10/10		Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10
Glandicoline B 10/10		Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10
Meleagrins 10/10		Meleagrins 10/10	Meleagrins 10/10
Roquefortine C 10/10		Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10
Roquefortine D 10/10		Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10
Viridicatin 1/10		Viridicatin 4/10	Viridicatin 3/10
Viridicatol 2/10		Viridicatol 3/10	Viridicatol 4/10
<i>P. hirsutum</i>	Atrovenetin 10/10	Atrovenetin 10/10	Atrovenetin 10/10
	Compactin 1	Compactin 1	Compactin 1
	Compactin 2	Compactin 2	Compactin 2
	Corymbiferan lactone C 1/10	Corymbiferan lactone C 3/10	Corymbiferan lactone C 5/10
	Corymbiferan lactone D 8/10	Corymbiferan lactone D 8/10	Corymbiferan lactone D 10/10
	Corymbiferone 3/10	Corymbiferone 9/10	Corymbiferone 9/10
	Cyclopeptin 8/10	Cyclopeptin 8/10	Cyclopeptin 4/10
	Cyclopenin 6/10	Cyclopenin 7/10	Cyclopenin 3/10
	Cyclophenol 6/10	Cyclophenol 7/10	Cyclophenol 3/10
		Daldinin D 6/10	
	Dehydrocyclopenin 6/10	Dehydrocyclopenin 7/10	Dehydrocyclopenin 3/10
	Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10
	Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10
	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10
	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10
		Terrestric acid 8/10	Terrestric acid 6/10
	Viridicatol 6/10	Viridicatol 7/10	Viridicatol 3/10

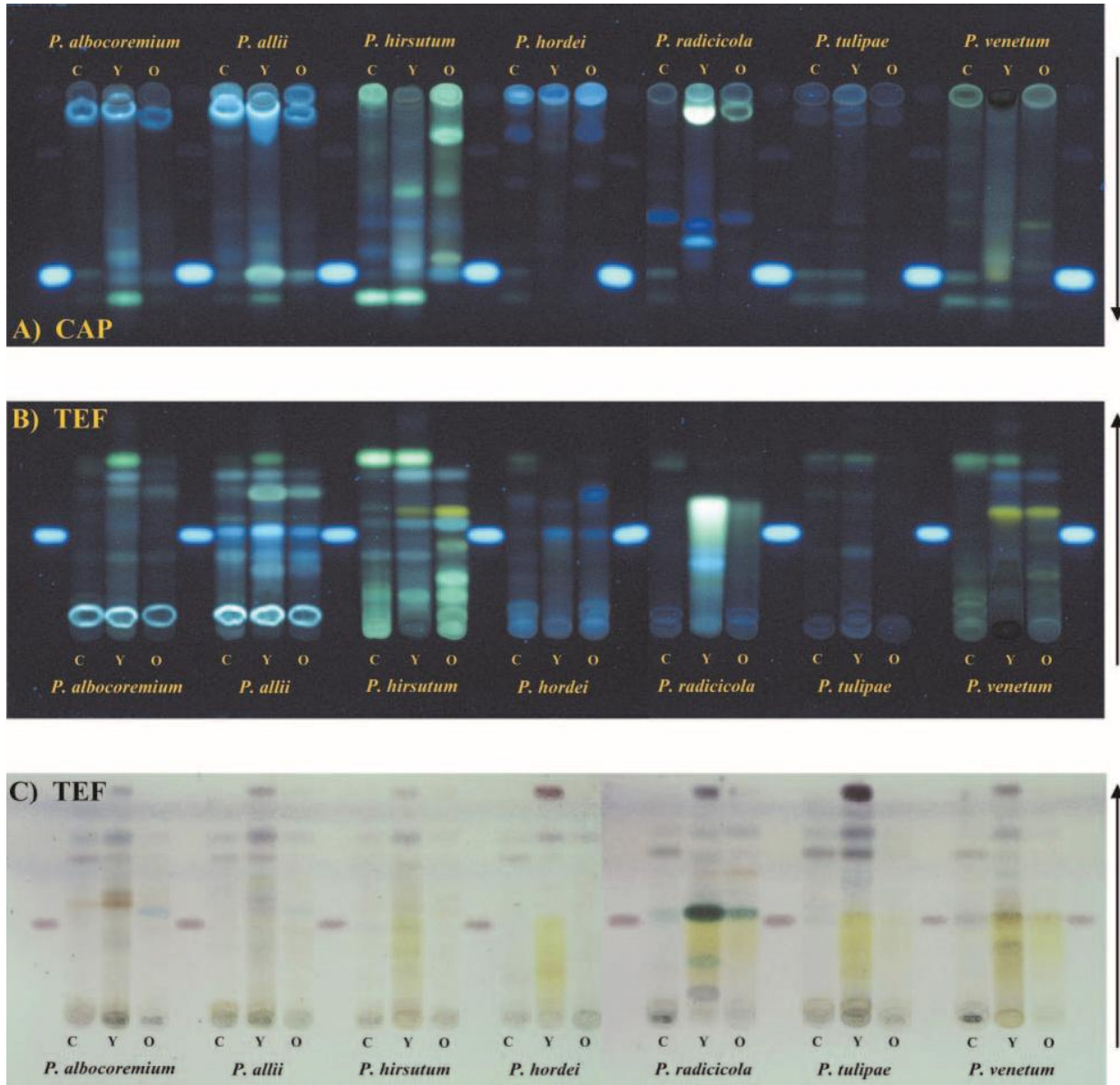
**Table 3** (concluded).

