

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION, DIVERSIDAD GENETICA Y BUSQUEDA DE MARCADORES
ASOCIADOS A PATOGENICIDAD EN CEPAS SELECTAS DE *Colletotrichum
gloeosporioides* (Penz) DE MICHOACAN, MEXICO**

VICTOR MONTERO TAVERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

MEXICO, DISTRITO FEDERAL AÑO 2000



Fac. de Química



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis, titulada “**Caracterización, diversidad genética y búsqueda de marcadores asociados a patogenicidad en cepas selectas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) de Michoacán, México**”, fue realizada por **Victor Montero Tavera** bajo la dirección de la Dra. Amanda Gálvez Mariscal, Profesora-Investigadora de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ha sido revisada y aprobada por los miembros del Comité Tutorial y Jurado indicados para obtener el grado:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

COMITE TUTORIAL Y JURADO

Dra. Amanda Gálvez Mariscal

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dra. H. Susana Azpiroz Rivero

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dra. Esperanza Martínez

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Dr. Francisco Ruiz Terán

Ciudad Universitaria, Distrito Federal, Mayo de 2000

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México

Porque a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me brindó la posibilidad de superarme financiando mis estudios.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

En especial a la Facultad de Química, por haberme otorgado la preparación científica necesaria para ser útil a mi familia y a mi país.

Al INIFAP-CEVAMEX

Especialmente al Laboratorio de Marcadores Genéticos Moleculares por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal

Por los útiles consejos vertidos durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Por su apoyo en la realización de todos los trámites de ingreso, permanencia y obtención del grado.

Al Dr. Héctor Guillén Andrade

Por sus atinados consejos y apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

A la Dra. Susana Azpiroz Rivero

Por alentarme decididamente a iniciar la Maestría.

A los compañeros del LAMAGEM

Por su amistad desinteresada y a toda prueba.

DEDICATORIA

A mis padres

Por la confianza incondicional y el cariño inigualable que depositaron en mí. Por haberme entregado la enseñanza más grande: ser un hombre de bien.

A Marisol

Por el amor que día a día va construyendo la familia. Por perpetuarnos en nuestros hijos maravillosos. Por la paciencia sin igual y la comprensión infinita que me has dado. Porque me das el mayor estímulo para seguir adelante: el AMOR...

A mis hijos

Porque el tiempo que les he robado se los devolveré multiplicado en cariño y comprensión. Porque su amor es el más limpio, puro e incomparable.

A mis hermanos

Meche, Mario, Javier, Estela, Josefina, Consuelo, Juana y Carlos. Porque el afecto fraternal perdurará a través de los vaivenes de la vida.

A TODAS LAS PERSONAS QUE ME AMAN O ME AMARON

“Cuando un hombre empieza a aprender, nunca sabe lo que va a encontrar. Espera recompensas que nunca llegarán. Lo que se aprende no es nunca lo que uno creía. Y así tropieza con el primero de sus enemigos naturales: ¡el miedo! Para superar su miedo el hombre debe desafiarlo y dar el siguiente paso en su aprendizaje, y el siguiente y el siguiente; no debe detenerse, entonces empezará a sentirse seguro de sí. Aprender no es ya una tarea aterradora. Cuando llegue ese momento el hombre habrá vencido a su primer enemigo natural. A cambio del miedo a adquirido la claridad de mente que le permite conocer y satisfacer sus deseos; nada está oculto.

Así ha encontrado a su segundo enemigo: ¡la claridad! porque dispersa el miedo pero también ciega. Hace al hombre no dudar nunca de sí; tiene valor porque tiene claridad. Pero todo es un error, es como si viera algo claro pero incompleto.

Para derrotar a su segundo enemigo debe desafiar su claridad y usarla sólo para ver, y vendrá un momento en que comprenda que su claridad era sólo un punto en sus ojos. Sabrá entonces que por fin ha alcanzado el poder; puede hacer con él lo que se le antoje.

Entonces el hombre habrá encontrado a su tercer enemigo: ¡el poder! Un hombre en esta etapa apenas advierte que su tercer enemigo se cierne sobre él. Y de pronto, sin saber, habrá perdido la batalla. Su enemigo lo habrá transformado en un hombre cruel y caprichoso.

El hombre tendrá que desafiar a su tercer enemigo con toda intención y darse cuenta de que el poder que aparentemente ha conquistado nunca ha sido suyo en verdad. Entonces sabrá cómo y cuándo usar ese poder. Así habrá vencido a su tercer enemigo.

Pero el hombre estará para entonces al final de su travesía por el camino del conocimiento y, casi sin advertencia, tropezará con su último enemigo: ¡la vejez! Este enemigo es el más cruel de todos, el único al que no se puede vencer por completo. Este es el tiempo en que el hombre ya no tiene miedo ni una claridad impaciente, todo su poder está bajo su control; pero también tiene un deseo constante de descansar, si se rinde a este deseo habrá perdido el último asalto y se convertirá en una débil criatura vieja. Pero si el hombre se sacude el cansancio y vive su destino hasta el final, puede entonces ser llamado **hombre de conocimiento**, aunque sólo sea por esos momentos en que logra ahuyentar al último enemigo, el enemigo invencible. Esos momentos de claridad, poder y conocimiento son suficientes.”

“LAS ENSEÑANZAS DE DON JUAN”

Carlos Castaneda

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Importancia del cultivo del aguacate.....	3
Factores limitantes de la producción.....	3
Características y síntomas de la antracnosis.....	3
Distribución de <i>C. gloeosporioides</i>	4
Taxonomía del género <i>Colletotrichum</i>	4
Caracterización genética y morfológica.....	5
Resistencia a antracnosis.....	5
Caracterización bioquímica del género <i>Colletotrichum</i>	6
Caracterización genética molecular.....	7
JUSTIFICACION.....	10
OBJETIVOS.....	11
HIPOTESIS.....	11
MATERIALES Y METODOS.....	12
Area de estudio.....	12
Muestreo.....	12
Material biológico.....	13
Caracterización morfológica.....	14

Caracterización patogénica (capacidad invasiva de pulpa).....	15
Velocidad de crecimiento.....	15
Caracterización bioquímica.....	16
Obtención de micelio.....	16
Extracción de enzimas.....	17
Electroforesis de isoenzimas.....	17
Caracterización genética por RAPD.....	19
Obtención de micelio.....	19
Extracción de ADN.....	20
Amplificación de fragmentos de ADN.....	21
Análisis estadísticos.....	22
Análisis conjunto.....	22
Marcadores asociados a patogenicidad.....	23
Análisis morfológicos.....	23
Análisis de patogenicidad.....	24
Velocidad de crecimiento.....	24
Análisis de isoenzimas.....	25
Análisis de RAPD.....	25
RESULTADOS	26
Descripción morfológica de los monoconidiales.....	26
Caracterización morfológica.....	31
Análisis de correlación.....	31
Componentes principales.....	32
Coeficientes de determinación.....	33
Análisis de correspondencia.....	34

Análisis de agrupamiento.....	35
Caracterización patogénica y velocidad de crecimiento.....	37
Índice de variabilidad genética.....	44
Caracterización bioquímica.....	45
Análisis de correlación.....	45
Componentes principales.....	46
Coeficientes de determinación.....	48
Análisis de correspondencia.....	48
Análisis de agrupamiento.....	49
Índice de variabilidad genética.....	49
Marcadores para estudios de flujo genético.....	51
Marcadores asociados a patogenicidad.....	51
Caracterización por RAPD.....	53
Análisis de correlación.....	53
Componentes principales.....	53
Coeficientes de determinación.....	55
Análisis de correspondencia.....	55
Análisis de agrupamiento.....	56
Índice de variabilidad genética.....	57
Marcadores para estudios de flujo genético.....	58
Marcadores asociados a patogenicidad.....	58
Análisis conjunto.....	58
DISCUSION.....	60
CONCLUSIONES.....	64

BIBLIOGRAFIA	66
ANEXO A. Análisis Estadísticos de datos Morfológicos.....	73
ANEXO B. Análisis Estadísticos de Isoenzimas.....	82
ANEXO C. Análisis Estadístico de RAPD.....	91
ANEXO D. Análisis Estadístico Conjunto.....	102

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislamientos monoconidiales, localidad de origen y síntoma producido	13
Cuadro 2. Caracteres considerados en la caracterización de 21 aislamientos de <i>C. gloeosporioides</i>	14
Cuadro 3. Sistemas enzimáticos, sustrato, cofactor y colorante usados para la caracterización bioquímica de <i>C. gloeosporioides</i> .	18
Cuadro 4. Estimadores de variabilidad genética por categorías de datos y total.	44
Cuadro 5. Índice de variabilidad genética por sistema enzimático y primer.	50
Cuadro 6. Presencia por monoconidial de los loci RAPD y alelos de isoenzimas asociados con la patogenicidad medida como peso de pulpa de aguacate Hass en gramos.	52
ANEXO A.	
Cuadro 1. Matriz de datos morfológicos.	73
Cuadro 2. Matriz de valores característicos de los primeros 10 componentes principales para los caracteres morfológicos.	74
Cuadro 3. Análisis de componentes principales, coeficientes de correlación y determinación, y varianza acumulada de las variables morfológicas de <i>C. gloeosporioides</i> .	74
Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los aislamientos monoconidiales de <i>C. gloeosporioides</i> calculadas a partir de datos morfológicos.	79

Cuadro 5. Análisis de correspondencia entre filas y columnas de la matriz de datos morfológicos.	80
---	----

ANEXO B

Cuadro 1. Matriz de datos de isoenzimas.	82
Cuadro 2. Matriz de valores característicos de los primeros 10 componentes principales calculados a partir de los alelos de isoenzimas.	84
Cuadro 3. Análisis de componentes principales, coeficientes de correlación y determinación, y varianza acumulada de las variables isoenzimáticas de <i>C. gloeosporioides</i> .	84
Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los aislamientos monoconidiales de <i>C. gloeosporioides</i> calculadas con los datos isoenzimáticos.	88
Cuadro 5. Análisis de correspondencia entre filas y columnas de la matriz de datos isoenzimáticos.	89

ANEXO C

Cuadro 1. Matriz de datos de bandas RAPD.	91
Cuadro 2. Matriz de valores característicos de los primeros 15 componentes principales calculados para las bandas RAPD.	92
Cuadro 3. Análisis de componentes principales, coeficientes de determinación y varianza acumulada de las variables de RAPD de <i>C. gloeosporioides</i> .	92
Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los aislamientos monoconidiales de <i>C. gloeosporioides</i> calculadas para los datos de RAPD.	97
Cuadro 5. Análisis de correspondencia entre filas y columnas de la matriz de datos de RAPD.	99

ANEXO D

Cuadro 1. Matriz de distancias genéticas construida con todos los atributos medidos (morfológicos, bioquímicos y RAPD).	102
--	-----

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Amplificación de fragmentos RAPD mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En el segundo ciclo se omitió el alineamiento a 35°C. En líneas gruesas se observan los fragmentos definidos por los iniciadores y que serán amplificados en ciclos sucesivos. 8
- Figura 2.** Características típica de los monoconidiales de *C. gloeosporioides*. Se observa la consistencia de micelio algodonoso (A), granuloso (E) y adsorbido al medio (D). La presencia de estrias de crecimiento (F). Hifas cortas del borde de crecimiento (C) y largas (B). Color de colonia blanco (A, B, C, D) y amarillo cremoso (E, F). 28
- Figura 3.** Dendograma de caracteres morfológicos de *C. gloeosporioides*. A la derecha se observa el número de identificación del monoconidial, y abreviados, localidad y síntoma. 35
- Figura 4.** Gráficas de barras que muestran el peso invadido final de pulpa a los ocho días y el diámetro final de crecimiento a los siete días. 38
- Figura 5.** Gráficas de crecimiento acumulado diario de *C. gloeosporioides*. 40
- Figura 6.** Crecimiento en área acumulada diaria de *C. gloeosporioides*. 42
- Figura 7.** Área acumulada diaria en milímetros cuadrados de *C. gloeosporioides*. 43
- Figura 8.** Crecimiento diario no acumulado de *C. gloeosporioides*. Se observa que el monoconidial 47 presenta un patrón diferente. 43
- Figura 9.** Zimogramas típicos de *Colletotrichum gloeosporioides*. a) Malato deshidrogenasa, b) Esterasa y c) Transaminasa glutámico oxaloacética. T = testigo, Mdh2-1 = alelo asociado a alta patogenicidad. 47
- Figura 10.** Perfil de alelos de isoenzimas presentes en los aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides*. Los marcados con blanco probablemente están relacionados con alta patogenicidad. 48
- Figura 11.** Dendograma de caracteres isoenzimáticos de *C. gloeosporioides*. A la derecha se observan el número de identificación de cada monoconidial y, abreviados, la localidad y el síntoma que producen. 50

- Figura 12.** Productos de amplificación característicos *C. gloeosporioides*. A) Primer OPBO6, B) OPQ09, C) OPA09 y D)OPV06. La explicación de los loci señalados se da en la sección de marcadores RAPD asociados a patogenicidad. 54
- Figura 13.** Dendograma basado en loci RAPD de *C. gloeosporioides*. A la derecha se observan el número de identificación de cada monoconidial y, abreviados, la localidad y síntoma que producen. 57
- Figura 14.** Dendograma construido con el total de caracteres estudiados. A la derecha se observan el número de identificación de los monoconidiales y, abreviados, la localidad y el síntoma que producen, 59

ABREVIATURAS

RAPD	Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar
CP	Componente Principal
MC	Monoconidial
ADN	Acido Desoxirribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción
PDA	Papa Dextrosa Agar
MDH	Malato Deshidrogenasa
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
GDH	Deshidrogenasa glutámica
CAT	Catalasa
IDH	Isocitrato Deshidrogenasa
EST	Esterasa
ACP	Fosfatasa Acida
GOT	Transaminasa glutámico oxaloacética
Tris-HCL	Trizma base ajustado con Acido Clorhídrico

EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
RNAsa A	Ribonucleasa A
IVG	Indice de Variabilidad Genética
r^2	Coefficiente de correlación
ACP	Análisis de Componentes Principales
U-AC	Uruapan. Antracnosis-Cuartheaduras
U-MS	Uruapan-Manchas superficiales
ZIRA-V	Ziracuaretiro-Viruela
SJN-A	San Juan Nuevo-Antracnosis
ZIROS-V	Zirosto-Viruela
TAN-MS	Tancítaro-Manchas superficiales
LR-MS	Los Reyes-Manchas superficiales
TAC-V	Tacámbaro-Viruela
TAC-A	Tacámbaro-Antracnosis
P-A	Peribán-Antracnosis
SJN-AC	San Juan Nuevo-Antracnosis-Cuartheaduras
PLP	Porcentaje de loci Polimórficos

CARACTERIZACION, DIVERSIDAD GENETICA Y BUSQUEDA DE MARCADORES ASOCIADOS A PATOGENICIDAD EN CEPAS SELECTAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) DE MICHOACAN, MEXICO.

RESUMEN

Se llevó a cabo la caracterización morfológica, bioquímica y molecular de 21 cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) provenientes de distintas regiones del Estado de Michoacán, seleccionadas en base a sus características morfológicas contrastantes. Se estudiaron también las relaciones de agrupamiento entre los aislamientos monoconidiales, así como la posible relación de marcadores bioquímicos y moleculares asociados a la patogenicidad de este hongo. Se presenta la descripción morfológica y patogénica de cada una de las cepas bajo estudio en la cual se observa que no hubo dos cepas con características iguales. Las características típicas de *C. gloeosporioides* son: micelio blanco, consistencia algodonosa, colonia blanca, crecimiento de micelio al azar e hifas cortas en el borde de crecimiento. Se observó también que no existe relación entre la patogenicidad medida como capacidad invasiva de pulpa de aguacate y la velocidad de crecimiento *in vitro*, esta última se caracteriza por presentar cuatro tipos de pendiente (velocidad de crecimiento) cuando se representa como una recta, en general las cepas con pendiente mayor corresponden a las cepas causantes de manchas superficiales provenientes de la localidad de Uruapan. El agrupamiento obtenido mediante perfiles isoenzimáticos y mediante RAPD es similar; el agrupamiento hecho con el total de datos resultó igual al obtenido con los cuatro iniciadores RAPD. En general se observa que las relaciones de agrupamiento se establecen tanto en base a la localidad de origen como al síntoma producido por la cepa. La variabilidad genética fue alta cuando se consideraron caracteres isoenzimáticos y bandas RAPD, pero fue menor cuando se usaron caracteres morfológicos. El promedio de bandas RAPD definidas por cada iniciador es muy alto (23.2), al igual que el promedio de alelos de isoenzimas por locus (2.6). Se encontraron tres alelos de isoenzimas que por ser únicos son útiles en el estudio de flujo de genes, ellos son Gdh1-3, Idh2-1 e Idh2-5, además de las bandas RAPD OPB06.7, OPB06.16, OPQ09.14, OPQ09.28, OPQ09.29, OPQ09.35, OPQ09.36, OPQ09.37, OPA09.14, OPA09.15, OPA09.23, OPA09.24 y OPA09.25. Se encontraron también tres alelos con probable asociación a alta patogenicidad de *C. gloeosporioides*: Mdh2-1, Adh2-2 y Acp1-4; y cuatro bandas RAPD: OPB06.11, OPQ09.12, OPA09.3 Y OPAQ09.7. Además hubo dos bandas RAPD asociadas a baja patogenicidad: OPB06.2 y OPB06.6.

INTRODUCCION

En México el cultivo del aguacate (*Persea americana* cv. Hass) es muy importante para la economía nacional debido a que se mantienen en promedio 91,000 hectáreas sembradas con producción anual promedio de 751,000 toneladas y rendimiento de 8.25 toneladas por hectárea. Las exportaciones ascienden a 42,775,000 dólares por año, y se exporta principalmente a Inglaterra, Francia y Japón (Dirección de Estudios Económicos Básicos 87-96. Sector Agropecuario. Consejo Nacional Agropecuario, 1997). La exportación a Estados Unidos se ha hecho únicamente en forma de pulpa y guacamole por tratarse, hasta 1998, de un producto vetado por ese país.

El Estado de Michoacán cuenta con el 90% de la superficie nacional sembrada siendo el iniciador productor en el ámbito mundial; los municipios más importantes de la franja aguacatera del estado son: Peribán, Uruapan, Tancítaro, San Juan Nuevo, Tacámbaro, Ario de Rosales. Tingüindín, Zitácuaro, Atapan, Salvador Escalante y Ziracuaretiro.

Uno de los factores más importantes que limitan la producción, abatiéndola hasta un 70%, es la presencia de enfermedades fungosas, de las cuales la más importante por el daño económico que causa, es la antracnosis que se reconoce por diversos síntomas tales como cuarteaduras, manchas y viruela. El agente causal de esta enfermedad es el hongo ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides*.

La antracnosis se presenta en todos los municipios productores y ataca al aguacate desde la etapa de formación de frutos hasta su traslado, almacenaje y comercialización. El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* cuya fase sexual (teleomorfo) es *Glomerella cingulata*. El control químico de este hongo es muy costoso pues se requiere de un gran número de aplicaciones de diferentes fungicidas.

ANTECEDENTES

Importancia del cultivo del aguacate

En México el aguacate se cultiva desde tiempos precoloniales, aprovechándose lo que actualmente conocemos como aguacate criollo, sin embargo, el mejoramiento genético tiende a incrementar la producción al desarrollar variedades más rendidoras, este es el caso de la variedad de aguacate llamada “Fuerte” introducida de Estados Unidos y que sustituyó prácticamente a todas las huertas criollas; posteriormente (especialmente en Michoacán) fue sustituida por la variedad Hass.

Actualmente la variedad Hass se mantiene como un gran monocultivo ocupando prácticamente toda la superficie cultivada con aguacate en el estado de Michoacán, el cual es el principal estado productor de este fruto con alrededor del 80% de la producción nacional y más de 90,000 hectáreas cultivadas (Consejo Nacional Agropecuario, 1997).

Factores limitantes de la producción

Debido a su condición de monocultivo en Michoacán, el aguacate enfrenta muchos factores adversos que limitan su producción, entre ellos podemos destacar deficiencias en la composición de nutrientes del suelo, susceptibilidad al ataque de plagas principalmente del suelo e insectos y vulnerabilidad a enfermedades virales, bacterianas y fungosas. Entre estas últimas la más importante por el daño económico que causa es la antracnosis cuyo agente causal es el hongo ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides*.

Características y síntomas de la antracnosis

C. gloeosporioides produce una gran cantidad de síntomas diversos cuando infecta la cáscara y la pulpa del aguacate, el más conocido es la antracnosis cuyos síntomas típicos son: lesiones oscuras y hundidas, circulares o elipsoidales con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas. Otros tipos de síntomas son los definidos por Morales (1996) quien señala que se pueden encontrar cuarteaduras, manchas superficiales, viruela y combinaciones de ellas tales como antracnosis-cuarteaduras o antracnosis-manchas superficiales.

Los daños por este hongo se pueden presentar en cualquier estado del desarrollo de la planta causando caída prematura de frutos o pérdida de calidad comercial en estos, afectando la fotosíntesis

y otras funciones fisiológicas e incluso, pudiendo permanecer como infección latente y causar daños en postcosecha e incluso durante su vida de anaquel (Bailey y Jeger, 1992).

Distribución de *C. gloeosporioides*

La antracnosis por *Colletotrichum spp* es una enfermedad que se caracteriza por su condición cosmopolita, encontrándose en todos los continentes, sobre todo en regiones templadas, tropicales y subtropicales donde ataca a una gran variedad de hospederos tales como cereales, pastos, gramíneas, frutales, hortalizas, etc. (Bailey y Jeger, 1992).

En México se han reportado hongos del género *Colletotrichum* prácticamente en todo el país. *C. gloeosporioides* se ha detectado en todas las regiones productoras de aguacate incluyendo el centro, norte y sureste del país, con especial preponderancia en los estados de Michoacán, Guanajuato y Puebla. En el estado de Michoacán se ha detectado prácticamente en todos los municipios de la franja aguacatera donde produce daños considerables llegando a abatir la producción hasta un 70% en algunas localidades; las zonas de Michoacán más afectadas son Tacámbaro, Uruapan, Peribán y Zitácuaro (Morales y Vidales, 1994).

Taxonomía del género *Colletotrichum*

La ubicación taxonómica de *C. gloeosporioides* permanece sin esclarecerse del todo debido a la gran variabilidad morfológica, cultural y de patotipos que presenta; por este motivo se han llegado a establecer hasta once sinónimos del mismo hongo colocándolo incluso en dos géneros diferentes: *Colletotrichum* y *Gloeosporium* (Sutton, 1992).

La identificación de especies de *Colletotrichum* se ha basado principalmente en caracteres morfológicos y de crecimiento en varios medios tales como forma y tamaño de conidios, presencia o ausencia de setas y esclerocios, y forma de haustorios y apresorios. Sin embargo, estos criterios no han sido lo suficientemente esclarecedores por lo que se intentó recurrir a características tales como la relación huésped-patógeno y especificidad de hospederos, así como a fisiología del crecimiento y patrones de proteínas solubles (Lenné y Burdon, 1990).

Las características morfológicas consideradas como descriptoras de la especie *C. gloeosporioides* son: conidios en masas de color rosado o salmón cubiertas por una capa mucilaginosa cuando las colonias no han envejecido, tamaño de los conidios de 12 a 18 μm de largo

por 3.5 a 6.0 μm de ancho, color de la colonia variable de blanco grisáceo a gris oscuro, setas presentes, esclerocios ausentes, apresorios clavados (en forma de maza), ovados y algunas veces lobulados (Morales, 1996).

Caracterización genética y morfológica

La caracterización genética y morfológica del género *Colletotrichum* y su teleomorfo *Glomerella cingulata* se han estudiado por mucho tiempo; así, Chilton y Wheeler (1949) describen cómo se lleva a cabo la segregación y frecuencias de mutación en cultivos monoascospóricos que presentan la característica genética plus (las cepas plus se complementan con cepas minus para reproducirse sexualmente). En 1987, al estudiar *G. cingulata* y otros ascomicetos filamentosos, Perkins señala los modelos de segregación de los genes que causan el que una cepa se comporte como “plus” o “minus”. Vaillancourt y Hanau en 1991 desarrollaron un método para hacer análisis genético de *C. graminicola* causante de antracnosis en maíz, el cual consiste en inocular el hongo en cámara húmeda sobre trozos esterilizados por autoclave de hojas de maíz, de esta manera se obtiene progeñie proveniente de cruzamientos sexuales.

En 1985 Tu reportó una modificación al medio de Mathur para crecimiento, esporulación y germinación de esporas de *C. lindemuthianum*, este medio mejorado contiene dextrosa, bactopectona, extracto de levadura y bactoagar a pH final de 5.5.

Por otra parte, Tamayo *et al.* (1995) describieron las diversas razas de *C. lindemuthianum* en Antioquía, Colombia encontrando once razas diferentes en un apoblación de 19 aislamientos monospóricos. Smith (1990) caracterizó morfológica, cultural y patogénicamente las especies de *Colletotrichum* aisladas de fresa, las que incluyeron *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Maas (1983) pudo diferenciar a *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. trifolii*, *C. dematium*, *G. cingulata* y *Gloeosporium spp.* con base en la virulencia de cada aislamiento.

Resistencia a antracnosis

Prusky *et al.* (1983) aislaron un metabolito secundario del aguacate con propiedades antifúngicas y lo caracterizaron como cis 1-acetoxy-2 hidroxy-4-oxo-heneicos-12. 15-dieno. En frutos inmaduros la alta concentración de este compuesto evita el desarrollo de *C. gloeosporioides*, sin embargo cuando el fruto madura la concentración de este metabolito decae y puede desarrollarse

la enfermedad. Este compuesto inhibe el crecimiento del hongo pero contribuye a la latencia de la enfermedad, debido a que no lo mata.

En un experimento *in vitro* Prusky *et al.* (1982) encontraron que el compuesto antifúngico a concentración de $790 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibió totalmente la germinación de las esporas y el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Es relevante señalar que la cáscara de frutos inmaduros de aguacate Hass tiene concentraciones de hasta $1200 \mu\text{g/g}$, sin embargo esta concentración decrece hasta $113 \mu\text{g/g}$ cuando el fruto madura.

La inducción de la permanencia de este dieno por cualquier método (bioquímico, mejoramiento genético o ingeniería genética) podría dar muy buenos resultados en la resistencia del aguacate a antracnosis, aunque se tendría que estudiar si el fruto así modificado es comestible.

Caracterización bioquímica del género *Colletotrichum*

Los estudios moleculares de la variación genética de los hongos son muy importantes ya que la magnitud de la variabilidad se correlaciona positivamente con la capacidad adaptativa y evolutiva de cada población, por lo tanto un hongo muy variable desde el punto de vista genético será también capaz de adaptarse rápidamente a fungicidas o a cultivares resistentes (Wolfe, 1985).

A pesar de la importancia de la estimación de la variabilidad genética de los hongos por medios moleculares, existen pocos trabajos que pongan énfasis en este aspecto. Una de las herramientas útiles y prácticas es la electroforesis de isoenzimas que se ha usado únicamente a partir de 1985 cuando Burdon y Roelfs definieron la manera en que cambian las frecuencias alélicas en poblaciones de *Puccinia graminis* cuando se reproducen de manera sexual y asexual encontrando que las primeras poseen mayor variabilidad. También intentaron correlacionar la variación de la virulencia y la variabilidad isoenzimática en poblaciones asexuales de *P. recondita* y *P. graminis*, y encontraron asociación de patrones enzimáticos con genotipos virulentos.

McDonald y McDermott (1993) consideran que los marcadores electroforéticos como las proteínas o isoenzimas estiman de manera muy precisa la estructura genética de las poblaciones, sin embargo, afirman que muchas especies de hongos poseen muy poca variación isoenzimática. A pesar de lo anterior, Morales (1996) logró separar aislamientos de *C. gloeosporioides* sobre la base de diferentes sistemas isoenzimáticos, aunque no logró obtener buena resolución para ninguna de las deshidrogenasas estudiadas.

Bonde *et al.* (1991) estudiando aislados de fresa pudieron separar *C. fragariae*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* usando coeficientes de similitud entre y dentro de los aislamientos, encontrando además cierto grado de parentesco entre las dos últimas especies. Por otra parte, Maas (1983) observó mayor parentesco entre *C. coccodes* y *C. fragariae* que con *C. gloeosporioides*. Lenné y Burdon (1990) encontraron seis patotipos de *C. gloeosporioides* asociados a diferentes patrones isoenzimáticos.

En *Uromyces appendiculatus*, agente causal de la roya del frijol, se estudiaron 55 enzimas y proteínas por medio de electroforesis de almidón para tratar de encontrar marcadores fenotípicos: trece enzimas resultaron útiles para este propósito (Linde *et al.*, 1990), lo cual sugiere que este tipo de estudios se pueden llevar a cabo en otras especies de hongos fitopatógenos.

Caracterización genética molecular

Otra herramienta molecular muy útil para conocer el grado de diversidad genética de las poblaciones es el estudio del ADN de la especie problema mediante diferentes técnicas. Sin embargo, una limitante ha sido la extracción del ADN del micelio de los hongos de tal forma que no esté degradado o contaminado; para ello Raeder y Broda (1985) desarrollaron un método rápido en los hongos *Phanerogochaeta chrysosporium*, *Aspergillus nidulans* y *Coprinus cinereus*; este método se basa en la desestabilización de las membranas celular y de los organelos mediante el detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS). La ventaja de este método es que requiere muy pequeñas cantidades de micelio liofilizado (50 mg). En 1992 Sreenivasaprasad *et al.* lo modificaron adicionando un tratamiento con fenol:cloroformo para incrementar la pureza del ADN.

Por otra parte, el desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite amplificar segmentos específicos o al azar de ADN (Randall *et al.* 1985) ha sido adaptada para estudios de marcadores tales como el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD) (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica se basa en la amplificación exponencial por PCR, mediante la repetición 35 a 45 veces de ciclos térmicos, de fragmentos de ADN definidos por los sitios de reconocimiento de iniciadores de 10 bases. La primera temperatura (94°C) es de desnaturalización, es decir, separación de las dos cadenas de ADN; la segunda (35°C) es para que el iniciador reconozca su sitio complementario en el ADN blanco, y la tercera (72°C) es la fase de síntesis de la cadena complementaria (Figura 1).

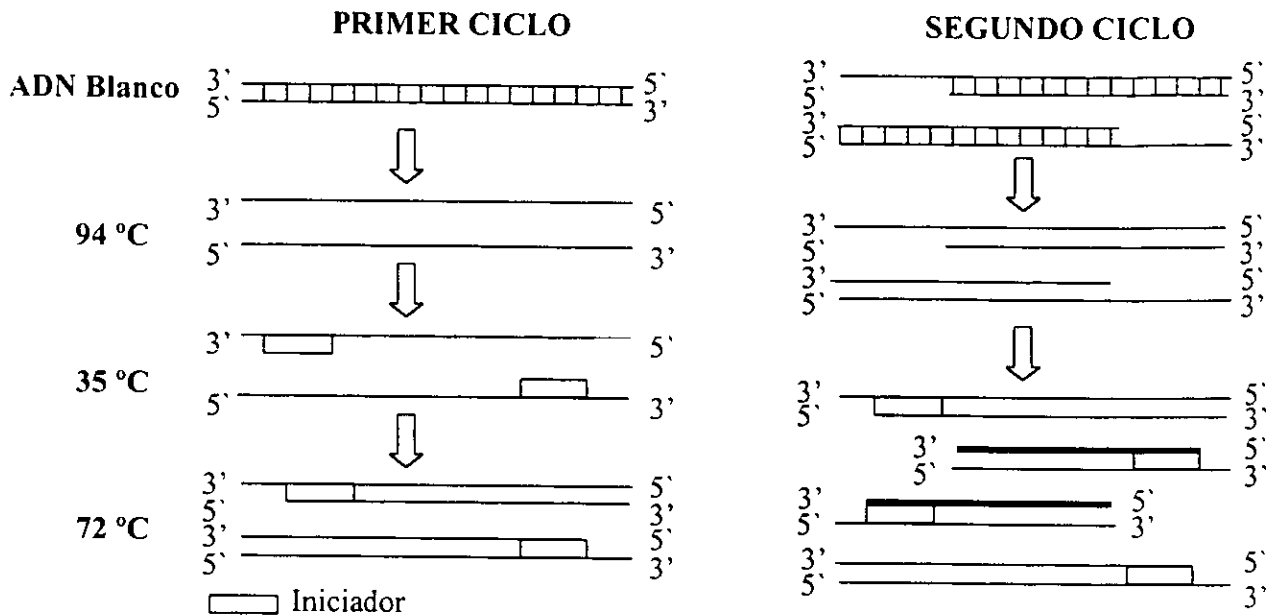


Figura 1. Amplificación de fragmentos RAPD mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En el segundo ciclo se omitió el alineamiento a 35°C. En líneas gruesas se observan los fragmentos definidos por los iniciadores y que serán amplificados en ciclos sucesivos.

Prácticamente desde su descubrimiento se ha dudado acerca de la reproducibilidad de los resultados usando RAPD; así Hallden *et al.* (1996) demostraron que en estudios de diversidad genética la reproducibilidad de los patrones de bandas tiene efectos tan importantes como la competencia por los sitios homólogos del ADN muestra en la reacción de amplificación. Sin embargo, la utilización de técnicas simples puede reducir apreciablemente ese error (Hu y Quiros, 1991; Stiles *et al.*, 1993). Por otra parte, Skroch y Nienhuis (1995) mencionan que el impacto de una mala interpretación de bandas puede ser de hasta el 2% mientras que la mínima reproducibilidad obtenida es del 76%. Kubelik y Szabo (1995), trabajando con el hongo *Puccinia graminis*, encontraron el doble de bandas RAPD usando iniciadores con 80-100% de G+C en lugar del 60-70% normal; el mismo resultado se obtuvo con ADN de muchos otros hongos, incluyendo ascomicetos.

Usando las herramientas descritas u otras similares Bailey y Jeger (1992) reportan un estudio de variación genética en *C. gloeosporioides* aislados de aguacate, papaya, plátano y mango confirmando que hay alta variación entre aislamientos del mismo cultivo y del mismo país, sin embargo aislamientos procedentes de diferentes cultivos fueron similares, como en el

caso de dos cepas de papaya que fueron iguales a una de aguacate. Braithwaite en 1990 estudió la variación genética de *C. gloeosporioides* que ataca *Stylosanthes spp.* usando el Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP); Mills *et al.* (1992) reportaron alta diversidad en esta especie aislada de aguacate usando patrones de restricción con las enzimas Hind III y Bam I e hibridados con el plásmido pMY60 usado como sonda. Sreenivasaprasad *et al.* (1992) usando RFLP en estudios de ADN ribosomal y mitocondrial de *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* aislados de fresa encontraron que hay una amplia heterogeneidad en *C. acutatum* de diferentes huéspedes y resultados similares fueron obtenidos mediante RAPD; *C. gloeosporioides* no presentó variación entre aislamientos.

Alahakoon *et al.* (1992) lograron seleccionar una variante genética virulenta en mango pasándola a través de frutos de tomate. Esta variante y las de campo mostraron diferentes patrones de bandas de RAPD y RFLP además de diferencias morfológicas en conidios, septos y núcleos. Por su parte, Udupa *et al.* (1998) lograron reconocer diversos patotipos del hongo *Ascochyta rabiei*, el cual es reconocido por presentar una pobre definición de su variabilidad genética, usando 14 marcadores RAPD y una sonda oligonucleótida complementaria a la secuencia microsatélite (GATA)₄. Otoyá *et al.* (1995) evaluaron la diversidad genética de *C. lindemuthianum* de Colombia usando RAPD y encontraron amplia variabilidad en este hongo que presenta evolución divergente entre el norte y sur de Colombia.

JUSTIFICACION

Existen evidencias que indican amplia variación genética en *C. gloeosporioides*, tales como la diversidad de colonias contrastantes en características como color, presencia de anillos, tasa de crecimiento y otros caracteres en cultivo. Otra característica altamente variable es la susceptibilidad a fungicidas. De manera relevante se observa que este hongo puede producir una gran diversidad de síntomas, tales como antracnosis, manchas, viruela, cuarteaduras, marchitez de brotes florales, y otros. Sin embargo los estudios para determinar con certeza el grado de la variabilidad genética son escasos, enfocándose principalmente al estudio de caracteres morfológicos y de virulencia. Los estudios a nivel genético que consideren el uso de huellas genómicas son prácticamente inexistentes.

La clasificación taxonómica en el nivel de género y especie es muy difícil por tratarse de un taxón muy variable, existiendo hasta la fecha una gran cantidad de sinónimos. Particularmente *C. gloeosporioides* presente una gran cantidad de tipos morfológicos por lo que requiere estudiar más profundamente las relaciones de agrupamiento que indiquen el posible parentesco entre los diversos tipos

Igualmente importantes es la búsqueda de genes, o marcadores genéticos relacionados con la patogenicidad ó virulencia de los hongos que atacan a los cultivos de importancia alimenticia. Con este conocimiento sería posible realizar estudios de mutaciones o reproducción sexual dirigida entre cepas seleccionadas por sus características patogénicas de manera que se posibilite el estudio de las bases genéticas de esa característica.

También de suma importancia son los estudios enfocados a encontrar la forma en que los genes de este hongo se mueven dentro y entre las poblaciones además de los progenitores a su descendencia, esto es, el flujo genético horizontal y vertical. Para este tipo de estudios es condición indispensable encontrar genes o marcadores de genes cuya presencia o ausencia pueda ser determinada fácilmente en diferentes poblaciones ó en generaciones filiales sucesivas. Adicionalmente los marcadores seleccionados pueden ser usados como modelo para estudios relacionados con evaluación de riesgos en bioseguridad.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

- 1.- Caracterizar una población de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* a nivel morfológico, patogénico, bioquímico y genético.
- 2.- Establecer las relaciones genéticas entre cepas de diferentes localidades del área productora de aguacate Hass de Michoacán, México.
- 3.- Encontrar marcadores bioquímicos (isoenzimas) y moleculares (RAPD) asociados a la patogenicidad de *C. gloeosporioides*.
- 4.- Seleccionar isoenzimas o bandas RAPD que puedan usarse como marcadores en estudios de flujo genético entre cepas de *C. gloeosporioides* de diferentes localidades.

