

Tesis Doctoral



“Los Polimorfismos en los Avr de *Fulvia fulva* (Sin: *Cladosporium fulvum*) afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis del tomate con la resistencia sistémica inducida y adquirida”.

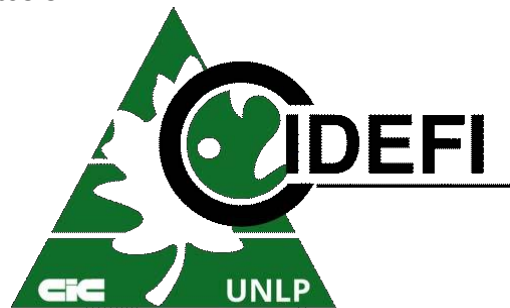
Doctorando: Ing. Agr. Cesar Gustavo Lucentini.

Director: Dr. Pedro Balatti. Profesor Titular de Fitopatología Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Investigador Principal CICBA

Codirector: Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat. Profesor Adjunto Microbiología Agrícola Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Investigador independiente CONICET

2020

Lugar de desarrollo de tesis:



El presente trabajo de tesis, para optar por el título Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA), bajo la dirección del Ph. D. Pedro Alberto Balatti y del Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat.

Agradecimientos:

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata y a la Escuela agropecuaria de M. C y M. L Inchausti, por la formación.

A mis directores, por haberme guiado en el desarrollo de este trabajo; por los conocimientos transmitidos y la confianza depositada.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones de Fitopatología y de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, por la inmensa y desinteresada colaboración.

A mis amigos de toda la vida, porque siempre están y estarán.

Especialmente, a mi familia, por todo su amor y respaldo.

ÍNDICE

“Los Polimorfismos en los Avr de <i>Fulvia fulva</i> (Sin: <i>Cladosporium fulvum</i>) afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis del tomate con la resistencia sistémica inducida y adquirida”.....	1
Lugar de desarrollo de tesis:.....	2
Agradecimientos:	3
ÍNDICE	4
RESUMEN	7
ABSTRACT	11
CAPITULO I: Introducción General.....	15
I.1. Importancia de la horticultura en Argentina.....	16
I.2.1 Producción de Tomate (<i>Solanum lycopersicum L</i>)	18
I.2.2. Enfermedades en Tomate: definición y agentes etiológicos.....	23
I.2.3. Fungí: Características y hábitos tróficos.....	25
I.2.4. Cladosporiosis o Moho de la Hoja del tomate (<i>Fulvia fulva</i>)	32
I.3. Melaninas	46
I. 4. Interacción Bioquímica de planta-patógeno.	57
I.5.1. Hipótesis general:	67
I.5.2. Objetivo general:	67
I.5.3. Objetivos específicos:.....	67
CAPITULO II: Identificación y caracterización molecular de los aislados de <i>Fulvia fulva</i> causante del moho de la hoja del tomate.	68
II.1. Introducción	69
II.1.1. Hipótesis del capítulo:	82
II.1.2. Objetivos del capítulo:	82
II.2. Materiales y métodos.....	83
II.2.1. Material biológico	83
II.2.2. Análisis molecular de la diversidad de <i>Fulvia fulva</i>	84
II.2.2.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico total	84
II.2.2.2. Caracterización molecular por Marcadores moleculares: ISSR.....	84
II.2.3. Amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Space).....	86
II.2.4. Amplificación de los genes <i>Avr</i>	88
II.2.5. Identificación molecular de las razas de las cepas	89
II.2.6. Amplificación de los genes <i>Ecp</i>	90
II.2.7. Polimorfismo dentro de los genes <i>Avr</i> y <i>Ecp</i>	91
II.3. Resultados:	92
II.3.1. Material biológico.....	92