Species	CYA	YES	OAT
<i>P. hordei</i>	Atrovenetin 9/10	Atrovenetin 8/10	Atrovenetin 10/10
			Corymbiferan lactone A 3/10
			Corymbiferan lactone B 3/10
			Corymbiferan lactone C 6/10
			Corymbiferan lactone D 9/10
			Corymbiferone 8/10
			Cyclopeptin 4/10
			Cyclophenin 4/10
			Cyclophenol 4/10
			Dehydrocyclophenin 4/10
	Roquefortine C 10/10		Roquefortine C 10/10
	Roquefortine D 10/10		Roquefortine D 10/10
<i>P. radicicola</i>		Terrestric acid 10/10	Terrestric acid 9/10
	Andrastin A 10/10	Andrastin A 8/10	Andrastin A 10/10
	Barceloneic acid B 1/10	Barceloneic acid B 6/10	Barceloneic acid B 1/10
	Barceloneic lactone 1/10	Barceloneic lactone 3/10	Barceloneic lactone 1/10
	Chrysogine 6/10	Chrysogine 1/10	
	Citrinin 4/10	Citrinin 10/10	Citrinin 7/10
	Cyclopeptin 10/10	Cyclopeptin 7/10	Cyclopeptin 8/10
	Cyclophenin 10/10	Cyclophenin 7/10	Cyclophenin 8/10
	Cyclophenol 10/10	Cyclophenol 2/10	Cyclophenol 7/10
	Dehydrocyclophenin 10/10	Dehydrocyclophenin 7/10	Dehydrocyclophenin 8/10
	Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10
	Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10
	Meleagrins 10/10	Meleagrins 9/10	Meleagrins 10/10
	Penicillic acid 9/10	Penicillic acid 9/10	Penicillic acid 10/10
	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10
	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10
	Terrestric acid 1/10	Terrestric acid 10/10	Terrestric acid 10/10
	Viridicatin 1/10	Viridicatin 3/10	Viridicatin 1/10
	Viridicatol 1/10	Viridicatol 1/10	Viridicatol 2/10
	<i>P. tulipae</i>	Andrastin A 8/10	Andrastin A 10/10
Chrysogine 10/10			
<i>Epi</i> -neoxaline 10/10		<i>Epi</i> -neoxaline 10/10	<i>Epi</i> -neoxaline 10/10
Glandicoline A 10/10		Glandicoline A 10/10	Glandicoline A 10/10
Glandicoline B 10/10		Glandicoline B 10/10	Glandicoline B 10/10
Meleagrins 10/10		Meleagrins 9/10	Meleagrins 10/10
Penitrem A 10/10		Penitrem A 10/10	Penitrem A 9/10
Roquefortine C 10/10		Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10
Roquefortine D 10/10		Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10
		Terrestric acid 6/10	Terrestric acid 9/10
		Atrovenetin 9/10	Atrovenetin 9/10
			Corymbiferan lactone C 4/10
			Corymbiferan lactone D 8/10
		Corymbiferone 3/10	Corymbiferone 9/10
	Cyclopeptin 10/10	Cyclopeptin 8/10	
	Cyclophenin 10/10	Cyclophenin 8/10	
	Cyclophenol 1/10	Cyclophenol 4/10	
	Dehydrocyclophenin 10/10	Dehydrocyclophenin 8/10	
	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10	
	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10	
	Terrestric acid 2/10	Terrestric acid 9/10	
	Viridicatin 3/10	Viridicatin 3/10	
	Viridicatol 1/10	Viridicatol 1/10	
<i>P. venetum</i>	Atrovenetin 9/10	Atrovenetin 9/10	Atrovenetin 9/10
	Corymbiferan lactone C 1/10		Corymbiferan lactone C 4/10
	Corymbiferan lactone D 1/10		Corymbiferan lactone D 8/10
	Corymbiferone 3/10	Corymbiferone 5/10	Corymbiferone 9/10
	Cyclopeptin 10/10	Cyclopeptin 10/10	Cyclopeptin 8/10
	Cyclophenin 10/10	Cyclophenin 10/10	Cyclophenin 8/10
	Cyclophenol 1/10	Cyclophenol 3/10	Cyclophenol 4/10
	Dehydrocyclophenin 10/10	Dehydrocyclophenin 10/10	Dehydrocyclophenin 8/10
	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10	Roquefortine C 10/10
	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10	Roquefortine D 10/10
	Terrestric acid 2/10	Terrestric acid 8/10	Terrestric acid 9/10
	Viridicatin 3/10	Viridicatin 6/10	Viridicatin 3/10
	Viridicatol 1/10	Viridicatol 2/10	Viridicatol 1/10

neate. *Penicillium radicicola* was separated from *P. albocoremium* along PCs 4 and 5 because of the production of citrinin, penicillic acid, and terrestric acid. The sixth

PC described 4% of the X matrix and 14% of the Y matrix, separating *P. venetum* from *P. hordei* on the production of cyclophenin, cyclopeptin, and viridicatin.

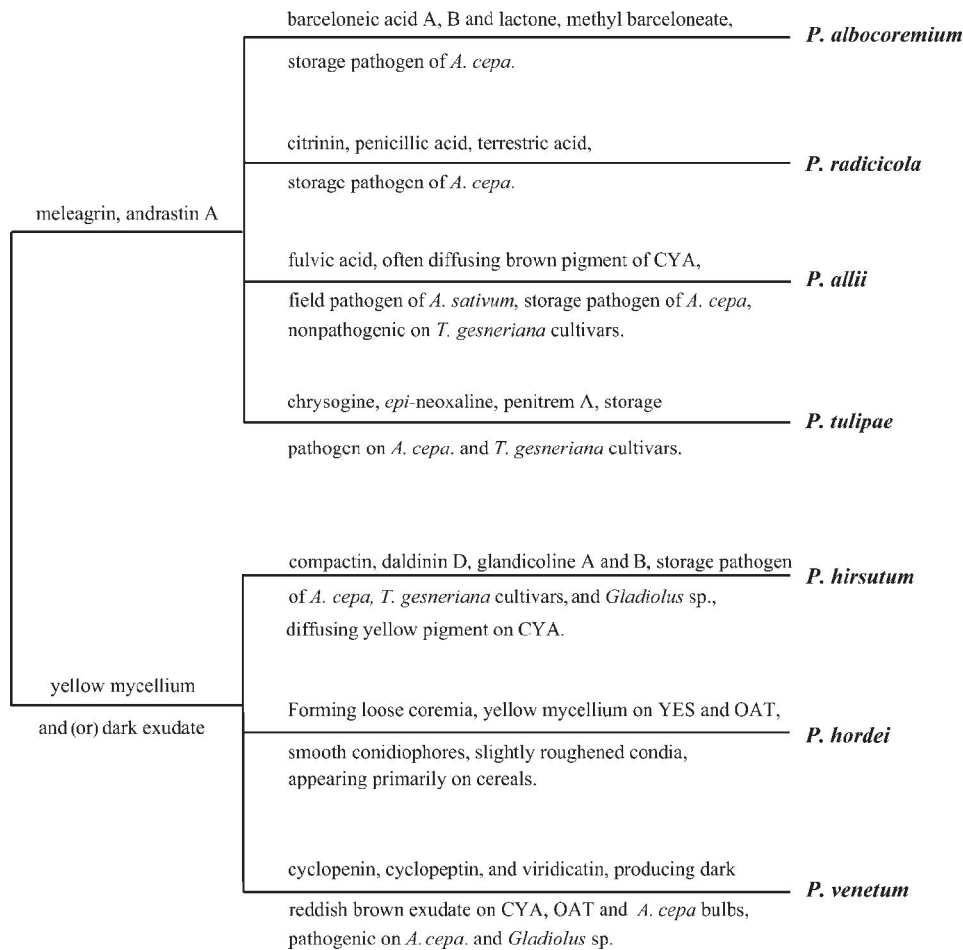
**Fig. 3.** TLC profiling of culture extracts from *Corymbifera* strains grown on Czapek yeast autolysate agar (CYA), yeast extract sucrose (YES), and oatmeal agar (OAT) using griseofulvin as a reference (arrows indicate direction of solvent flow). (A) Developed in CAP (dicholormethane–acetone–isopropanol; 85:15:20, by volume) and viewed under UV light (365 nm). (B) Developed in TEF (toluene – ethyl acetate – formic acid (90%); 5:3:2, by volume) and viewed under UV light (365 nm). (C) Developed in TEF, after being sprayed with 0.5% *p*-anisaldehyde (4-methoxybenzaldehyde) in ethanol – acetic acid – concentrated sulphuric acid (17:2:1, by volume) and heated for 10 min at 130 °C.