HIPOTESIS

Las hipótesis a probar en el presente estudio son:

- 1.- La variabilidad morfológica observada indica que es posible la existencia de una amplia variabilidad genética.
- 2.- Los patrones de bandas RAPD proporcionan una mejor estimación de la variabilidad genética que las isoenzimas y los caracteres morfológicos.
- 3.- Existe una relación directa entre los diferentes síntomas y localidad de origen de los hongos con sus perfiles de isoenzimas y RAPD.
- 4.- Es posible establecer la correlación entre bandas de isoenzimas y RAPD con la patogenicidad de las cepas para encontrar posibles marcadores asociados a los genes responsables de esta característica.
- 5.- Si la variabilidad estimada por isoenzimas y RAPD es amplia puede ser posible encontrar bandas únicas o fácilmente identificables que sirvan como marcadores para estudios de flujo genético.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Marcadores Genéticos Moleculares (LAMAGEM) del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a cargo de la Dra. Susana Azpiroz Rivero y actualmente del Dr. Héctor Guillén Andrade; y en el Laboratorio 312 de Alimentos y Biotecnología de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a cargo de la Dra. Amanda Gálvez Mariscal y la Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

Area de Estudio

La región de estudio se localiza en Michoacán entre las coordenadas 19°-20'° latitud norte y 101°-102° longitud oeste. El clima predominante es semicálido subhúmedo con lluvias en verano y porcentaje de lluvia invernal menor al 5%. Tancítaro posee un clima templado en su parte norte; Tacámbaro presenta una pequeña área semifrías.

Los tipos de suelo predominantes son andosol, luvisol, litosol y regosol distribuidos en mosaico con predominancia en Uruapan, San Juan Nuevo y Tancítaro de los tres primeros tipos.

En Uruapan y Tacámbaro la mayoría de los huertos se presentan entre los 1300 y 1500 msnm, en Tancítaro, Peribán y San Juan Nuevo la altitud predominante es entre 1500 y 2000 msnm (INEGI, 1985).

Muestreo

Se colectaron 3 frutos de aguacate cultivar Hass por cada una de tres parcelas con los síntomas representativos producidos por *Colletotrichum gloeosporioides*: antracnosis típica, antracnosis-cuartheaduras, manchas superficiales y viruela. El muestreo se hizo al azar en cada tipo de síntoma (Cuadro 1).

Los frutos colectados se mantuvieron en una cámara húmeda para transportarse al laboratorio, donde se hicieron siembras en medios nutritivos por cada tipo de síntoma.

Cuadro 1. Aislamientos monoconidiales, localidad de origen y síntoma producido.

Monoconidial	Localidad	Síntoma
45	Uruapan	Antracnosis-cuartheaduras
46	Uruapan	Manchas superficiales
47	Uruapan	Manchas superficiales
48	Uruapan	Manchas superficiales
48A	Uruapan	Manchas superficiales
49	Uruapan	Manchas superficiales
50	Uruapan	Manchas superficiales
51	Uruapan	Manchas superficiales
M51	Uruapan	Manchas superficiales
52	Uruapan	Manchas superficiales
53D	Zirosto	Viruela
53E	Zirosto	Viruela
54	San Juan Nuevo	Antracnosis
55	Tacámbaro	Antracnosis
56	San Juan Nuevo	Antracnosis-cuartheaduras
57	Tacámbaro	Viruela
58	Peribán	Antracnosis
59	Tancítaro	Manchas superficiales
60	Los Reyes	Manchas superficiales
61	Tacámbaro	Viruela
62	Ziracuaretiro	Viruela

Material Biológico

Para obtener el material biológico se hicieron siembras por tipo de síntoma en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) al 4% en cajas Petri de 100 milímetros de diámetro. A los dos días de crecimiento se reaislaron nuevos subcultivos en los diferentes hongos presentes para obtener aislamientos puros. Cuando estos llenaron la caja y habían esporulado, se hicieron preparaciones temporales con lactofenol azul para observarse al microscopio compuesto y proceder a su identificación mediante el uso de claves dicotómicas especializadas.

De la manera descrita se obtuvieron aislamientos puros de *Colletotrichum gloeosporioides*, de los cuales se seleccionaron los que mostraron características diferentes y se procesaron para obtener aislamientos monoconidiales de la siguiente manera: se sometieron a luz continua durante ocho días para obtener abundante esporulación, posteriormente a cada caja se le agregaron 10 mililitros de agua destilada estéril y la superficie del hongo se removió con una espátula para liberar los conidios; la suspensión así obtenida se consideró como suspensión

madre para preparar diluciones sucesivas en proporción 1:10 y realizar siembras en PDA para obtener colonias individuales procedentes de un solo conidio. Este resultado se obtuvo al llegar a una solución diluida en un factor de 10^{-8} . De esta manera se obtuvieron 60 aislamientos monoconidiales de los cuales se seleccionaron los que mostraron características morfológicas contrastantes. Estos aislamientos fueron usados como material de estudio.

Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se hicieron siembras en PDA en incubadora a 28°C, los caracteres considerados fueron los siguientes (Cuadro 2): color de micelio, color de la colonia, presencia de anillos radiales, color de anillos, presencia y color de manchas radiales, consistencia del micelio y color del centro de la colonia donde se colocó el inóculo.

Cuadro 2. Caracteres considerados en la caracterización de 21 aislamientos de *C. gloeosporioides*.

CARACTERES MORFOLOGICOS Y FISIOLÓGICOS	SISTEMAS ENZIMATICOS	INICIADORES DECAMEROS
Color de micelio	Malato deshidrogenasa	OPBO6 (5'-TGCTCTGCCC-3')
Consistencia del micelio	Alcohol deshidrogenasa	OPQ09 (5'-GGCTAACCGA-3')
Tipo de crecimiento del micelio	Glutamato deshidrogenasa	OPA09 (5'-GGGTAACGCC-3')
Dirección de las hifas del borde	Catalasa	OPV06 (5'-ACGCCCAGGT-3')
Tamaño de las hifas del borde	Isocitrato deshidrogenasa	
Color de colonia al reverso	Esterasa	
Color del centro de la colonia	Fosfatasa ácida	
Forma de la colonia	Transaminasa glutámico oxaloacética	
Presencia de anillos concéntricos		
Presencia de manchas radiales		
Presencia de estrías		
Velocidad de crecimiento*		
Capacidad invasiva de pulpa*		

* Aunque estos caracteres no son estrictamente morfológicos se incluyeron en este apartado para una mejor manejabilidad de datos y análisis estadísticos, los cuales resultaron más completos.

Se hicieron tres repeticiones y las mediciones se llevaron a cabo cuando cada aislamiento llenó la caja de cultivo. Adicionalmente se hicieron experimentos de velocidad de crecimiento y de patogenicidad por separado, ya que estos indicadores son considerados de valor en estudios de caracterización fitopatológica.

Caracterización patogénica (capacidad invasiva de pulpa)

Los frutos necesarios para este experimento por triplicado se seleccionaron con base a uniformidad de tamaño, madurez fisiológica (tres cuartos de madurez) y contenido de materia seca (23%); la procedencia de todos los frutos fue la región de Uruapan.

Para cada repetición se obtuvieron inóculos de las cajas Petri conteniendo medio PDA con sacabocados de 7mm de diámetro, las rodajas de medio con el hongo obtenidas se insertaron en tres perforaciones equidistantes practicadas con el mismo sacabocados en un fruto de aguacate Hass.

Los frutos así inoculados se mantuvieron en charolas cubiertas con plástico para formar una cámara húmeda mantenida a condiciones ambiente. Después de ocho días se retiraron de la cámara húmeda, se retiró la pulpa infectada por cada inóculo, se pesó y se promedió por fruto. Para su análisis estadístico los pesos promedio se distribuyeron en una escala de 4 categorías: el tipo I tuvo el rango de 1 a 3.8 g, el tipo II de 3.9 a 6.7 g, el tipo III de 6.8 a 9.6 g y el tipo IV de 9.7 a 12.5 g.

Velocidad de Crecimiento

Este experimento se hizo con tres repeticiones. Para llevarlo a cabo se hicieron siembras simultáneas en cajas Petri con medio PDA de los 21 monoconidiales a temperatura de incubación de 28°C y condiciones de oscuridad total. Diariamente se midió el diámetro de la colonia con un calibrador tipo Vernier con el objetivo de encontrar la tasa diaria de crecimiento en diámetro y en área, así como el crecimiento acumulado por día. Las mediciones se detuvieron cuando el monoconidial con crecimiento más rápido llenó la caja Petri. Esta característica es muy usada en Fitopatología para determinar el número de variantes presentes en los hongos, además de dar una idea de la capacidad patogénica de los mismos.

En el análisis de los resultados de este experimento se consideró una escala de tres categorías de acuerdo al diámetro final alcanzado por cada monoconidial en el tiempo considerado. Para la velocidad de crecimiento de tipo I el rango fue de 4.0 a 6.0 mm, el tipo II de 6.7 a 9.3 mm y el tipo III de 9.4 a 12.0 mm.

Caracterización Bioquímica

Esta caracterización se llevó a cabo por medio de la obtención de perfiles isoenzimáticos por electroforesis en gel horizontal de almidón al 12%. Las enzimas consideradas fueron las siguientes (Cuadro 2): Malato deshidrogenasa (MDH), Alcohol deshidrogenasa (ADH), Glutamato deshidrogenasa (GDH), Catalasa (CAT), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Esterasa (EST), Fosfatasa ácida (ACP) y Transaminasa glutámico-oxaloacética (GOT) (Morales, 1996).

Obtención de Micelio

Se sembraron 21 monoconidiales en 200 mL de medio de cultivo líquido Papa-Dextrosa. La preparación de este medio se hizo hirviendo durante 10 minutos 200 gramos de papas frescas picadas en 500 mililitros de agua destilada, posteriormente se filtró la solución obtenida a través de manta de cielo, se le agregaron 20 gramos de dextrosa y se aforó a 500 mL. Este medio fue distribuido en porciones de 100 mL en matraces de 250 mL en cada uno de los cuales se colocaron tres rodajas de 7mm de diámetro de un monoconidial. Los matraces así sembrados se mantuvieron a 28°C y con agitación orbital de 200 revoluciones por minuto. Cuando el micelio llenó el matraz se filtró a través de manta de cielo y se exprimió para eliminar la máxima cantidad de medio posible. La masa de micelio obtenida se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para su posterior liofilización, la cual se hizo con el propósito de tener material deshidratado pero con la estructura celular intacta lo cual mantiene los materiales celulares (proteínas, ADN, etc.) en condiciones estables.

La liofilización de los monoconidiales se realizó a presión de vacío de 10 mBar a temperatura de -50°C en la liofilizadora Labconco Lyph Lock 4.5. Una vez concluido el proceso de liofilización las muestras se molieron hasta obtener un polvo muy fino en un molino para café (Moulinex) y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Extracción de enzimas

Para la extracción de las isoenzimas se pesaron 20 miligramos de tejido liofilizado en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se le agregaron 200 μ l de amortiguador de extracción (Montero 1996), y se molieron con un taladro doméstico al cual se le adaptó una punta de teflón a manera de broca con el fin de descompartamentalizar las células del micelio; este proceso duró 5 segundos, después las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a 13000xG; del sobrenadante se obtuvieron 4 alícuotas de 20 μ l las cuales se guardaron a -80°C hasta su uso en el cargado de los geles para el corrimiento electroforético. Todo este proceso se llevó a cabo manteniendo las muestras en hielo para evitar la desnaturalización de las isoenzimas.

Electroforesis de isoenzimas

La preparación de los geles y las condiciones generales de la electroforesis fueron las establecidas por Stuber y Goodman (1988). Se prepararon dos tipos de gel, C y D, a concentración del 12% de almidón. Los dos tipos de geles difirieron en su formulación y en el pH, el cual fue de 6.5 para el gel D y 8.3 para el gel C; cada tipo de gel se usó para revelar diferentes enzimas de acuerdo a su pH óptimo de separación. La preparación de los geles se hizo de la siguiente manera: en un matraz de 1000 mL se puso la cantidad correspondiente de almidón (42.25 g para el gel C y 61.75 para el D) y sacarosa (14.15 g para C y 14.25 para D), se le agregó un 30% del volumen final de amortiguador para gel (350 mL para C y 500 mL para D) y se puso a agitar en una plancha magnética para formar una suspensión, el resto del amortiguador se calentó hasta ebullición en un horno de microondas y posteriormente se vertió en la suspensión de almidón-sacarosa sin dejar de agitar hasta que empezó a gelificar, inmediatamente después el gel así obtenido se puso a “cocer” en el horno de microondas hasta obtener una consistencia cristalina y sin burbujas de aire; posteriormente se le aplicó vacío durante 5 segundos para uniformizarlo y se procedió a vaciarlo en el portagel que medía. El gel se dejó enfriar durante una hora y posteriormente se guardó a temperatura ambiente en una bolsa de plástico cuidando que quedara perfectamente adherida a la superficie del gel sin que se formaran túneles de aire o burbujas. Al día siguiente el gel se enfrió a 4°C durante una hora para proceder al cargado de las muestras. Las alícuotas de las muestras se descongelaron y se mantuvieron en hielo, en ellas se humedeció una tira de papel filtro Whatman del número 4 de 11x3 mm, el exceso de muestra se

le quitó por absorción con otro papel filtro, y se insertó en un corte practicado a 3 cm del extremo del gel (este corte junto con las tiras de papel corresponden a los pozos de la electroforesis en acrilamida). Como testigos se colocaron dos tiras humedecidas en alícuotas consistentes de una mezcla de los extractos de los 21 monoconidiales. El gel así preparado quedó listo para el corrimiento. Para ello se colocó en las charolas de electroforesis dentro del refrigerador de 4°C con el amortiguador de corrimiento con el pH adecuado para cada tipo de gel. El gel D se corrió a 250V durante 6 horas y el C a 175V durante 5 horas; como indicador de corrimiento se usó una tira de papel filtro embebida en una solución diluida de azul de bromofenol.

Cuadro 3. Sistemas enzimáticos, sustrato, cofactor y colorante usados para la caracterización bioquímica de *C. gloeosporioides*.

ENZIMA	BUFFER (pH)	SUSTRATO	COFACTOR	COLORANTE
Malato deshidrogenasa	9.1+-	Acido DL-Málico	β -NAD	PMS (Fenazín methosulfato)
Alcohol deshidrogenasa	8.0	Etanol	β -NAD	MTT y PMS
Glutamato deshidrogenasa	8.5	Acido Glutámico		NBT (Nitro blue tetrazolio) y PMS
Catalasa	Agua destilada	Peróxido de Hidrógeno		Cloruro férrico y ferricianuro de potasio
Isocitrato deshidrogenasa	8.0	Acido Isocítrico	β -NAD	NBT y PMS
Esterasa	6.0	α y β -Naftilacetato	Ninguno	Fast blue RR salt
Fosfatasa ácida	5.0	Fosfato ácido de naftilo	Cloruro de Magnesio	Fast garnet GBC salt
Transaminasa glutámico oxaloacética	7.4	Acido Cetoglutámico y Ac. Aspártico	Fosfato dibásico de sodio	Fast blue BB salt

Al término del corrimiento se procedió al revelado de los geles, para ello se obtuvieron cortes transversales (rebanadas), 5 para el gel D y 4 para el gel C, las cuales se sumergieron en

50 mL de solución de revelado específica para cada sistema enzimático como se muestra en el Cuadro 3; esta solución contiene el sustrato de la enzima por revelar, su cofactor y/o grupo prostético, así como los colorantes para detectar el producto final de la reacción enzimática; el tiempo de revelado fue de 16 horas a 36°C y con agitación orbital constante. con excepción de la catalasa que se reveló y fijó inmediatamente.

Una vez que se observaron bandas de actividad enzimática nítidas se procedió a la fijación del gel, para lo cual se enjuagó perfectamente la rebanada con agua corriente para eliminar lo mejor posible la solución de revelado. Después la rebanada se cubrió con una solución fijadora de ácido acético, metanol y agua en proporción 1:5:5 (vol:vol:vol). Al cabo de tres horas se enjuagó perfectamente esta solución y se sustituyó por una solución de glicerol al 10% para rehidratar y suavizar la rebanada de gel durante 24 horas.

Después de este procedimiento se llevó a cabo la conservación final de la rebanada de gel y para ello se cortaron dos hojas de papel celofán natural y se empaparon en una solución de glicerol al 10%, una de ellas se colocó encima de un cristal de medidas un poco menores, encima del cual se colocó la rebanada de gel sin que quedaran burbujas en la cara que queda en contacto con el celofán, encima de ella se colocó la otra hoja de celofán sin que quedaran burbujas de aire; los extremos sobrantes de celofán se doblaron bajo el cristal. El sistema así formado se cubrió con papel absorbente para evitar la luz directa y se dejó secar a temperatura ambiente por 48 horas o en incubadora a 36°C durante 4 horas. Una vez que la rebanada de gel se secó se cortó el celofán a 0.5 cm de las orillas del gel y se procedió a su etiquetado. De esta forma el zimograma (patrón de bandas de isoenzimas) quedó listo para su análisis.

Caracterización genética por RAPD

Obtención de micelio

Con el fin de obtener grandes cantidades de micelio para la extracción de ADN (alrededor de 1 gramo de peso seco), se hicieron siembras 200 mL en medio líquido Papa-Dextrosa preparado en la forma antes indicada. El micelio se exprimió, se congeló con nitrógeno líquido, se liofilizó y se molió hasta obtener un polvo muy fino.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el método de Raeder y Broda (1985) modificado por Sreenivasaprasad (1992) de la siguiente manera: Se pesaron 100 miligramos de micelio liofilizado en tubos Eppendorf de 2 mL, se les agregó 1000 μl de amortiguador de extracción (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM EDTA sal disódica y 0.5% SDS) más 1 mL de fenol:cloroformo (7:3 vol:vol) agitando con una punta de pipeta para hacer que todo el polvo de micelio estuviera en contacto con él; se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante 15 min. y se centrifugaron a 13,000xg durante una hora; la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se le agregaron 30 μl de ribonucleasa A (20 mg·ml⁻¹) y se incubó 15 min. a 37°C; posteriormente se realizaron dos extracciones orgánicas agregando 1 mL de fenol:cloroformo y centrifugando 10 min. a 13000xg; después se agregaron 500 μl de isopropanol para precipitar el DNA y se dejó estabilizar durante 15 min. a temperatura ambiente; después se centrifugó 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se enjuagó la pastilla de ADN con 200 μl de etanol al 70%; finalmente se incubó a 36°C para secarlo y se resuspendió en 200 μl de solución Tris EDTA 10 mM pH 8.0.

A partir de la solución obtenida se preparó una alícuota diluida 1:4 para cuantificar la concentración y la pureza de ADN por espectrofotometría de luz ultravioleta. La concentración se obtuvo mediante la fórmula

$$[\text{ADN} (\text{ng} / \mu\text{l})] = (\text{DO}_{260}) (\text{FD}) (50 \text{ng} / \mu\text{l})$$

donde: DO_{260} = Densidad óptica de la solución de ADN leída a longitud de onda de 260 nm

FD = Factor de dilución

$50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ = Una unidad de densidad óptica del ADN a 260 nm.

La pureza se midió como la razón de las lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (260/280) donde valores entre 1.8 y 2.0 indican ADN con la pureza suficiente para la reacción de PCR, valores menores de 1.8 indican contaminación por proteínas y valores mayores de 2.0 indican contaminación por fenol o alguna otra sustancia orgánica.

Las soluciones originales de ADN de todos los monoconidiales se estandarizaron a $200 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y se usaron como soluciones madre para preparar las soluciones de trabajo a concentración de $20 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Amplificación de fragmentos de ADN

Con las soluciones de trabajo de ADN se procedió a hacer las reacciones de PCR usando los iniciadores (iniciadores decámeros) OPB06, OPQ09, OPA09 y OPV06 de Operon Technologies Inc.(Estados Unidos; las concentraciones de los reactivos involucrados en las reacciones de amplificación por cada $20 \mu\text{l}$ de reacción fueron: ADN muestra (40ng), iniciador ($1 \mu\text{M}$), Taq polimerasa (1 unidad), dNTP's ($200 \mu\text{M}$ cada uno), MgCl_2 (2 mM) y buffer 10X ($2\mu\text{L}$). La Taq polimerasa usada fue de la compañía Gibco.

Para la amplificación se usó el termociclador Techné PHC 2 enfriado por agua. el programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de desnaturalización de 7 minutos a 94°C , 3 ciclos de 94°C 1 min., 36°C por 1min y 72°C por 2min; 36 ciclos de 94°C 10 segundos, 40°C 20 seg. y 72° 2 min.; y un ciclo de extensión final de 72°C 5 min.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% a $5\text{V}/\text{cm}$ y se revelaron por tinción con bromuro de etidio a $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante una hora.

La documentación se realizó por fotografía instantánea, previo lavado del gel en agua corriente, usando una cámara instantánea DynaTech con filtro naranja.

Las bandas observadas se codificaron mediante un código binario dando el valor de 1 a la presencia de una banda dada y 0 a su ausencia.

Análisis estadístico

En todos los análisis estadísticos de este estudio se consideró un nivel de significancia de 0.05.

Análisis conjunto

Los datos de todos los experimentos (morfológicos, isoenzimas, RAPD, patogénico y velocidad de crecimiento) se codificaron en formato binario de presencia/ausencia, incluidos los caracteres cuantitativos que por su distribución normal fueron categorizados en rangos para determinar en cual de estos se encontraba la observación correspondiente a cada monoconidial. La codificación se hizo de acuerdo a los lineamientos establecidos por Crisci y López (1983) quienes recomiendan la formación de tantas categorías como sea necesario para cubrir la variedad de datos generados, es decir que una variable dada puede ser dividida en dos o más subvariables siempre y cuando las variables consideradas reciban el mismo tratamiento con la finalidad de no dar mayor peso estadístico a ninguna de ellas.

Con el procedimiento descrito arriba se formó una matriz de ceros y unos que se consideró como la matriz de datos originales que contenía los resultados morfológicos, isoenzimáticos y de bandas RAPD. A partir de esta matriz se calcularon distancias genéticas mediante el programa de cómputo RAPD104 (Armstrong *et al.* 1994). Este paquete fue desarrollado para el análisis de marcadores genéticos de expresión dominante que se estudian únicamente por su presencia o ausencia y que se codifican como uno o cero, tales como las bandas RAPD. En este trabajo se usó para uniformizar los análisis estadísticos ya que los datos originales estaban en código binario; para ello se consideró que los datos morfológicos de todos los monoconidiales provenían de una sola población hipotética analizada con un iniciador también hipotético ya que este programa requiere de esos datos para su funcionamiento. Asimismo se consideró que los datos de isoenzimas correspondían a una población analizada con distintos iniciadores cada uno de los cuales representaba uno de los sistemas enzimáticos determinados en este estudio. Con la matriz de datos se hizo un análisis de distancias genéticas mediante el programa RAPD104 usando el algoritmo de Rogers y Tanimoto (1960) que se basa en la proporción de bandas compartidas por dos individuos. A partir de la matriz de distancias genéticas, la cual muestra el grado de disimilaridad entre todos los pares posibles de

monoconidiales, se realizó un análisis de agrupamiento que generó un dendograma usando el método Neighbor Join Tree del programa de cómputo NTSYS desarrollado para análisis de taxonomía numérica (Rohlf 1993) con el objetivo de conocer las relaciones de semejanza entre todos los monoconidiales.

Adicionalmente se calculó el Índice de Variabilidad Genética (IVG) de Montero *et al.* (1998) propuesto originalmente para calcular diversidad genética basándose en marcadores dominantes, específicamente bandas RAPD y que se basa en la proporción de individuos que poseen una banda particular sobre el número total de bandas y iniciadores usados. Este índice se utilizó para uniformizar las estimaciones de variabilidad genética dado el tipo de datos (presencia-ausencia) de la matriz original de datos.

Marcadores asociados a patogenicidad

Con los resultados de patogenicidad (pulpa invadida por micelio) y las bandas RAPD e isoenzimas obtenidas se hizo un análisis de varianza con atención especial al tamaño del efecto de cada banda medido por el coeficiente de correlación (r^2). Dado que la patogenicidad del hongo es un carácter poligénico se esperaba que diferentes bandas presentaran una F significativa y r^2 alta (con valores de 0.2 o mayores), las bandas que cumplen con estas características se considera que tienen un efecto significativo en la patogenicidad en comparación con otras bandas. El objetivo de este análisis fue encontrar bandas RAPD y de isoenzimas asociadas positiva o negativamente con la capacidad de invasión de la pulpa presentada por *C. gloeosporioides*.

Análisis morfológicos

De la matriz original de datos se usaron únicamente las columnas correspondientes a los caracteres morfológicos (variables) con el fin de calcular el Índice de Variabilidad Genética, tomando en cuenta las consideraciones hechas en el apartado de Análisis Conjunto para el manejo de este tipo de datos. También se calculó la matriz de distancias genéticas con el algoritmo de Rogers y Tanimoto (1960) y se hizo un análisis de agrupamiento con el método Neighbor Join Tree para obtener un dendograma.

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre todas las variables con el fin de encontrar aquellas que estuvieran altamente correlacionadas y poder seleccionar las más adecuadas para un

análisis de componentes principales, el cual se hizo para encontrar el peso de cada variable con respecto a cada uno de ellos, de manera que se puede determinar cual de ellas contribuye en mayor medida a explicar la variabilidad observada. Estos análisis se hicieron con el paquete estadístico de cómputo SAS (SAS Institute, 1988).

El análisis de componentes principales es una técnica de estadística multidimensional que permite conocer las relaciones espaciales de las variables medidas así como la estructura de las mediciones mismas, lo que facilita la determinación de la significancia de cada variable con respecto al total de acuerdo a su varianza, además del peso estadístico descriptivo de cada una basándose en categorías jerarquizadas de mayor a menor con respecto a la varianza, estas jerarquías son llamadas “componentes principales”.

Este análisis se complementó con un análisis de correlación de Pearson y análisis de coeficientes de determinación con el objeto de encontrar las variables que poseen la mayor varianza acumulada y que, por lo tanto, expliquen de manera general la distribución de la variabilidad del hongo bajo estudio. De esta forma se encontró la cantidad mínima indispensable de caracteres capaces de describir y caracterizar a *C. gloeosporioides*

También se llevó a cabo un análisis de correspondencia para comprobar la independencia de filas y columnas de la matriz de datos y conocer cuántos de los monoconidiales representan la diversidad de los 21 en estudio, además de encontrar las variables que describen una cepa típica de *C. gloeosporioides*; esto se considera como un primer paso para conocer la diversidad del género *Colletotrichum* en el estado de Michoacán. Este análisis se hizo con el paquete NTSYS.

Análisis de patogenicidad

El análisis de este experimento se basó en la construcción de una gráfica de barras de la cantidad total de pulpa de frutos de aguacate invadida en el periodo de 8 días y su comparación con las gráficas de crecimiento en medio de cultivo PDA.

Velocidad de crecimiento

Su determinación consistió en la construcción de gráficos con los datos provenientes de las mediciones diarias del diámetro de las colonias. Se hicieron gráficas de la cantidad de

crecimiento diario, crecimiento diario acumulado, crecimiento final y área acumulada. De cada una de ellas se determinó la ecuación que describe mejor el crecimiento de cada monoconidial mediante análisis de regresión. Estas ecuaciones son características para cada cepa.

Análisis de Isoenzimas

De la matriz original de datos se seleccionaron las columnas correspondientes a las bandas de isoenzimas las cuales permitieron aplicar diferentes tipos de análisis estadísticos. Se calculó el Índice de Variabilidad Genética, análisis de varianza, porcentaje de loci polimórficos, promedio de alelos por locus, número total de loci resueltos y número total de alelos encontrados. También se buscaron bandas que pudieran ser útiles en estudios de flujo genético entre cepas de *C. gloeosporioides*; como bandas útiles para este tipo de estudios se consideraron aquellas que fueran únicas o de frecuencia muy baja, de buena definición y reproducibles. Una de las características que hacen útiles a las isoenzimas es que son marcadores codominantes, por lo que su seguimiento a través de sucesivas generaciones es fácil y rápido.

Con las isoenzimas también se hicieron análisis de coeficientes de determinación para seleccionar variables en la misma forma que para los caracteres morfológicos, se calculó también una matriz de correlación de Pearson, análisis de correspondencia, distancias genéticas y de agrupamiento.

Análisis de RAPD

Con las bandas generadas por las amplificaciones de ADN se hicieron los siguientes análisis: análisis de varianza por locus para encontrar bandas correlacionadas con la patogenicidad, Índice de Variabilidad Genética, porcentaje de bandas polimórficas, determinación de bandas útiles para estudios de flujo genético, análisis de coeficientes de determinación y selección de variables, análisis de correlación, de correspondencia, distancias genéticas y de agrupamiento.

Con el objeto de saber qué iniciador describe mejor el agrupamiento de todos los monoconidiales se hizo un análisis de distancias genética y agrupamiento por cada uno, además del análisis con todos ellos.

RESULTADOS

Descripción morfológica de los monoconidiales

Las características típicas morfológicas de *C. gloeosporioides* se muestran en la figura 2.

Monoconidial 45

Cepa de micelio gris claro de consistencia algodonosa y crecimiento al azar (en todas direcciones). Colonia vista por el reverso de la caja de color blanco, con el centro (lugar donde se colocó el inóculo inicial) de color gris muy oscuro. El borde de crecimiento es circular con hifas de tamaño corto que crecen en forma radial; por lo tanto el crecimiento de esta cepa se da en dos etapas: en la primera el crecimiento es de tipo radial y en una segunda etapa el crecimiento es en todas direcciones (al azar) para colonizar completamente el espacio ocupado en la primera etapa. Esta es una de las cepas que presentan mayor velocidad de crecimiento (tipo III en una escala de 3 categorías); también muestra una amplia capacidad de invasión de pulpa (tipo IV en una escala de 4 categorías).

Monoconidial 46

Cepa con micelio blanco de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. El color de la colonia al reverso es blanca, presenta manchas radiales al madurar y centro blanco. El borde de la colonia es circular con hifas largas que crecen al azar. Es una de las cepas que presentan menor velocidad de crecimiento en medio de cultivo (tipo I), sin embargo presentó capacidad de invasión de pulpa intermedia baja (tipo II).

Monoconidial 47

Cepa con micelio gris claro de consistencia algodonosa y crecimiento al azar pero con color de la colonia al reverso blanco igual que el centro y con manchas radiales al envejecer. El borde de la colonia es circular con hifas cortas de crecimiento al azar. Presenta alta velocidad de crecimiento (tipo III), pero capacidad intermedia baja (tipo II) de invasión de pulpa.

Monoconidiales 48 y 48A

Cepa con micelio blanco de consistencia lanosa y crecimiento en espiral. Colonia blanca al reverso, de forma circular y con centro gris verdoso claro. Las hifas del borde son cortas y crecen en dirección inclinada correspondiendo al crecimiento espiral del micelio. Su velocidad de crecimiento fue alta (tipo III) y su capacidad de invasión de pulpa intermedia alta (tipo III).

Monoconidial 49

Micelio gris claro de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. Colonia blanco grisáceo al reverso de forma irregular con anillos concéntricos y de centro gris muy oscuro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Tuvo alta velocidad de crecimiento (Tipo III) y capacidad de invasión de pulpa intermedia alta (tipo III).

Monoconidial 50

Micelio blanco de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso con manchas radiales al envejecer y centro verdoso oscuro. El borde de la colonia es irregular con hifas cortas que crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es intermedia (tipo II) y posee baja capacidad de invasión de pulpa (tipo I).

Monoconidial 51

Micelio blanco de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. Colonia blanca de forma irregular con anillos concéntricos y centro gris muy oscuro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es intermedia (tipo II) y baja capacidad de invasión de pulpa (tipo I).

Monoconidial M51

Micelio blanco de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. Colonia blanca de forma irregular con anillos concéntricos y centro gris muy oscuro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es intermedia (tipo II) y su capacidad de invasión de pulpa es muy baja (tipo I).

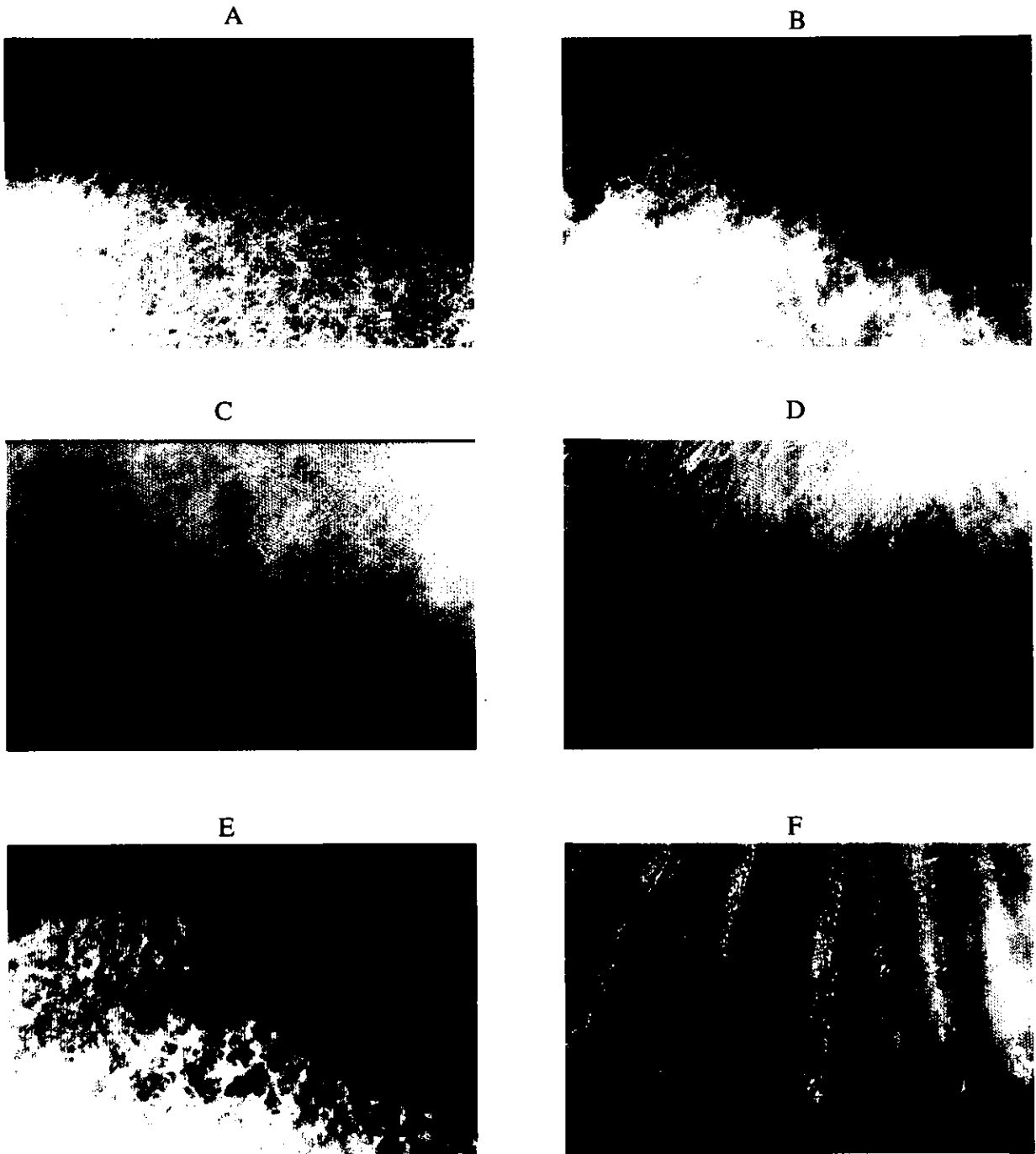


Figura 2. Características típicas de los monoconidiales de *C. gloeosporioides*. Se observa la consistencia de micelio algodonoso (A), granuloso (E) y adsorbido al medio (D). La presencia de estrías de crecimiento (F). Hifas cortas del borde de crecimiento (C) y largas (B). Color de colonia blanco (A, B, C, D) y amarillo cremoso (E, F).

Monoconidial 52

Micelio blanco de consistencia algodonosa y de crecimiento radial. Colonia blanca al reverso de forma irregular con manchas radiales que aparecen al envejecer y centro gris muy oscuro, presenta además estrías por crecimiento acumulado de micelio. Las hifas del borde son cortas y crecen de forma radial. Su velocidad de crecimiento es alta (tipo III) al igual que su capacidad de invasión de pulpa (tipo IV).

Monoconidial 53D

Micelio blanco de consistencia granulosa y crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma irregular con centro verdoso oscuro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Presenta velocidad de crecimiento baja (tipo I) al igual que la capacidad de invasión de pulpa (tipo I).

Monoconidial 53E

Micelio blanco de consistencia algodonosa que crece al azar. Colonia blanca al reverso de forma irregular con centro gris muy oscuro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Presenta una baja velocidad de crecimiento (tipo I) y capacidad de invasión de pulpa media baja (tipo II).

Monoconidial 54

Micelio blanco de consistencia algodonosa que crece al azar. Colonia de color blanco-amarilla al reverso, de forma irregular con manchas radiales al envejecer y centro gris verdoso claro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Presenta una baja velocidad de crecimiento (tipo I) pero capacidad de invasión de pulpa media alta (tipo III).