Secondary metabolite production by the surveyed strains did differ in expression depending upon the media used for growth (Table 3; Fig. 3), resulting in differing dendrograms for CYA, YES, and OA media (not shown). For CYA, *P. hirsutum*, *P. hordei*, and *P. venetum* separated away from *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicola*, and *P. tulipae*; where *P. hirsutum* later separated from *P. hordei* and *P. venetum*, and *P. tulipae* separated from *P. albocoremium*, *P. allii*, and *P. radicola*. *Penicillium albocoremium* subsequently separated from *P. radicola* and *P. allii*. For YES, strains of *P. hordei* formed a unique outgroup, while *P. hirsutum* and *P. venetum* separated from

*P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicola*, and *P. tulipae*. *Penicillium albocoremium* then separated from *P. radicola* and *P. tulipae*, followed in turn by *P. allii*. For OAT, *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicola*, and *P. tulipae* once again separated away from *P. hirsutum*, *P. hordei*, and *P. venetum*. Two groups, *P. albocoremium* and *P. allii*, and *P. radicola* and *P. tulipae*, separated together and then formed distinct groups, while *P. venetum* separated from *P. hirsutum* and *P. hordei*. From the OAT analysis, an intermixed grouping of *P. hirsutum*, *P. hordei*, and *P. venetum* outliers did separate early, away from their respective species groupings.

**Fig. 4.** Diagnostic key for the separation and classification of *Corymbifera* strains employing phenotypic, chemotaxonomic, and pathological traits.



**Discussion**

Variability in strain phenotypic expression of species strains resulted in a more fragmented classification compared with secondary metabolite expression. Phenotypic variability has been previously observed from *Penicillium* strains of the same species, where strains had a different colony diameter and conidia colour when grown on the same media (Lund et al. 1995, 2003; Hansen et al. 2003). Six *P. radicola* strains formed an outgroup during the YES cluster analysis because of the production of white colonies, which differed from the remaining *P. radicola* strains that produced various shades of blue–green colonies. Lack of sporulation, resulting in white colonies, has been previously reported to be responsible for *P. commune* strain variation on YES media (Lund et al. 2003). Even though phenotypic expression did vary for species upon the same media, it is possible to separate strains of the *Corymbifera* based on a few distinctive phenotypic traits. *Penicillium hordei* is distinct from the remainder of the other *Corymbifera* in the production of densely fasciculate conidiophores appearing as clumps of loose formed coremia on CYA and OAT, and all of the strains from this species were correctly classified on YES because of the production of yellowish white colonies. *Penicillium venetum* colonies are typified by producing red-

dish yellow to reddish brown exudates and having a dark reverse on CYA and OAT agar. *Penicillium hirsutum* and *P. hordei* are the only *Corymbifera*-producing yellow mycelium on YES and OAT agar, and *P. hirsutum* sometimes produces yellow diffusible pigment on CYA. *Penicillium albocoremium*, *P. tulipae*, and *P. radicola* are quite similar in phenotype expression; however, several traits are different (Overy and Frisvad 2003). In this survey, *P. tulipae* and *P. radicola* often formed several intermixed groupings when clustered; however, these species were reliably separated from each other when secondary metabolite profiles were compared. It is also important to note here that both phenotypic and secondary metabolic expression is medium dependent, and variation of the source of medium ingredients can affect the comparability of chemotaxonomic and to greater extent phenotypic descriptions between labs (Filténborg et al. 1990; Constantinescu 1990).

The use of secondary metabolite profiles was applied to give a consistent classification of *Corymbifera* strains when more than one medium was employed. Depending on the species, CYA typically yielded the greatest chemical diversity; however, several metabolites (terrestric acid, corymbiferone, the corymbiferan lactones, and daldinin D) were only produced when strains were grown on either YES or OA agar. Several secondary metabolites, influential for the

classification of *Corymbifera* strains, were realized by D-PSLR analysis. These diagnostic metabolites and a few diagnostic phenotypic characters are presented as a diagnostic key in Fig. 4. Metabolite identification and species classification by HPLC-DAD does require expensive machinery and trained personnel. However, secondary metabolite profiling by TLC offers a relatively inexpensive and reliable means of separating and classifying strains into species groups (Frisvad and Filtenborg 1983, 1989; Overy et al. 2003). Provided here is a TLC template to be referred to for the identification of ser. *Corymbifera* species upon CYA, YES, and OAT agar (Fig. 3).

Series *Corymbifera* is phenotypically and ecologically most similar to the series *Viridicata*. *Viridicata* species often produce rough-walled conidiophores, and although they are typically associated with cereals, *P. aurantiogriseum* and *P. polonicum* have also been isolated from *Allium cepa* and *A. sativum*. *Penicillium aurantiogriseum* can be distinguished from the *Corymbifera* by forming smaller colonies on YES and producing the secondary metabolites: anacine, aurantioamin, aurantidine, penicillic acid, verrucosidin, and pseurotin (Frisvad and Samson 2004). *Penicillium polonicum* differs from the *Corymbifera* as it produces penicillic acid, puberuline and (or) verrucofortine, form velutinous rather than fasciculate colonies and is not producing synemata (Frisvad and Samson 2004). *Penicillium crustosum*, from ser. *Camemberti*, is a ubiquitous storage fungus and is common in the rhizosphere soil of vegetables (Frisvad and Filtenborg 1989; Domsch et al. 1980). The secondary metabolite production of *P. crustosum* is similar to *P. tulipae* with the production of penitrem A, roquefortine C, and terrestrial acid; however, *P. crustosum* produces velutinous to weakly fasciculate, crustose colonies and does not produce the metabolites glandicoline A and B, meleagrins and epineoxaline. *Penicillium hordei*, the only ser. *Corymbifera* member that has an association with cereals can easily be separated from *Viridicata* by the production of loosely formed coremia and the production of corymbiferone and the corymbiferan lactones A–D.

Characterization (and later classification) of ser. *Corymbifera* taxa were initially based solely upon phenotypic traits (i.e., colony morphology and micromorphology) (Biourge 1923; Dierckx 1901; Pitt 1979; Stolk 1969; Vincent and Pitt 1989; Westling 1911). These phenotypic descriptions were later substantiated by a consistency in strain secondary metabolite production (Frisvad and Filtenborg 1989; Overy and Frisvad 2003). All of the ser. *Corymbifera* characterizations have recently been supported by monophyletic groupings of representative strains using both internal transcribed spacer and  $\beta$ -tubulin sequences (Samson et al. 2004; Skouboe et al. 1999). Phylogeny of strains within subgenus *Penicillium* based on  $\beta$ -tubulin sequences separated *P. hirsutum*, *P. hordei*, and *P. venetum* away from the remaining *Corymbifera* and placed *P. albocoremium* as being more similar to *P. allii* and *P. radicola* as being more similar to *P. tulipae*; however, unified series groupings within section *Viridicata* could not be substantiated using  $\beta$ -tubulin sequences alone (Samson et al. 2004). Results presented here from strain classification using secondary metabolite production corroborated the phylogenetic findings of Samson et al. (2004) when cluster analysis was performed using Jaccard

and simple matching coefficients. However, classification of *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. radicola*, and *P. tulipae* strains using the Yule coefficient (which gave the highest cophenetic correlation and has previously been recommended for giving the best clustering using binary metabolite matrices (Frisvad 1992)) grouped *P. tulipae* away from *P. albocoremium*, *P. allii*, and *P. radicola*. Geiser et al. (1998) have previously reported that phenotypic characters such as morphology and secondary metabolite production (typically used for identification and taxonomy) do not reflect phylogenetic relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial  $\beta$ -tubulin and hydrophobin DNA sequences. Future studies aimed at comparing total phenotypic expression (i.e., morphology, enzymatic, and secondary metabolite production) with multigene phylogeny (at least three or more genes) are required to resolve these discrepancies.

Previously reported taxonomy within the ser. *Corymbifera* is upheld by this study. Over the past year, recent studies have been published on extracellular enzyme profiling of the *Corymbifera* series (Overy et al. 2005b) and pathogenicity trials carried out to clarify the pathological association of *Corymbifera* species with various bulbs (Overy et al. 2005a). Additionally, several chemotaxonomically relevant and novel metabolites have been recently identified from the *Corymbifera* (Overy and Blunt 2004; Overy et al. 2005c, 2005d, 2005e), and this information has been applied to provide a more complete secondary metabolite representation of each species (see Table 3). The taxonomical survey carried out in this study has included the use of many more secondary metabolites than previously used in other taxonomic classifications performed on this series (Frisvad and Filtenborg 1989; Frisvad et al. 2000; Frisvad and Samson 2004).

## References

- Biourge, P. 1923. Les Moisissures du groupe *Penicillium* Link. *Cellule*, **33**: 7–331.
- Cappelli, C., Buonauro, R., and Polverari, A. 1991. Occurrence of *Penicillium corymbiferum* on saffron in Italy. *Plant Pathol.* **40**: 148–149.
- Chauhan, S.K., and Saaltink, G.J. 1969. A *Penicillium* attack on hyacinth bulbs as affected by temperature and humidity. *Neth. J. Plant Pathol.* **75**: 197–204.
- Constantinescu, O. 1990. Standardisation of methods in *Penicillium* identification. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Edited by R.A. Samson and J.I. Pitt. Plenum Press, London. pp. 17–25.
- Dierckx, R.P. 1901. Un essai de révision du genre *Penicillium* Link. *Ann. Soc. Scient. Brux.* **25**: 83–89.
- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London.
- Doss, R.P., Cascante, X.M., and Chastagner, G.A. 1989. The influence of infection with *Penicillium corymbiferum* on the forcing performance of wounded or unwounded bulbs of Iris cultivars "Ideal" and "Blue Star" treated with ethylene or ethephon. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **39**: 161–166.
- Esbensen, K.H., Schönkopf, S., Midtgaard, T., and Guyot, D. 2000. *Multivariate data analysis – in practice*. The Unscrambler. CAMO ASA, Oslo.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., and Thrane, U. 1990. The significance of yeast extract composition on metabolite production in *Peni-*