Monoconidial 55

Micelio blanco de consistencia algodonosa muy fina de crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma irregular con centro blanco. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. La velocidad de crecimiento es intermedia (tipo II) y su capacidad de invasión de pulpa media baja (tipo II).

Monoconidial 56

Micelio de color blanco cremoso que crece al azar y adsorbido a la superficie del medio de la caja de cultivo. Colonia de color blanco cremoso al reverso de forma irregular con centro blanco. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Presenta velocidad de crecimiento intermedia (tipo II) y baja capacidad de invasión de pulpa (tipo I).

Monoconidial 57

Micelio blanco amarillo de consistencia algodonosa que crece de manera radial. Colonia de color blanco-naranja al reverso de forma circular con anillos concéntricos y centro de color naranja. Las hifas del borde son cortas y crecen de manera radial, lo cual le da una apariencia estriada al borde de crecimiento. Presenta velocidad de crecimiento intermedia (tipo II) pero capacidad de invasión de pulpa media alta (tipo III).

Monoconidial 58

Micelio blanco de consistencia granulosa de crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma circular con centro gris verdoso claro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Presenta velocidad de crecimiento intermedia (tipo II) pero alta capacidad de invasión de pulpa (tipo IV).

Monoconidial 59

Micelio blanco de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma irregular con anillos concéntricos y centro amarillo naranja. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es intermedia (tipo II) y su capacidad de invasión de pulpa es media alta (tipo III).

Monoconidial 60

Micelio blanco de consistencia granulosa y crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma irregular con centro blanco. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es baja (tipo I) al igual que su capacidad de invasión de pulpa (tipo I).

Monoconidial 61

Micelio blanco de consistencia algodonosa muy fina y crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma irregular con centro de color verdoso oscuro. Las hifas del borde son cortas y crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es alta (tipo III) pero su capacidad de invasión de pulpa es baja (tipo I).

Monoconidial 62

Micelio gris claro de consistencia algodonosa y crecimiento al azar. Colonia blanca al reverso de forma circular con anillos concéntricos. El borde de crecimiento es circular con hifas cortas que crecen al azar. Su velocidad de crecimiento es alta (tipo III), pero su capacidad de invasión de pulpa es media baja (tipo II).

Caracterización morfológica

Los 21 hongos estudiados presentaron características morfológicas diferentes, no hubo un conjunto de características igual en dos monoconidiales. La diversidad morfológica es alta, lo cual se refleja en el valor del IVG (Cuadro 4 de la página 43).

Análisis de Correlación

De la matriz original se seleccionaron las columnas correspondientes a las características morfológicas, patogénicas y de velocidad de crecimiento (ver Anexo A, Cuadro 1); con ellas se hizo el análisis de correlación de Pearson entre todos los caracteres. De aquí se encontraron diferentes variables altamente correlacionadas (con valores de r^2 de 0.79 a 1.0).

Los resultados de este análisis muestran que siempre que una cepa presenta color de micelio blanco cremoso, éste crece adsorbido a la superficie del medio de cultivo y el color de la colonia vista por el reverso de la caja es de color blanco cremoso; sin embargo estas características fueron únicas para el monoconidial 56 de la localidad de San Juan Nuevo y que produce síntomas de antracnosis-cuartheaduras. De igual forma, siempre que el color de micelio de la cepa es blanco-amarillo el color de la colonia vista por el reverso es de color blanco-naranja y el centro de la colonia (lugar donde se colocó el inóculo) es de color naranja; estas características fueron propias del monoconidial 57 que procede de la localidad de Tacámbaro y

produce el síntoma de viruela. Igualmente, cuando el micelio tiene consistencia lanosa crece en forma espiral y las hifas del borde crecen de manera inclinada coincidiendo con los brazos de las espirales del micelio; estas características fueron típicas de las cepas 48 y 48A que proceden de la localidad de Uruapan y producen manchas superficiales. Cuando el crecimiento del micelio fue al azar, casi siempre las hifas del borde de crecimiento también crecieron al azar (la única excepción fue el monoconidial 45 donde las hifas del borde crecieron de forma radial). Cuando las hifas del micelio crecieron en forma radial se presentaron estrías en el borde de crecimiento y las hifas del borde crecieron de forma radial con la única excepción del monoconidial 45 el cual presentó hifas del borde con crecimiento radial pero micelio con crecimiento al azar.

En contra de lo que pudiera esperarse la velocidad de crecimiento en medio de cultivo no se correlacionó con la patogenicidad medida como invasión de pulpa en gramos. Se esperaría que existiera una relación directa entre crecimiento y patogenicidad, sin embargo en pocos casos se presentó esta relación. Este punto se discute en el apartado de patogenicidad.

Componentes principales

De las variables altamente correlacionadas entre sí se dejó sólo una de ellas y las demás se eliminaron, se dejaron también todas las variables que no mostraron correlación con alguna otra y se procedió a realizar un análisis de componentes principales (ACP) para encontrar la distribución de la variabilidad morfológica observada entre las variables definidas por las categorías de cada componente.

Para que este ACP fuera lo más completo posible se incluyeron los datos codificados para la velocidad de crecimiento y patogenicidad, de esta forma estos caracteres tuvieron la misma probabilidad de ser elegidos en los análisis de selección de variables que los caracteres morfológicos.

Los valores característicos (eigenvalues) de la matriz de covarianza tuvieron valores descendentes casi de manera proporcional (ver Anexo A, Cuadro 2) ya que el componente principal 1 (CP1) explicó la variabilidad observada en un 18.45%, el CP2 explicó el 14.5%, el CP3 explicó el 12%, el CP4 explicó el 9.6%, el CP5 y el CP6 explicaron aproximadamente un 7.8% cada uno.

Los primeros ocho componentes principales presentaron una proporción acumulada del 81.5%. Este número de CP es alto pues en otras especies sólo se requieren 4 ó 5 (Hair *et al.* 1995, Hamrick y Godt 1990); esta característica es un primer indicador de que la variabilidad del hongo es amplia y que dado que la varianza se distribuye en varios componentes no se puede reducir a pocos de ellos y a las variables que estos definan, esto significa que no hay grupos definidos de caracteres morfológicos para cada componente.

Los vectores característicos (eigenvectors) (ver Anexo, Cuadro 3) mostraron que para el CP1 las variables que explican mayormente su proporción de variabilidad morfológica medida son: presencia de color de micelio blanco que representa un -22.6% de este componente, crecimiento al azar (-29.8%), forma del borde de crecimiento de la colonia (-32.2%), disposición radial de las hifas del borde de crecimiento (22.2%), disposición al azar de las hifas del borde de crecimiento (-36.6%), velocidad de crecimiento tipo III (32.8%) y capacidad de invasión de pulpa tipo I (-26%). Aunque los valores pueden ser negativos para la selección de esos caracteres se considera su valor absoluto.

Para el CP2 las variables de mayor poder explicativo fueron: presencia de anillos concéntricos (32.3%), consistencia lanosa del micelio (-25.0%), consistencia algodonosa del micelio (43.7%), centro de la colonia gris muy oscuro (29.5%), centro de la colonia gris verdoso claro (-36%), crecimiento del micelio en espiral (-24.9%), y dirección inclinada de las hifas del borde de crecimiento (-25%).

Para el CP3 las variables más importantes fueron: color de micelio gris claro (-33.3%), consistencia algodonosa muy fina del micelio (-24.2%), velocidad de crecimiento tipo III (-36.9%), invasión de pulpa tipo II (-27.7%) e invasión de pulpa tipo III (32.6%).

Para el CP4 únicamente la presencia de manchas radiales (33%) e invasión de pulpa tipo IV (24.5%) tuvieron valores altos de explicación de la proporción de la variabilidad total definida por este componente.

Coefficientes de determinación

A partir de la matriz de los vectores característicos se calcularon coeficientes de correlación entre las variables y los CP (ver Anexo A, Cuadro 3), posteriormente se calcularon

los coeficientes de determinación y a partir de estos la varianza acumulada de cada variable a través de todos los CP entendiendo que cada caracter tiene un vector característico. Se consideró empíricamente, de acuerdo a los resultados obtenidos, que las variables con varianza acumulada de valor mayor o igual a 2.0 fueron los que representaban el conjunto mínimo de características que describen adecuadamente las cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las variables seleccionadas fueron: presencia de anillos concéntricos (varianza acumulada igual a 0.2152), presencia de manchas radiales (0.2055), consistencia algodonosa del micelio (0.2870), centro gris muy oscuro (0.2057), forma del borde de crecimiento (0.2415), velocidad de crecimiento tipo II (0.3171), velocidad de crecimiento tipo III (0.2438), invasión de pulpa tipo I (0.2097) e invasión de pulpa tipo III (0.2793).

Para futuros estudios de variabilidad morfológica de *C. gloeosporioides* se recomienda incluir y prestar la mayor atención a estas nueve variables.

Análisis de correspondencia

Este análisis (Anexo A, Cuadro 5) se realizó para comprobar la completa independencia de filas y columnas de la matriz de datos. También sirvió para determinar cuántos de los monoconidiales representan la variabilidad de todas las cepas estudiadas. Los resultados mostraron que los primeros ocho monoconidiales acumulan el 80% de la variabilidad total, los primeros once acumulan el 91.77%. Esto significa que en estudios descriptivos de estos monoconidiales basta estudiar los primeros 8 a 11 de acuerdo al orden hasta aquí manejado, es decir desde el monoconidial 45 hasta el M51 ó 53E.

Adicionalmente este análisis confirmó estadísticamente, por medio del cálculo de la distancia al centroide, que las variables características (distancia menor o igual a 1.0) de este hongo fueron: micelio blanco de consistencia algodonosa, color de colonia blanca, crecimiento de micelio al azar e hifas del borde de crecimiento cortas que crecen al azar.

Por otra parte las variables más raras (aquellas con mayor distancia al centroide) fueron: micelio blanco cremoso, colonia blanco grisácea, colonia blanco cremosa, micelio adsorbido al medio de cultivo y centro de la colonia de color amarillo-naranja.

Análisis de Agrupamiento

Con la matriz de datos morfológicos, velocidad de crecimiento y patogenicidad se calcularon las distancias genéticas entre monoconidiales (Anexo A Cuadro 4), considerando que si se elimina el efecto ambiental mediante condiciones de cultivo controladas las diferencias observadas se deben a la constitución genética de cada monoconidial. Se observó que la distancia más pequeña (0.0) se encontró entre las cepas 48 y 48A las cuales fueron idénticas. La distancia más grande (0.487) se encontró entre 5 pares: 47/57, 52/56, 53D/57, 57/60 y 57/61. Estos resultados indican que el monoconidial 57, que participa en 4 parejas, es diferente de todos los demás, esta diferencia se debe principalmente a que presenta tres características únicas: color de micelio blanco-amarillo, color de colonia blanco-naranja y centro naranja.

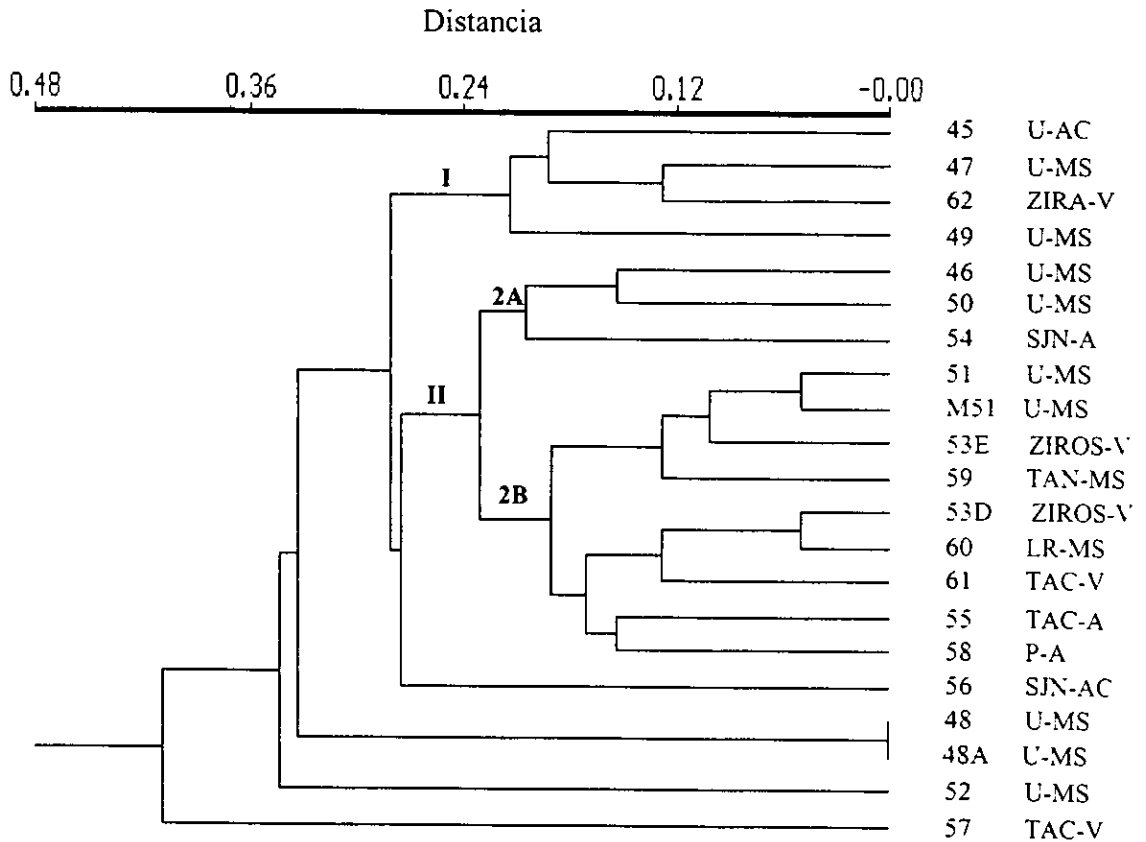


Figura 3. Dendrograma de caracteres morfológicos de *C. gloeosporioides*. A la derecha se observa el número de identificación del monoconidial, y abreviados, localidad y síntoma.

Con las distancias genéticas se procedió al análisis de agrupamiento que dio origen al dendograma que se muestra en la Figura 3, en la que se observa que el monoconidial (MC) 57 se separa completamente del resto a una distancia mayor de 0.36, el MC 52 le sigue a distancia de aproximadamente 0.36 y los MC 48 y 48A, idénticos entre ellos, a distancia un poco menor de 0.36. A distancia un poco mayor de 0.24 se forman los grandes grupos I y II, con el grupo I formado preponderantemente por monoconidiales de Uruapan. A distancia aproximada de 0.24 el grupo II se subdivide en los subgrupos 2A y 2B, en el 2A dos de los MC son de Uruapan y en el 2B se observan tres MC que producen viruela, cuatro que producen manchas superficiales y dos que producen antracnosis.

La distribución general del dendograma se da en base tanto de la localidad de colecta del monoconidial como a los síntomas que produce.

Caracterización patogénica y velocidad de crecimiento

La caracterización patogénica determinada como la capacidad de invasión de pulpa de aguacate Hass medida en gramos se representó por medio de una gráfica de barras y se comparó con la gráfica de diámetro total alcanzado por cada monoconidial en medio de cultivo (Figura 4).

En la Figura 4 también se observan las gráficas de barras de la cobertura final en milímetros de cada monoconidial y el peso en gramos de la pulpa invadida (patogenicidad) de cada uno de ellos. Se puede ver que no hay una correspondencia completa entre ambas características; por ejemplo, el MC 62 presenta una de las mayores coberturas finales pero baja patogenicidad. Únicamente los MC 45, 48 y 52 presentan comportamiento alto tanto en cobertura como en peso de la pulpa invadida, por su parte el MC 53D tiene valores bajos en ambas características. De lo anterior se desprende que la patogenicidad no tiene que ver con la velocidad de crecimiento en medio de cultivo, por lo menos no en todos los casos.

Las gráficas de crecimiento acumulado diario resultaron ser aproximadamente rectas por lo cual se hicieron análisis de regresión para encontrar las ecuaciones que mejor las describen donde la pendiente representa la velocidad de crecimiento (Figura 5). En la gráfica que contiene todos los monoconidiales se puede observar la formación de cuatro grupos por la forma de su curva de crecimiento: el grupo I contiene a los monoconidiales con mayor pendiente (12.2 a 14) los cuales son 48, 45, 48A y 62; el grupo II está formado por monoconidiales de pendiente media alta (10.6 a 12.1) que son 47, 52, 49 y 61; el grupo III de pendiente media baja (8.4 a 9.4) agrupa a la mayoría de los monoconidiales que fueron 50, 51, 55, 58, 46, 57, M51 y 56; por último el grupo IV de pendiente baja (4 a 4.6) quedó formado por los monoconidiales 54, 59, 60, 53E y 53D.

Las gráficas de crecimiento medido como área acumulada diaria dieron como resultado curvas exponenciales en las cuales también se hicieron análisis de regresión para encontrar las ecuaciones características que describen el comportamiento de cada monoconidial (Figura 6). En la gráfica donde se concentran todos los monoconidiales (Figura 7) se observa la formación de los cuatro grupos descritos antes con mayor definición.

En la Figura 8 se observa el crecimiento diario no acumulado en milímetros; aquí se observa que la mayoría de los monoconidiales presentaron una reducción en su crecimiento al cuarto día, lo cual concide con el inicio de la producción en masa de conidios, probablemente el crecimiento se inhibe en favor de la producción de conidios los cuales al germinar diseminarán al hongo.

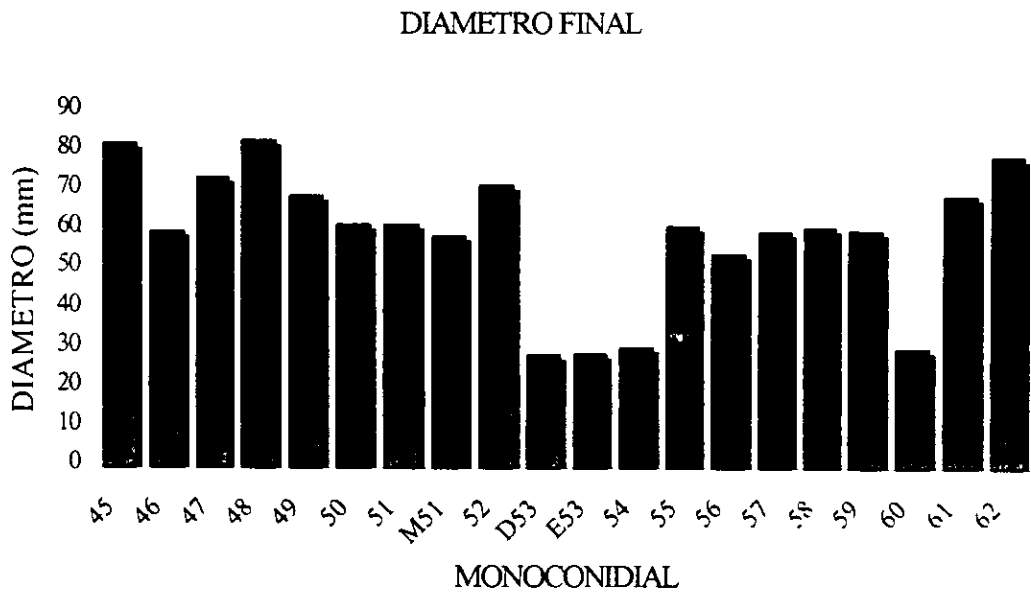
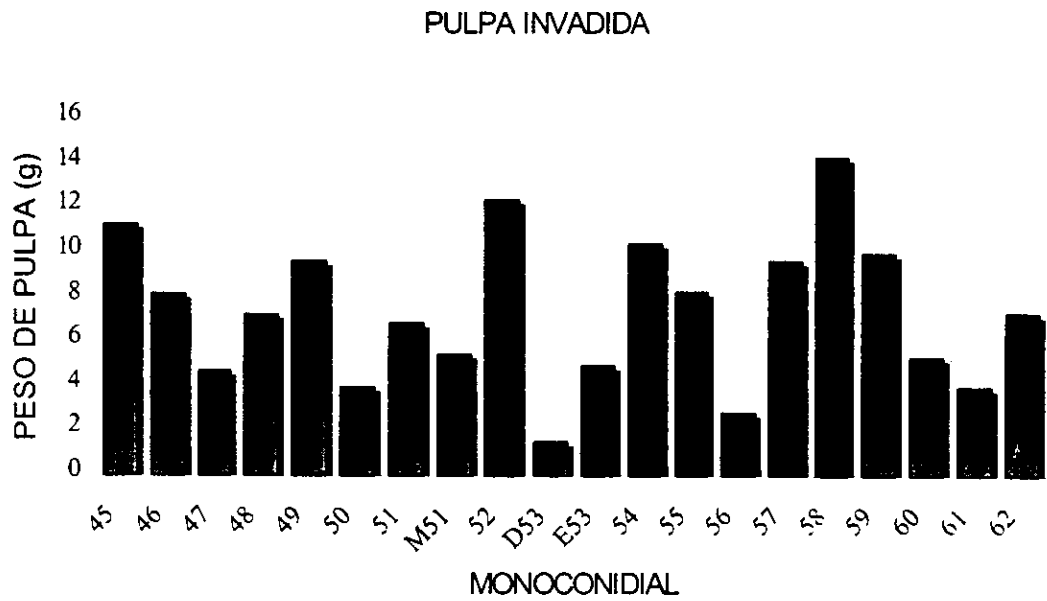
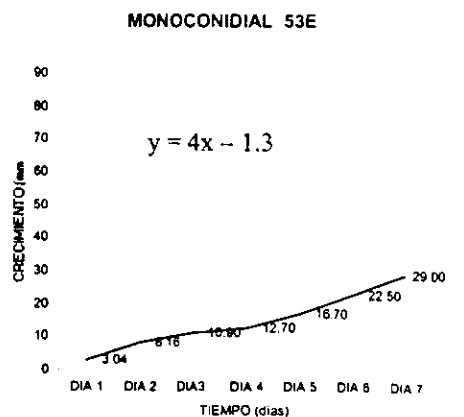
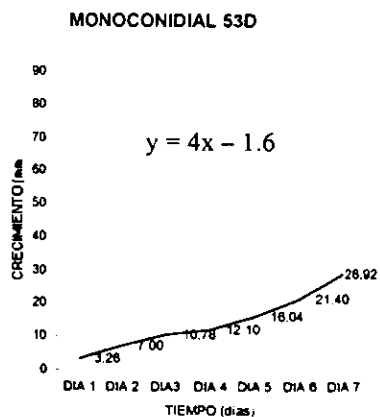
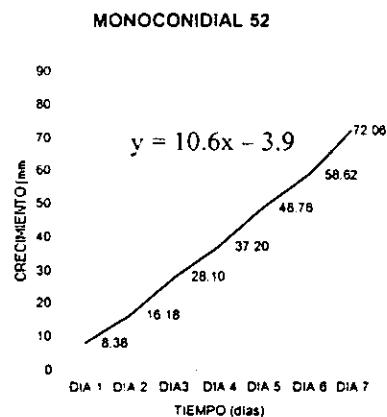
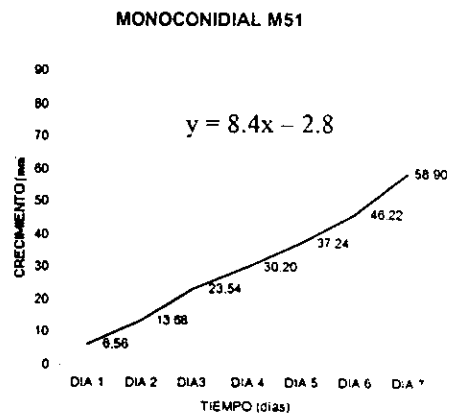
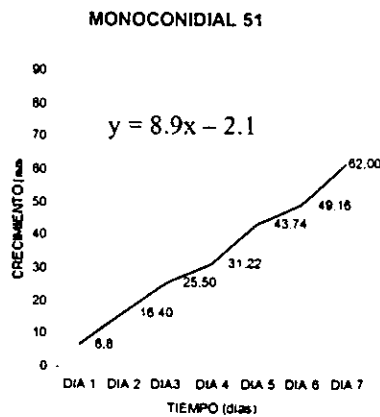
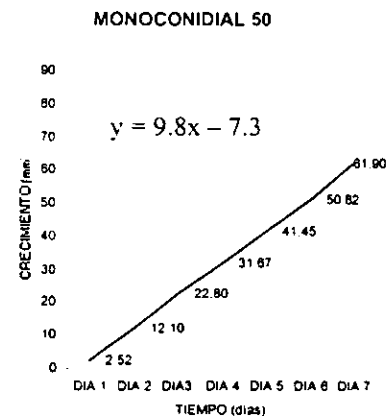
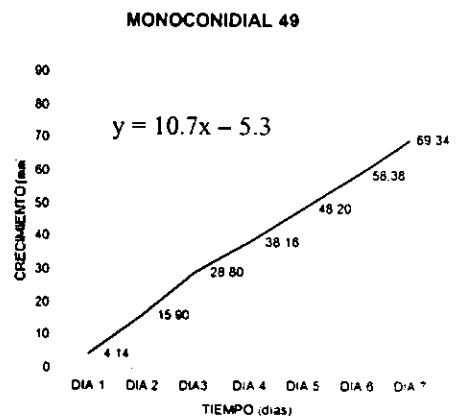
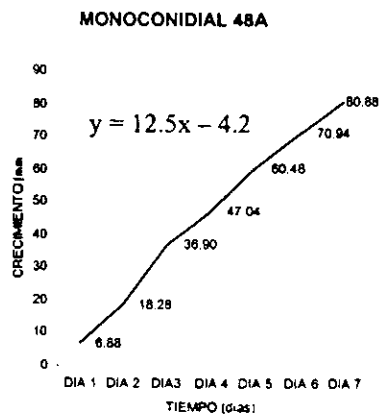
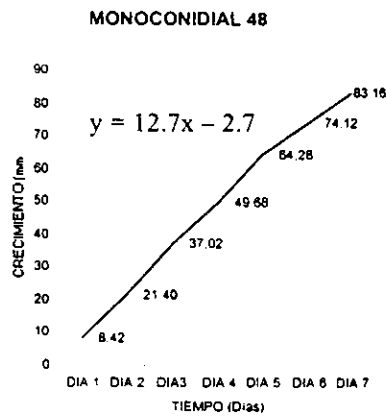
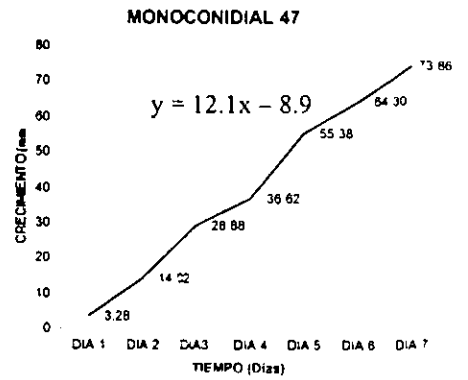
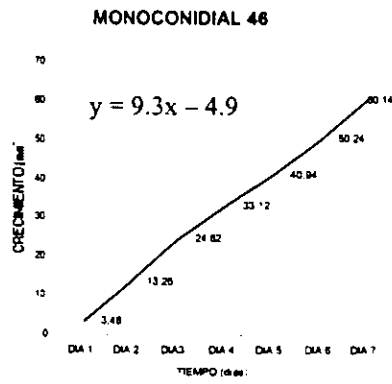
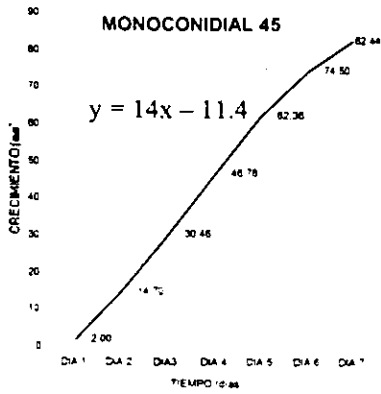


Figura 4. Gráficas de barras que muestran el peso invadido final de pulpa a los ocho días y el diámetro final de crecimiento a los siete días.



continúa...

...continuación

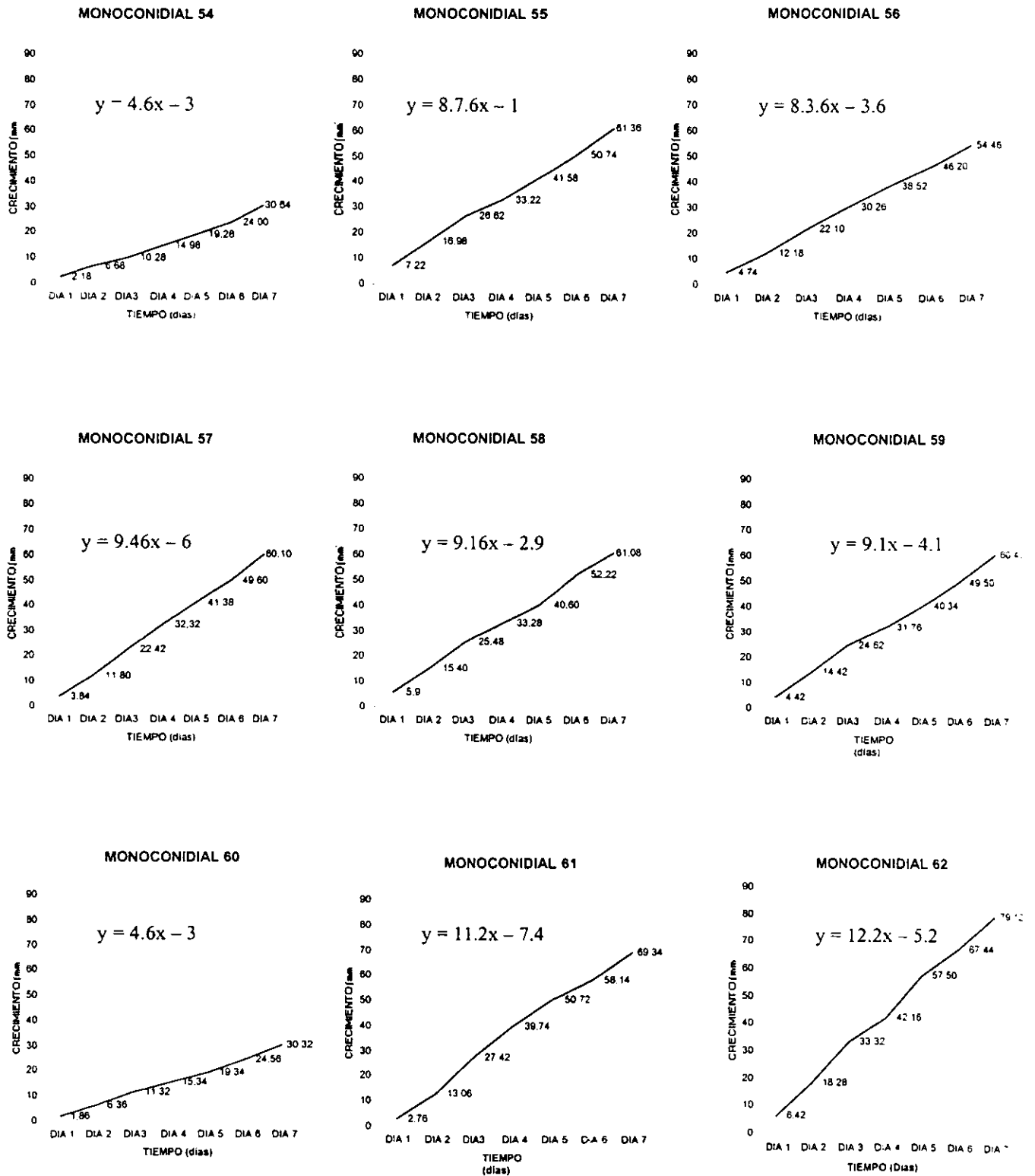
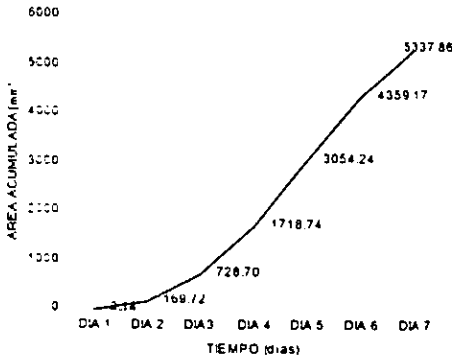
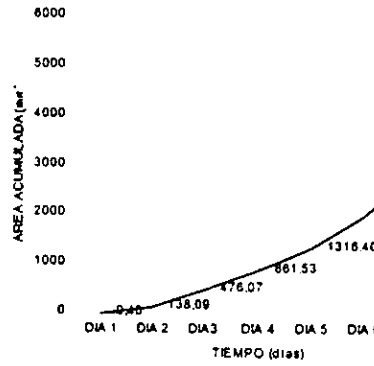


Figura 5. Gráficas de crecimiento acumulado diario de *C. gloeosporioides*.

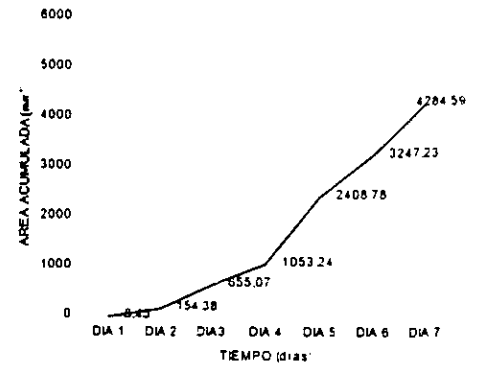
MONOCONIDIAL 45



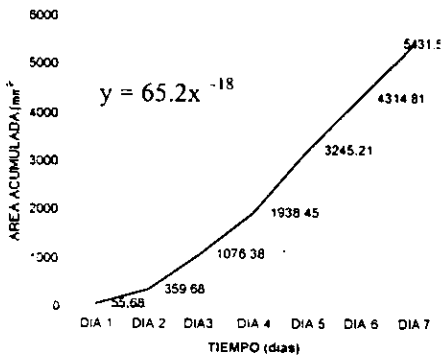
MONOCONIDIAL 46



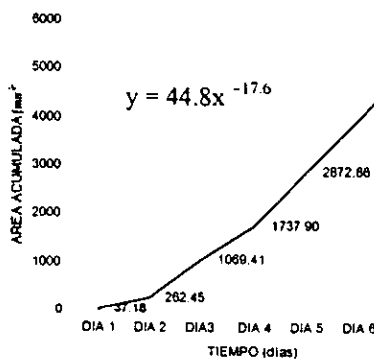
MONOCONIDIAL 47



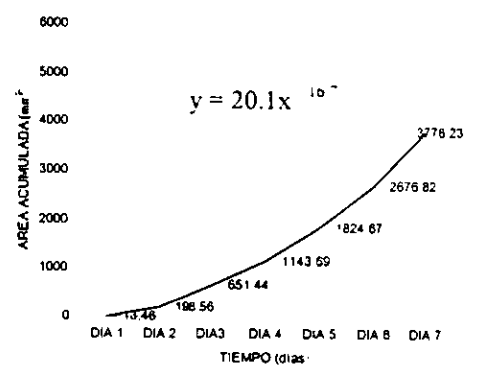
MONOCONIDIAL 48



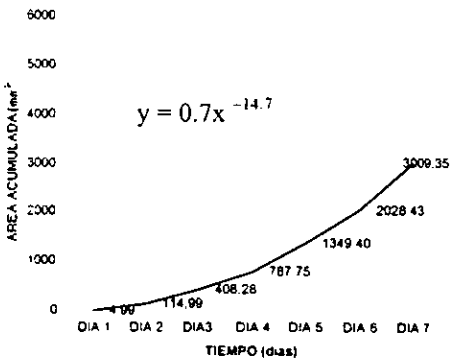
MONOCONIDIAL 48A



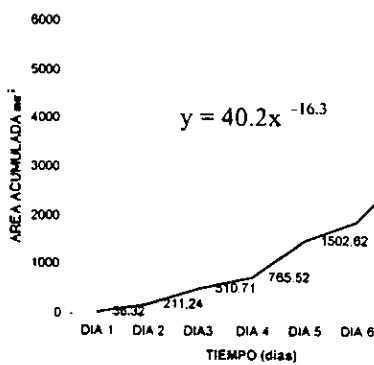
MONOCONIDIAL 49



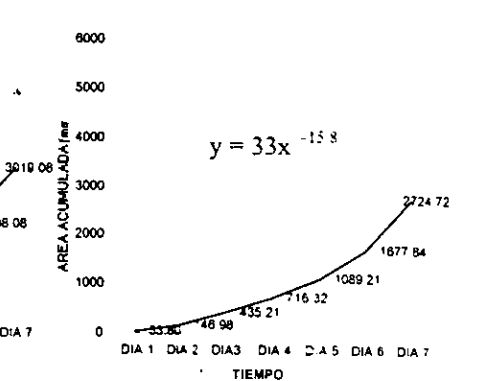
MONOCONIDIAL 50



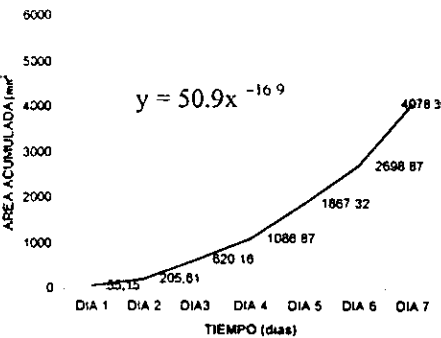
MONOCONIDIAL 51



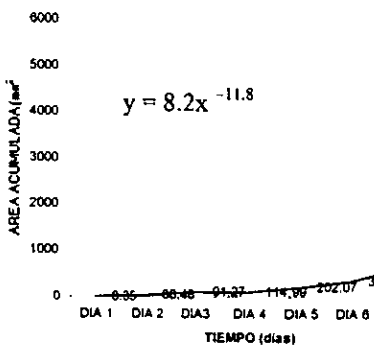
MONOCONIDIAL M51



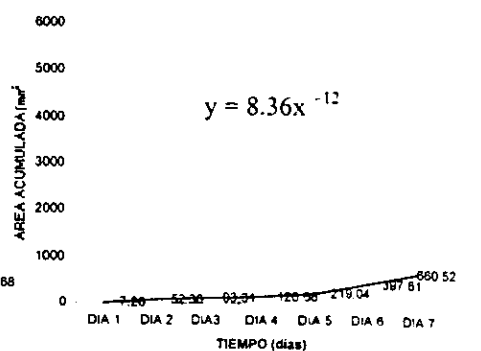
MONOCONIDIAL 52



MONOCONIDIAL 53D



MONOCONIDIAL 53E



...continuación...