- cillium*. In Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Edited by R.A. Samson and J.I. Pitt. Plenum Press, London. Pp. 433–441.
- Frisvad, J.C. 1992. Chemometrics and chemotaxonomy: a comparison of multivariate statistical methods for the evaluation of binary fungal secondary metabolite data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **14**: 253–269. doi: 10.1016/0169-7439(92)80109-H.
- Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotocins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1301–1310.
- Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. 1989. Terverticillate *Penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, **81**: 837–861.
- Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* **49**: 1–173.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Lund, F., and Samson, R.A. 2000. The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. In Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Edited by R.A. Samson and J.I. Pitt. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. pp. 265–283.
- Geiser, D.M., Frisvad, J.C., and Taylor, J.W. 1998. Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial  $\beta$ -tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia*, **90**: 831–845.
- Gower, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, **53**: 325–338.
- Hansen, M.E., Lund, F., and Carstensen, J.M. 2003. Visual clone identification of *Penicillium commune* isolates. *J. Microbiol. Methods*, **52**: 221–229. doi: 10.1016/S0167-7012(02)00160-4.
- Hill, S.A. 1977. New or uncommon plant diseases and pests. *Plant Pathol.* **26**: 94–95.
- Kornerup, A., and Wanscher, J.H. 1978. *Methuen handbook of colour*. Eyre Methuen, London.
- Lund, F., Filtenborg, O., and Frisvad, J.C. 1995. Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiol.* **12**: 173–180.
- Lund, F., Nielsen, A.B., and Skouboe, P. 2003. Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. *Food Microbiol.* **20**: 725–734.
- Nicholson, P., and Ingram, D.S. 1989. Isolation of *Penicillium corymbiferum* from basal rotted narcissus bulbs. *Mycol. Res.* **92**: 359–382.
- Overy, D.P., and Blunt, J.W. 2004. Corymbiferan lactones from *Penicillium hordei*: stimulation of novel phenolic metabolites using plant tissue media. *J. Nat. Prod.* **67**: 1850–1853. doi: 10.1021/np049723c.
- Overy, D.P., and Frisvad, J.C. 2003. New *Penicillium* species associated with bulbs and root vegetables. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 631–639. doi: 10.1078/072320203770865945.
- Overy, D.P., Seifert, K., Savard, M.E., and Frisvad, J.C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 69–77. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00086-2.
- Overy, D.P., Frisvad, J.C., Steinmeier, U., and Thrane, U. 2005a. Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biol. Technol.* **35**: 217–221. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.08.001.
- Overy, D.P., Karlshøj, K., and Due, M.J. 2005b. Low temperature and enzymatic profiling of taxa from the *Penicillium* series *Corymbifera*; species responsible for blue mould storage rot in bulbs. *J. Plant Pathol.* **87**: 53–59.
- Overy, D.P., Larsen, T.O., Dalsgaard, P.W., Frydenvang, K., Phipps, R.K., Monro, M.H.G., and Christophersen, C. 2005c. Andrastin A and barceloneic metabolites, protein farnesyl transferase inhibitors from *Penicillium albocoremium*: chemotaxonomic significance and pathological implications. *Mycol. Res.* **109**: 1243–1249. doi: 10.1017/S09537562050003734.
- Overy, D.P., Nielsen, K.F., and Smedsgaard, J. 2005d. Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium* ser. *Corymbifera*: in planta production and implications for competitive fitness. *J. Chem. Ecol.* **31**: 2373–2390. doi: 10.1007/s10886-005-7107-y.
- Overy, D.P., Zidorn, C.H.W., Petersen, B.O., Duus, J.Ø., Dalsgaard, P.W., Larsen, T.O., and Phipps, R. 2005e. Medium dependent production of corymbiferone, a novel metabolite from *Penicillium hordei* cultured on plant tissue agar. *Tetrahedron Lett.* **46**: 3225–3228. doi: 10.1016/j.tetlet.2005.03.043.
- Pitt, J.I. 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Prince, T.A., Stephens, C.T., and Herner, R.C. 1988. Pathogenicity, fungicide resistance, and ethylene production of *Penicillium* spp. isolated from tulip bulbs. *Phytopathology*, **78**: 682–686.
- Raper, K.B., and Thom, C. 1949. *A manual of the Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Rohlf, F.J. 2002. NTSYSpc. Version 2.11. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Saaltink, G.J. 1971. The infection of bulbs by *Penicillium* sp. *Int. Soc. Hort. Sci.* **23**: 235–241.
- Samson, R.A., Stolk, A.C., and Hadlok, R. 1976. Revision of the subsection *Fasiculata* of *Penicillium* and some allied species. *Stud. Mycol.* **11**: 1–47.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. (Editors.) 2002. Introduction to food and air-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P., and Frisvad, J.C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin sequences. *Stud. Mycol.* **49**: 175–200.
- Skouboe, P., Frisvad, J.C., Taylor, J.W., Lauritsen, D., Boysen, M., and Rossen, L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.* **103**: 873–881. doi: 10.1017/S0953756298007904.
- Smedsgaard, J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *J. Chromatogr. A*. **760**: 264–270. doi: 10.1016/S0021-9673(96)00803-5.
- Stolk, A.C. 1969. Four new species of *Penicillium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **35**: 261–274. doi: 10.1007/BF02219148.
- Vincent, M.A., and Pitt, J.I. 1989. *Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic. *Mycologia*, **81**: 300–303.
- Westling, R. 1911. Üben die grünen Spezies der Gattung *Penicillium*. *Ark. Bot.* **11**: 1–156.

## XII.5.2 Plant Pathology 55, 583.

Valdez, J. G., Makuch, M. A., Ordovini, A. F., Masuelli, R. W., Overy, D. P. & Piccolo, R. J. 2006. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology* **55**, 583.

## First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*)

J. G. Valdez<sup>a\*</sup>, M. A. Makuch<sup>a</sup>, A. F. Ordovini<sup>a</sup>, R. W. Masuelli<sup>a</sup>, D. P. Overy<sup>b,c</sup> and R. J. Piccolo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>INTA La Consulta, CC8 (5567), Mendoza, Argentina; <sup>b</sup>CMB, BioCentrum-DTU, Building 221, Technical University of Denmark, 2800 Kgs Lyngby, Denmark; and <sup>c</sup>IBS, Edward Llwyd Building, University of Wales, Aberystwyth SY23 3DA, UK

Blue mould disease in garlic (*Allium sativum*) is associated worldwide with various *Penicillium* species, and has been attributed to significant annual crop losses in Argentina; the world's second largest exporter of garlic. To identify the pathogenic *Penicillium* species responsible, affected plants were sampled in La Consulta station (33°45' S, 69°02' W) and placed in a damp chamber. Characteristic disease symptoms are stunted and chlorotic plants with withered leaves and reduced bulb size. Bulbs are often covered with blue/green conidial masses. Isolations were made from fungal colonies emerging on affected bulbs. Pure cultures (IBT 26466, 26467, 26511 and 26512; CMB collection, BioCentrum-DTU, Denmark) were initially identified by micromorphology as *Penicillium allii*, and identifications were confirmed by comparing reversed phase-HPLC secondary metabolite profiles with those of *P. allii* type strains.

To confirm pathogenicity, sterilized garlic cloves were injured with a needle and inoculated with 5 µL *P. allii* spore suspensions (adjusted to 5 × 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>). Inoculated cloves were planted in a field not previously cultivated with garlic, and the original disease symptoms were produced on inoculated plants while water-inoculated control plants remained healthy. The survival rate of inoculated plants was 68% and *P. allii* was reisolated from diseased field plants.

*Penicillium viridicatum* was first reported as the causal agent of blue mould of garlic in Argentina (Gatica & Oriolani, 1984) before the characterization of *P. allii* (Vincent & Pitt, 1989). *Penicillium allii* is micro-morphologically similar to *P. viridicatum* and both species produce yellow exudates in pure culture. To compare pathogenic ability, standard *P. viridicatum* strains IBT 16939 and 15053 were inoculated into sterilized garlic cloves and incubated for 12 days. The *P. viridicatum* strains were not able to sporulate on the garlic cloves.