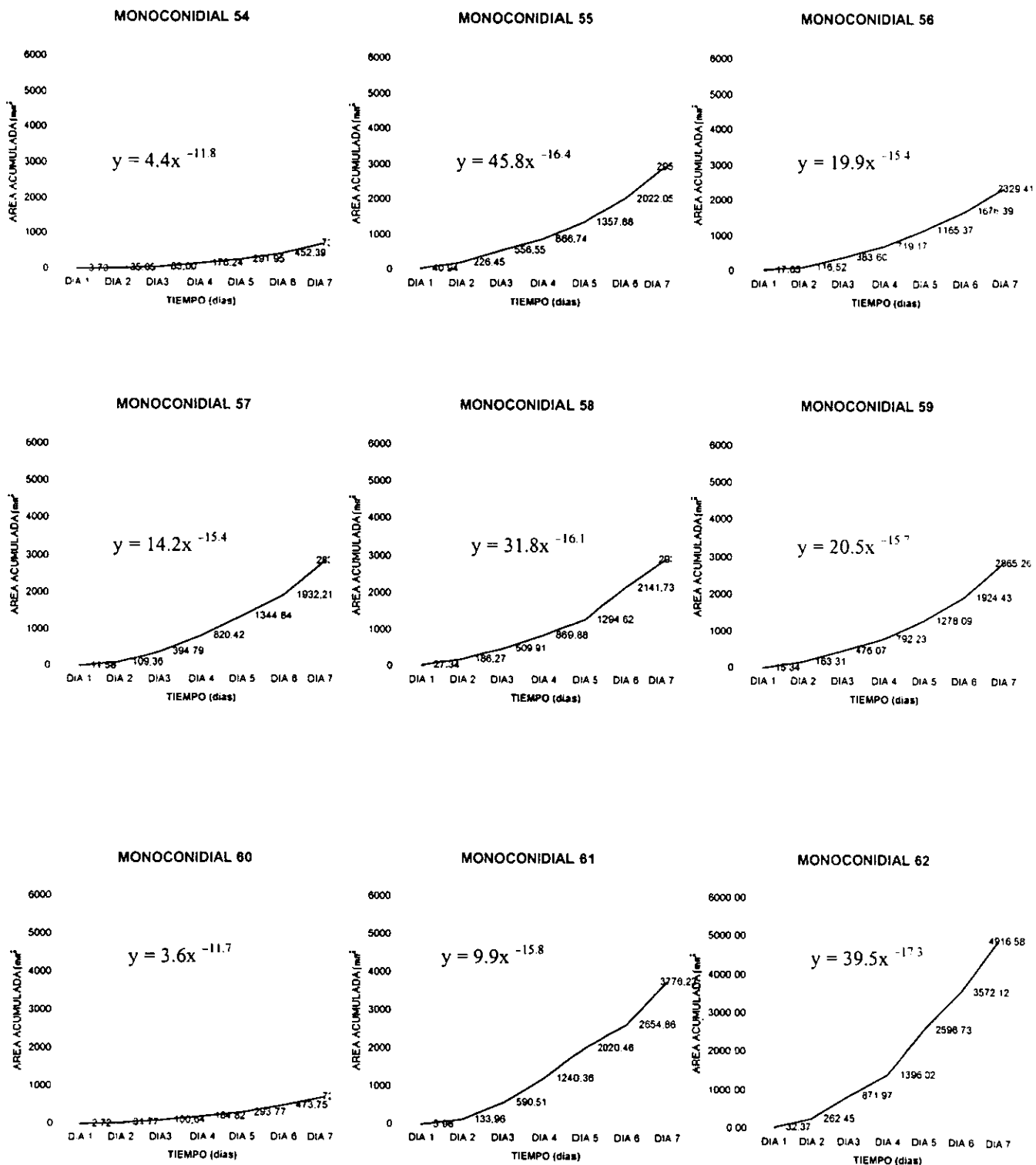


Figura 6. Crecimiento en área acumulada diaria de *C. gloeosporioides*.

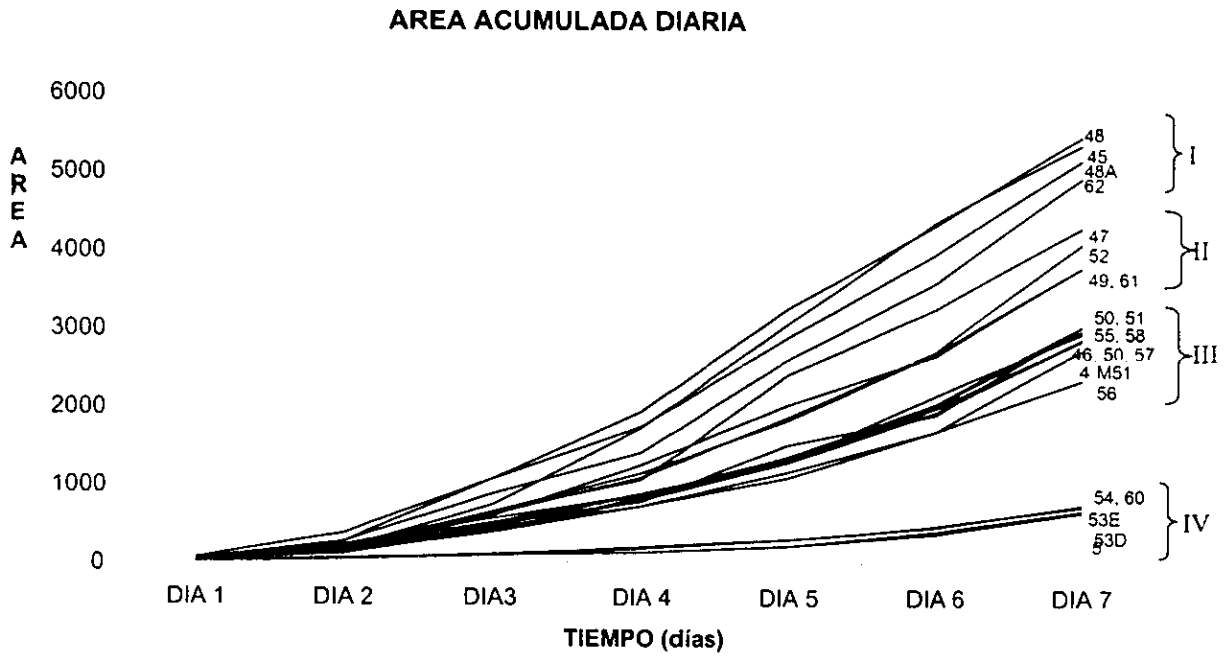


Figura 7. Area acumulada diaria en milímetros cuadrados de *C.*

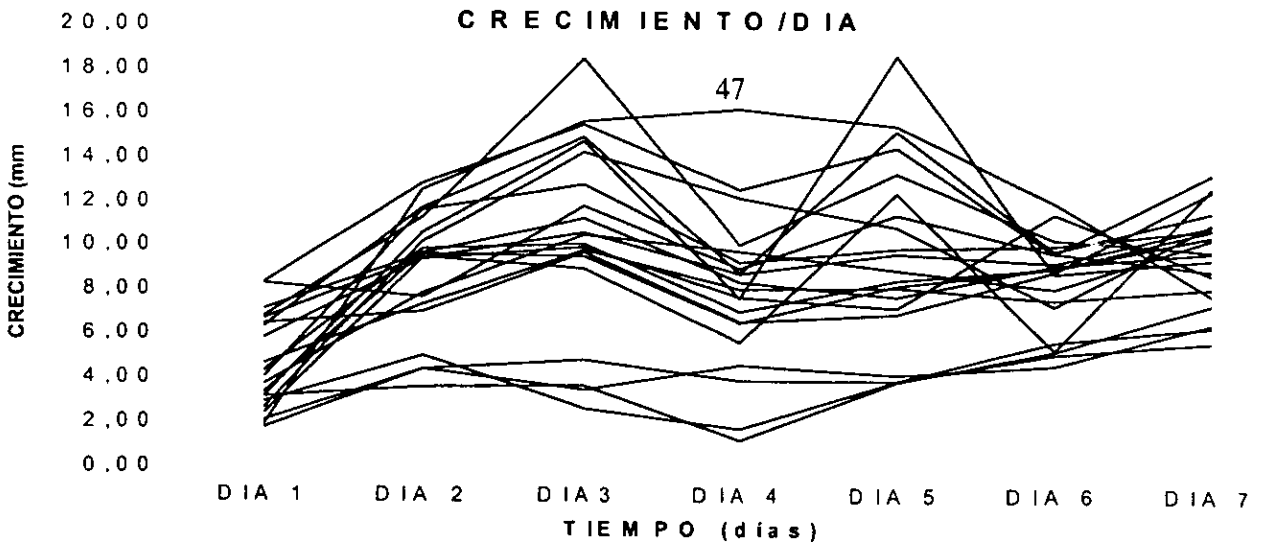


Figura 8. Crecimiento diario no acumulado de *C. gloeosporioides*. Se observa que el monoconidial 47 presenta un patrón diferente.

Índice de Variabilidad Genética

Con los datos morfológicos de patogenicidad y velocidad de crecimiento se calculó el Índice de Variabilidad Genética para obtener un valor que describa la variación genética de *C. gloeosporioides* de Michoacán. Este valor (0.2153) se compara con los obtenidos en los otros tipos de caracterización en el Cuadro 4. El IVG es un índice que proporciona valores absolutos adimensionales que estiman la variabilidad genética, de acuerdo a cada tipo de datos, con base a la distribución entre todos los monoconidiales de cada uno de los caracteres medidos, por lo tanto esta comparación es válida a pesar del origen diverso de los datos medidos.

El Cuadro 4 refleja que con los caracteres morfológicos se estima una magnitud menor de variabilidad genética que cuando se emplean isoenzimas o RAPD. Por otra parte, con estas dos técnicas se detecta una magnitud de variabilidad con valores muy cercanos, por lo que pueden ser los caracteres de elección para estudios futuros de variabilidad genética de *C. gloeosporioides*. Los otros estimadores son poco precisos y se estudian prácticamente sólo como referencia, como ejemplo se observa que el Porcentaje de Caracteres Polimórficos no presenta diferencias importantes entre los diferentes tipos de datos, en cambio el promedio de caracteres por locus posee diferencias demasiado grandes entre RAPD y los otros tipos de caracteres como para que resulte útil como estimador de variabilidad genética.

Cuadro 4. Estimadores de variabilidad genética por categorías de datos y total.

	IVG	No. Total de Caracteres ¹	Porcentaje de Caracteres Polimórficos	Promedio de Caracteres por Locus ²
Morfológicos	0.2153	39	61.5	2.9
Isoenzimas	0.350	44	68.2	2.6
RAPD	0.344	93	71.0	23.2
Total	0.3031	176	66.9	9.6

1 Para isoenzimas se refiere a alelos. Para RAPD se refiere a bandas.

2 Para RAPD en este análisis se considera cada iniciador como un locus.

Caracterización bioquímica

Mediante los análisis de electroforesis en gel de almidón se logró buena resolución en ocho sistemas enzimáticos cuyos zimogramas típicos se observan en la Figura 9. Se definieron 17 loci y 44 alelos (Figura 10); se consideró un locus como cada una de las zonas de actividad en el zimograma de cada enzima y un alelo como cada una de las bandas de actividad enzimática detectadas en cada locus. El promedio de alelos por locus fue de 2.6.

De las ocho enzimas detectadas cuatro fueron deshidrogenasas (Malato deshidrogenasa, Glutamato deshidrogenasa, Alcohol deshidrogenasa e Isocitrato deshidrogenasa) las cuales, de acuerdo a Morales (1996), se consideraban de difícil resolución para *C. gloeosporioides*.

La enzima Isocitrato deshidrogenasa presentó un patrón de dos bandas asociadas a cada alelo, las demás presentaron una banda por cada alelo. En el Cuadro 1 del Anexo B se muestran los alelos presentes por cada monoconidial.

Análisis de correlación

De la matriz original de datos se seleccionaron las columnas pertenecientes a las bandas definidas por las isoenzimas, con ellas se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson con el propósito de encontrar las bandas que tuvieran mayor correlación. Se consideraron como bandas altamente correlacionadas aquellas que presentaran valores mayores o iguales a 0.7.

Los resultados muestran que existe alta correlación entre las bandas Mdh1-1, Est1-3, Est3-2 y Cdh1-1. Mdh1-2 se correlaciona con Mdh2-2; Mdh3-1 se correlaciona positivamente con Cat2-2 y negativamente con Idh1-1; Adh2-2 tiene correlación completa con Idh2-2; Idh2-4 se correlaciona completamente con Acp1-2; Est3-3 se correlaciona negativamente con Est4-1 y positivamente con Acp2-3, finalmente, Acp2-1 se correlaciona con Acp2-2.

De las variables altamente correlacionadas entre sí se seleccionó sólo una de ellas y se eliminaron las demás para proceder a un análisis de componentes principales.

Componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) tuvo el objetivo de encontrar las variables más representativas de la variabilidad isoenzimática observada de acuerdo a cada componente.

Los valores característicos (eigenvalues) (ver Anexo B, Cuadro 2) tuvieron dos comportamientos: el valor característico de los dos primeros CP fue alto con proporción de 22.95% y 15.44% respectivamente, los siguientes seis tuvieron valores bajos (9.74%, 8.49%, 7.6%, 6.76%, 4.98% y 3.98%).

Los primeros ocho componentes principales presentaron una proporción acumulada de 79.8%. Dado que este número de componentes es alto se puede concluir, al igual que para el análisis de componentes principales de los datos morfológicos, que la varianza al interior de cada componente es pequeña y que más bien se distribuyen en varios de ellos, lo cual significa que hay muchas variables que son importantes en la descripción de la variabilidad de este hongo. Por lo tanto se puede afirmar que *C. gloeosporioides* presenta una gran diversidad de formas con respecto a las isoenzimas que posee.

Los vectores característicos (eigenvectors) (ver Anexo B, Cuadro 3) mostraron que para el CP1 las bandas más importantes por su porcentaje de variabilidad explicada fueron: Mdh1-1 con un valor de 0.2695, Mdh2-1 (-0.2451), Adh1-1 (-0.2758), Gdh1-1 (0.2031), Idh2-2 (0.3417), Est1-2 (0.2128), Est1-3 (0.2843), Est3-2 (0.2119), y Got1-2 (0.2128).

Para el CP2 las variables más importantes fueron: Mdh3-1 (-0.3966), Mdh3-2 (0.2490), Cat2-2 (-0.2458), Idh1-1 (0.2937), Est1-4 (-0.2082), Est4-1 (-0.2237), Acp2-1 (-0.3405) y Got1-2 (-0.2514).

Para el CP3 las variables más importantes fueron: Gdh1-2 (0.3809), Est1-1 (0.3627), Est2-2 (0.2618), Est3-3 (0.2164) y Got1-2 (0.2106).

Para el CP4 las bandas más importantes fueron: Mdh1-2 (-0.2030), Mdh2-2 (-0.2030), Cat1-1 (0.3017), Acp1-1 (-0.2048) y Acp1-4 (-0.2161).

Para el CP5 las variables más importantes fueron: Adh2-1 (0.2096), Idh2-4 (-0.2094), Est2-1 (0.2984) y Acp1-2 (-0.2094).

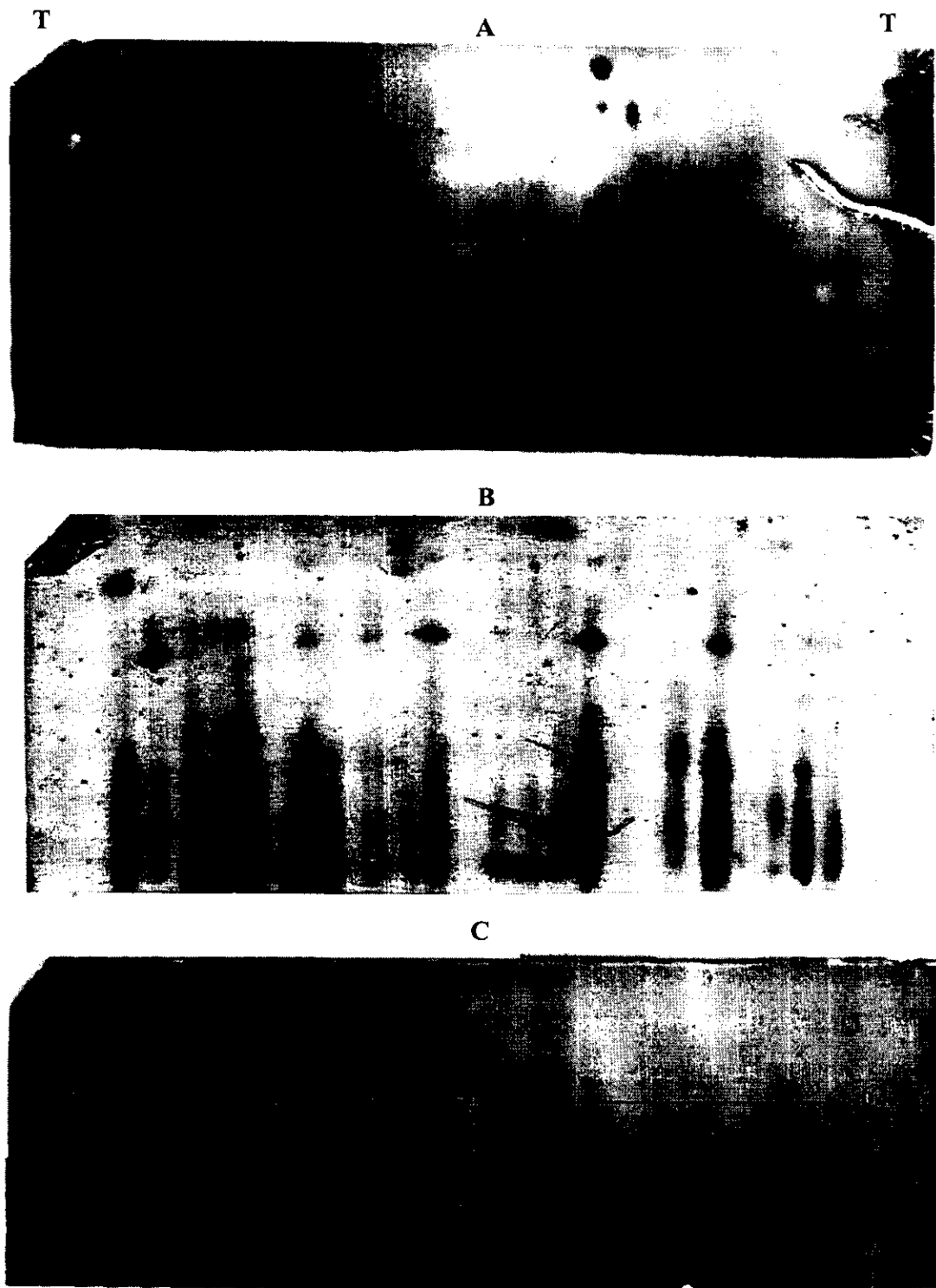


Figura 9. Zimogramas típicos de *Colletotrichum gloeosporioides*. a) Malato deshidrogenasa, b) Esterasa y c) Transaminasa glutámico oxaloacética. T = testigo, Mdh2-1 = alelo asociado a alta patogenicidad.

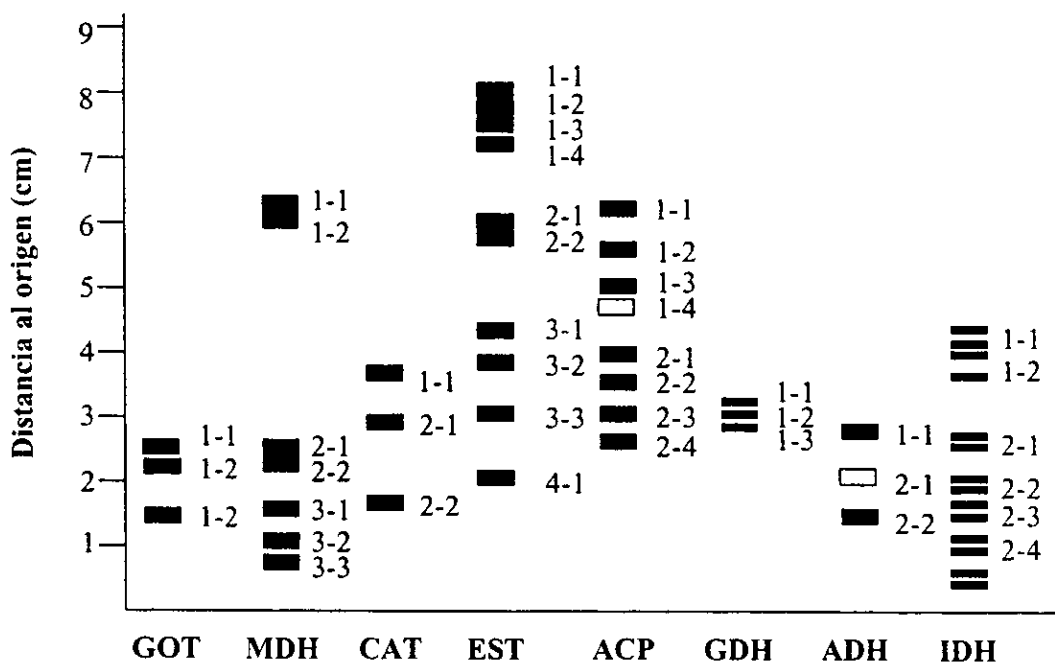


Figura 10. Perfil de alelos de isoenzimas presentes en los aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides*. Los marcados con blanco probablemente están relacionados con alta patogenicidad

Coefficientes de determinación

A partir de la matriz de los vectores característicos se hizo un análisis de coeficientes de determinación y varianza acumulada para encontrar el conjunto mínimo de bandas de isoenzimas que describen mejor la variabilidad la variabilidad isoenzimática total observada. Se consideró que las variables más importantes eran aquellas que poseían un valor acumulado de la varianza a través de todos los CP mayor o igual a 0.2 (ver Anexo B, Cuadro 3).

Las bandas seleccionadas fueron: Mdh2-1, Mdh3-2, Mdh3-3, Adh1-1, Adh2-1, Cat2-1, Idh1-1, Est1-4, Est4-1, Acp1-3 y Got1-1. Estas bandas son las recomendadas cuando se hagan estudios descriptivos de *C. gloeosporioides* de Michoacán.

Análisis de correspondencia

Con este análisis se confirmó la completa independencia entre filas y columnas de la matriz de datos (ver Anexo B, Cuadro 5). También se encontraron los valores más comunes de las variables de *C.*

gloeosporioides, los cuales describen un perfil isoenzimático típico del hongo bajo estudio, estas bandas fueron aquellas que presentan la distancia más corta al centroide: Mdh3-2, Idh1-1, Idh2-3, Est1-4, Est2-1, Est4-1 y Acp1-3. Por otra parte, las variables más raras (las que tienen mayor distancia con respecto al centroide) fueron: Idh1-2, Idh2-1, Est1-1, Acp1-1 y Acp2-1.

Los valores característicos acumulados mostraron que los primeros ocho monoconidiales representan el 78.98% de la variabilidad isoenzimática total, mientras que con los primeros 12 se explica el 91%. Es decir, que en estudios descriptivos bastaría estudiar estas cepas (desde la 45 hasta la 51 ó 53E) para representar la variabilidad de toda la colección.

Análisis de Agrupamiento

Con la matriz de datos de isoenzimas se llevó a cabo el análisis de distancias genéticas (ver Anexo B, Cuadro 4), el cual dio como resultado que la menor distancia se encontró entre los MC 48 y 48A, situación igual a la del análisis morfológico. La distancia más grande (0.0 de identidad) se encontró en cuatro pares diferentes: 48/56, 48A/56, 50/56 y 53D/56; es notorio que en las cuatro parejas uno de los integrantes es el monoconidial 56, lo cual indica que este es el que más se separa, lo que significa que su perfil isoenzimático es diferente a todos los demás. Esto contrasta con el análisis morfológico donde el MC 57 fue el que más se separó.

A partir de la matriz de distancias genéticas se procedió a la construcción de un dendograma mediante el análisis de agrupamiento. En la Figura 11 se observa que el MC 56 se separa completamente de los demás, los cuales forman dos grandes grupos, en el primero de ellos se observa una gran preponderancia de los MC de Uruapan y en el segundo se encuentran cuatro de los cinco MC que producen viruela formando parejas.

En general se puede decir que al igual que en los análisis morfológicos el agrupamiento se da con base en la localidad de colecta y a los síntomas producidos.

Índice de Variabilidad Genética (IVG)

Con los datos de isoenzimas se calcularon Índices de Variabilidad Genética por sistema enzimático (Cuadro 5) y promedio (Cuadro 4). Se encontró que el sistema que mayor variabilidad detecta es Alcohol deshidrogenasa (0.5634) a pesar de que sólo tiene 2 loci y 3 alelos debido a que estos son altamente variables. El sistema que menos variabilidad detecta es Glutamato deshidrogenasa (0.1543) que presenta tres alelos pero de baja frecuencia.

Cuadro 5. Índice de variabilidad genética por sistema enzimático e iniciador.

ENZIMA	IVG
Alcohol deshidrogenasa	0.5634
Catalasa	0.3535
Esterasa	0.2798
Fosfatasa ácida	0.2545
Glutamato deshidrogenasa	0.1543
Isocitrato deshidrogenasa	0.2357
Malato deshidrogenasa	0.4566
Transaminasa glutámico oxaloacética	0.5022

INICIADOR	IVG
OPB06	0.3358
OPQ09	0.2313
OPA09	0.4119
OPV06	0.1053

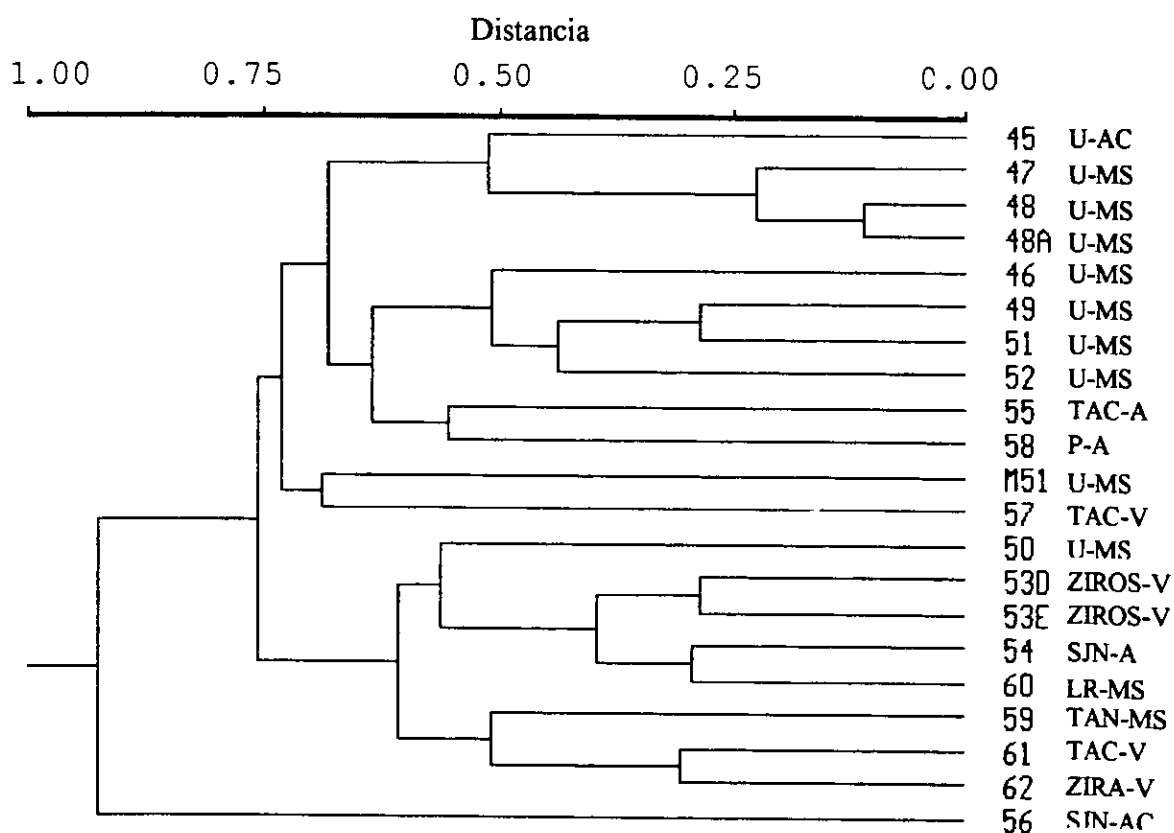


Figura 11. Dendrograma de caracteres isoenzimáticos de *C. gloeosporioides*. A la derecha se observan el número de identificación de cada monoconidial y, abreviados, la localidad y el síntoma que producen.

El Índice de Variabilidad Genética Promedio fue de 0.3500 (Cuadro 4) valor notoriamente más alto que el obtenido con los datos morfológicos. Esto significa que las isoenzimas son mejores descriptores de la variabilidad genética de *C. gloeosporioides*.

Adicionalmente se calcularon el porcentaje de loci polimórficos (PLP) y Número Promedio de Alelos por Locus (Cuadro 4). El PLP tuvo un valor alto (76.5%) lo cual proporciona una estimación de la amplia variabilidad genética exhibida por este hongo.

Marcadores para estudios de flujo genético

Los marcadores para estudios de flujo genético deben ser bandas de isoenzimas de fácil resolución e interpretación, que la posibilidad de confundirlas con otras sea muy baja y que puedan determinarse fácilmente los estados homocigoto y heterocigoto. Dado que las enzimas se comportan como marcadores codominantes se puede considerar como un buen marcador aquel alelo que presente baja frecuencia entre todos los monoconidiales o, de ser posible, que sea una banda única, esto permitiría hacer cruzamientos dirigidos o diseñar experimentos de intercambio de genes y poder analizar la presencia de esta banda en la progenie con alto grado de seguridad.

Se encontraron tres bandas únicas que pudieran funcionar como marcadores (Gdh1-3, Idh2-1 e Idh2-5), sin embargo estas enzimas requieren mucho cuidado para su resolución y si existe alguna leve diferencia entre corrimientos, por pequeña que sea, se pueden obtener diferencias de resolución, lo cual lleva a confusiones en la identificación de estos marcadores. Por lo tanto se recomienda un gran cuidado y una estandarización exhaustiva de las condiciones experimentales para lograr la reproducibilidad y la correcta identificación de dichas bandas.

Marcadores asociados a patogenicidad

Mediante análisis de varianza entre cada alelo y los datos de patogenicidad (pulpa invadida en gramos) fue posible determinar cuales alelos tienen efectos estadísticos significativos en este carácter, además se consideró el coeficiente de correlación (r^2) para determinar el tamaño del efecto de cada alelo.

Los alelos seleccionados fueron aquellos que tuvieron una F significativa y valor de r^2 alto y que además se presentaran en monoconidiales de patogenicidad alta o baja sin ningún tipo

de duda. Se esperaba que fuera más de un alelo involucrado en este carácter ya que la patogenicidad es una característica poligénica.

Los marcadores (Cuadro 6) que mostraron asociación con la patogenicidad fueron Mdh2-1, Adh2-1 y Acp1-4 presentes en cepas de alta patogenicidad.

Los resultados indican que podría existir un efecto aditivo entre estos marcadores pues el MC 46 presenta solamente el alelo Mdh2-1 y la pulpa invadida fue de 8.18 gramos, el MC 45 presenta los alelos Mdh2-1 y Acp1-4 y su pulpa invadida es de 11.31 gramos, el MC 58 fue el de mayor patogenicidad (14.33 gramos) y presenta los tres alelos.

Cuadro 6. Presencia por monoconidial de los loci RAPD y alelos de isoenzimas asociados con la patogenicidad medida como peso de pulpa de aguacate Hass en gramos.

	OPB06.2	OPB06.6	OPB06.11	OPQ09.12	OPA09.3	OPA09.7	Mdh2.1	Adh2-1	Acp1-4	Peso de Pulpa
45					A	A	A		A	11.31
46			A	A		A	A			8.18
47					A	A	A			4.71
48					A	A				7.24
49						A	A	A		9.65
50				A						4.00
51			A			A	A	A		6.88
M51					A			A		5.50
52			A	A	A	A	A	A		12.41
53D	B	B								1.55
53E	B	B								4.97
54				A						10.45
55			A		A	A	A			8.28
56										2.82
57					A		A	A		9.66
58			A	A	A	A	A	A		14.33
59										10.01
60	B	B								5.32
61										3.99
62										7.28

B = Bandas asociadas a baja patogenicidad.

A = Bandas asociadas a alta patogenicidad.

Caracterización por RAPD

Para este análisis se consideró cada banda definida por cada iniciador como un locus. Los cuatro iniciadores estudiados dieron por resultado la definición de 93 bandas, el iniciador OPBO6 tuvo 18 bandas, el OPQ09, 38; el OPA09, 25 y el OPV06, 12. Un ejemplo de los productos de amplificación de cada iniciador se ve en la Figura (12).

Análisis de correlación

De la matriz original de datos se seleccionaron las columnas correspondientes a las bandas definidas por cada uno de los cuatro iniciadores usados, con ellas se hizo un análisis de componentes principales y posteriormente un análisis de correlación. En este caso se procedió así para simplificar el análisis debido al gran número de bandas RAPD obtenidas (93).

Para el análisis de correlación se consideraron únicamente las bandas que tuvieron valores altos de r^2 con el fin de conocer las relaciones entre los posibles marcadores genéticos asociados a patogenicidad.

Los resultados mostraron correlación completa entre los loci OPQ09.1, OPQ09.2, OPQ09.3, OPQ09.4, OPQ09.8 y OPQ09.9. Lo anterior nos indica que estos fragmentos de ADN pudieran formar parte de un grupo de ligamiento, de ahí la correlación con valor de 1.0 entre todas ellas. Además de este grupo, el único par de bandas en los que hubo alta correlación (con valor de 0.8416) fue entre los loci 2 y 6, ambos definidos por el iniciador OPBO6.

Componentes principales

El análisis de componentes principales se hizo para encontrar los loci que más aportan a la variabilidad genética total de acuerdo a las categorías definidas por cada componente.

La matriz de valores característicos (eigenvalues) mostró una distribución escalonada de los componentes principales ya que el CP1 representa un 19.4% de la variabilidad total, el CP2 representa el 16.3%, el CP3 el 11.3%, el CP4 el 8.2%, y el CP5 el 6.7%.

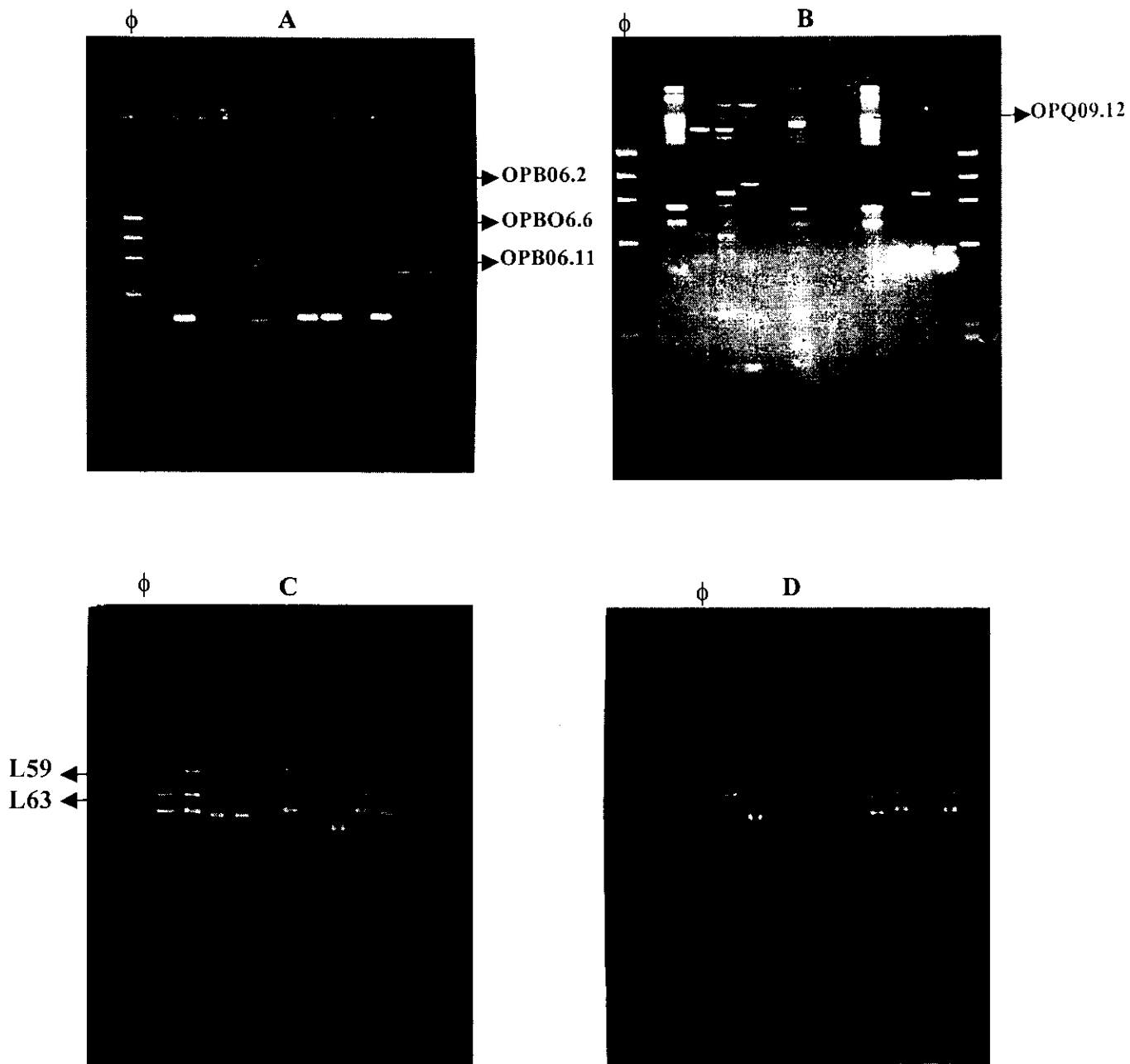


Figura 12. Productos de amplificación característicos *C. gloeosporioides*. A) Iniciador OPBO6, B) OPQ09, C) OPA09 y D) OPV06. La explicación de los loci señalados se da en la sección de marcadores RAPD asociados a patogenicidad (Página 57). El marcador de peso molecular es ϕ X174/HaeIII.

Con los primeros siete componentes principales se obtiene un 73.6% de la variabilidad total y con los primeros 11 un 8.9%. Esto, al igual que en los análisis anteriores demuestra la amplia variabilidad exhibida por *C. gloeosporioides*.

La matriz de vectores característicos mostró que para el CP1 los loci que más aportaron a la variabilidad explicada por ese componente fueron: locus OPQ09.1 (y los loci correlacionados con éste), el locus OPQ09.8 (correlacionado con el locus OPQ09.9), el locus OPBO6.13 y el locus OPQ09.10. Para el CP2 los loci más importantes fueron: el OPBO6.12, OPQ09.5, OPQ09.16, OPQ09.23, OPQ09.26, y OPQ09.34. Para el CP3 los loci más importantes fueron: OPBO6.1, OPBO6.3, OPBO6.4, OPBO6.8, OPBO6.16 y OPBO6.17. Para el CP4 fueron: OPQ09.18, OPQ09.19, OPQ09.30 y OPQ09.40. Para el CP5 fueron: OPBO6.10, OPQ09.14, OPQ09.25, OPQ09.28 y OPQ09.29. Todos los loci indicados tuvieron un valor absoluto mayor o igual a 0.20.

Coefficientes de determinación

El análisis de coeficientes de determinación y varianza acumulada se hizo con el objeto de encontrar el conjunto mínimo de loci que mejor describe la variabilidad total observada, es decir, aquellos loci que tengan el valor más alto de varianza acumulada a través de todos los componentes principales. Se consideraron las variables con varianza acumulada mayor o igual a 0.3.

Los loci seleccionados fueron: OPBO6.3, OPBO6.8, OPBO6.10, OPBO6.11, OPQ09.14, OPQ09.18, OPQ09.28, OPQ09.30, OPQ09.31, OPQ09.33, OPQ09.35, OPQ09.36, OPQ09.37, OPA09.6, OPA09.14, OPA09.15, OPA09.18, OPA09.20, OPA09.23, y OPV06.5. Estos son los loci recomendados para estudios descriptivos o de caracterización de *C. gloeosporioides*.

Análisis de correspondencia

Este análisis se hizo para confirmar la independencia de filas y columnas de la matriz de datos de bandas RAPD. Se usó también para encontrar los loci característicos de este hongo, es decir los que son más comunes, para ello se seleccionaron las bandas que presentaron menor distancia al centroide (menor o igual a 2.0), estos loci fueron: OPBO6.11, OPBO6.13, OPBO6.14, OPBO6.15, OPQ09.7, OPQ09.12, OPQ09.18, OPQ09.19, OPQ09.24 y OPA09.11.

Por otra parte los loci más raros (los de frecuencia más baja y de distancia al centroide mayor o igual a 12.0) fueron: OPBO6.7, OPBO6.16, OPQ09.14, OPQ09.28, OPQ09.33, OPQ09.35, OPQ09.36 y OPQ09.37.

Los valores característicos acumulados mostraron que los primeros ocho monoconidiales (MC) representan el 70% de la variabilidad total de la colección mientras que los primeros trece representan el 89%. Estos resultados concuerdan con los encontrados mediante los análisis de caracteres morfológicos y de isoenzimas.

Análisis de agrupamiento

A partir de la matriz de datos de los loci definidos por RAPD se calculó un matriz de distancias genéticas que mostró que la menor distancia genética se encuentra entre los monoconidiales 61 (de la localidad de Tacámbaro y causante de viruela) y 62 (de la localidad de Ziracuaretiro y causante de viruela), y la distancia más grande entre los monoconidiales 46 (de la localidad de Uruapan y causante de manchas superficiales) y 47 (de la localidad de Uruapan y causante de manchas superficiales).

A partir de la matriz de distancias genéticas se hizo un análisis de agrupamiento que dio como resultado el dendograma de la Figura 13. Aquí puede observarse que la distribución general muestra agrupamientos por localidad ya que el grupo I contiene siete de los monoconidiales procedentes de Uruapan, aunque uno de ellos es causante del síntoma antracnosis-cuartheaduras. En el grupo II hay tres monoconidiales procedentes de Uruapan y causantes de manchas superficiales, pero se ve que los monoconidiales de Zirosto causantes de viruela se agrupan estrechamente, asimismo los monoconidiales procedentes de Tacámbaro y Peribán que causan Antracnosis se unen estrechamente en el subgrupo I.2.

Es notorio que en el subgrupo 1.1 se encuentran todos los monoconidiales que presentaron resolución para pocas bandas RAPD mientras que los demás grupos y subgrupos presentan una cantidad apreciablemente mayor de bandas.

La distribución de este dendograma se da con base en el número de bandas presentadas por cada monoconidial y, como en el caso de los análisis morfológicos y de isoenzimas (aunque no tan bien definidos), en la localidad y síntomas producidos.

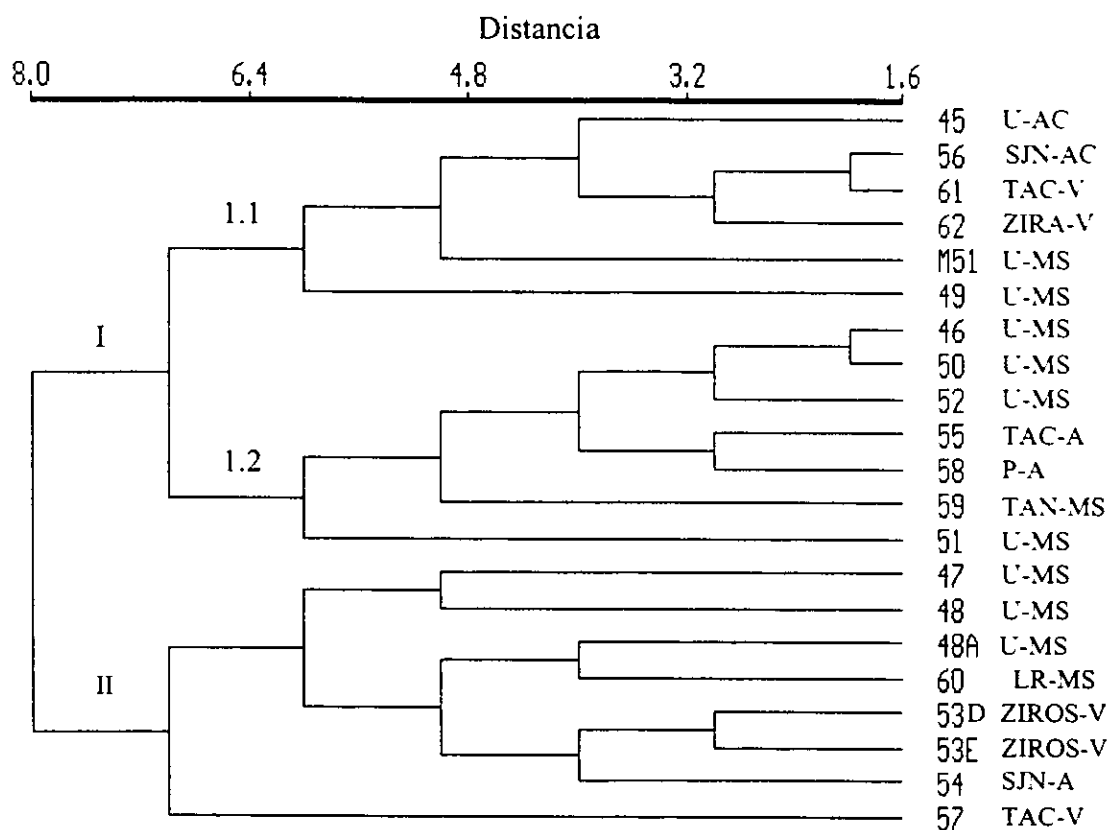


Figura 13. Dendrograma basado en loci RAPD de *C. gloeosporioides*. A la derecha se observan el número de identificación de cada monoconidial y, abreviados, la localidad y síntoma que producen.

Indice de variabilidad genética

Se calculó el Índice de Variabilidad Genética (IVG) para las bandas definidas por cada iniciador y el promedio (Cuadro 5). Se encontró que el iniciador que presenta mayor valor de IVG fue el OPA09 (0.4119) y el menor (a pesar de producir el mayor número de bandas) fue el OPQ09 (0.2313). El valor promedio de IVG para la colección completa fue de 0.3437, valor aproximadamente igual al encontrado mediante los análisis isoenzimáticos. Esto nos indica que ambos sistemas funcionan igualmente bien para la detección y descripción de la variabilidad genética de *C. gloeosporioides*.

Marcadores para estudios de flujo genético

Debido a que los marcadores RAPD se comportan como dominantes se debe hacer la consideración de que la selección de estas bandas para estudios de flujo genético está condicionada a que sean secuenciadas para convertirlas en sondas y usarse para detección de regiones homólogas de ADN por medio de la técnica de SCAR (Región Amplificada de Secuencia Conocida), de esta forma se obtendrían marcadores codominantes a los que se podrá dar seguimiento seguro y confiable en la progenie.

Las bandas seleccionadas son las que se presentan de forma única en algún monoconidial. En este estudio esas bandas fueron: OPBO6.7, OPBO6.16, OPQ09.14, OPQ09.28, OPQ09.29, OPQ09.35, OPQ09.36, OPQ09.37, OPA09.14, OPA09.15, OPA09.23, OPA09.24 y OPA09.25. los monoconidiales que poseen esas bandas pueden ser usados para realizar cruzamientos dirigidos o de intercambio de genes y su progenie puede ser analizada mediante la determinación de la presencia o ausencia de estas bandas ya convertidas a SCAR.

Marcadores asociados a patogenicidad

Mediante análisis de varianza entre cada locus RAPD y los datos de invasión de pulpa se determinó qué bandas están asociadas con la patogenicidad de *C. gloeosporioides* (Cuadro 6). Las consideraciones fueron las mismas que para el análisis isoenzimático.

Los loci que se asocian a la patogenicidad por su F significativa y valor alto de r^2 son: loci OPB06.2 y OPB06.6 asociados a patogenicidad baja exhibida por los MC 53D, 53E y 60; loci OPB06.11, OPQ09.12, OPA09.3 y OPA09.7 asociados a alta patogenicidad (Cuadro 6); todos los monoconidiales que poseen estas bandas presentan alta patogenicidad, con la única excepción del 47.

Análisis Conjunto

A partir de la matriz original de datos se realizó un análisis de distancias genéticas con el fin de encontrar los monoconidiales más semejantes y los más diferentes sobre la base de todas las características estudiadas. Esta matriz de distancias genéticas además sirvió para realizar un

análisis de agrupamiento y construir un dendograma que represente las relaciones totales de los monoconidiales (Figura.14).

Los resultados muestran que la distancia más pequeña se dio entre los monoconidiales 61 y 62 y la distancia más grande entre los MC 48 y 50.

El dendograma muestra un agrupamiento con base en las localidades de colecta y a los síntomas producidos, es decir, confirma los resultados encontrados en cada uno de los análisis de agrupamiento realizados.

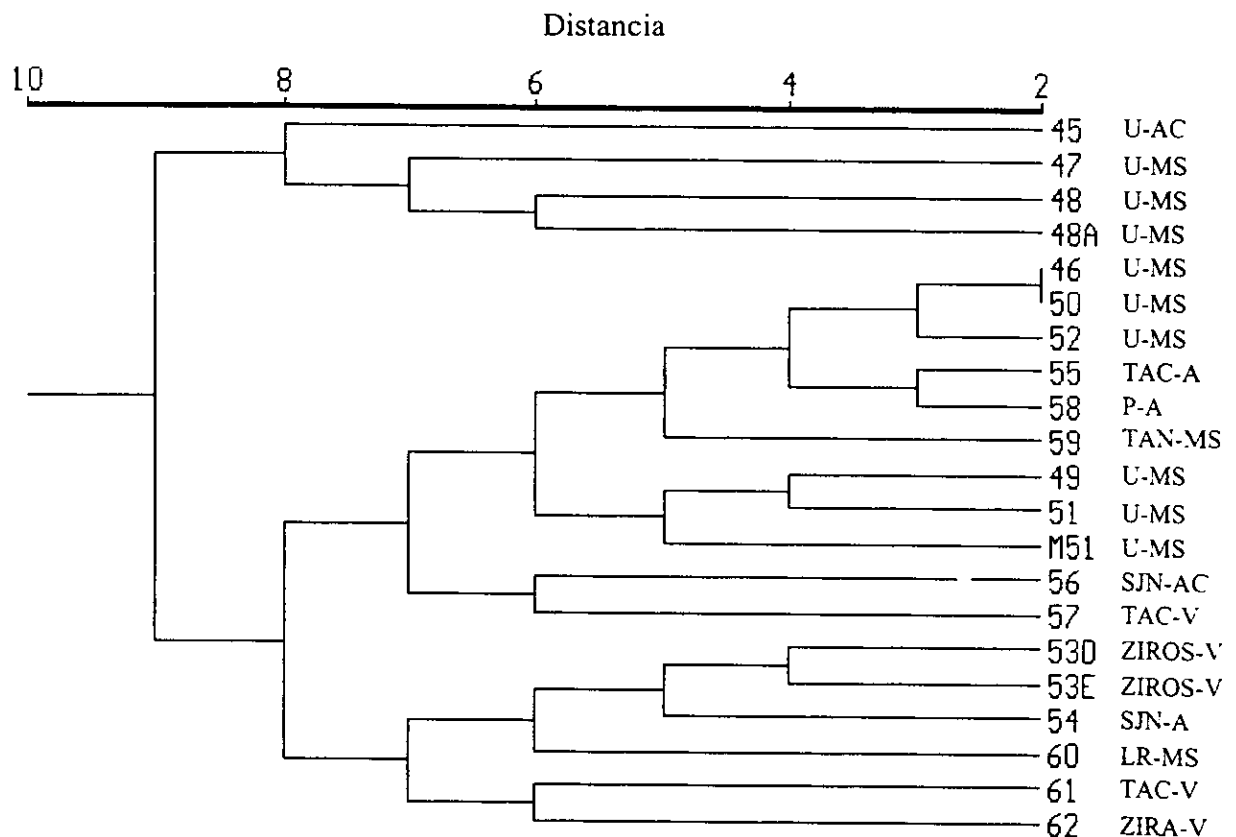


Figura 14. Dendograma construido con el total de caracteres estudiados. A la derecha se observan el número de identificación de los monoconidiales y, abreviados, la localidad y el síntoma que producen,

DISCUSION

Los resultados de la caracterización morfológica indican una gran variabilidad de los caracteres considerados. El rasgo más importante fue el que, en contra de lo que señala la bibliografía donde comúnmente se reportan colonias de color gris, predominó el color blanco; hubo también dos monoconidiales sobresalientes por su tipo de crecimiento ya que el micelio se desarrolla llenando la caja de cultivo de manera espiral con los brazos bien definidos, este es el primer reporte de cepas de *C. gloeosporioides* con esta característica, los monoconidiales que la poseen son 48 y 48A ambos procedentes de Uruapan y productores del síntoma de manchas superficiales, es de señalar que ambas cepas fueron idénticas morfológicamente aunque difirieron en sus patrones isoenzimáticos y de RAPD.

Para caracterizar morfológicamente las cepas de este hongo no se tomaron en cuenta la forma y tamaño de los conidios ya que Morales (1996) reporta poca variedad en esas características, por lo que su valor como criterio descriptivo dentro del género *Colletotrichum* es discutible. En cambio se consideraron variables poco o nada utilizadas en la descripción de este hongo tales como color del centro de la colonia, dirección del crecimiento de las hifas del borde de la colonia, presencia de manchas radiales cuando la colonia madura y tipo de crecimiento del micelio; estos caracteres demostraron su importancia en este tipo de estudios, particularmente la presencia de manchas radiales y color del centro de la colonia los cuales fueron seleccionados como buenos descriptores de la variabilidad genética del hongo bajo estudio.

Respecto a la caracterización patogénica es notable que no se correlacionó directamente con la velocidad de crecimiento en medio de cultivo: por ejemplo la cepa 48 tuvo una gran cantidad de pulpa invadida manifestándose como una de las más virulentas, sin embargo su velocidad de crecimiento fue apenas intermedia con respecto a las demás. Lo contrario sucede con la cepa 58 la cual tuvo la mayor velocidad de crecimiento, pero su capacidad invasiva de pulpa no fue de las más altas. La posible explicación de estos resultados es que la capacidad invasiva está determinada por diversas condiciones tales como la textura fina de la pulpa de aguacate, la temperatura óptima del desarrollo de cada monoconidial lo cual se podría asociar al microclima del lugar exacto de procedencia del hongo, la acumulación diferencial de metabolitos secundarios tales como el heneicosadieno reportado por Prusky (1982) como resultado de posibles diferencias metabólicas y genéticas de los frutos de aguacate usados; en cambio la

velocidad de crecimiento en medio de cultivo está determinada por otro tipo de factores como la capacidad para aprovechar los nutrientes del medio (los cuales son diferentes a la pulpa), la velocidad del ciclo celular y/o de elongación de la célula después de la mitosis, etc. Todos estos factores son difíciles de controlar por el investigador y cada uno de ellos requiere el diseño específico de estrategias experimentales para su estudio. A pesar de ello es factible encontrar marcadores bioquímicos y de ADN (sobre todo de éstos) asociados a estos rasgos considerando si su comportamiento es como loci de caracteres cuantitativos (QTL) o como genes de efectos mayores; sería también de mucha ayuda conocer y caracterizar bioquímicamente los compuestos asociados a la patogenicidad ya sea para incrementarla o reducirla y que pueden estar presentes tanto en el fitopatógeno como en el huésped tales como niveles de trealosas, del heneicosadieno de Prusky, o producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, etc.

Respecto a la posible relación entre los diferentes síntomas producidos por *C. gloeosporioides*; se esperaría que en un análisis de agrupamiento se formaran grupos estrechos con aquellos monoconidiales que presentan iguales síntomas, sin embargo solamente es posible hablar de tendencias de la formación de grupos entre monoconidiales que producen el mismo síntoma. Los resultados del presente trabajo muestran tendencias de agrupamiento tanto por síntomas como por localidad de origen. Estos resultados pueden deberse a dos situaciones: 1) Se requiere un estudio más profundo para caracterizar los monoconidiales que presentan los mismos síntomas tales como más sistemas isoenzimáticos, más iniciadores u otras técnicas complejas y precisas como el Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), 2) Probablemente los diferentes síntomas no se presentan por diferencias genéticas en los hongos sino en los huéspedes ó por la influencia de factores externos como la humedad o temperatura de cada microclima; una tercera posibilidad (aunque discutible) es que, en el fondo, los síntomas no sean diferentes en sí, sino que se presenten solamente como diferencias de grado en la severidad de las mismas, estas diferencias podrían deberse a que el hongo ataca al aguacate en diferentes etapas fenológicas o de maduración del fruto, otra posibilidad es que una misma cepa produzca diferentes síntomas cuando se encuentra en condiciones diferentes (microclimáticas, fenológicas, estacionales, de maduración, etc.). Todas estas posibilidades permanecen como incógnitas a resolver.

Todos los estimadores usados en este estudio (número de componentes principales, Índice de Variabilidad Genética, porcentaje de caracteres polimórficos, y promedio de caracteres por locus y varianza acumulada) indican la amplia variabilidad genética de *C. gloeosporioides*. Esta característica ha sido reportada en diferentes poblaciones del hongo, aunque en México –con cepas mexicanas- sólo se ha realizado el trabajo de Morales (1996).

En el caso del estado de Michoacán esta amplia variabilidad genética se puede deber al intenso intercambio de germoplasma de aguacate en forma de plantas recién injertadas o frutos de aguacate, esto se da porque la gran mayoría de los viveros se encuentra en Uruapan y de aquí se distribuyen plantas a las otras localidades, por otra parte este municipio es el lugar donde se concentra una parte importante de la producción de todo el estado ya que de aquí se comercializa y se envía principalmente a la ciudad de México o Guadalajara; este intenso tráfico en ambos sentidos propicia de igual manera un intercambio de germoplasma del hongo que se encuentra como infección latente (sin síntomas visibles) en plantas y frutos. Aunado a esto es de considerarse la capacidad de *C. gloeosporioides* para reproducirse sexualmente siendo además una especie heterotálica, es claro que este tipo de reproducción que incluye la meiosis y por consiguiente el entrecruzamiento de segmentos cromosómicos es, junto con las mutaciones, la mayor fuente de variabilidad de este hongo, cuya fase sexual, *Glomerella cingulata*, es ampliamente reconocida. Por otra parte el modo de dispersión por esporas facilita el intercambio de material genético a distancias considerables pudiendo abarcar diferentes localidades. Todo lo anterior podría dar como resultado un alto flujo de genes entre hongos de diferentes orígenes.

La estimación de la variabilidad genética mediante el IVC demuestra que tanto RAPD como isoenzimas tienen un valor similar y muy alto comparado con los caracteres morfológicos. Se puede afirmar que ambas técnicas proporcionan estimaciones adecuadas, a pesar de que la potencialidad de las isoenzimas es menor debido a que el número de ellas es pequeño comparado con los RAPD. Las isoenzimas se consideran estrictamente como marcadores fenotípicos, sin embargo bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, stress, etc., las diferencias que presentan pueden atribuirse a factores inherentes al genoma del hongo; y desde este punto de vista representan una descripción adecuada de la variabilidad genética.

Con respecto a los marcadores bioquímicos y bandas RAPD es importante notar que hubo una gran cantidad de bandas de ambos tipos, lo cual dio como resultado que todos los genotipos

fueran únicos, es decir no hubo dos cepas que tuvieran exactamente las mismas bandas. En algunos textos se menciona esta característica como “variación genotípica”, pero es importante aclarar que no es sinónimo de “variabilidad genética” ya que ésta se obtiene cuando las frecuencias absolutas de los genes son aproximadas a 0.5, es decir que esos genes son de aparición variable en la población estudiada. Lo anterior significa que la variación se asocia con el número de caracteres mientras que la variabilidad se correlaciona con las frecuencias absolutas de estos.

En el presente trabajo se observa que el valor del Índice de Variabilidad Genética es alto, sin embargo, considerando la gran cantidad de caracteres se esperaría uno mucho más alto. Esto es así debido a que muchos caracteres presentan frecuencias bajas mientras que pocos caracteres tuvieron frecuencias altas, esta situación se aprecia de manera preponderante en el caso de los RAPD. Aún así, el valor del IVG en ambos tipos de bandas fue alto, aunque Morales *et al* (1998) reportan un valor más alto en otras cepas procedentes de Michoacán (0.41) y Montero *et al* (1998) reportan valores de 0.44 y 0.41 para una población de hongos de Uruapan y otra de Tacámbaro respectivamente. Estos trabajos fueron realizados usando iniciadores diferentes a los del presente trabajo; es de esperarse que diferentes iniciadores produzcan un patrón diferente de bandas sobre las mismas muestras, por lo tanto lo ideal es utilizar el mayor número posible de iniciadores para obtener una caracterización lo más completa posible.

Generalizando, este estudio es importante porque sienta las bases para investigar a profundidad la estructura genética de las poblaciones de *Colletotrichum gloeosporioides* y los caracteres genéticos asociados a su virulencia.

Se recomiendan diferentes líneas de investigación que pueden tener como base los resultados obtenidos en este trabajo con impacto en la producción, a mediano y largo plazo, del aguacate y el control del patógeno.

Incluso este hongo podría usarse como modelo en estudios de evaluación de riesgos en bioseguridad por sus características de alta variabilidad con un gran número de bandas de isoenzimas y, principalmente de RAPD, además de sus tipos de reproducción sexual y asexual. Se cuenta también con plásmidos y sistemas de transformación genética por balística eficientes y capaces de producir transformantes estables (Rodríguez *et al.* 1992).

Las sugerencias son las siguientes:

1. Caracterización de la variabilidad genética y estructura poblacional de un mayor número de cepas y de poblaciones de *C. gloeosporioides*.
2. Estudios de flujo de genes entre cepas bien caracterizadas de este hongo.
3. Investigación acerca de la correlación entre marcadores genéticos que pudieran usarse como etiquetas de genes y la patogenicidad.
4. Conversión por Ingeniería Genética o mutaciones dirigidas de cepas virulentas a cepas avirulentas y su posible uso mediante cruzamiento sexual con cepas regionales características de alta virulencia para disminuir el daño causado por este hongo.
5. Búsqueda de germoplasma de aguacate criollo con resistencia genética natural a la antracnosis para identificar el o los genes responsables de la resistencia y transferirlos al aguacate Hass por fitomejoramiento o por ingeniería genética (esta última opción parece ser mejor debido al largo tiempo que se requiere para la obtención de poblaciones recombinantes de este fruto debido a su largo ciclo de vida).

Para todos estos tipos de estudio se recomienda que se consideren un mayor número de aislamientos monoconidiales, de síntomas y de marcadores (isoenzimas y/o RAPD).

CONCLUSIONES

Del presente trabajo se pueden extraer diversas conclusiones importantes acerca de la caracterización morfológica, bioquímica y de ADN del hongo causante de la Antracnosis del aguacate en Michoacán *Colletotrichum gloeosporioides*. También sirve como estudio preliminar que señala algunos temas donde convendría llevar a cabo investigaciones dirigidas que conduzcan a un conocimiento más profundo de la biología, especialmente la patología, de este hongo con el objetivo de plantear eficaces estrategias de control.

Las conclusiones más importantes son las siguientes:

1. *Colletotrichum gloeosporioides* es una especie genéticamente muy variable. Todos los estimadores relacionados con la diversidad genética considerados en este estudio presentan valores altos.
2. Tanto las isoenzimas como las bandas RAPD son mejores estimadores de la variabilidad genética que los caracteres morfológicos, sin embargo existe complementariedad entre todos estos tipos de marcadores.
3. Las relaciones genéticas que se establecen entre las diferentes cepas monoconidiales coinciden, en primer lugar y de acuerdo a los análisis de agrupamiento, con la localidad de origen y, en segundo, con los síntomas que producen.
4. La velocidad de crecimiento en medio de cultivo y la patogenicidad no están correlacionadas de manera directa.
5. Los alelos de isoenzimas Mdh-1, Adh2-a y Acp1-4 están correlacionadas con alta patogenicidad de los monoconidiales que las poseen. De igual forma los loci RAPD OPB06.11, OPQ09.12, OPA09.3 y OPA09.7 están asociados con esta característica.
6. Los loci RAPD OPB06.2 y OPB06.6 están correlacionados con baja patogenicidad.
7. Las características descriptivas típicas de *C. gloeosporioides* recomendadas en estudios de caracterización son: micelio blanco algodonoso, colonia blanca, crecimiento al azar e hifas del borde cortas.
8. Se recomiendan las variables morfológicas, bioquímicas y de ADN seleccionadas en este trabajo para llevar a cabo estudios de variabilidad genética sobre una población más amplia de aislamientos monoconidiales.
9. Se encontraron diversas bandas de isoenzimas y RAPD que pueden funcionar como marcadores en estudios de flujo genético.
10. Se presenta el primer reporte de cepas (48 y 48A) con patrón de crecimiento en espiral.

BIBLIOGRAFIA

- Alahakoon, P.W., Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. and Mills, P.R. 1992. Selection of a genetic variant within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passaging through wounded tomato fruit. *Physiol and Mol Plant Pathol* 41:227-240.
- Armstrong, J.S., Gibbs, A.J., Peakall, R. And Weiller, G. 1994. The RAPDistance package.
<ftp://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance> or
<http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>.
- Bailey, A:J., and Jeger, J:M: 1992. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388 pp.
- Bonde, M.R., Peterson, G.L. and Maas, J.L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology* 81:1523-1528.
- Braithwaite, K.S., Irwin, J.A.G. and Manners, J.M. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes spp.* in Australia. *In: Colletotrichum*: biology, pathology and control. Bailey, A:J., and Jeger, J:M: 1992. C.A.B. International. 388 pp.
- Burdon, J.J. and Roelfs, A.P. 1985. The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 75:1068-1073.

- Burdon, J.J. and Roelfs, A.P. 1985b. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. *Phytopathology* 75:907-913.
- Chilton, S.J.P. and Wheeler, H.E. 1949. Genetic of *Glomerella*. VII. Mutation and segregation in plus cultures. *Am Jour Bot* 36:717-721.
- Consejo Nacional Agropecuario. 1997. Estadística básicas del sector agropecuario 87-96. Dirección de Estudios Económicos. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural.
- Crisci, J.V., López-Armengol, M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. O. E. A. Serie de Biología, Monografía No. 26. Washington, D.C.
- Hair, J.F. Jr., Anderson, R.E., Tatham, R.L. and Black, W.C. 1995. Multivariate data analysis. Fourth edition. Prentice Hall.
- Haldén, C., Hansen, M., Nilson, N.O., Hjerdin, A. and Säll, T. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analyses. *Theor Appl Genet* 93:1185-1192.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding and genetic resources* (Eds. A.H. D. Brown, M. Clegg, A. Kahler, and B. Weir). Sinauer Associates Inc. Mass. USA.
- Hu, J. And Quiros, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10:505-511.

- INEGI, S P.P. 1985. Síntesis geográfica del estado de Michoacán. Anexo cartográfico. Cartas: topográfica, climática, edafología y vegetación.
- Kubelick, A.R. and Szabo, L.J. 1995. High-GC primers are useful in RAPD analyses of fungi. *Curr Genet* 28:384-389
- Lenné, J:M., and Burdon, J:J: 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology* 80:728-731.
- Linde, D.C., Groth, J.V. and Roelfs, A.P. 1990. Comparisons of isozyme and virulence diversity patterns in the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology* 80:141-147.
- Maas, J.C. 1983. Pathogenicity and gel electrophoretic protein pattern comparisons among strawberry anthracnose fungi. *Phytopathology* 73:843.
- McDonald, B.A. and McDermott, J.M. 1993. Populations genetics of plant pathogenic fungi. Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. *BioScience* 43(5):311-319.
- Mills, P.R., Hodson, A. and Brown, A.E. 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. *In: Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, A:J:, and Jeger, J:M: 1992. C.A.B. International. 388 pp.

- Montero, T.V. 1996. Estimación de la diversidad genética de los híbridos dobles de maíz H-28 y H-30 por medio de electroforesis de isoenzimas. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.
- Montero, T.V., Montalvo, H.L., García, M.J.L., Azpiroz, R.H.S., Peña, L.A. y Gálvez, M.A. 1998. Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional mediante el uso de fragmentos de ADN amplificados al Azar. *Agricultura Técnica en México* 24(1):83-89.
- Morales, J.L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate de Michoacán. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad.
- Morales, G.J.L., Montero, T.V., Azpiroz, R.H.S., y Gálvez, M.A. 1998. Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* en aguacate Hass procedente de Michoacán, México. Memorias del XVII Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitogenética, Acapulco, Guerrero.
- Morales, G.J.L., y Vidales, F.J.A. 1994. Enfermedades del aguacate en Michoacán. Folleto para productores Núm. 24. SARH-INIFAP-CIPAC. Uruapan, Michoacán. México. 19 pp.
- Perkins, D.D. 1987. Mating-type switching in filamentous ascomycetes. *Genetics* 115:215-216.

- Prusky, D., Koen, N.T., and Eaks, Y. 1983. Further evidence for involvement of a preformed antifungal compound in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruit. *Physiol Plant Pathol* 22:189-198
- Prusky, D., Koen, N.T., Sims, J.J. and Midland, S.L. 1982. Possible involvement of an antifungal compound in latency of *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruit. *Phytopatology* 72:1578-1582.
- Raeder, U. And Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1:17-20.
- Randall, K.S., Scharf, S., Faloona, F., mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Rodriguez, R.J. and Redman, R.S., 1992. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes spp.* in Australia. *In: Colletotrichum: biology, pathology and control.* Bailey, A.J., and Jeger, J.M: 1992. C.A.B. International. 388 pp.
- Rogers, D.J. and Tanimoto, T.T. 1960. A computer program for classifying plants. *Science* 132:1115-1118.
- Rohlf, J.F. 1993. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System V. 1.80. Department of Ecology and Evolution State University of New York. Stony Brook, New York.

SAS Institute Inc., 1988. SAS/STAT User's guide, version 6.03. Fourth edition. SAS Inst. Inc., Cary, N.C. USA. pp 173-188, 751-771.

Skroch, P. and Nienhuis, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet* 91:1086-1091.

Smith, B.J. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant disease* 74(1):69-76.

Sreenivasaprasad, S., Averil, E.B., and Mills, P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol Mol Plant Pathol* 41:265-281.

Stiles, J.J., Lenné, C., Sondur, S., Moshidi, M.B. and Manshardt, R. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor Appl Genet* 85:697-701.

Stuber, C.W., Wendel, J.F., Goodman, M.M. and Smith, J.M. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin 286. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina, USA.

Sutton, B.C.: 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, A.J., and Jeger, J.M.: 1992. C.A.B. International. 388 pp.

- Tamayo, M.P.J., Otaya, M.M. y Pastor, C.M.A. 1995. Diversidad de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*, el patógeno de la antracnosis del frijol en Rionegro, Antioquía. *Fitopatología Colombiana* 19(1):1-6.
- Tu, J.C. 1985. An improved Mathur's medium for growth, sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbios* 44:87-93-
- Vaillancourt, L.J. and Hanau, R.M. 1991. A method for genetic analyses of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*) from maize. *Genetics* 81(5):530-534.
- Williams, G.K., Kulbeck, A.R., Rafalski, J.A. y Tigney, V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid research* 18:6531-6535.
- Wolfe, M.S. 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annu Rev. Phytopathol* 23:251-273.

ANEXO A. ANALISIS ESTADISTICOS MORFOLOGICOS.

Cuadro 1. Matriz de datos morfológicos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
45	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
46	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
47	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
48	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
48A	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
49	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
50	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
51	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
M51	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
52	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
53D	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
53E	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
54	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
55	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
56	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
58	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
59	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
60	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
61	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
62	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

45	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
46	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
47	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
48	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
48A	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
49	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
50	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
51	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
M51	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
52	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
53D	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
53E	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
54	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
55	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
56	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
57	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
58	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
59	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
60	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
61	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
62	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Los caracteres del 1 al 39 corresponden a: Micelio blanco, gris claro, blanco cremoso y blanco amarillo; colonia blanca vista por el reverso, blanca grisácea, blanco amarilla, blanco cremosa y blanco naranja; anillos concéntricos; manchas radiales; micelio lanoso, algodonoso, algodonoso muy fino, adsorbido y granuloso; centro naranja, blanco, gris muy oscuro, verdoso oscuro, gris verdoso claro y amarillo naranja; color de manchas radiales; crecimiento al azar, espiral y radial; forma del borde de crecimiento; tamaño de las hifas del borde; dirección de las hifas del borde radial, al azar e inclinada; estrías en el borde de crecimiento; velocidad de crecimiento tipo I (4 a 6.6 mm). Tipo II (6.7 a 9.3 mm) y Tipo III (9.4 a 12.0 mm); invasión de pulpa Tipo I (1.0 a 3.3 g), Tipo II (3.9 a 1.7 g), Tipo III (6.8 a 9.6 g) y Tipo IV (9.7 a 12.5 g).

Cuadro 2. Matriz de valores característicos de los primeros 10 componentes principales para los caracteres morfológicos..

	Eigenvalues	diferencia	proporción	acumulada	Raiz
CP1	0,9726	0,2051	0,1840	0,1840	0,9862
CP2	0,7675	0,1314	0,1452	0,3292	0,8761
CP3	0,6361	0,1308	0,1203	0,4496	0,7976
CP4	0,5053	0,0872	0,0956	0,5451	0,7108
CP5	0,4181	0,0063	0,0791	0,6242	0,6466
CP6	0,4118	0,0759	0,0779	0,7022	0,6417
CP7	0,3359	0,0739	0,0635	0,7657	0,5796
CP8	0,2620	0,0242	0,0496	0,8153	0,5119
CP9	0,2378	0,0436	0,0450	0,8603	0,4877
CP10	0,1942	,	0,0367	0,8970	0,4407

Cuadro 3. Análisis de componentes principales, coeficientes de correlación y determinación, y varianza acumulada de las variables morfológicas de *C. gloeosporioides*.