*Penicillium hirsutum* was recently reported as a pathogen on garlic in Argentina (Cavagnaro *et al.*, 2005). However, *P. allii* but not *P. hirsutum* has been reported as an aggressive pathogen of garlic in comparative pathogenicity trials conducted in damp chambers (Overy *et al.*, 2005). The results reported here suggest that *P. allii*, rather than *P. hirsutum* or *P. viridicatum*, is the pathogenic species responsible for garlic crop losses due to blue mould rot in Argentina. This is the first report confirming *P. allii* as a field pathogen of *A. sativum*.

### Acknowledgements

This work was partly supported by project Pict # 0803687 of Argentina.

### References

- Cavagnaro PF, Camargo A, Piccolo RJ, Garcia Lampasona S, Burba JL, Masuelli RW, 2005. Resistance to *Penicillium hirsutum* Dierckx in garlic accessions. *European Journal of Plant Pathology* 112, 195–9.
- Gatica M, Oriolani E, 1984. *Penicillium viridicatum* Westling, agente causal de la 'podredumbre verde o moho azul' del ajo (*Allium sativum* L.) en Mendoza, Republica Argentina. *Informativo de Investigaciones Agrarias* 421/424, 1–7.
- Overy DP, Frisvad JC, Steinmeier U, Thrane U, 2005. Clarification of the agents causing blue mould storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biology and Technology* 35, 217–21.
- Vincent MA, Pitt JI, 1989. *Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic. *Mycologia* 81, 300–3.

\*E-mail: jvaldez@laconsulta.inta.gov.ar. Accepted 14 February 2006 at [www.bspp.org.uk/ndr](http://www.bspp.org.uk/ndr) where figures relating to this paper can be viewed.

## First report of *Armillaria gallica* on highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Italy

D. Prodorutti<sup>a\*</sup>, L. Palmieri<sup>b</sup>, D. Gobbin<sup>b</sup> and I. Pertot<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Plant Protection Department; and <sup>b</sup>SafeCrop Centre, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, via Mach 1, 38010 S. Michele all'Adige (TN), Italy

Since 2003, highbush blueberry plants (*Vaccinium corymbosum*) with atypical growth were found in the Trentino Region (north-eastern Italy). At the beginning, plants were stunted and developed small leaves that reddened prematurely in autumn. Later the roots rotted, several branches wilted and plants usually died within a few months. An *Armillaria* sp. was isolated on malt extract agar (MEA) from the roots of dead or stunted plants.

DNA extracted from two isolates growing in the bark mulch used in the orchard, and from a further seven isolates infecting roots, was amplified by PCR using seven primer combinations designed on internal transcribed spacer and intergenic spacer regions of rDNA (Pérez-Sierra *et al.*, 2000; Sicoli *et al.*, 2003). RFLP analysis with *AhlI* and sequencing after amplification with the LR12R/O1 primer combination (Pérez-Sierra *et al.*, 2000) included three isolates for *Armillaria borealis*, and one each for *Armillaria mellea*, *Armillaria gallica* and *Armillaria cepistepes* for reference. All the isolates had the same restriction patterns and sequences (GenBank accession numbers DQ336609–17) as the reference for *A. gallica*.

The pathogenicity of two isolates, one isolated from the bark mulch and one from the root, was tested on blueberry plants. The inoculum was prepared using autoclaved applewood pieces inoculated with the two isolates on MEA in Petri dishes (kept in the dark at 25°C). When the wood pieces had been completely colonized, they were placed between roots of 2-year-old potted blueberry plants. Infected plants were kept in a glasshouse (average daily temperature 20 ± 5°C, natural light) and after 10 months inoculated plants showed symptoms similar to those observed on plants

with symptoms in the original orchard of isolation. *Armillaria gallica* was reisolated from the infected plants and reidentified using RFLP analysis and sequencing.

*Armillaria* species induce root disease on a broad range of plants and cause economic losses, especially on fruit and forest trees. Both *A. mellea* and *Armillaria ostoyae* have been reported on highbush blueberry in the USA (Caruso, 1995), but this is the first report of root rot caused by *A. gallica* on this host.

### Acknowledgements

The research was supported by Safecrop Centre, funded by Fondo per la ricerca, Autonomous Province of Trento.

### References

- Caruso FL, 1995. *Armillaria* root rot. In: Caruso FL, Ramsdell DC, eds. *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*. St Paul, MN, USA: APS Press, 22–3.
- Pérez-Sierra A, Whitehead D, Whitehead M, 2000. Molecular methods used for the detection and identification of *Armillaria*. In: Fox RTV, ed. *Armillaria Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus*. Andover, UK: Intercept, 95–108.
- Sicoli G, Fatethi J, Stenlid J, 2003. Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology* 33, 287–97.

\*E-mail: danielle.prodorutti@iasma.it. Accepted 13 January 2006 at [www.bspp.org.uk/ndr](http://www.bspp.org.uk/ndr) where figures relating to this paper can be viewed.

### XII.5.3 Fitopatologia Brasileira 31, 583-585.

Valdez, J. G. & Piccolo, R. J. 2006. Use of spectrophotometry as a tool to quantify the sporulation of *Penicillium allii* in garlic lesions. *Fitopatologia Brasileira* **31**(6), 583-585.

# Use of Spectrophotometry as a Tool to Quantify the Sporulation of *Penicillium allii* in Garlic Lesions

Jorge G. Valdez & Ricardo J. Piccolo

EEA La Consulta, INTA, cc (8) 5567, La Consulta, Mendoza, Argentina, e-mail: jvaldez@laconsulta.inta.gov.ar

(Accepted for publication 15/08/2006)

Author for correspondence: Jorge G. Valdez

---

VALDEZ, J.G. & PICCOLO, R.J. Use of spectrophotometry as a tool to quantify the sporulation of *Penicillium allii* in garlic lesions. *Fitopatologia Brasileira* 31:595-597. 2006.

## ABSTRACT

A technique to measure the concentration of *Penicillium allii* conidia in damp chamber experiments by spectrophotometry was developed. A negative linear correlation ( $R^2=0.56$ ) was observed between transmittance at 340 nm and the concentration of *P. allii* conidia in water agar 0.05%. The equation that relates transmittance (T) with concentration (conidia mL<sup>-1</sup>) (y) is:  $y = 9.3 \cdot 10^6 - 86497 T$ . The method was assayed by inoculating 43 *P. allii* strains in two garlic cultivars. The method proved to be more rapid than the traditional use of a hemocytometer with an improved accuracy. The CV of the number of conidia per hemocytometer reticule was of 35.04%, while the transmittance CV was of 2.73%. The extreme values chosen for T were 40 and 80 because the sensitivity of the method decreased when concentrations of conidia were out of this range.