Eigenvectors	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10
V1	-0,2256	-0,2319	0,2345	0,2635	-0,1569	0,1316	0,2237	0,1471	0,1134	-0,0516
V2	0,1545	0,1728	-0,3338	-0,0332	0,0148	0,1232	-0,1506	-0,1110	-0,1339	0,2187
V3	-0,0189	0,0057	-0,0115	-0,1317	0,0901	-0,1333	-0,0994	0,0710	-0,1708	-0,2014
V4	0,0901	0,0535	0,1108	-0,0987	0,0520	-0,1215	0,0263	-0,1071	0,1914	0,0343
V5	-0,1024	-0,1114	-0,1485	0,1951	-0,1102	0,0653	0,4342	0,1382	-0,0152	0,0828
V6	0,0409	0,0686	-0,0303	-0,0340	-0,0869	0,0718	-0,1678	-0,0058	-0,0174	0,1597

continúa...

...continuación

V7	-0,0096	-0,0163	0,0795	0,0692	0,0550	0,1176	-0,1932	-0,0964	0,0120	-0,0754
V8	-0,0189	0,0057	-0,0115	-0,1317	0,0901	-0,1333	-0,0994	0,0710	-0,1708	-0,2014
V9	0,0901	0,0535	0,1108	-0,0987	0,0520	-0,1215	0,0263	-0,1071	0,1914	0,0343
V10	0,0953	0,3230	0,0947	-0,2686	-0,2766	0,1110	0,0152	0,1365	0,2042	0,1550
V11	-0,0008	0,0356	0,2209	0,3393	0,3235	0,1249	-0,1022	0,1377	-0,0897	0,0004
V12	0,1443	-0,2497	-0,0075	-0,0322	-0,0861	0,0609	0,0278	0,1653	0,0442	-0,1267
V13	0,1362	0,4368	0,2241	0,1825	-0,0593	0,2223	-0,0826	0,1645	0,0111	-0,1005
V14	-0,0668	-0,0278	-0,2417	-0,0158	0,1895	0,0115	0,1728	0,0106	0,2264	0,2131
V15	-0,0189	0,0057	-0,0115	-0,1317	0,0901	-0,1333	-0,0994	0,0710	-0,1708	-0,2014
V16	-0,1948	-0,1650	0,0366	-0,0028	-0,1341	-0,1615	-0,0186	-0,4114	-0,1109	0,2154
V17	0,0901	0,0535	0,1108	-0,0987	0,0520	-0,1215	0,0263	-0,1071	0,1914	0,0343
V18	-0,1021	-0,0286	-0,1416	-0,0162	0,3569	0,1417	0,1967	-0,1915	0,1524	-0,0012
V19	0,0926	0,2949	-0,0428	0,2423	-0,3462	0,0072	0,0480	0,0576	-0,1612	-0,2446
V20	-0,1467	-0,0485	-0,0348	0,1265	0,0320	-0,1965	-0,1305	0,2849	0,1972	0,2703
V21	0,0668	-0,3593	0,1472	-0,0170	-0,1170	0,1740	-0,0586	-0,1839	-0,2468	0,0282
V22	-0,0142	0,0287	0,0651	-0,0595	-0,0554	0,0732	0,0345	0,0612	0,0173	0,1128
V23	0,0125	0,0412	0,0819	0,3296	0,4647	0,1800	-0,0666	0,0708	-0,0457	0,0539
V24	-0,2982	0,1666	-0,1408	-0,0644	0,0133	0,1439	-0,1263	-0,0509	-0,2027	0,0874
V25	0,1443	-0,2497	-0,0075	-0,0322	-0,0861	0,0609	0,0278	0,1653	0,0442	-0,1267
V26	0,1539	0,0831	0,1483	0,0966	0,0728	-0,2048	0,0985	-0,1144	0,1585	0,0393
V27	0,3219	-0,0812	-0,1535	-0,2515	0,3270	-0,0292	0,0102	0,0753	-0,1084	-0,2298
V28	0,0071	-0,0051	-0,0581	-0,0102	-0,1693	-0,1133	-0,0383	-0,0514	0,0566	-0,0051
V29	0,2219	0,1280	0,0763	0,1528	0,0457	-0,2637	0,0972	-0,1604	-0,0225	0,0431
V30	-0,3662	0,1217	-0,0688	-0,1206	0,0405	0,2028	-0,1250	-0,0048	-0,0217	0,0836
V31	0,1443	-0,2497	-0,0075	-0,0322	-0,0861	0,0609	0,0278	0,1653	0,0442	-0,1267
V32	0,1539	0,0831	0,1483	0,0966	0,0728	-0,2048	0,0985	-0,1144	0,1585	0,0393
V33	-0,1628	-0,0547	0,0213	0,1760	-0,0723	0,0059	-0,3130	-0,3186	0,2818	-0,3500
V34	-0,1657	0,1313	0,3479	-0,3353	0,1264	-0,0309	0,3887	0,1407	-0,2681	0,0742
V35	0,3284	-0,0766	-0,3692	0,1593	-0,0541	0,0250	-0,0757	0,1779	-0,0136	0,2758
V36	-0,2601	-0,0242	-0,0399	0,0009	0,0304	-0,4102	-0,2375	0,3689	0,1019	-0,0076
V37	-0,0482	0,1532	-0,2765	-0,0535	0,0139	0,2416	0,2940	-0,1314	0,2240	-0,3413
V38	0,2134	-0,1629	0,3259	-0,1924	0,0084	0,3430	-0,2060	-0,0442	0,0901	0,2413
V39	0,0950	0,0340	-0,0095	0,2451	-0,0528	-0,1744	0,1496	-0,1933	-0,4160	0,1076

	CoeCorr1	CoeCorr2	CoeCorr3	CoeCorr4	CoeCorr5	CoeCorr6	CoeCorr7	CoeDet1(r2)
V1	-0,2225	-0,2032	0,1870	0,1873	-0,1015	0,0844	0,1297	0,0502
V2	0,1523	0,1514	-0,2662	-0,0236	0,0096	0,0791	-0,0873	0,0235
V3	-0,0187	0,0050	-0,0092	-0,0936	0,0583	-0,0855	-0,0576	0,0004
V4	0,0888	0,0468	0,0884	-0,0701	0,0336	-0,0780	0,0152	0,0080
V5	-0,1010	-0,0976	-0,1184	0,1387	-0,0712	0,0419	0,2517	0,0104
V6	0,0403	0,0601	-0,0242	-0,0241	-0,0562	0,0461	-0,0973	0,0016
V7	-0,0095	-0,0143	0,0634	0,0492	0,0356	0,0755	-0,1120	0,0001
V8	-0,0187	0,0050	-0,0092	-0,0936	0,0583	-0,0855	-0,0576	0,0004
V9	0,0888	0,0468	0,0884	-0,0701	0,0336	-0,0780	0,0152	0,0080
V10	0,0940	0,2829	0,0756	-0,1910	-0,1788	0,0713	0,0088	0,0090
V11	-0,0008	0,0312	0,1762	0,2412	0,2092	0,0801	-0,0592	0,0000
V12	0,1423	-0,2187	-0,0059	-0,0229	-0,0557	0,0391	0,0161	0,0205
V13	0,1343	0,3826	0,1787	0,1297	-0,0383	0,1426	-0,0479	0,0183
V14	-0,0659	-0,0244	-0,1928	-0,0112	0,1225	0,0074	0,1002	0,0044
V15	-0,0187	0,0050	-0,0092	-0,0936	0,0583	-0,0855	-0,0576	0,0004
V16	-0,1921	-0,1445	0,0292	-0,0020	-0,0867	-0,1036	-0,0108	0,0374

continúa...

...continuación

V17	0,0888	0,0468	0,0884	-0,0701	0,0336	-0,0780	0,0152	0,0080
V18	-0,1006	-0,0251	-0,1129	-0,0115	0,2307	0,0909	0,1140	0,0103
V19	0,0914	0,2584	-0,0341	0,1722	-0,2239	0,0046	0,0278	0,0085
V20	-0,1447	-0,0425	-0,0278	0,0899	0,0207	-0,1261	-0,0756	0,0212
V21	0,0659	-0,3148	0,1174	-0,0120	-0,0757	0,1117	-0,0340	0,0044
V22	-0,0140	0,0251	0,0520	-0,0423	-0,0358	0,0470	0,0200	0,0002
V23	0,0124	0,0361	0,0653	0,2343	0,3005	0,1155	-0,0386	0,0002
V24	-0,2941	0,1460	-0,1123	-0,0457	0,0086	0,0923	-0,0732	0,0877
V25	0,1423	-0,2187	-0,0059	-0,0229	-0,0557	0,0391	0,0161	0,0205
V26	0,1518	0,0728	0,1183	0,0686	0,0471	-0,1314	0,0571	0,0234
V27	0,3175	-0,0711	-0,1225	-0,1788	0,2114	-0,0187	0,0059	0,1022
V28	0,0070	-0,0045	-0,0463	-0,0073	-0,1095	-0,0727	-0,0222	0,0001
V29	0,2188	0,1121	0,0608	0,1086	0,0295	-0,1692	0,0563	0,0486
V30	-0,3612	0,1066	-0,0549	-0,0857	0,0262	0,1301	-0,0724	0,1323
V31	0,1423	-0,2187	-0,0059	-0,0229	-0,0557	0,0391	0,0161	0,0205
V32	0,1518	0,0728	0,1183	0,0686	0,0471	-0,1314	0,0571	0,0234
V33	-0,1605	-0,0479	0,0170	0,1251	-0,0467	0,0038	-0,1814	0,0261
V34	-0,1634	0,1150	0,2774	-0,2384	0,0817	-0,0198	0,2253	0,0271
V35	0,3239	-0,0671	-0,2945	0,1133	-0,0350	0,0160	-0,0439	0,1064
V36	-0,2565	-0,0212	-0,0319	0,0006	0,0197	-0,2632	-0,1376	0,0667
V37	-0,0476	0,1342	-0,2205	-0,0380	0,0090	0,1550	0,1704	0,0023
V38	0,2104	-0,1428	0,2600	-0,1368	0,0054	0,2201	-0,1194	0,0449
V39	0,0937	0,0298	-0,0076	0,1742	-0,0341	-0,1119	0,0867	0,0089

	CoeDet2	CoeDet3	CoeDet4	CoeDet	CoeDet	CoeDet7)	VarAcu1	VarAcu2
V1	0,0471	0,0439	0,0494	0,0159	0,0111	0,0290	0,0502	0,0973
V2	0,0262	0,0889	0,0008	0,0001	0,0097	0,0131	0,0235	0,0497
V3	0,0000	0,0001	0,0123	0,0052	0,0114	0,0057	0,0004	0,0004
V4	0,0025	0,0098	0,0069	0,0017	0,0095	0,0004	0,0080	0,0105
V5	0,0109	0,0176	0,0270	0,0079	0,0027	0,1093	0,0104	0,0212
V6	0,0041	0,0007	0,0008	0,0049	0,0033	0,0163	0,0016	0,0058
V7	0,0002	0,0050	0,0034	0,0020	0,0089	0,0216	0,0001	0,0003
V8	0,0000	0,0001	0,0123	0,0052	0,0114	0,0057	0,0004	0,0004
V9	0,0025	0,0098	0,0069	0,0017	0,0095	0,0004	0,0080	0,0105
V10	0,0914	0,0072	0,0513	0,0495	0,0079	0,0001	0,0090	0,1003
V11	0,0011	0,0389	0,0818	0,0677	0,0100	0,0061	0,0000	0,0011
V12	0,0546	0,0000	0,0007	0,0048	0,0024	0,0004	0,0205	0,0752
V13	0,1671	0,0400	0,0237	0,0023	0,0317	0,0040	0,0183	0,1854
V14	0,0007	0,0466	0,0002	0,0232	0,0001	0,0173	0,0044	0,0051
V15	0,0000	0,0001	0,0123	0,0052	0,0114	0,0057	0,0004	0,0004
V16	0,0238	0,0011	0,0000	0,0116	0,0167	0,0002	0,0374	0,0613
V17	0,0025	0,0098	0,0069	0,0017	0,0095	0,0004	0,0080	0,0105
V18	0,0007	0,0160	0,0002	0,0823	0,0129	0,0224	0,0103	0,0110
V19	0,0762	0,0015	0,0417	0,0775	0,0000	0,0013	0,0085	0,0847
V20	0,0021	0,0010	0,0114	0,0007	0,0248	0,0099	0,0212	0,0233
V21	0,1131	0,0173	0,0002	0,0089	0,0194	0,0020	0,0044	0,1175
V22	0,0007	0,0034	0,0025	0,0020	0,0034	0,0007	0,0002	0,0009
V23	0,0015	0,0053	0,0772	0,1396	0,0208	0,0026	0,0002	0,0016
V24	0,0243	0,0158	0,0029	0,0001	0,0133	0,0092	0,0877	0,1120
V25	0,0546	0,0000	0,0007	0,0048	0,0024	0,0004	0,0205	0,0752
V26	0,0060	0,0175	0,0066	0,0034	0,0269	0,0056	0,0234	0,0294

continúa...

...continuación.

V27	0,0058	0,0188	0,0450	0,0691	0,0005	0,0001	0,1022	0,1080
V28	0,0000	0,0027	0,0001	0,0185	0,0082	0,0008	0,0001	0,0001
V29	0,0144	0,0046	0,0166	0,0013	0,0446	0,0055	0,0486	0,0629
V30	0,0130	0,0038	0,0103	0,0011	0,0264	0,0091	0,1323	0,1452
V31	0,0546	0,0000	0,0007	0,0048	0,0024	0,0004	0,0205	0,0752
V32	0,0060	0,0175	0,0066	0,0034	0,0269	0,0056	0,0234	0,0294
V33	0,0026	0,0004	0,0220	0,0034	0,0000	0,0568	0,0261	0,0287
V34	0,0151	0,0965	0,0799	0,0103	0,0006	0,0876	0,0271	0,0422
V35	0,0051	0,1087	0,0180	0,0019	0,0004	0,0033	0,1064	0,1115
V36	0,0005	0,0013	0,0000	0,0006	0,1080	0,0327	0,0667	0,0672
V37	0,0205	0,0610	0,0020	0,0001	0,0375	0,0501	0,0023	0,0228
V38	0,0233	0,0847	0,0263	0,0000	0,0755	0,0246	0,0449	0,0682
V39	0,0010	0,0001	0,0427	0,0018	0,0195	0,0130	0,0089	0,0099

	CoeDet2	CoeDet3	CoeDet4	CoeDet5	CoeDet6	CoeDet7	VarAcu1	VarAcu2
V1	0,0471	0,0439	0,0494	0,0159	0,0111	0,0290	0,0502	0,0973
V2	0,0262	0,0889	0,0008	0,0001	0,0097	0,0131	0,0235	0,0497
V3	0,0000	0,0001	0,0123	0,0052	0,0114	0,0057	0,0004	0,0004
V4	0,0025	0,0098	0,0069	0,0017	0,0095	0,0004	0,0080	0,0105
V5	0,0109	0,0176	0,0270	0,0079	0,0027	0,1093	0,0104	0,0212
V6	0,0041	0,0007	0,0008	0,0049	0,0033	0,0163	0,0016	0,0058
V7	0,0002	0,0050	0,0034	0,0020	0,0089	0,0216	0,0001	0,0003
V8	0,0000	0,0001	0,0123	0,0052	0,0114	0,0057	0,0004	0,0004
V9	0,0025	0,0098	0,0069	0,0017	0,0095	0,0004	0,0080	0,0105
V10	0,0914	0,0072	0,0513	0,0495	0,0079	0,0001	0,0090	0,1003
V11	0,0011	0,0389	0,0818	0,0677	0,0100	0,0061	0,0000	0,0011
V12	0,0546	0,0000	0,0007	0,0048	0,0024	0,0004	0,0205	0,0752
V13	0,1671	0,0400	0,0237	0,0023	0,0317	0,0040	0,0183	0,1854
V14	0,0007	0,0466	0,0002	0,0232	0,0001	0,0173	0,0044	0,0051
V15	0,0000	0,0001	0,0123	0,0052	0,0114	0,0057	0,0004	0,0004
V16	0,0238	0,0011	0,0000	0,0116	0,0167	0,0002	0,0374	0,0613
V17	0,0025	0,0098	0,0069	0,0017	0,0095	0,0004	0,0080	0,0105
V18	0,0007	0,0160	0,0002	0,0823	0,0129	0,0224	0,0103	0,0110
V19	0,0762	0,0015	0,0417	0,0775	0,0000	0,0013	0,0085	0,0847
V20	0,0021	0,0010	0,0114	0,0007	0,0248	0,0099	0,0212	0,0233
V21	0,1131	0,0173	0,0002	0,0089	0,0194	0,0020	0,0044	0,1175
V22	0,0007	0,0034	0,0025	0,0020	0,0034	0,0007	0,0002	0,0009
V23	0,0015	0,0053	0,0772	0,1396	0,0208	0,0026	0,0002	0,0016
V24	0,0243	0,0158	0,0029	0,0001	0,0133	0,0092	0,0877	0,1120
V25	0,0546	0,0000	0,0007	0,0048	0,0024	0,0004	0,0205	0,0752
V26	0,0060	0,0175	0,0066	0,0034	0,0269	0,0056	0,0234	0,0294
V27	0,0058	0,0188	0,0450	0,0691	0,0005	0,0001	0,1022	0,1080
V28	0,0000	0,0027	0,0001	0,0185	0,0082	0,0008	0,0001	0,0001
V29	0,0144	0,0046	0,0166	0,0013	0,0446	0,0055	0,0486	0,0629
V30	0,0130	0,0038	0,0103	0,0011	0,0264	0,0091	0,1323	0,1452
V31	0,0546	0,0000	0,0007	0,0048	0,0024	0,0004	0,0205	0,0752
V32	0,0060	0,0175	0,0066	0,0034	0,0269	0,0056	0,0234	0,0294
V33	0,0026	0,0004	0,0220	0,0034	0,0000	0,0568	0,0261	0,0287
V34	0,0151	0,0965	0,0799	0,0103	0,0006	0,0876	0,0271	0,0422
V35	0,0051	0,1087	0,0180	0,0019	0,0004	0,0033	0,1064	0,1115
V36	0,0005	0,0013	0,0000	0,0006	0,1080	0,0327	0,0667	0,0672

continúa...

...continuación

V37	0,0205	0,0610	0,0020	0,0001	0,0375	0,0501	0,0023	0,0228
V38	0,0233	0,0847	0,0263	0,0000	0,0755	0,0246	0,0449	0,0682
V39	0,0010	0,0001	0,0427	0,0018	0,0195	0,0130	0,0089	0,0099

	VarAcu3	VarAcu4	VarAcu5	VarAcu6	VarAcu7
V1	0,1412	0,1905	0,2065	0,2176	0,2466
V2	0,1386	0,1393	0,1395	0,1492	0,1624
V3	0,0005	0,0128	0,0181	0,0295	0,0352
V4	0,0203	0,0272	0,0290	0,0384	0,0388
V5	0,0388	0,0659	0,0737	0,0764	0,1857
V6	0,0065	0,0073	0,0122	0,0155	0,0318
V7	0,0054	0,0088	0,0107	0,0196	0,0412
V8	0,0005	0,0128	0,0181	0,0295	0,0352
V9	0,0203	0,0272	0,0290	0,0384	0,0388
V10	0,1075	0,1588	0,2083	0,2162	0,2163
V11	0,0400	0,1219	0,1895	0,1995	0,2056
V12	0,0752	0,0759	0,0807	0,0831	0,0836
V13	0,2254	0,2491	0,2514	0,2831	0,2870
V14	0,0517	0,0519	0,0751	0,0752	0,0925
V15	0,0005	0,0128	0,0181	0,0295	0,0352
V16	0,0623	0,0623	0,0740	0,0907	0,0909
V17	0,0203	0,0272	0,0290	0,0384	0,0388
V18	0,0270	0,0272	0,1095	0,1224	0,1448
V19	0,0861	0,1279	0,2054	0,2054	0,2067
V20	0,0242	0,0356	0,0363	0,0611	0,0709
V21	0,1348	0,1350	0,1439	0,1633	0,1653
V22	0,0043	0,0068	0,0088	0,0122	0,0129
V23	0,0070	0,0842	0,2238	0,2446	0,2472
V24	0,1279	0,1308	0,1309	0,1442	0,1534
V25	0,0752	0,0759	0,0807	0,0831	0,0836
V26	0,0469	0,0536	0,0570	0,0839	0,0895
V27	0,1268	0,1718	0,2409	0,2414	0,2415
V28	0,0028	0,0028	0,0214	0,0296	0,0305
V29	0,0676	0,0841	0,0855	0,1301	0,1356
V30	0,1490	0,1594	0,1604	0,1868	0,1959
V31	0,0752	0,0759	0,0807	0,0831	0,0836
V32	0,0469	0,0536	0,0570	0,0839	0,0895
V33	0,0291	0,0511	0,0545	0,0545	0,1113
V34	0,1387	0,2186	0,2289	0,2296	0,3171
V35	0,2202	0,2383	0,2402	0,2406	0,2439
V36	0,0685	0,0685	0,0691	0,1771	0,2098
V37	0,0838	0,0859	0,0860	0,1234	0,1735
V38	0,1529	0,1792	0,1793	0,2548	0,2794
V39	0,0100	0,0527	0,0545	0,0740	0,0870

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides* calculadas a partir de datos morfológicos.

	45	46	47	48	48A	49	50	51	M51	52
45	0.0000									
46	0.3333	0.0000								
47	0.2308	0.2564	0.0000							
48	0.3077	0.3333	0.3333	0.0000						
48A	0.3077	0.3333	0.3333	0.0000	0.0000					
49	0.2051	0.3333	0.2821	0.3590	0.3590	0.0000				
50	0.3333	0.1538	0.3077	0.3846	0.3846	0.3333	0.0000			
51	0.2564	0.2308	0.2821	0.3590	0.3590	0.2051	0.1795	0.0000		
M51	0.2564	0.2308	0.3333	0.3590	0.3590	0.2051	0.1282	0.0513	0.0000	
52	0.2051	0.3333	0.3846	0.3590	0.3590	0.3590	0.2821	0.3077	0.3077	0.0000
53D	0.3333	0.3077	0.3077	0.3333	0.3333	0.3333	0.1538	0.2308	0.1795	0.3846
53E	0.2308	0.2564	0.2564	0.3333	0.3333	0.2308	0.2051	0.0769	0.1282	0.2821
54	0.3846	0.2051	0.3590	0.3333	0.3333	0.2821	0.2051	0.2821	0.2821	0.3333
55	0.3333	0.2051	0.1538	0.3333	0.3333	0.3333	0.2051	0.1282	0.1795	0.3846
56	0.3333	0.3077	0.3077	0.3846	0.3846	0.3333	0.2564	0.2821	0.2308	0.4872
57	0.3590	0.3846	0.4872	0.4103	0.4103	0.3590	0.4359	0.3590	0.3590	0.3590
58	0.2821	0.2564	0.3077	0.2821	0.2821	0.3333	0.2051	0.1795	0.1795	0.3333
59	0.3077	0.1795	0.3333	0.3077	0.3077	0.2051	0.1795	0.1026	0.1026	0.3590
60	0.3333	0.2564	0.2564	0.3333	0.3333	0.3333	0.2051	0.2308	0.1795	0.3846
61	0.2821	0.3077	0.2051	0.2821	0.2821	0.2821	0.1538	0.2308	0.1795	0.3333
62	0.1538	0.2821	0.1282	0.3077	0.3077	0.1538	0.2821	0.1538	0.2051	0.3590

	53D	53E	54	55	56	57	58	59	60	61
53D	0.0000									
53E	0.1538	0.0000								
54	0.2564	0.2051	0.0000							
55	0.2051	0.1538	0.3077	0.0000						
56	0.2564	0.3077	0.3590	0.2564	0.0000					
57	0.4872	0.4359	0.4359	0.4359	0.3846	0.0000				
58	0.1538	0.2051	0.2564	0.1538	0.2564	0.4359	0.0000			
59	0.2308	0.1795	0.2308	0.1795	0.2821	0.3077	0.1795	0.0000		
60	0.0513	0.1538	0.2564	0.1538	0.2564	0.4872	0.1538	0.2308	0.0000	
61	0.1026	0.2051	0.3077	0.1538	0.2564	0.4872	0.2051	0.2308	0.1538	0.0000
62	0.2821	0.1795	0.3333	0.2308	0.2821	0.3590	0.2821	0.2051	0.2821	0.2308

62

62 0.0000

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cuadro 5. Análisis de correspondencia entre filas y columnas de la matriz de datos morfológicos.

Trace of matrix = 281.031

X2 = 595.787 df = 760 Prob = 1.0000

i	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	0.44853	15.96	15.96
2	0.40910	14.56	30.52
3	0.34881	12.41	42.93
4	0.27681	9.85	52.78
5	0.22332	7.95	60.73
6	0.20356	7.24	67.97
7	0.17928	6.38	74.35
8	0.15886	5.65	80.00
9	0.13213	4.70	84.70
10	0.09036	3.22	87.92
11	0.08770	3.12	91.04
12	0.07122	2.53	93.57
13	0.06389	2.27	95.85
14	0.04928	1.75	97.60
15	0.03484	1.24	98.84
16	0.01460	0.52	99.36
17	0.00937	0.33	99.69
18	0.00550	0.20	99.89
19	0.00315	0.11	100.00
20	0.00000	0.00	100.00

Row variables:

Variable	Rel. freq	Dist^2
1	0.04717	215.453
2	0.05189	143.905
3	0.05189	171.058
4	0.04717	319.216
5	0.04717	319.216
6	0.04717	244.855
7	0.05189	141.237
8	0.04717	131.831
9	0.05189	366.244
10	0.05660	277.942
11	0.04245	251.841
12	0.04245	166.581
13	0.05189	317.383
14	0.04245	188.590
15	0.04245	850.545
16	0.05660	634.109
17	0.04245	254.022
18	0.04717	296.383
19	0.04245	251.841
20	0.04245	193.679
21	0.04717	141.253

continúa...

...continuación

Column variables:

Variable	Rel. freq	Dist^2	Variable	Rel. freq	Dist^2
1	0.07075	0.42618	21	0.01887	432.677
2	0.02358	308.582	22	0.00472	2.020.000
3	0.00472	2.255.556	23	0.02358	279.030
4	0.00472	1.666.667	24	0.07547	0.35930
5	0.07547	0.34382	25	0.01415	585.253
6	0.00943	911.818	26	0.00943	783.333
7	0.00472	1.827.273	27	0.03774	157.137
8	0.00472	2.255.556	28	0.08962	0.12587
9	0.00472	1.666.667	29	0.01887	373.788
10	0.02358	309.867	30	0.07075	0.45235
11	0.02358	279.030	31	0.01415	585.253
12	0.00943	960.000	32	0.00943	783.333
13	0.05189	0.84055	33	0.01887	462.121
14	0.01887	435.354	34	0.03774	164.498
15	0.00472	2.255.556	35	0.04245	129.343
16	0.01415	685.185	36	0.02358	353.980
17	0.00472	1.666.667	37	0.02830	255.713
18	0.01887	435.354	38	0.03302	187.780
19	0.02358	319.289	39	0.01415	593.580
20	0.01887	435.354			

ANEXO B ANALISIS ESTADISTICOS DE ISOENZIMAS

Cuadro 1. Matriz de datos de isoenzimas

	MC45	MC46	MC47	MC48	MC48A	MC49	MC50	MC51	MCM51	MC52	MC53	DMC53E	MC54	MC55
Mdh1-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Mdh1-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mdh2-1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
Mdh2-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mdh3-1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mdh3-2	2	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Mdh3-3	3	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Adh1-1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Adh2-1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
Adh2-2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Gdh1-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gdh1-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gdh1-3	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Cat1-4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Car2-1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Cat2-2	2	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Idh1-1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Idh1-2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Idh2-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Idh2-2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Idh2-3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Idh2-4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Idh2-5	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Est1-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est1-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est1-3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est1-4	4	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Est2-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Est2-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est3-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est3-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est3-3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Est4-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Acp1-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Acp1-2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Acp1-3	3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Acp1-4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acp2-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acp2-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acp2-3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Acp2-4	4	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Got1-1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Got1-2	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Got1-3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

continúa...

...continuación

	MC56	MC57	MC58	MC59	MC60	MC61	MC62
Mdh1-1	0	0	0	0	0	1	0
Mdh1-2	0	1	0	0	0	0	0
Mdh2-1	1	0	1	1	0	0	0
Mdh2-2	0	1	0	0	0	0	0
Mdh3-1	0	0	0	0	0	0	1
Mdh3-2	1	0	0	1	0	0	0
Mdh3-3	0	0	0	1	0	0	1
Adh1-1	0	0	0	0	0	0	0
Adh2-1	0	0	1	1	0	0	0
Adh2-2	0	0	0	0	0	1	1
Gdh1-1	0	0	0	0	0	0	0
Gdh1-2	1	1	0	1	0	0	1
Gdh1-3	0	0	0	0	0	0	0
Cat1-1	0	0	0	1	0	0	1
Car2-1	0	1	0	0	1	0	1
Cat2-2	0	0	0	0	0	0	0
Idh1-1	1	0	0	1	1	1	0
Idh1-2	0	1	0	0	0	0	0
Idh2-1	1	0	0	0	0	0	0
Idh2-2	0	0	0	0	0	1	1
Idh2-3	1	0	1	1	1	1	1
Idh2-4	0	0	0	0	0	0	0
Idh2-5	0	0	0	0	0	0	0
Est1-1	1	1	1	1	0	0	0
Est1-2	0	0	0	0	1	1	0
Est1-3	0	0	0	0	1	1	0
Est1-4	0	0	1	1	1	1	1
Est2-1	1	0	1	1	1	1	1
Est2-2	1	0	0	0	0	1	1
Est3-1	0	0	0	0	0	1	1
Est3-2	0	0	0	0	0	1	0
Est3-3	1	1	0	0	0	0	0
Est4-1	0	0	0	1	1	1	1
Acp1-1	0	0	1	0	0	0	0
Acp1-2	0	0	0	0	0	0	0
Acp1-3	1	0	0	1	1	0	1
Acp1-4	0	0	0	1	0	0	0
Acp2-1	1	0	1	0	0	0	0
Acp2-2	0	0	1	0	0	0	0
Acp2-3	1	0	0	0	0	0	0
Acp2-4	0	1	0	0	0	0	0
Got1-1	1	1	0	1	0	1	0
Got1-2	0	0	0	1	1	1	1
Got1-3	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 2. Matriz de valores característicos de los primeros 10 componentes principales calculados a partir de los alelos de isoenzimas.

	Eigenvalue	Diferencia	Proporci	Acumulado	Raiz
CP1	1,6296	0,5337	0,2295	0,2295	1,2766
CP2	1,0959	0,4046	0,1544	0,3839	1,0469
CP3	0,6913	0,0886	0,0974	0,4812	0,8314
CP4	0,6027	0,0660	0,0849	0,5661	0,7763
CP5	0,5366	0,0575	0,0756	0,6417	0,7326
CP6	0,4791	0,1254	0,0675	0,7092	0,6922
CP7	0,3537	0,0714	0,0498	0,7590	0,5948
CP8	0,2823	0,0140	0,0398	0,7988	0,5313
CP9	0,2683	0,0192	0,0378	0,8366	0,5180
CP10	0,2491	,	0,0351	0,8716	0,4991

Cuadro 3. Análisis de componentes principales, coeficientes de correlación y determinación, y varianza acumulada de las variables isoenzimáticas de *C. gloeosporioides*.

Eigenvector	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10
V1	0,2695	0,0896	-0,0967	0,0659	-0,1041	0,0571	-0,0354	0,0104	0,1307	-0,0799
V2	-0,0580	0,0836	0,1043	-0,2030	-0,2124	0,0629	0,1468	0,0524	0,0428	-0,0544
V3	-0,2451	0,1365	-0,0662	0,3155	0,2450	0,0171	-0,0669	-0,1829	0,0411	0,1947
V4	-0,0580	0,0836	0,1043	-0,2030	-0,2124	0,0629	0,1468	0,0524	0,0428	-0,0544
V5	-0,0597	-0,3966	0,0606	0,0750	-0,0837	0,0012	-0,0291	0,0736	0,0055	0,0649
V6	0,0326	0,2490	-0,2353	0,3431	0,1920	-0,1722	-0,0095	0,1690	-0,2440	-0,0711
V7	-0,1754	-0,1603	-0,1423	-0,0073	0,0942	0,1309	0,4087	0,3268	-0,0301	-0,2747
V8	-0,2758	-0,0897	-0,3275	0,0555	-0,1270	-0,0842	0,0045	0,0729	0,2575	0,0635
V9	-0,1703	0,1900	-0,1912	-0,1258	0,2096	0,1673	0,2988	-0,1692	-0,0549	0,0720
V10	0,3417	-0,0517	0,0005	-0,0611	-0,0006	-0,0605	0,0039	0,0842	-0,2119	0,1953
V11	0,2031	0,0955	-0,1033	0,1093	-0,1412	0,0437	-0,0387	0,0171	-0,0690	-0,1282
V12	-0,0318	0,0542	0,3809	0,0967	0,0844	0,0319	0,2619	0,1376	-0,1672	-0,0550
V13	-0,0294	0,0336	-0,0728	-0,0217	0,0560	-0,0988	0,0426	-0,1227	-0,0250	0,0822
V14	0,1835	-0,0105	0,0043	0,3017	-0,1415	0,1836	0,2673	-0,0475	-0,1916	0,1036
V15	-0,0159	-0,0345	0,1656	-0,1975	0,0766	-0,3908	0,3159	-0,2324	0,0304	0,1372
V16	-0,1125	-0,2458	-0,0731	0,1681	-0,1736	0,0867	-0,1315	0,0480	0,1298	-0,1484
V17	0,1411	0,2937	-0,2268	0,0003	0,1936	0,0657	0,2268	0,2463	0,0874	0,0708
V18	-0,0553	0,0713	0,1418	-0,0106	-0,1579	-0,1986	-0,0546	-0,1019	0,0130	-0,1045
V19	-0,0185	0,0588	0,1216	0,0795	0,0876	0,0452	-0,1143	0,1769	0,0286	0,0748
V20	0,3417	-0,0517	0,0005	-0,0611	-0,0006	-0,0605	0,0039	0,0842	-0,2119	0,1953
V21	0,0228	-0,0625	-0,1567	0,0629	0,1255	0,0843	-0,0542	0,0433	-0,0306	0,1311
V22	-0,0642	-0,0179	-0,0474	-0,0278	-0,2094	0,2162	0,0766	0,0270	0,1160	0,3073
V23	0,0194	0,0096	-0,0365	-0,0339	0,0136	-0,0322	-0,0631	0,0482	-0,2183	0,0619

continúa...

...continuación

V24	-0,0807	0,1640	0,3267	0,0558	0,0926	0,1847	-0,0061	-0,1190	-0,1409	-0,1696
V25	0,2128	0,0089	-0,0806	-0,1601	0,1497	-0,0678	-0,1048	0,1245	0,3629	0,0063
V26	0,2843	0,0669	-0,0964	0,0158	-0,0692	0,0171	-0,0377	-0,0276	0,2261	-0,1691
V27	0,0099	-0,2082	-0,1412	-0,2971	0,3446	0,1916	0,0752	-0,0667	-0,0470	-0,1947
V28	-0,1013	-0,1368	-0,0818	-0,0227	0,2984	0,1090	-0,0450	-0,0710	0,1216	0,1993
V29	0,1008	-0,0980	0,2618	-0,0570	0,2147	-0,0269	-0,0087	0,1958	0,1040	0,3364
V30	0,1982	-0,1356	0,1119	-0,1127	0,1587	-0,0036	0,0762	-0,0783	0,1585	0,2016
V31	0,2119	0,0505	-0,0445	0,0535	-0,0112	0,0799	0,0090	-0,1046	0,2581	-0,0928
V32	-0,0764	0,1710	0,2164	-0,0167	0,0508	-0,0616	-0,0695	0,2983	0,1633	-0,0919
V33	0,1377	-0,2237	-0,1883	0,2215	-0,0119	-0,2173	0,1200	-0,1759	-0,0696	0,0465
V34	-0,0613	0,0527	-0,0281	-0,2048	-0,0389	0,2789	-0,0505	-0,1223	-0,0938	0,0455
V35	-0,0642	-0,0179	-0,0474	-0,0278	-0,2094	0,2162	0,0766	0,0270	0,1160	0,3073
V36	-0,1091	-0,3405	0,1916	0,2604	0,0890	-0,0160	-0,0574	0,1192	0,0177	-0,0049
V37	-0,0423	-0,0278	0,0290	0,2161	-0,0400	0,1611	0,1811	-0,1034	0,0097	0,1485
V38	0,0343	0,1116	0,1177	0,0386	0,1672	0,2454	-0,2869	-0,1382	0,0057	-0,0165
V39	0,0528	0,0528	-0,0040	-0,0409	0,0796	0,2002	-0,1726	-0,3152	-0,0228	-0,0913
V40	-0,0535	0,1085	0,0596	0,0462	0,1763	0,0227	-0,1237	0,3415	0,1327	0,0392
V41	-0,1510	0,1974	-0,0453	-0,0354	0,0080	-0,4022	0,0976	-0,1140	0,1460	0,0041
V42	0,0971	0,1868	0,2106	0,3166	-0,0680	0,1195	0,2489	-0,1283	0,3807	0,0614
V43	0,2128	-0,2514	0,0568	0,0735	0,1874	0,0568	0,2491	-0,0848	0,1596	-0,3407
V44	0,0225	0,0602	-0,1047	-0,1277	-0,1797	0,1243	0,0482	0,2106	-0,1152	0,0896

	CoeCorr 1	CoeCorr 2	CoeCorr 3	CoeCorr 4	CoeCorr 5	CoeCorr 6	CoeCorr 7	CoeCorr 8	CoeDet 1	CoeDet 2
V1	0,3441	0,0938	-0,0804	0,0512	-0,0763	0,0395	-0,0211	0,0055	0,0928	0,0084
V2	-0,0740	0,0875	0,0867	-0,1576	-0,1556	0,0435	0,0873	0,0278	0,0043	0,0073
V3	-0,3129	0,1429	-0,0550	0,2449	0,1795	0,0118	-0,0398	-0,0972	0,0767	0,0195
V4	-0,0740	0,0875	0,0867	-0,1576	-0,1556	0,0435	0,0873	0,0278	0,0043	0,0073
V5	-0,0762	-0,4152	0,0504	0,0582	-0,0613	0,0009	-0,0173	0,0391	0,0045	0,1647
V6	0,0416	0,2607	-0,1956	0,2664	0,1406	-0,1192	-0,0057	0,0898	0,0014	0,0649
V7	-0,2238	-0,1678	-0,1183	-0,0057	0,0690	0,0906	0,2431	0,1737	0,0393	0,0269
V8	-0,3521	-0,0939	-0,2723	0,0431	-0,0930	-0,0583	0,0027	0,0387	0,0971	0,0084
V9	-0,2174	0,1989	-0,1590	-0,0976	0,1535	0,1158	0,1777	-0,0899	0,0370	0,0378
V10	0,4363	-0,0541	0,0004	-0,0475	-0,0004	-0,0419	0,0023	0,0447	0,1491	0,0028
V11	0,2592	0,1000	-0,0859	0,0843	-0,1034	0,0302	-0,0230	0,0091	0,0526	0,0096
V12	-0,0405	0,0567	0,3167	0,0751	0,0618	0,0221	0,1558	0,0731	0,0013	0,0031
V13	-0,0375	0,0352	-0,0605	-0,0169	0,0411	-0,0684	0,0254	-0,0652	0,0011	0,0012
V14	0,2343	-0,0110	0,0035	0,2342	-0,1036	0,1271	0,1590	-0,0252	0,0430	0,0001
V15	-0,0203	-0,0362	0,1377	-0,1533	0,0561	-0,2705	0,1879	-0,1235	0,0003	0,0012
V16	-0,1436	-0,2573	-0,0607	0,1305	-0,1272	0,0600	-0,0782	0,0255	0,0161	0,0632
V17	0,1801	0,3075	-0,1886	0,0002	0,1418	0,0455	0,1349	0,1308	0,0254	0,0903
V18	-0,0706	0,0746	0,1179	-0,0083	-0,1157	-0,1375	-0,0325	-0,0541	0,0039	0,0053
V19	-0,0236	0,0615	0,1011	0,0617	0,0642	0,0313	-0,0680	0,0940	0,0004	0,0036
V20	0,4363	-0,0541	0,0004	-0,0475	-0,0004	-0,0419	0,0023	0,0447	0,1491	0,0028
V21	0,0291	-0,0654	-0,1303	0,0488	0,0919	0,0583	-0,0322	0,0230	0,0007	0,0041
V22	-0,0820	-0,0187	-0,0394	-0,0215	-0,1534	0,1496	0,0456	0,0144	0,0053	0,0003
V23	0,0247	0,0100	-0,0303	-0,0263	0,0100	-0,0223	-0,0375	0,0256	0,0005	0,0001
V24	-0,1030	0,1717	0,2717	0,0433	0,0678	0,1279	-0,0036	-0,0633	0,0083	0,0282
V25	0,2717	0,0093	-0,0670	-0,1243	0,1097	-0,0469	-0,0623	0,0662	0,0578	0,0001
V26	0,3629	0,0701	-0,0802	0,0123	-0,0507	0,0118	-0,0224	-0,0147	0,1032	0,0047

continúa...

...continuación

V27	0,3629	-0,2180	-0,1174	-0,2307	0,2524	0,1326	0,0447	-0,0355	0,0001	0,0454
V28	-0,1293	-0,1432	-0,0680	-0,0176	0,2186	0,0755	-0,0268	-0,0377	0,0131	0,0196
V29	0,1287	-0,1026	0,2177	-0,0442	0,1573	-0,0186	-0,0052	0,1040	0,0130	0,0101
V30	0,2531	-0,1419	0,0930	-0,0875	0,1163	-0,0025	0,0453	-0,0416	0,0502	0,0192
V31	0,2705	0,0529	-0,0370	0,0415	-0,0082	0,0553	0,0054	-0,0556	0,0573	0,0027
V32	-0,0975	0,1790	0,1799	-0,0130	0,0372	-0,0426	-0,0413	0,1585	0,0074	0,0306
V33	0,1758	-0,2342	-0,1566	0,1719	-0,0087	-0,1504	0,0714	-0,0935	0,0242	0,0524
V34	-0,0783	0,0552	-0,0233	-0,1590	-0,0285	0,1930	-0,0300	-0,0650	0,0048	0,0029
V35	-0,0820	-0,0187	-0,0394	-0,0215	-0,1534	0,1496	0,0456	0,0144	0,0053	0,0003
V36	-0,1392	-0,3564	0,1593	0,2021	0,0652	-0,0111	-0,0342	0,0633	0,0152	0,1214
V37	-0,0540	-0,0291	0,0241	0,1678	-0,0293	0,1115	0,1077	-0,0549	0,0023	0,0008
V38	0,0438	0,1168	0,0978	0,0300	0,1225	0,1699	-0,1707	-0,0734	0,0015	0,0130
V39	0,0674	0,0553	-0,0033	-0,0317	0,0583	0,1386	-0,1026	-0,1674	0,0036	0,0029
V40	-0,0683	0,1136	0,0496	0,0358	0,1291	0,0157	-0,0736	0,1815	0,0037	0,0123
V41	-0,1928	0,2067	-0,0376	-0,0275	0,0058	-0,2784	0,0580	-0,0606	0,0291	0,0408
V42	0,1239	0,1955	0,1751	0,2458	-0,0498	0,0827	0,1481	-0,0682	0,0120	0,0365
V43	0,2716	-0,2632	0,0473	0,0570	0,1373	0,0393	0,1482	-0,0451	0,0578	0,0662
V44	0,0287	0,0630	-0,0870	-0,0991	-0,1316	0,0861	0,0286	0,1119	0,0006	0,0038

	CoeDet3	CoeDet4	CoeDet5	CoeDet6	CoeDet7	CoeDet8	VarAcu1	VarAcu2	VarAcu3	VarAcu4
V1	0,0078	0,0034	0,0079	0,0023	0,0007	0,0001	0,0928	0,1012	0,1089	0,1123
V2	0,0090	0,0320	0,0330	0,0027	0,0128	0,0015	0,0043	0,0116	0,0207	0,0526
V3	0,0036	0,0773	0,0440	0,0002	0,0027	0,0178	0,0767	0,0962	0,0998	0,1771
V4	0,0090	0,0320	0,0330	0,0027	0,0128	0,0015	0,0043	0,0116	0,0207	0,0526
V5	0,0031	0,0044	0,0051	0,0000	0,0005	0,0029	0,0045	0,1692	0,1723	0,1766
V6	0,0460	0,0914	0,0270	0,0205	0,0001	0,0152	0,0014	0,0663	0,1123	0,2037
V7	0,0168	0,0000	0,0065	0,0119	0,0993	0,0568	0,0393	0,0662	0,0830	0,0830
V8	0,0892	0,0024	0,0118	0,0049	0,0000	0,0028	0,0971	0,1055	0,1947	0,1971
V9	0,0304	0,0123	0,0322	0,0194	0,0531	0,0152	0,0370	0,0748	0,1052	0,1175
V10	0,0000	0,0029	0,0000	0,0025	0,0000	0,0038	0,1491	0,1519	0,1519	0,1548
V11	0,0089	0,0093	0,0146	0,0013	0,0009	0,0002	0,0526	0,0622	0,0711	0,0803
V12	0,1206	0,0073	0,0052	0,0007	0,0408	0,0101	0,0013	0,0044	0,1250	0,1322
V13	0,0044	0,0004	0,0023	0,0068	0,0011	0,0080	0,0011	0,0023	0,0067	0,0071
V14	0,0000	0,0706	0,0147	0,0233	0,0425	0,0012	0,0430	0,0431	0,0431	0,1138
V15	0,0228	0,0303	0,0043	0,1057	0,0593	0,0287	0,0003	0,0016	0,0244	0,0546
V16	0,0044	0,0219	0,0221	0,0052	0,0103	0,0012	0,0161	0,0794	0,0838	0,1058
V17	0,0428	0,0000	0,0275	0,0030	0,0306	0,0322	0,0254	0,1157	0,1585	0,1585
V18	0,0167	0,0001	0,0183	0,0273	0,0018	0,0055	0,0039	0,0092	0,0260	0,0260
V19	0,0123	0,0049	0,0056	0,0014	0,0078	0,0166	0,0004	0,0041	0,0164	0,0213
V20	0,0000	0,0029	0,0000	0,0025	0,0000	0,0038	0,1491	0,1519	0,1519	0,1548
V21	0,0204	0,0031	0,0115	0,0049	0,0017	0,0010	0,0007	0,0048	0,0252	0,0282
V22	0,0019	0,0006	0,0321	0,0323	0,0035	0,0004	0,0053	0,0056	0,0075	0,0081
V23	0,0011	0,0009	0,0001	0,0007	0,0024	0,0012	0,0005	0,0006	0,0017	0,0026
V24	0,0888	0,0024	0,0063	0,0236	0,0000	0,0075	0,0083	0,0365	0,1252	0,1277
V25	0,0054	0,0199	0,0164	0,0032	0,0065	0,0082	0,0578	0,0579	0,0633	0,0832
V26	0,0077	0,0002	0,0035	0,0002	0,0008	0,0004	0,1032	0,1079	0,1156	0,1158
V27	0,0077	0,0685	0,0870	0,0254	0,0034	0,0024	0,0001	0,0455	0,0621	0,1306
V28	0,0056	0,0004	0,0652	0,0082	0,0012	0,0027	0,0131	0,0327	0,0383	0,0387

continúa...

...continuación

V29	0,0570	0,0025	0,0338	0,0005	0,0000	0,0204	0,0130	0,0230	0,0800	0,0826
V30	0,0104	0,0099	0,0185	0,0000	0,0035	0,0033	0,0502	0,0694	0,0798	0,0897
V31	0,0016	0,0022	0,0001	0,0044	0,0000	0,0058	0,0573	0,0600	0,0616	0,0638
V32	0,0389	0,0002	0,0019	0,0026	0,0029	0,0473	0,0074	0,0380	0,0770	0,0772
V33	0,0295	0,0381	0,0001	0,0327	0,0086	0,0164	0,0242	0,0766	0,1061	0,1441
V34	0,0007	0,0325	0,0011	0,0538	0,0015	0,0079	0,0048	0,0077	0,0084	0,0409
V35	0,0019	0,0006	0,0321	0,0323	0,0035	0,0004	0,0053	0,0056	0,0075	0,0081
V36	0,0305	0,0526	0,0058	0,0002	0,0020	0,0075	0,0152	0,1365	0,1671	0,2197
V37	0,0007	0,0363	0,0012	0,0180	0,0195	0,0057	0,0023	0,0031	0,0038	0,0400
V38	0,0115	0,0012	0,0205	0,0417	0,0490	0,0102	0,0015	0,0145	0,0261	0,0272
V39	0,0000	0,0013	0,0046	0,0277	0,0177	0,0528	0,0036	0,0065	0,0065	0,0078
V40	0,0030	0,0017	0,0228	0,0004	0,0091	0,0620	0,0037	0,0160	0,0189	0,0206
V41	0,0017	0,0010	0,0000	0,1120	0,0057	0,0069	0,0291	0,0699	0,0716	0,0726
V42	0,0369	0,0778	0,0034	0,0099	0,0369	0,0087	0,0120	0,0486	0,0854	0,1632
V43	0,0027	0,0042	0,0257	0,0022	0,0369	0,0038	0,0578	0,1240	0,1267	0,1308
V44	0,0091	0,0127	0,0237	0,0107	0,0014	0,0236	0,0006	0,0044	0,0135	0,0262

	VarAcu5	VarAcu6	VarAcu7	VarAcu8
V1	0,1202	0,1225	0,1232	0,1233
V2	0,0857	0,0884	0,1012	0,1027
V3	0,2211	0,2213	0,2239	0,2417
V4	0,0857	0,0884	0,1012	0,1027
V5	0,1818	0,1818	0,1823	0,1851
V6	0,2307	0,2512	0,2512	0,2664
V7	0,0895	0,1014	0,2008	0,2575
V8	0,2089	0,2138	0,2138	0,2166
V9	0,1497	0,1690	0,2221	0,2374
V10	0,1548	0,1573	0,1573	0,1611
V11	0,0949	0,0963	0,0971	0,0973
V12	0,1375	0,1382	0,1790	0,1890
V13	0,0094	0,0161	0,0172	0,0252
V14	0,1284	0,1518	0,1943	0,1955
V15	0,0589	0,1647	0,2240	0,2527
V16	0,1278	0,1330	0,1433	0,1446
V17	0,1860	0,1889	0,2195	0,2518
V18	0,0443	0,0716	0,0734	0,0789
V19	0,0269	0,0283	0,0361	0,0527
V20	0,1548	0,1573	0,1573	0,1611
V21	0,0398	0,0447	0,0464	0,0474
V22	0,0402	0,0725	0,0760	0,0764
V23	0,0027	0,0034	0,0058	0,0070
V24	0,1339	0,1576	0,1576	0,1651
V25	0,0996	0,1028	0,1093	0,1176
V26	0,1193	0,1195	0,1204	0,1208
V27	0,1193	0,2430	0,2464	0,2488
V28	0,1039	0,1121	0,1133	0,1160
V29	0,1163	0,1168	0,1169	0,1372
V30	0,1081	0,1081	0,1116	0,1148
V31	0,0639	0,0684	0,0684	0,0742
V32	0,0791	0,0817	0,0846	0,1318

continúa...

...continuación

V33	0,1442	0,1769	0,1855	0,2019
V34	0,0420	0,0959	0,0974	0,1053
V35	0,0402	0,0725	0,0760	0,0764
V36	0,2255	0,2257	0,2276	0,2352
V37	0,0412	0,0592	0,0787	0,0844
V38	0,0477	0,0894	0,1383	0,1485
V39	0,0124	0,0402	0,0579	0,1107
V40	0,0434	0,0437	0,0528	0,1148
V41	0,0726	0,1846	0,1903	0,1972
V42	0,1666	0,1765	0,2134	0,2221
V43	0,1566	0,1588	0,1957	0,1995
V44	0,0499	0,0606	0,0619	0,0855

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides* calculadas con los datos isoenzimáticos.

	MC45	MC46	MC47	MC48	MC48A	MC49	MC50	MC51	MCM51	MC52
MC45	1.000									
MC46	0.375	1.000								
MC47	0.471	0.500	1.000							
MC48	0.438	0.357	0.833	1.000						
MC48A	0.467	0.385	0.750	0.900	1.000					
MC49	0.250	0.500	0.412	0.294	0.313	1.000				
MC50	0.158	0.286	0.313	0.267	0.286	0.400	1.000			
MC51	0.316	0.500	0.412	0.294	0.313	0.714	0.313	1.000		
MCM51	0.238	0.158	0.250	0.278	0.294	0.316	0.222	0.316	1.000	
MC52	0.182	0.375	0.389	0.278	0.294	0.563	0.294	0.563	0.368	1.000
MC53D	0.136	0.167	0.143	0.100	0.105	0.200	0.400	0.200	0.136	0.190
MC53E	0.182	0.158	0.190	0.150	0.100	0.190	0.375	0.250	0.083	0.130
MC54	0.185	0.167	0.240	0.208	0.167	0.240	0.400	0.240	0.143	0.231
MC55	0.227	0.278	0.238	0.143	0.150	0.238	0.211	0.300	0.125	0.350
MC56	0.048	0.125	0.000	0.000	0.000	0.105	0.000	0.167	0.100	0.100
MC57	0.158	0.200	0.235	0.188	0.200	0.313	0.200	0.235	0.294	0.294
MC58	0.381	0.316	0.474	0.368	0.316	0.400	0.316	0.474	0.261	0.381
MC59	0.211	0.267	0.375	0.429	0.357	0.375	0.357	0.294	0.211	0.275
MC60	0.167	0.143	0.227	0.250	0.200	0.227	0.412	0.227	0.167	0.217
MC61	0.273	0.200	0.421	0.471	0.412	0.227	0.333	0.227	0.167	0.167
MC62	0.238	0.222	0.389	0.438	0.375	0.250	0.375	0.190	0.130	0.182
	MC53D	MC53E	MC54	MC55	MC56	MC57	MC58	MC59	MC60	MC61
MC53D	1.000									
MC53E	0.667	1.000								
MC54	0.550	0.684	1.000							
MC55	0.130	0.174	0.222	1.000						
MC56	0.000	0.048	0.037	0.211	1.000					
MC57	0.050	0.048	0.217	0.278	0.059	1.000				
MC58	0.217	0.318	0.346	0.429	0.136	0.316	1.000			
MC59	0.294	0.278	0.381	0.200	0.056	0.188	0.368	1.000		
MC60	0.421	0.556	0.700	0.208	0.043	0.143	0.292	0.471	1.000	
MC61	0.227	0.273	0.360	0.208	0.091	0.143	0.409	0.389	0.429	1.000
MC62	0.250	0.238	0.391	0.174	0.048	0.158	0.261	0.533	0.556	0.750

Cuadro 5. Análisis de correspondencia entre filas y columnas de la matriz de datos isoenzimáticos.

		Trace of matrix = 1.79380	
X2		= 599.130	df = 860 Prob = 1.0000
i	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	0.33235	18.53	18.53
2	0.28490	15.88	34.41
3	0.19498	10.87	45.28
4	0.16457	9.17	54.45
5	0.15012	8.37	62.82
6	0.11515	6.42	69.24
7	0.09845	5.49	74.73
8	0.07623	4.25	78.98
9	0.06609	3.68	82.66
10	0.06059	3.38	86.04
11	0.05164	2.88	88.92
12	0.04597	2.56	91.48
13	0.03943	2.20	93.68
14	0.03448	1.92	95.60
15	0.02723	1.52	97.12
16	0.01691	0.94	98.07
17	0.01344	0.75	98.81
18	0.01140	0.64	99.45
19	0.00793	0.44	99.89
20	0.00194	0.11	100.00

Column variables:		
Variable	Rel. freq	Dist^2
MC45	0.26946	0.48412
MC46	0.03892	2.19667
MC47	0.02695	2.64875
MC48	0.03593	1.56724
MC48A	0.02994	2.10590
MC49	0.02695	2.42210
MC50	0.03593	1.89192
MC51	0.02695	2.26927
MCM51	0.03593	1.64419
MC52	0.03892	2.99322
MC53D	0.03892	1.70378
MC53E	0.03593	2.64736
MC54	0.03892	2.24270
MC55	0.05689	1.44995
MC56	0.04192	2.80459
MC57	0.02695	5.89534
MC58	0.02695	4.92138
MC59	0.04790	1.19263
MC60	0.02994	2.06316
MC61	0.04491	1.78812
MC62	0.04491	1.73054

continúa...

...continuación

Row variables:		
Variable	Rel. freq	Dist^2
Mdh1	0.01497	2.88329
Mdh1	0.01198	3.85299
Mdh2	0.02994	1.57550
Mdh2	0.01198	3.85299
Mdh3	0.01796	3.16707
Mdh3	0.03892	0.85855
Mdh3	0.03293	1.10003
Adh1	0.02994	1.71910
Adh2	0.02096	2.44385
Adh2	0.02395	1.61865
Gdh1	0.01198	3.67598
Gdh1	0.01796	2.30429
Gdh1	0.01198	2.82708
Cat1	0.02096	1.93163
Car2	0.01796	3.22654
Cat2	0.01796	2.85781
Idh1	0.03892	0.88980
Idh1	0.01198	4.56667
Idh2	0.00599	5.89206
Idh2	0.02395	1.61865
Idh2	0.06587	0.17684
Idh2	0.01796	2.07673
Idh2	0.01796	2.60802
Est1	0.01497	3.90662
Est1	0.02096	1.89012
Est1	0.02395	1.50268
Est1	0.05090	0.47941
Est2	0.05389	0.50116
Est2	0.01497	2.32940
Est3	0.01198	3.11396
Est3	0.01497	2.21529
Est3	0.01796	2.33502
Est4	0.04790	0.67012
Acp1	0.00898	6.39050
Acp1	0.01198	3.13932
Acp1	0.03593	1.04824
Acp1	0.01796	1.94292
Acp2	0.01198	4.14114
Acp2	0.01198	3.34591
Acp2	0.01497	2.31798
Acp2	0.02695	1.65381
Got1	0.02695	1.52615
Got1	0.02994	1.18157
Got1	0.01497	2.47703

Cuadro 2. Matriz de valores característicos de los primeros 15 componentes principales calculados para las bandas RAPD.

	Eigenvalue	Differen	Proporti	Cumulati	Raiz
CP1	18,021	2,84812	0,193772	0,193772	4,2451
CP2	15,173	4,66673	0,163147	0,356918	3,8952
CP3	10,506	2,92204	0,112967	0,469885	3,2413
CP4	7,584	1,35495	0,081547	0,551432	2,7539
CP5	6,229	0,46370	0,066978	0,618409	2,4958
CP6	5,765	0,53330	0,061992	0,680401	2,4011
CP7	5,232	0,68533	0,056257	0,736658	2,2873
CP8	4,547	0,84564	0,048888	0,785546	2,1323
CP9	3,701	0,25475	0,039795	0,825341	1,9238
CP10	3,446	0,70722	0,037056	0,862397	1,8564
CP11	2,739	0,51003	0,029451	0,891849	1,6550
CP12	2,229	0,48574	0,023967	0,915816	1,4930
CP13	1,743	0,34993	0,018744	0,93456	1,3203
CP14	1,393	0,02033	0,014982	0,949542	1,1804
CP15	1,373	,	0,014763	0,964305	1,1718

Cuadro 3. Análisis de componentes principales, coeficientes de determinación y varianza acumulada de las variables de RAPD de *C. gloeosporioides*.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CoeCorr1	CoeCorr2
V1	-0,1175	0,0349	0,2095	0,1275	-0,1152	-0,0122	-0,0026	0,0448	0,0105	0,0586	-0,4989	0,1358
V2	-0,0978	-0,0814	0,1121	0,1477	-0,0495	-0,0093	-0,0338	0,1430	0,1383	0,1830	-0,4152	-0,3172
V3	-0,0484	0,0336	0,2446	-0,1118	0,0951	0,0667	-0,0799	0,0843	0,0847	0,0440	-0,2056	0,1308
V4	-0,1043	-0,0537	0,2306	0,1333	-0,0045	-0,0086	0,0171	0,0395	0,0657	0,0118	-0,4429	-0,2090
V5	-0,0654	0,1385	0,1950	-0,0914	-0,0635	0,0508	-0,0912	0,0805	0,0046	0,0983	0,2775	0,5395
V6	-0,1329	-0,0133	0,0374	0,1764	0,0912	-0,0417	-0,0610	0,1217	0,1797	0,1238	-0,5643	-0,0516
V7	-0,0565	-0,0280	0,1089	-0,0808	0,0361	0,0498	-0,1946	0,2038	0,1829	0,2241	-0,2398	-0,1091
V8	-0,0484	0,0336	0,2446	-0,1118	0,0951	0,0667	-0,0799	0,0843	0,0847	0,0440	-0,2056	0,1308
V9	-0,1105	0,1598	-0,0141	0,0035	0,0305	-0,0123	-0,1772	0,1273	0,1082	0,1537	-0,4690	0,6226
V10	-0,0920	0,0947	0,1351	-0,0435	0,2315	0,0185	-0,1016	0,0643	0,1343	-0,0072	-0,3905	0,3690
V11	0,1377	0,0631	0,0858	-0,0426	0,1096	0,0009	0,2472	0,0865	0,0082	0,0706	0,5847	0,2456
V12	-0,0823	0,2221	0,0586	0,0080	0,0663	-0,0170	-0,0074	-0,0500	-0,0434	-0,0822	-0,3496	0,8652
V13	0,1814	0,0579	0,0886	0,0191	0,1241	0,0433	0,1116	0,0383	-0,0669	0,0708	0,7700	0,2257
V14	0,1107	-0,0108	0,1366	0,1974	0,0574	-0,0057	0,1668	0,0203	-0,0569	0,0510	0,4698	-0,0421
V15	0,1504	0,1219	0,0558	-0,0054	0,0090	0,0240	0,0928	0,0770	-0,1612	0,0855	0,6385	0,4746
V16	-0,0559	-0,0006	0,2094	-0,1260	0,0678	0,0378	-0,0927	0,0430	0,0527	0,0252	-0,2374	-0,0023
V17	-0,1102	-0,0729	0,2207	0,1007	-0,0135	-0,0222	-0,0038	0,0158	0,0477	0,0020	-0,4679	-0,2839
V18	-0,0906	-0,1089	0,0710	0,1994	-0,0866	-0,0755	0,0554	-0,0449	-0,0084	-0,0306	-0,3847	-0,4243
V19	0,2080	0,0165	-0,0125	0,0397	0,0301	-0,1292	-0,0132	-0,0003	0,0968	0,0970	0,8828	0,0644
V20	0,2080	0,0165	-0,0125	0,0397	0,0301	-0,1292	-0,0132	-0,0003	0,0968	0,0970	0,8828	0,0644
V21	0,2080	0,0165	-0,0125	0,0397	0,0301	-0,1292	-0,0132	-0,0003	0,0968	0,0970	0,8828	0,0644
V22	0,2080	0,0165	-0,0125	0,0397	0,0301	-0,1292	-0,0132	-0,0003	0,0968	0,0970	0,8828	0,0644

continua...

...continuación

V23	-0,0823	0,2221	0,0586	0,0080	0,0663	-0,0170	-0,0074	-0,0500	-0,0434	-0,0822	-0,3496	0,8652
V24	-0,0369	0,1854	0,1535	-0,0503	-0,1019	0,0244	0,0325	-0,0519	-0,1272	-0,0454	-0,1568	0,7223
V25	0,1330	0,1146	0,0903	-0,0262	-0,0018	-0,1609	-0,0382	-0,0747	-0,1097	0,1147	0,5645	0,4462
V26	0,2080	0,0165	-0,0125	0,0397	0,0301	-0,1292	-0,0132	-0,0003	0,0968	0,0970	0,8828	0,0644
V27	0,2080	0,0165	-0,0125	0,0397	0,0301	-0,1292	-0,0132	-0,0003	0,0968	0,0970	0,8828	0,0644
V28	0,1809	0,0373	0,0102	0,1218	0,0079	0,0784	-0,0778	-0,0138	0,1112	-0,0267	0,7680	0,1454
V29	-0,0929	0,1507	0,0510	0,0136	0,0105	-0,0359	-0,0047	-0,0909	-0,0538	-0,2040	-0,3943	0,5874
V30	0,1463	0,0445	0,1424	0,0875	0,0512	-0,0008	0,0094	-0,0893	0,0426	-0,0846	0,6209	0,1734
V31	0,1392	0,1316	-0,0001	0,1107	-0,1206	0,0652	-0,0908	-0,0037	0,0399	0,0309	0,5908	0,5125
V32	-0,0844	0,1094	-0,1153	0,0826	0,2494	-0,0616	-0,0569	-0,0106	0,1040	-0,0724	-0,3582	0,4260
V33	0,1435	0,0560	0,0968	0,0300	0,0323	0,1472	-0,0544	-0,0022	0,0970	-0,2166	0,6090	0,2183
V34	-0,0907	0,2109	-0,0958	0,0628	0,0102	-0,0509	-0,0701	0,0039	-0,0037	0,0206	-0,3851	0,8214
V35	0,0274	0,1781	0,1197	0,0021	-0,1297	0,0909	0,0889	0,0131	0,0593	-0,1055	0,1162	0,6937
V36	0,0250	-0,0225	0,1658	0,2606	-0,0357	0,0673	0,0248	-0,0614	0,0263	-0,1435	0,1060	-0,0877
V37	0,0281	0,0170	0,0660	0,2345	0,0887	0,0165	0,0381	-0,1937	0,1633	-0,0430	0,1195	0,0664
V38	0,0594	0,0755	0,1783	-0,0571	0,1005	-0,0282	0,0963	-0,0760	0,0067	-0,0750	0,2520	0,2941
V39	-0,0297	0,1406	-0,1285	0,0152	-0,0540	0,1760	0,0004	-0,0536	0,2327	-0,0491	-0,1259	0,5476
V40	-0,0419	0,0164	0,1999	0,0625	0,0489	0,0115	0,1412	-0,0695	-0,0013	-0,1195	-0,1778	0,0637
V41	-0,0907	0,2109	-0,0958	0,0628	0,0102	-0,0509	-0,0701	0,0039	-0,0037	0,0206	-0,3851	0,8214
V42	0,1588	0,1246	0,0041	0,0828	-0,0995	-0,0041	-0,0547	-0,0086	0,0385	0,0993	0,6741	0,4855
V43	-0,0707	0,0923	0,0082	0,1218	-0,2359	-0,0343	-0,0078	0,0403	-0,0937	0,1296	-0,3000	0,3596
V44	-0,0907	0,2109	-0,0958	0,0628	0,0102	-0,0509	-0,0701	0,0039	-0,0037	0,0206	-0,3851	0,8214
V45	0,1392	0,1316	-0,0001	0,1107	-0,1206	0,0652	-0,0908	-0,0037	0,0399	0,0309	0,5908	0,5125
V46	-0,0844	0,1094	-0,1153	0,0826	0,2494	-0,0616	-0,0569	-0,0106	0,1040	-0,0724	-0,3582	0,4260
V47	-0,0407	0,1813	-0,0168	0,0039	-0,2353	-0,0086	-0,0397	0,0160	-0,1091	0,1008	-0,1726	0,7062
V48	-0,0864	-0,0935	0,0755	0,2560	-0,0852	-0,0665	0,0878	-0,0227	0,0089	-0,0226	-0,3667	-0,3641
V49	-0,1227	-0,0240	0,0048	0,2729	0,0593	-0,0926	0,0474	-0,0259	0,0644	-0,0594	-0,5210	-0,0934
V50	0,0959	0,0371	-0,0149	0,0729	-0,0727	0,1157	0,1013	0,0931	0,2728	-0,1107	0,4070	0,1443
V51	0,1093	-0,0055	0,0142	0,1327	0,0421	0,0941	-0,2774	-0,0987	-0,1654	0,0068	0,4640	-0,0214
V52	-0,0907	0,2109	-0,0958	0,0628	0,0102	-0,0509	-0,0701	0,0039	-0,0037	0,0206	-0,3851	0,8214
V53	0,1093	-0,0055	0,0142	0,1327	0,0421	0,0941	-0,2774	-0,0987	-0,1654	0,0068	0,4640	-0,0214
V54	0,1093	-0,0055	0,0142	0,1327	0,0421	0,0941	-0,2774	-0,0987	-0,1654	0,0068	0,4640	-0,0214
V55	0,1093	-0,0055	0,0142	0,1327	0,0421	0,0941	-0,2774	-0,0987	-0,1654	0,0068	0,4640	-0,0214
V56	-0,0369	0,1854	0,1535	-0,0503	-0,1019	0,0244	0,0325	-0,0519	-0,1272	-0,0454	-0,1568	0,7223
V57	-0,0317	0,1708	0,0042	-0,0193	0,1222	0,1214	0,1282	-0,1049	-0,0639	0,1203	-0,1347	0,6651
V58	-0,0177	0,1994	-0,0894	0,0970	-0,0357	0,0277	0,0029	0,0600	0,1629	-0,0501	-0,0753	0,7769
V59	0,0048	0,1428	-0,0174	-0,1264	0,0501	-0,0929	0,0945	-0,1538	-0,0020	0,0691	0,0203	0,5561
V60	0,0775	-0,0135	-0,0453	-0,0551	-0,0016	-0,0620	-0,0202	0,0635	0,1098	-0,0972	0,3292	-0,0526
V61	0,1717	0,0165	-0,0341	0,0508	0,0499	0,1449	0,0185	0,1231	0,0019	-0,0037	0,7288	0,0642
V62	0,1145	-0,0008	-0,0532	0,0823	0,0212	0,2803	-0,0364	0,1567	-0,0406	-0,1137	0,4860	-0,0031
V63	0,0658	0,1642	-0,0190	-0,0657	0,0589	0,0237	0,1535	0,1124	0,0355	-0,0882	0,2793	0,6398
V64	0,1379	-0,0185	-0,0937	-0,0060	-0,0018	0,1141	-0,0128	0,1466	-0,0419	-0,1585	0,5855	-0,0721
V65	0,1250	0,0337	-0,1279	0,0400	0,1468	0,0294	-0,0111	0,1601	0,0028	-0,0743	0,5305	0,1313
V66	-0,0208	-0,0425	0,1494	0,0840	0,0588	0,1853	-0,1104	0,1278	-0,1268	-0,0335	-0,0882	-0,1656
V67	0,0791	0,1122	0,0965	-0,0972	0,0064	0,0049	0,1285	0,2071	-0,0112	0,1790	0,3356	0,4369
V68	0,1096	0,0455	-0,0012	0,2083	-0,0889	-0,0147	0,0809	0,0938	-0,0476	0,1728	0,4654	0,1770
V69	0,0939	0,0903	0,0824	-0,0091	-0,0779	-0,1748	0,1671	-0,0011	0,0904	0,0257	0,3988	0,3518
V70	-0,0301	-0,0230	-0,0586	-0,0620	-0,0062	0,1829	0,0614	-0,3117	0,1201	0,2100	-0,1277	-0,0897
V71	-0,0301	-0,0230	-0,0586	-0,0620	-0,0062	0,1829	0,0614	-0,3117	0,1201	0,2100	-0,1277	-0,0897
V72	-0,0630	-0,0559	-0,0221	0,0739	-0,0697	0,1046	0,0655	-0,1975	0,0726	0,2088	-0,2675	-0,2178
V73	-0,1119	-0,1181	0,0610	0,1075	-0,0076	0,1252	0,0647	-0,0010	0,0126	0,2250	-0,4749	-0,4599
V74	-0,1335	0,0685	-0,0040	0,2536	-0,0630	-0,0897	0,0238	-0,0159	0,0048	-0,0043	-0,5667	0,2670
V75	-0,0725	0,1711	-0,1084	0,0606	0,0773	0,0690	0,0473	0,1181	-0,1612	0,0905	-0,3076	0,6666
V76	0,0854	0,0367	0,0615	0,0417	0,0855	0,3092	0,0721	-0,1081	-0,0492	0,0314	0,3626	0,1428
V77	0,0089	0,2007	0,0610	-0,0153	0,0880	-0,1187	0,0472	-0,0549	0,0038	0,0333	0,0377	0,7817
V78	0,0060	-0,0095	-0,0461	0,0131	0,1129	0,1836	0,1743	0,1885	-0,2597	0,1203	0,0254	-0,0369

continúa...