**Additional keywords:** *Allium sativum* L., blue mold, hemocytometer.

## RESUMO

**Uso de espectrofotometria como uma ferramenta para quantificar a esporulação de *Penicillium allii* em lesões no alho**

Foi desenvolvida uma técnica para quantificar, por espectrofotometria, a concentração de conídios de *P. allii* em experimentos de alho em câmara úmida. Foi observada uma correlação linear negativa ( $R^2=0.56$ ) entre a transmitância a 340 nm e a suspensão conidial de *P. allii* em agar-água 0.05%. O método foi calibrado com um hemocitômetro e a equação que relaciona a transmitância (T) com a concentração (conídio mL<sup>-1</sup>) (y) é:  $y = 9.3 \cdot 10^6 - 86497 T$ . A técnica foi testada inoculando 43 isolados de *P. allii* em duas cultivares de alho. O método mostrou-se mais rápido e eficiente que o uso tradicional de um hemocitômetro. O coeficiente de variação (CV) do número de conídios por quadrícula do hemocitômetro foi de 35.04%, enquanto que o CV da transmitância foi de 2.73%. Os valores extremos escolhidos para T foram 40 e 80 devido ao fato que a sensibilidade do método diminuiu em altas ou baixas concentrações de conídios.

**Palavras-chave adicionais:** *Allium sativum* L., mofo azul, hemocitômetro.

---

Blue mold disease in garlic is associated with *Penicillium allii* Vincent & Pitt in Argentina (Valdez *et al.*, 2006), the world's second largest exporter of garlic. The disease is responsible for important losses in field and in storage. The assignation of pathogenicity to an isolate generally consists of inoculating in a point made on the sterilized surface of a clove followed by an incubation period in damp chamber conditions. Differences in sporulation are observed between different species of *Penicillium* and also among different pathotypes of *P. allii*. Comparing the sporulation, Cavagnaro *et al.* (2005) assigned to the garlic cv. Castaño INTA a tolerant response to the disease, whereas a sensitive response was assigned to the cv. Fuego INTA.

Sporulation is one of the most accurate variables used in plant pathology to measure the degree of disease development (Hai & Sutton, 1998; Sache & Vallavieille-Pope, 1995) and the fitness of a fungus growing upon a certain host (Lebreton *et al.*, 1999; Suassuna *et al.*, 2004). Several methods have been developed to quantify

sporulation, but one of the most applied in plant pathology is the use of a hemocytometer for both the calibration of spore suspensions prior to inoculation and for quantification of sporulation. The use of a hemocytometer is time-consuming and leads to considerable error. According to Berkson *et al.* (1935), the specific error of hemocytometer counts depends on the number of cells which are counted in each area of the reticule. The concentration of cells can also be measured using a standard spectrophotometer. This method has been performed to obtain the equivalent CFU/mL of bacteria (Dominguez *et al.*, 2001). This practice has also been automated to monitor the development of bacteria or fungi on analytical spectrophotometers.

The objective of the work was to set up a simple spectrophotometric methodology to determine the concentration of *P. allii* conidial suspensions and compare its accuracy to hemocytometer counts. As a result of the work a simple and accurate methodology, which can be adequate for other plant-pathogen systems, is presented.

Garlic cloves of the cvs Fuego INTA and Castaño INTA were peeled, sterilized, injured and inoculated with different strains of *P. allii*. The necrotic tissue was excised with a scalpel 12 d after incubation, and vortexed in a microtube containing 1 mL of sterile water and 1 % tween 20. The tissue was then removed with a sterile forceps and the microtube was vortexed again for 3 minutes. For spectrophotometer analysis, a 200 µL aliquot was pipetted into a new microtube.

To avoid the gradual decrease of absorbance caused by the decantation of conidia (Foote, 1972; Harbo, 1975), the blank solution was prepared with 0.5 g of agar L<sup>-1</sup> (Autrey *et al.*, 1996).

Transmittance, as the optical turbidity of the suspensions, was measured using a Spectronic 20D spectrophotometer (Milton Roy, Rochester, NY) at a wavelength of 340 nm. The photometer cells were glass test tubes of 10 mL. The equipment was calibrated at T=100 with 5 mL of the blank solution (0.5 g agar L<sup>-1</sup>) and 50 µL of the conidial suspension were pipetted into the cell. It was mixed slowly by inversion, three or four times. If bubbles were produced, they were extracted with a clean steel needle. The transmittance was recorded and when it was greater than 80 %, additional 30 µL of the conidial suspension were added. If the transmittance was less than 40 %, the procedure was repeated in a new test tube, this time starting with 25 µL of the suspension.

Ten µL obtained from the test tube read in the spectrophotometer were deposited in each chamber of a hemocytometer (Boeco, Germany) and left to stabilize for more than 3 minutes. Ten to twenty grids per chamber were counted and the average used to estimate the conidial concentration. Coefficient of variation (CV) was determined.

The CV of the spectrophotometric measurements was estimated with 5 readings of 10 different microtubes containing conidia.

Hemocytometer measurements with a CV lower than 20% were chosen to run a simple regression analysis

between concentration of conidia (dependent variable) and Transmittance (independent variable) for each Castaño INTA and Fuego INTA garlic cultivar. A *t* paired test was used to compare both estimations.

Transmittance readings and hemocytometer counts from 117 conidium suspensions representing garlic lesions are plotted as x and y respectively (Figure 1). The coefficient of variation for hemocytometer counts was 35.04% while the coefficient of variance for the spectrophotometric transmittance was 2.73%.

The equation that estimates the linear regression between transmittance and conidial concentration was  $y = 9.3 \cdot 10^6 - 86497 T$ , where *y* represents the concentration of conidia (conidia mL<sup>-1</sup>) and *T* the value of transmittance read in the spectrophotometer. There were no differences between Castaño INTA and Fuego INTA equations (*p*<0.0001). The R<sup>2</sup> obtained was 0.56 and the number of times that the spectrophotometer estimation fitted into the confidence interval of the hemocytometer readings was more than 44%. The estimated concentration of conidia by hemocytometer and by spectrophotometer were quite similar (Table 1).

Others authors have used Absorbance instead of Transmittance. Expressed in terms of Absorbance (A), the regression is positive:  $y = 672220 + 86497 A$ . The equation obtained by Harbo (1975) ( $y = 16000 + 1634000 A$ ) is not applicable for conidial estimation, probably because it was obtained from honey-bee sperm. The equations of Autrey *et al.* (1996) ( $y = 170000 A$ ) and Johnson & Bowyer (1974) ( $y = 358593 + 137746 A$ ) overestimated the conidial concentration when compared with our equation.