...continuación

V79	-0,0844	0,1094	-0,1153	0,0826	0,2494	-0,0616	-0,0569	-0,0106	0,1040	-0,0724	-0,3582	0,4260
V80	-0,0407	0,1813	-0,0168	0,0039	-0,2353	-0,0086	-0,0397	0,0160	-0,1091	0,1008	-0,1726	0,7062
V81	-0,0103	0,0743	0,2283	-0,0733	0,0949	0,0422	0,0845	-0,0876	-0,0662	-0,1635	-0,0436	0,2894
V82	0,0062	0,0780	-0,0924	-0,0677	-0,2114	0,2069	0,0276	-0,0639	0,1774	-0,0925	0,0261	0,3040
V83	-0,0199	-0,0662	-0,0377	0,0530	-0,0677	-0,1306	0,0128	0,0811	-0,0668	0,0153	-0,0845	-0,2580
V84	-0,0690	0,0208	-0,1379	-0,0164	0,1963	0,1534	0,0821	-0,0982	-0,0550	0,1130	-0,2931	0,0811
V85	-0,0185	0,0290	-0,0786	-0,0140	-0,2529	0,0521	0,0067	0,1269	0,0216	-0,2040	-0,0784	0,1129
V86	0,0331	-0,0147	-0,0083	0,1494	0,0077	0,1661	0,2348	0,1664	0,0472	0,0051	0,1406	-0,0573
V87	-0,0846	0,0136	-0,0937	0,1048	0,1782	0,1511	0,1567	-0,0770	0,0156	0,1392	-0,3590	0,0531
V88	-0,0091	0,0814	-0,1330	0,0504	-0,0395	-0,0496	0,1100	0,1748	-0,0502	0,0025	-0,0386	0,3171
V89	-0,0926	-0,0734	-0,0917	0,1328	0,0704	-0,0265	0,0693	0,1261	-0,0943	-0,1365	-0,3931	-0,2858
V90	-0,0986	-0,0315	-0,0764	0,1403	0,0903	-0,0094	0,1172	0,1257	-0,1312	-0,0046	-0,4185	-0,1227
V91	-0,0166	0,0492	-0,0648	0,0113	-0,2123	0,1826	0,0780	-0,0641	0,1976	-0,0878	-0,0703	0,1916
V92	-0,1201	0,0553	-0,0881	-0,0021	0,0023	0,1751	-0,0366	0,1358	-0,0094	0,1648	-0,5097	0,2155
V93	-0,0410	-0,0374	0,0417	-0,1072	-0,0052	0,1257	-0,1886	0,2247	0,1890	-0,0013	-0,1742	-0,1457

	CoeCorr3	CoeCorr4	CoeCorr5	CoeCorr6	CoeCorr7	CoeCorr8	CoeDet1	CoeDet2	CoeDet3	CoeDet4	CoeDet5	CoeDet6
V1	0,6791	0,3511	-0,2874	-0,0292	-0,0059	0,0954	0,0586	0,0047	0,1423	0,0448	0,0331	0,0004
V2	0,3635	0,4066	-0,1234	-0,0223	-0,0772	0,3049	0,0406	0,0258	0,0408	0,0600	0,0061	0,0002
V3	0,7929	-0,3079	0,2373	0,1602	-0,1827	0,1798	0,0100	0,0044	0,1940	0,0344	0,0226	0,0107
V4	0,7476	0,3670	-0,0112	-0,0207	0,0391	0,0842	0,0462	0,0112	0,1724	0,0489	0,0000	0,0002
V5	0,6320	-0,2517	-0,1584	0,1219	-0,2085	0,1716	0,0181	0,0747	0,1232	0,0230	0,0100	0,0062
V6	0,1213	0,4857	0,2276	-0,1000	-0,1394	0,2595	0,0750	0,0007	0,0045	0,0857	0,0208	0,0042
V7	0,3529	-0,2225	0,0902	0,1197	-0,4451	0,4345	0,0135	0,0031	0,0384	0,0180	0,0033	0,0060
V8	0,7929	-0,3079	0,2373	0,1602	-0,1827	0,1798	0,0100	0,0044	0,1940	0,0344	0,0226	0,0107
V9	-0,0458	0,0096	0,0762	-0,0297	-0,4053	0,2715	0,0518	0,0995	0,0006	0,0000	0,0023	0,0004
V10	0,4378	-0,1199	0,5779	0,0445	-0,2325	0,1371	0,0359	0,0349	0,0591	0,0052	0,1338	0,0008
V11	0,2781	-0,1174	0,2737	0,0021	0,5655	0,1844	0,0805	0,0155	0,0239	0,0050	0,0300	0,0000
V12	0,1899	0,0221	0,1656	-0,0409	-0,0169	-0,1065	0,0288	0,1922	0,0111	0,0002	0,0110	0,0007
V13	0,2873	0,0525	0,3097	0,1040	0,2552	0,0816	0,1397	0,0131	0,0255	0,0010	0,0384	0,0045
V14	0,4426	0,5435	0,1433	-0,0137	0,3816	0,0432	0,0520	0,0005	0,0604	0,1073	0,0082	0,0001
V15	0,1809	-0,0148	0,0224	0,0576	0,2123	0,1641	0,0960	0,0578	0,0101	0,0001	0,0002	0,0014
V16	0,6787	-0,3469	0,1691	0,0907	-0,2119	0,0917	0,0133	0,0000	0,1421	0,0437	0,0115	0,0034
V17	0,7152	0,2773	-0,0337	-0,0534	-0,0086	0,0336	0,0516	0,0207	0,1578	0,0279	0,0005	0,0012
V18	0,2301	0,5492	-0,2162	-0,1812	0,1267	-0,0957	0,0349	0,0462	0,0163	0,1095	0,0187	0,0137
V19	-0,0404	0,1094	0,0751	-0,3103	-0,0302	-0,0006	0,1836	0,0011	0,0005	0,0043	0,0023	0,0401
V20	-0,0404	0,1094	0,0751	-0,3103	-0,0302	-0,0006	0,1836	0,0011	0,0005	0,0043	0,0023	0,0401
V21	-0,0404	0,1094	0,0751	-0,3103	-0,0302	-0,0006	0,1836	0,0011	0,0005	0,0043	0,0023	0,0401
V22	-0,0404	0,1094	0,0751	-0,3103	-0,0302	-0,0006	0,1836	0,0011	0,0005	0,0043	0,0023	0,0401
V23	0,1899	0,0221	0,1656	-0,0409	-0,0169	-0,1065	0,0288	0,1922	0,0111	0,0002	0,0110	0,0007
V24	0,4974	-0,1386	-0,2542	0,0585	0,0743	-0,1107	0,0058	0,1339	0,0763	0,0070	0,0259	0,0014
V25	0,2928	-0,0721	-0,0044	-0,3864	-0,0873	-0,1592	0,0751	0,0511	0,0264	0,0019	0,0000	0,0622
V26	-0,0404	0,1094	0,0751	-0,3103	-0,0302	-0,0006	0,1836	0,0011	0,0005	0,0043	0,0023	0,0401
V27	-0,0404	0,1094	0,0751	-0,3103	-0,0302	-0,0006	0,1836	0,0011	0,0005	0,0043	0,0023	0,0401
V28	0,0329	0,3355	0,0197	0,1882	-0,1779	-0,0295	0,1390	0,0054	0,0003	0,0409	0,0002	0,0147
V29	0,1652	0,0374	0,0263	-0,0863	-0,0107	-0,1938	0,0366	0,0885	0,0084	0,0005	0,0003	0,0031
V30	0,4615	0,2409	0,1278	-0,0019	0,0216	-0,1903	0,0908	0,0077	0,0657	0,0211	0,0065	0,0000
V31	-0,0002	0,3049	-0,3010	0,1565	-0,2078	-0,0078	0,0822	0,0674	0,0000	0,0338	0,0363	0,0102
V32	-0,3736	0,2274	0,6224	-0,1478	-0,1302	-0,0225	0,0302	0,0466	0,0431	0,0188	0,1552	0,0091
V33	0,3138	0,0825	0,0806	0,3534	-0,1243	-0,0047	0,0874	0,0122	0,0304	0,0025	0,0026	0,0520
V34	-0,3106	0,1728	0,0255	-0,1222	-0,1603	0,0084	0,0349	0,1732	0,0298	0,0108	0,0003	0,0062
V35	0,3879	0,0058	-0,3236	0,2181	0,2034	0,0280	0,0032	0,1236	0,0464	0,0000	0,0420	0,0198
V36	0,5374	0,7177	-0,0890	0,1615	0,0567	-0,1310	0,0026	0,0020	0,0891	0,1871	0,0032	0,0109
V37	0,2140	0,6457	0,2215	0,0396	0,0870	-0,4130	0,0034	0,0011	0,0141	0,1514	0,0197	0,0007

continúa...

...continuación

V38	0.5778	-0,1572	0,2508	-0,0676	0,2203	-0,1620	0,0150	0,0222	0,1030	0,0090	0,0252	0,0019
V39	-0.4165	0,0418	-0,1349	0,4225	0,0009	-0,1142	0,0037	0,0770	0,0535	0,0006	0,0073	0,0743
V40	0.6481	0,1722	0,1221	0,0276	0,3230	-0,1482	0,0074	0,0010	0,1296	0,0108	0,0060	0,0003
V41	-0.3106	0,1728	0,0255	-0,1222	-0,1603	0,0084	0,0349	0,1732	0,0298	0,0108	0,0003	0,0062
V42	0.0133	0,2280	-0,2484	-0,0099	-0,1250	-0,0184	0,1071	0,0605	0,0001	0,0189	0,0247	0,0000
V43	0.0267	0,3354	-0,5888	-0,0824	-0,0179	0,0858	0,0212	0,0332	0,0002	0,0408	0,1389	0,0028
V44	-0.3106	0,1728	0,0255	-0,1222	-0,1603	0,0084	0,0349	0,1732	0,0298	0,0108	0,0003	0,0062
V45	-0.0002	0,3049	-0,3010	0,1565	-0,2078	-0,0078	0,0822	0,0674	0,0000	0,0338	0,0363	0,0102
V46	-0.3736	0,2274	0,6224	-0,1478	-0,1302	-0,0225	0,0302	0,0466	0,0431	0,0188	0,1552	0,0091
V47	-0.0545	0,0108	-0,5873	-0,0206	-0,0908	0,0341	0,0070	0,1280	0,0009	0,0000	0,1382	0,0002
V48	0.2447	0,7050	-0,2127	-0,1596	0,2008	-0,0483	0,0317	0,0340	0,0185	0,1805	0,0181	0,0106
V49	0.0155	0,7515	0,1480	-0,2224	0,1083	-0,0553	0,0639	0,0022	0,0001	0,2051	0,0088	0,0206
V50	-0.0482	0,2006	-0,1813	0,2778	0,2317	0,1986	0,0390	0,0053	0,0007	0,0146	0,0132	0,0321
V51	0.0460	0,3654	0,1050	0,2258	-0,6346	-0,2104	0,0507	0,0001	0,0007	0,0485	0,0044	0,0212
V52	-0.3106	0,1728	0,0255	-0,1222	-0,1603	0,0084	0,0349	0,1732	0,0298	0,0108	0,0003	0,0062
V53	0.0460	0,3654	0,1050	0,2258	-0,6346	-0,2104	0,0507	0,0001	0,0007	0,0485	0,0044	0,0212
V54	0.0460	0,3654	0,1050	0,2258	-0,6346	-0,2104	0,0507	0,0001	0,0007	0,0485	0,0044	0,0212
V55	0.0460	0,3654	0,1050	0,2258	-0,6346	-0,2104	0,0507	0,0001	0,0007	0,0485	0,0044	0,0212
V56	0.4974	-0,1386	-0,2542	0,0585	0,0743	-0,1107	0,0058	0,1339	0,0763	0,0070	0,0259	0,0014
V57	0.0137	-0,0533	0,3050	0,2915	0,2932	-0,2236	0,0043	0,1136	0,0001	0,0010	0,0373	0,0354
V58	-0.2899	0,2671	-0,0890	0,0666	0,0066	0,1279	0,0013	0,1549	0,0259	0,0259	0,0032	0,0018
V59	-0.0564	-0,3482	0,1251	-0,2232	0,2160	-0,3280	0,0001	0,0794	0,0010	0,0440	0,0063	0,0207
V60	-0.1467	-0,1517	-0,0041	-0,1488	-0,0462	0,1354	0,0255	0,0007	0,0066	0,0084	0,0000	0,0092
V61	-0.1106	0,1400	0,1246	0,3479	0,0424	0,2625	0,1251	0,0011	0,0038	0,0071	0,0062	0,0504
V62	-0.1725	0,2266	0,0528	0,6730	-0,0833	0,3341	0,0556	0,0000	0,0092	0,0186	0,0011	0,1886
V63	-0.0614	-0,1810	0,1470	0,0568	0,3512	0,2397	0,0184	0,1051	0,0012	0,0119	0,0087	0,0013
V64	-0.3038	-0,0165	-0,0045	0,2739	-0,0292	0,3126	0,0807	0,0013	0,0285	0,0001	0,0000	0,0313
V65	-0.4146	0,1101	0,3663	0,0705	-0,0254	0,3413	0,0663	0,0044	0,0530	0,0044	0,0538	0,0021
V66	0.4843	0,2313	0,1469	0,4449	-0,2526	0,2726	0,0018	0,0070	0,0724	0,0194	0,0086	0,0824
V67	0.3129	-0,2678	0,0160	0,0119	0,2938	0,4417	0,0265	0,0490	0,0302	0,0260	0,0001	0,0001
V68	-0.0039	0,5736	-0,2218	-0,0352	0,1850	0,2001	0,0510	0,0080	0,0000	0,1195	0,0197	0,0005
V69	0.2672	-0,0251	-0,1944	-0,4197	0,3821	-0,0023	0,0375	0,0318	0,0220	0,0002	0,0151	0,0734
V70	-0.1901	-0,1708	-0,0155	0,4391	0,1404	-0,6646	0,0038	0,0021	0,0111	0,0106	0,0001	0,0803
V71	-0.1901	-0,1708	-0,0155	0,4391	0,1404	-0,6646	0,0038	0,0021	0,0111	0,0106	0,0001	0,0803
V72	-0.0717	0,2036	-0,1739	0,2511	0,1499	-0,4211	0,0169	0,0122	0,0016	0,0151	0,0121	0,0263
V73	0.1978	0,2962	-0,0191	0,3006	0,1480	-0,0021	0,0531	0,0543	0,0121	0,0318	0,0001	0,0376
V74	-0.0130	0,6983	-0,1572	-0,2153	0,0545	-0,0339	0,0756	0,0183	0,0001	0,1771	0,0099	0,0193
V75	-0.3514	0,1670	0,1928	0,1658	0,1082	0,2517	0,0223	0,1141	0,0381	0,0101	0,0149	0,0114
V76	0.1993	0,1148	0,2134	0,7424	0,1648	-0,2306	0,0310	0,0052	0,0123	0,0048	0,0183	0,2295
V77	0.1977	-0,0423	0,2195	-0,2850	0,1079	-0,1171	0,0003	0,1569	0,0121	0,0006	0,0193	0,0338
V78	-0.1493	0,0362	0,2817	0,4407	0,3988	0,4020	0,0002	0,0003	0,0069	0,0005	0,0318	0,0809
V79	-0.3736	0,2274	0,6224	-0,1478	-0,1302	-0,0225	0,0302	0,0466	0,0431	0,0188	0,1552	0,0091
V80	-0.0545	0,0108	-0,5873	-0,0206	-0,0908	0,0341	0,0070	0,1280	0,0009	0,0000	0,1382	0,0002
V81	0.7401	-0,2019	0,2370	0,1012	0,1932	-0,1867	0,0004	0,0215	0,1690	0,0148	0,0225	0,0043
V82	-0.2993	-0,1865	-0,5276	0,4968	0,0632	-0,1362	0,0002	0,0237	0,0276	0,0126	0,1115	0,1028
V83	-0.1220	0,1460	-0,1691	-0,3137	0,0293	0,1729	0,0017	0,0171	0,0046	0,0077	0,0115	0,0410
V84	-0.4470	-0,0451	0,4900	0,3684	0,1878	-0,2093	0,0202	0,0017	0,0616	0,0007	0,0962	0,0565
V85	-0.2549	-0,0384	-0,6311	0,1250	0,0153	0,2705	0,0014	0,0033	0,0200	0,0005	0,1596	0,0065
V86	-0.0270	0,4114	0,0193	0,3988	0,5371	0,3548	0,0047	0,0008	0,0002	0,0615	0,0001	0,0662
V87	-0.3036	0,2885	0,4447	0,3627	0,3585	-0,1641	0,0304	0,0007	0,0284	0,0302	0,0792	0,0548
V88	-0.4310	0,1389	-0,0986	-0,1192	0,2515	0,3728	0,0004	0,0258	0,0573	0,0070	0,0039	0,0059
V89	-0.2971	0,3658	0,1756	-0,0637	0,1585	0,2689	0,0364	0,0210	0,0272	0,0486	0,0124	0,0017
V90	-0.2476	0,3865	0,2254	-0,0226	0,2680	0,2680	0,0413	0,0039	0,0189	0,0542	0,0204	0,0002
V91	-0.2100	0,0312	-0,5298	0,4385	0,1784	-0,1367	0,0012	0,0094	0,0136	0,0004	0,1124	0,0801
V92	-0.2854	-0,0059	0,0058	0,4204	-0,0838	0,2895	0,0612	0,0119	0,0251	0,0000	0,0000	0,0736
V93	0.1351	-0,2952	-0,0130	0,3019	-0,4314	0,4791	0,0071	0,0055	0,0056	0,0317	0,0001	0,0380

continúa...

...continuación

	CoeDet7	CoeDet8	VarAcu1	VarAcu2	VarAcu3	VarAcu4	VarAcu5	VarAcu6	VarAcu7	VarAcu8
V1	0,0000	0,0043	0,0586	0,0634	0,2057	0,2504	0,2835	0,2839	0,2839	0,2882
V2	0,0026	0,0436	0,0406	0,0664	0,1072	0,1672	0,1733	0,1736	0,1762	0,2198
V3	0,0146	0,0152	0,0100	0,0143	0,2083	0,2428	0,2653	0,2760	0,2906	0,3058
V4	0,0007	0,0033	0,0462	0,0574	0,2298	0,2787	0,2788	0,2790	0,2796	0,2830
V5	0,0190	0,0138	0,0181	0,0929	0,2161	0,2391	0,2491	0,2553	0,2743	0,2881
V6	0,0085	0,0316	0,0750	0,0757	0,0802	0,1659	0,1866	0,1908	0,1993	0,2309
V7	0,0866	0,0885	0,0135	0,0166	0,0550	0,0730	0,0762	0,0822	0,1688	0,2573
V8	0,0146	0,0152	0,0100	0,0143	0,2083	0,2428	0,2653	0,2760	0,2906	0,3058
V9	0,0718	0,0346	0,0518	0,1513	0,1520	0,1520	0,1543	0,1547	0,2265	0,2611
V10	0,0236	0,0088	0,0359	0,0709	0,1300	0,1352	0,2690	0,2698	0,2935	0,3023
V11	0,1398	0,0159	0,0805	0,0960	0,1199	0,1249	0,1549	0,1549	0,2947	0,3107
V12	0,0001	0,0053	0,0288	0,2209	0,2321	0,2322	0,2432	0,2439	0,2441	0,2494
V13	0,0285	0,0031	0,1397	0,1527	0,1782	0,1792	0,2176	0,2221	0,2506	0,2537
V14	0,0637	0,0009	0,0520	0,0525	0,1129	0,2202	0,2284	0,2285	0,2921	0,2930
V15	0,0197	0,0126	0,0960	0,1539	0,1640	0,1640	0,1642	0,1656	0,1853	0,1980
V16	0,0196	0,0039	0,0133	0,0133	0,1554	0,1991	0,2105	0,2140	0,2336	0,2375
V17	0,0000	0,0005	0,0516	0,0723	0,2301	0,2580	0,2585	0,2597	0,2597	0,2602
V18	0,0070	0,0043	0,0349	0,0811	0,0974	0,2069	0,2257	0,2393	0,2464	0,2507
V19	0,0004	0,0000	0,1836	0,1847	0,1852	0,1895	0,1918	0,2319	0,2323	0,2323
V20	0,0004	0,0000	0,1836	0,1847	0,1852	0,1895	0,1918	0,2319	0,2323	0,2323
V21	0,0004	0,0000	0,1836	0,1847	0,1852	0,1895	0,1918	0,2319	0,2323	0,2323
V22	0,0004	0,0000	0,1836	0,1847	0,1852	0,1895	0,1918	0,2319	0,2323	0,2323
V23	0,0001	0,0053	0,0288	0,2209	0,2321	0,2322	0,2432	0,2439	0,2441	0,2494
V24	0,0024	0,0057	0,0058	0,1397	0,2160	0,2230	0,2489	0,2503	0,2528	0,2585
V25	0,0033	0,0119	0,0751	0,1262	0,1526	0,1545	0,1545	0,2167	0,2200	0,2319
V26	0,0004	0,0000	0,1836	0,1847	0,1852	0,1895	0,1918	0,2319	0,2323	0,2323
V27	0,0004	0,0000	0,1836	0,1847	0,1852	0,1895	0,1918	0,2319	0,2323	0,2323
V28	0,0138	0,0004	0,1390	0,1444	0,1447	0,1856	0,1857	0,2005	0,2143	0,2147
V29	0,0001	0,0176	0,0366	0,1251	0,1335	0,1341	0,1343	0,1374	0,1375	0,1551
V30	0,0002	0,0170	0,0908	0,0985	0,1643	0,1853	0,1919	0,1919	0,1921	0,2091
V31	0,0189	0,0000	0,0822	0,1497	0,1497	0,1834	0,2197	0,2299	0,2488	0,2488
V32	0,0074	0,0002	0,0302	0,0768	0,1199	0,1387	0,2939	0,3030	0,3104	0,3106
V33	0,0068	0,0000	0,0874	0,0996	0,1300	0,1325	0,1351	0,1871	0,1939	0,1939
V34	0,0112	0,0000	0,0349	0,2081	0,2379	0,2488	0,2490	0,2552	0,2665	0,2665
V35	0,0181	0,0004	0,0032	0,1267	0,1731	0,1732	0,2151	0,2349	0,2530	0,2534
V36	0,0014	0,0081	0,0026	0,0046	0,0937	0,2808	0,2840	0,2948	0,2962	0,3043
V37	0,0033	0,0800	0,0034	0,0045	0,0186	0,1700	0,1897	0,1903	0,1936	0,2736
V38	0,0212	0,0123	0,0150	0,0372	0,1402	0,1491	0,1743	0,1762	0,1975	0,2098
V39	0,0000	0,0061	0,0037	0,0807	0,1342	0,1349	0,1422	0,2165	0,2165	0,2226
V40	0,0456	0,0103	0,0074	0,0085	0,1381	0,1488	0,1548	0,1551	0,2007	0,2110
V41	0,0112	0,0000	0,0349	0,2081	0,2379	0,2488	0,2490	0,2552	0,2665	0,2665
V42	0,0068	0,0002	0,1071	0,1676	0,1676	0,1865	0,2112	0,2113	0,2181	0,2182
V43	0,0001	0,0035	0,0212	0,0544	0,0546	0,0955	0,2344	0,2372	0,2374	0,2408
V44	0,0112	0,0000	0,0349	0,2081	0,2379	0,2488	0,2490	0,2552	0,2665	0,2665
V45	0,0189	0,0000	0,0822	0,1497	0,1497	0,1834	0,2197	0,2299	0,2488	0,2488
V46	0,0074	0,0002	0,0302	0,0768	0,1199	0,1387	0,2939	0,3030	0,3104	0,3106
V47	0,0036	0,0005	0,0070	0,1350	0,1360	0,1360	0,2742	0,2744	0,2780	0,2786
V48	0,0176	0,0011	0,0317	0,0657	0,0842	0,2646	0,2828	0,2934	0,3110	0,3121
V49	0,0051	0,0014	0,0639	0,0662	0,0663	0,2713	0,2801	0,3007	0,3059	0,3073
V50	0,0235	0,0185	0,0390	0,0444	0,0451	0,0597	0,0729	0,1050	0,1285	0,1470
V51	0,1761	0,0208	0,0507	0,0508	0,0515	0,1000	0,1044	0,1256	0,3017	0,3225
V52	0,0112	0,0000	0,0349	0,2081	0,2379	0,2488	0,2490	0,2552	0,2665	0,2665
V53	0,1761	0,0208	0,0507	0,0508	0,0515	0,1000	0,1044	0,1256	0,3017	0,3225

continúa...

...continuación

V54	0,1761	0,0208	0,0507	0,0508	0,0515	0,1000	0,1044	0,1256	0,3017	0,3225
V55	0,1761	0,0208	0,0507	0,0508	0,0515	0,1000	0,1044	0,1256	0,3017	0,3225
V56	0,0024	0,0057	0,0058	0,1397	0,2160	0,2230	0,2489	0,2503	0,2528	0,2585
V57	0,0376	0,0234	0,0043	0,1178	0,1179	0,1189	0,1562	0,1916	0,2292	0,2526
V58	0,0000	0,0077	0,0013	0,1563	0,1822	0,2081	0,2113	0,2131	0,2132	0,2208
V59	0,0204	0,0505	0,0001	0,0795	0,0805	0,1245	0,1308	0,1515	0,1719	0,2224
V60	0,0009	0,0086	0,0255	0,0262	0,0329	0,0412	0,0412	0,0504	0,0514	0,0600
V61	0,0008	0,0323	0,1251	0,1262	0,1299	0,1371	0,1433	0,1937	0,1945	0,2268
V62	0,0030	0,0523	0,0556	0,0556	0,0648	0,0835	0,0846	0,2732	0,2762	0,3286
V63	0,0539	0,0270	0,0184	0,1235	0,1246	0,1365	0,1452	0,1465	0,2004	0,2274
V64	0,0004	0,0458	0,0807	0,0821	0,1106	0,1107	0,1107	0,1419	0,1423	0,1881
V65	0,0003	0,0546	0,0663	0,0707	0,1237	0,1281	0,1819	0,1840	0,1842	0,2389
V66	0,0279	0,0348	0,0018	0,0089	0,0812	0,1007	0,1093	0,1918	0,2197	0,2545
V67	0,0377	0,0915	0,0265	0,0755	0,1057	0,1318	0,1319	0,1319	0,1697	0,2612
V68	0,0150	0,0188	0,0510	0,0591	0,0591	0,1785	0,1982	0,1988	0,2137	0,2325
V69	0,0638	0,0000	0,0375	0,0692	0,0913	0,0915	0,1066	0,1800	0,2438	0,2438
V70	0,0086	0,2071	0,0038	0,0059	0,0171	0,0276	0,0277	0,1081	0,1167	0,3238
V71	0,0086	0,2071	0,0038	0,0059	0,0171	0,0276	0,0277	0,1081	0,1167	0,3238
V72	0,0098	0,0831	0,0169	0,0290	0,0306	0,0457	0,0578	0,0840	0,0939	0,1770
V73	0,0096	0,0000	0,0531	0,1074	0,1195	0,1514	0,1515	0,1891	0,1987	0,1987
V74	0,0013	0,0005	0,0756	0,0939	0,0940	0,2710	0,2809	0,3003	0,3016	0,3021
V75	0,0051	0,0297	0,0223	0,1364	0,1745	0,1846	0,1995	0,2109	0,2160	0,2458
V76	0,0119	0,0249	0,0310	0,0362	0,0485	0,0532	0,0715	0,3010	0,3129	0,3378
V77	0,0051	0,0064	0,0003	0,1572	0,1693	0,1699	0,1892	0,2231	0,2282	0,2346
V78	0,0695	0,0758	0,0002	0,0005	0,0074	0,0079	0,0397	0,1206	0,1901	0,2659
V79	0,0074	0,0002	0,0302	0,0768	0,1199	0,1387	0,2939	0,3030	0,3104	0,3106
V80	0,0036	0,0005	0,0070	0,1350	0,1360	0,1360	0,2742	0,2744	0,2780	0,2786
V81	0,0163	0,0163	0,0004	0,0219	0,1910	0,2058	0,2283	0,2325	0,2488	0,2652
V82	0,0017	0,0087	0,0002	0,0239	0,0515	0,0642	0,1757	0,2784	0,2802	0,2889
V83	0,0004	0,0140	0,0017	0,0188	0,0234	0,0311	0,0426	0,0835	0,0839	0,0979
V84	0,0154	0,0205	0,0202	0,0219	0,0836	0,0843	0,1805	0,2370	0,2525	0,2730
V85	0,0001	0,0343	0,0014	0,0047	0,0248	0,0253	0,1849	0,1914	0,1915	0,2258
V86	0,1261	0,0590	0,0047	0,0055	0,0057	0,0672	0,0673	0,1336	0,2597	0,3187
V87	0,0562	0,0126	0,0304	0,0311	0,0595	0,0897	0,1690	0,2238	0,2800	0,2926
V88	0,0277	0,0652	0,0004	0,0262	0,0835	0,0905	0,0944	0,1003	0,1280	0,1931
V99	0,0110	0,0339	0,0364	0,0574	0,0846	0,1332	0,1456	0,1473	0,1582	0,1922
V90	0,0314	0,0337	0,0413	0,0451	0,0640	0,1183	0,1386	0,1389	0,1703	0,2039
V91	0,0139	0,0088	0,0012	0,0106	0,0242	0,0246	0,1370	0,2171	0,2310	0,2398
V92	0,0031	0,0393	0,0612	0,0731	0,0983	0,0983	0,0983	0,1719	0,1750	0,2143
V93	0,0813	0,1076	0,0071	0,0126	0,0182	0,0499	0,0500	0,0879	0,1693	0,2769

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides* calculadas para los datos de RAPD.

	45	45	47	48	48a	49	50	51	M51	52
45	0.0000									
45	0.5120	0.0000								
47	0.4878	0.7347	0.0000							
48	0.5000	0.6324	0.5000	0.0000						
48a	0.5581	0.6423	0.6619	0.5909	0.0000					
49	0.2453	0.5000	0.5469	0.6015	0.6324	0.0000				
50	0.5469	0.3393	0.7432	0.7347	0.6324	0.5120	0.0000			
51	0.4370	0.5120	0.5354	0.6522	0.6015	0.3966	0.5238	0.0000		
M51	0.2115	0.5469	0.4754	0.5581	0.5909	0.2936	0.5354	0.3393	0.0000	
52	0.5120	0.3243	0.6809	0.6324	0.5354	0.5238	0.3091	0.5120	0.5000	0.0000
53D	0.4500	0.6714	0.5692	0.6619	0.6324	0.4878	0.6222	0.5000	0.3826	0.6714
53E	0.4500	0.6324	0.5692	0.6809	0.5909	0.5120	0.6222	0.5000	0.4628	0.6324
54	0.3684	0.6324	0.5469	0.6619	0.5000	0.4370	0.5354	0.5000	0.4103	0.5909
55	0.3393	0.3966	0.5909	0.6015	0.5238	0.4628	0.4103	0.4237	0.3243	0.2778
56	0.1942	0.5802	0.4628	0.5909	0.5581	0.2778	0.5000	0.3826	0.2115	0.5120
57	0.2936	0.6015	0.4878	0.5909	0.6015	0.3684	0.5909	0.4370	0.3684	0.5802
58	0.4103	0.3826	0.6423	0.5909	0.5120	0.5000	0.3684	0.4628	0.4237	0.1942
59	0.3540	0.4628	0.5802	0.6522	0.6423	0.3966	0.3966	0.4878	0.3091	0.3540
60	0.4237	0.7083	0.5909	0.6423	0.5000	0.4370	0.6423	0.5238	0.4103	0.6522
61	0.2286	0.6015	0.5354	0.6119	0.5354	0.3393	0.5238	0.4370	0.2778	0.5354
62	0.1765	0.5469	0.5000	0.5581	0.5469	0.2936	0.5120	0.4237	0.1942	0.5000

	53D	53E	54	55	56	57	58	59	60	61
53D	0.0000									
53E	0.2286	0.0000								
54	0.2286	0.2286	0.0000							
55	0.5581	0.5354	0.4878	0.0000						
56	0.3966	0.3684	0.2778	0.3393	0.0000					
57	0.4754	0.4500	0.4237	0.4754	0.2617	0.0000				
58	0.5909	0.5469	0.5000	0.1400	0.3826	0.5120	0.0000			
59	0.4754	0.4754	0.4500	0.2453	0.2936	0.4628	0.3243	0.0000		
60	0.4103	0.4370	0.3826	0.5120	0.3393	0.4500	0.5469	0.5238	0.0000	
61	0.3684	0.3393	0.2453	0.3684	0.1212	0.2936	0.4103	0.3540	0.2778	0.0000
62	0.3826	0.3540	0.3243	0.3243	0.1020	0.3091	0.3684	0.3091	0.3540	0.1400

	62
62	0.0000

Cuadro 5. Análisis de correspondencia entre filas y columnas de la matriz de datos de RAPD.

		Trace of matrix = 3.47624	
X2		= 1411.352 df = 1840	Prob = 1.0000
i	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	0.56576	16.28	16.28
2	0.41609	11.97	28.24
3	0.35553	10.23	38.47
4	0.28359	8.16	46.63
5	0.24697	7.10	53.73
6	0.22026	6.34	60.07
7	0.19359	5.57	65.64
8	0.16781	4.83	70.47
9	0.16387	4.71	75.18
10	0.14050	4.04	79.22
11	0.13082	3.76	82.99
12	0.12085	3.48	86.46
13	0.10436	3.00	89.46
14	0.08985	2.58	92.05
15	0.06986	2.01	94.06
16	0.06369	1.83	95.89
17	0.04579	1.32	97.21
18	0.04006	1.15	98.36
19	0.03709	1.07	99.43
20	0.01991	0.57	100.00

Column variables:

Variable	Rel. freq	Dist^2
45	0.01970	6.33811
46	0.08867	1.28502
47	0.07389	3.46725
48	0.09113	2.32473
48A	0.08374	2.22166
49	0.03695	4.18706
50	0.07143	2.99253
51	0.05911	2.40347
M51	0.02709	4.23278
52	0.07389	1.39572
53D	0.05665	2.76342
53E	0.05172	3.05956
54	0.03695	3.86627
55	0.04187	2.25790
56	0.00493	35.65278
57	0.03448	8.13977
58	0.04926	1.98539
59	0.03941	3.10770
60	0.04187	6.68706
61	0.00985	21.65625
62	0.00739	17.97531

...continúa...

...continuación

Row variables:

Variable	Rel. freq	Dist^2
1	0.01478	2.07913
2	0.00739	5.76310
3	0.00493	7.95588
4	0.01232	2.99503
5	0.00739	4.19961
6	0.00985	3.65007
7	0.00246	22.88235
8	0.00493	7.95588
9	0.00739	4.37652
10	0.00739	4.48410
11	0.01478	1.71809
12	0.00739	3.04972
13	0.01724	1.28268
14	0.02463	0.75903
15	0.02217	0.97202
16	0.00739	14.25817
17	0.01478	4.59377
18	0.00985	9.34701
19	0.01478	2.01024
20	0.01478	2.01024
21	0.01478	2.01024
22	0.01478	2.01024
23	0.00739	3.04972
24	0.00493	4.72854
25	0.01724	1.44908
26	0.01478	2.01024
27	0.01478	2.01024
28	0.00739	3.31235
29	0.01232	3.57057
30	0.01478	1.72553
31	0.00985	2.11151
32	0.00246	12.53333
33	0.01232	2.11276
34	0.00493	5.12658
35	0.00739	2.79910
36	0.01478	1.81309
37	0.02463	0.82713
38	0.00493	5.36863
39	0.01232	2.67403
40	0.00493	6.81863
41	0.00493	5.12658
42	0.01232	1.80336
43	0.00493	6.15629
44	0.00493	5.12658
45	0.00985	2.11151
46	0.00246	12.53333
47	0.00246	9.97297
48	0.00739	6.11691
49	0.00985	3.84909
50	0.00246	10.27778
51	0.00246	13.00000
52	0.00493	5.12658
53	0.00246	13.00000
54	0.00246	13.00000
55	0.00246	13.00000

continúa...

...continuación

56	0.00493	4.72854
57	0.01478	1.66382
58	0.00739	2.97601
59	0.02217	1.60274
60	0.00739	6.33056
61	0.01478	1.86373
62	0.00985	3.32882
63	0.02463	1.00174
64	0.01970	2.05982
65	0.02217	1.25302
66	0.01724	1.82706
67	0.02217	1.09402
68	0.02217	0.84397
69	0.02217	2.35740
70	0.00246	28.00000
71	0.00246	28.00000
72	0.00493	10.66304
73	0.01724	3.80309
74	0.01232	2.54234
75	0.00739	3.60255
76	0.01232	2.32542
77	0.01232	1.81123
78	0.00246	15.91667
79	0.00246	12.53333
80	0.00246	9.97297
81	0.00246	10.94118
82	0.01232	4.16270
83	0.00739	7.88181
84	0.00985	15.40312
85	0.01724	4.91759
86	0.00739	4.28086
87	0.00985	3.92396
88	0.02217	1.55888
89	0.02217	3.77596
90	0.01478	5.65772
91	0.01478	3.12224
92	0.01970	1.74896
93	0.00493	11.73725

ANEXO D. ANALISIS ESTADISTICO CONJUNTO

Cuadro 1. Matriz de distancias genéticas construida con todos los atributos medidos (morfológicos, bioquímicos y RAPD).

45	46	47	48	48A	49	50	51	M51	52	
45	0.0000									
46	0.4762	0.0000								
47	0.4286	0.5749	0.0000							
48	0.4561	0.5394	0.4144	0.0000						
48A	0.4828	0.5394	0.5210	0.3704	0.0000					
49	0.3396	0.4493	0.4828	0.5455	0.5574	0.0000				
50	0.5333	0.3318	0.6142	0.6250	0.5574	0.4696	0.0000			
51	0.4356	0.4286	0.4762	0.5749	0.5394	0.3318	0.4493	0.0000		
M51	0.3474	0.5085	0.4893	0.5272	0.5394	0.3474	0.4629	0.3238	0.0000	
52	0.4957	0.3779	0.5920	0.5691	0.5085	0.4696	0.3704	0.4493	0.4762	0.0000
53D	0.5021	0.5920	0.5514	0.6087	0.5863	0.5021	0.4893	0.4828	0.4286	0.6196
53E	0.4696	0.5633	0.5333	0.6142	0.5691	0.4957	0.5085	0.4356	0.4762	0.5920
54	0.4957	0.5749	0.5574	0.6142	0.5333	0.4828	0.4696	0.5148	0.5021	0.5806
55	0.4356	0.4000	0.5148	0.5749	0.5272	0.4893	0.4215	0.4000	0.4144	0.3927
56	0.3927	0.5333	0.5148	0.5863	0.5633	0.4072	0.5021	0.4286	0.3551	0.5633
57	0.4144	0.5514	0.5210	0.5574	0.5574	0.4144	0.5574	0.4629	0.4215	0.5333
58	0.4286	0.4072	0.5455	0.5210	0.4828	0.4828	0.3853	0.4072	0.4356	0.3396
59	0.4215	0.4144	0.5148	0.5394	0.5394	0.3779	0.3628	0.4144	0.3396	0.4215
60	0.4957	0.6196	0.5455	0.5806	0.5085	0.4828	0.5210	0.5021	0.4493	0.6142
61	0.3628	0.5574	0.4629	0.5148	0.4762	0.4215	0.4493	0.4561	0.3853	0.5514
62	0.2995	0.5085	0.4215	0.4893	0.4893	0.3474	0.4629	0.4286	0.3551	0.5272
	53D	53E	54	55	56	57	58	59	60	61
53D	0.0000									
53E	0.2312	0.0000								
54	0.2995	0.2574	0.0000							
55	0.5333	0.5021	0.5272	0.0000						
56	0.4696	0.4629	0.4762	0.4000	0.0000					
57	0.5514	0.5333	0.5085	0.5021	0.4072	0.0000				
58	0.5272	0.4957	0.4957	0.2488	0.4493	0.5210	0.0000			
59	0.4425	0.4356	0.4356	0.3396	0.4000	0.4629	0.3474	0.0000		
60	0.3474	0.3704	0.3551	0.4893	0.4493	0.5333	0.4957	0.4493	0.0000	
61	0.3853	0.3927	0.3779	0.4144	0.3396	0.4629	0.4072	0.3704	0.3158	0.0000
62	0.4286	0.3927	0.4072	0.4144	0.3396	0.4215	0.4356	0.3077	0.3628	0.2041
	62									
62	0.0000									