Spectrophotometric measurement was faster and easier than the technique of conidial counting using a hemocytometer. Also the spectrophotometric measurements were less variable (CV=2.73%) than the counts made on the hemocytometer (CV=35.04%). That means that a less variable method (spectrophotometry) was calibrated with a more variable method (hemocytometer). Results could be comparable with other less time-consuming procedures, like the use of the MicroCell for screening techniques to

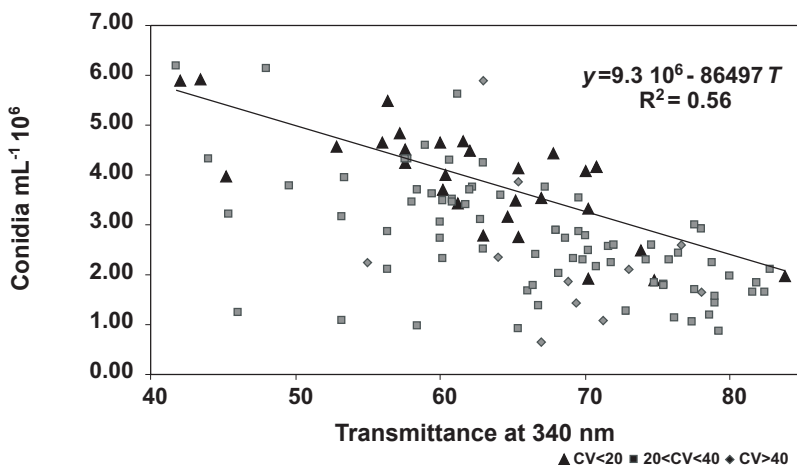


FIG.1-Relationship between spectrophotometric transmittance and haemocytometer counts. The solid line is the regression line and it was estimated over the readings on a haemocytometer where the CV was less than 20% (n=30), represented by black triangles. Grey squares represent those haemocytometer counts with a CV between 20% and 40% (n= 76) and gray rhombi to measurements with a CV greater than 40% (n=11). Squares and rhombi are more distant than the triangles from the regression line because the last one was obtained with the more accurate haemocytometer counts.

**TABLE 1** - Number of conidia estimated by means of spectrophotometry that fit into the confidence interval of haemocytometer readings discriminated according to the CV

	CV<20	20<CV<40	CV>40	Total
Total of readings	30	76	11	117
Total of matchings	11	37	4	52
Coincidence	36.7%	48.7%	36.4%	44.4%

measure sperm concentration (Sokol *et al.*, 2000). More sophisticated approaches for cell concentration estimates, like flow cytometry, have a higher cost (Wigg *et al.*, 2003) and are therefore rarely applied in pathogenicity trials.

The obtained R<sup>2</sup> value was less than others previously reported in the literature, such as 0.96 (Harbo, 1975) and 0.90 (Autrey *et al.*, 1996) but in those cases turbidity was measured starting from a pure fraction of cells and, in this work, turbidity was measured from necrotic tissue of garlic. It could be possible that some soluble compounds and small solid particles were released from necrotic garlic tissues and interfered with the final estimation.

In the cases where measured transmittance was greater than 80 %, the addition of an extra volume of conidia decreased the transmittance, indicating that the relationship between transmittance and conidial concentration continued to be linear. Extending further the range of transmittance measurements, the transmittance/conidial concentration relationship behaved exponentially rather than linearly. At low T value (T<40) and at high T value (T>80) the accuracy of the methodology to estimate concentration of conidia of *P. allii* in garlic tissue decreased.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Jesica Mocayar and Luis Rodriguez, ISP Toribio Luzuriaga, Tunuyán, Mendoza, for technical assistance. This work was partly supported by the Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (project Pict # 0803687) of Argentina.

#### REFERENCES

AUTREY, L.J.C., MOUTIA, Y. & SAUMTALLY, S. Screening of seedlings against rust, inoculation treatment and assessment by video image analysis. *Sugar Cane* 1:4-10. 1996.

BERKSON, J., MAGATH, T.B. & HURN, M. Laboratory standards in relation to chance fluctuations of the erythrocyte count as estimated with haemocytometer. *Journal of the American Statistical Association* 30:414-426. 1935.

CAVAGNARO, P.F., CAMARGO, A., PICCOLO, R.J., GARCIA LAMPASONA, S., BURBA, J.L. *et al.* Resistance to *Penicillium hirsutum* Dierckx in garlic accessions. *European Journal of Plant Pathology* 112:195-199. 2005.

DOMINGUEZ, M.C., DE LA ROSA, M. & BOROBIO, M.V. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47:391-398. 2001.

FOOTE, R.H. How to measure sperm cell concentration by turbidity (optical density). *Proceedings of the Fourth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. N.A.A.B.: 57-61. 1972.

HAI, Y. & SUTTON, J.C. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20:243-252. 1998.

HARBO, J.R. Measuring the concentration of spermatozoa from honey bees (*Apis mellifera*) with spectrophotometry. *Annals Entomological Society of America* 68:1050-1052. 1975.

JOHNSON, R. & BOWYER, D.E. A rapid method for measuring production of yellow rust spores on single seedlings to assess differential interactions of wheat cultivars with *Puccinia striiformis*. *Annals Applied Biology* 77:251-258. 1974.

LEBRETON, L., LUCAS, J.M. & ANDRIVON, D. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France. *Phytopathology* 89:679-686. 1999.

SACHE, I. & VALLAVIEILLE-POPE, C.D. Classification of airborne plant pathogens based on sporulation and infection characteristics. *Canadian Journal of Botany* 73:1186-1195. 1995.

SOKOL, R.Z., SHULMAN, P. & PAULSON, R.J. Comparison of two methods for the measurement of sperm concentration. *Fertility and Sterility* 73:591-594. 2000.

SUASSUNA, N.D., MAFFIA, L.A. & MIZUBUTI, E.S.G. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 53:405-413. 2004.

VALDEZ, J.G., MAKUCH, M.A., ORDOVINI, A.F., MASUELLI, R.W., OVERY, D.P. & PICCOLO, R.J. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology* 55. 583. 2006.

WIGG, A.J., PHILLIPS, J.W., WHEATLAND, L. & BERRY, M.N. Assessment of cell concentration and viability of isolated hepatocytes using flow cytometry. *Annals Biochemistry* 317:19-25. 2003.