II.3.2. Análisis de la Diversidad Genética.....	95
II.3.3. Identificación de Razas de <i>Fulvia fulva</i> aisladas de hojas de tomate que muestran síntomas típicos del moho de la hoja del tomate	98
II.3.4. Polimorfismos en los genes <i>Avr</i>	100
II.3.5. Polimorfismos de los genes <i>Ecp</i>	104
II.3.6 Cambios en la estructura de las proteínas.....	109
II.4. Discusión:.....	112
II.5. Conclusión.....	116
CAPITULO III: Pigmentación de <i>Fulvia fulva</i>: Identificación de un intermediario clave en la síntesis de melanina-dihidroxinaftaleno.....	118
III.1. Introducción.....	119
III.1.1. Hipótesis del capítulo.....	124
III.1.2. Objetivos del capítulo	124
III.2. Materiales y métodos.....	125
III.2.1. Material Biológico	125
III. 2.2. Extracción de los pigmentos oscuros.....	125
III.2.3. Análisis espectroscópico.....	126
III.2.4. Análisis del efecto de diferentes agentes químicos que modulan la síntesis de melaninas en el crecimiento y la pigmentación.....	127
III.2.5. Extracción e identificación de los intermedios de la vía de melanina por UV-MALDI MS.....	128
III.2.6. Identificación de secuencias génicas que codifican el dominio KS de PKSs involucradas en la síntesis de pigmentos oscuros.....	129
III.3. Resultados.....	131
III.3.1. Análisis espectroscópico.....	131
III.3.2. Efecto de diferentes agentes químicos que modulan la síntesis de melaninas en el crecimiento y la pigmentación de la colonia del representante de la raza 2 de <i>F. fulva</i> ..	134
III.3.3. Análisis filogenético	136
III.4. Discusión	139
III.5. Conclusión	145
CAPITULO IV: <i>Metabolitos secundarios sintetizados por Fulvia fulva</i>.....	146
IV.1 Introducción.....	147
IV.1.1 Hipótesis del capítulo:.....	150
IV.1.2 Objetivos del capítulo	150
IV.2. Materiales y métodos	151
IV.2.1 Material fúngico.....	151
IV.2.2 Condiciones de crecimiento	151

IV.2.3	Compuestos orgánicos volátiles (COVs (VOCs en inglés)): Extracción, identificación y cuantificación	152
IV.2.4	Espectro fluorométrico de sobrenadantes de cultivos fúngicos	153
IV.2.5	Ensayo de virulencia	153
IV.3	Resultados.....	154
IV.3.1	COVs liberados por <i>Fulvia fulva</i> y <i>Stemphylium lycopersici</i>	154
IV.3.2	Estudio de la característica biológica y química del sobrenadante de los cultivos fúngicos	159
IV.4	Discusión	162
IV.4.1	COVs liberados por <i>Fulvia fulva</i> y <i>Stemphylium lycopersici</i>	162
IV.4.2	Estudio de la característica biológica y química del sobrenadante de los cultivos fúngicos	166
IV.5	Conclusiones	166
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES		168
V.1	Conclusiones.....	169
V.2	Consideraciones finales	170
CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....		171
VI.1	Bibliografía	172
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS		207

RESUMEN

La Cladosporiosis o también conocida enfermedad del moho de la hoja en el tomate, es causada por *Fulvia fulva* (Syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva* Cooke). Este hongo en base a su filogenia y morfología se ubica en el reino *Fungi*, phylum *Ascomycota*, clase *Dothideomycetes*, orden *Capnodiales*, familia *Mycosphaerellaceae*. La enfermedad del moho de la hoja predomina en zonas de producción de tomate de la Argentina en las que se dan condiciones de alta humedad y temperaturas medias a altas, lo que ocurre solo en algunos lugares a campo y luego en los invernaderos. El hongo *F. fulva* pasa las etapas con ambientes desfavorables como la temporada fría del invierno como saprótrofo o en estado conidial o en estructuras de resistencia, microesclerocios, sobre los residuos del cultivo y/o en el suelo por un período de hasta un año. Cuando la condición es favorable los microesclerocios germinan y genera conidios, que actúan como inóculo primario. La infección de *F. fulva* comienza con la dispersión de los conidios que en condiciones de alta humedad se adhieren a la superficie de la hoja, produciendo sobre esta, hifas que ingresan a los tejidos de la hoja por los estomas abiertos y colonizan el espacio intercelular. El hongo desarrolla en el espacio apoplástico hasta que despliega conidióforos que aparecen en la cara abaxial de las hojas infectadas. La interacción *F. fulva*-tomate cumple con la relación gen a gen, en la que cada producto genético de avirulencia de patógenos (*avr*) es reconocido por una proteína receptora codificada por el gen de resistencia dominante (*Cf*) del huésped correspondiente. En los últimos tiempos se han aislado las proteínas efectoras o de avirulencia de *F. fulva* (*Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, *Avr5* y *Avr9*), así como también las proteínas extracelulares (*Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4*, *Ecp5* y *Ecp6*). *F. fulva* tiene, al menos potencialmente, la capacidad de sintetizar no solo una gran diversidad de proteínas

efectoras que además pueden combinarse y así de esa manera se ha definido la existencia de 17 razas de *F. fulva* las que difieren en su capacidad para sintetizar proteínas efectoras. La base de la patogenicidad que *F. fulva* tiene en las plantas de tomate es el resultado de la interacción de las efectoras que interaccionan con los híbridos de tomate y cuando no son detectadas por los genes de resistencia *Cf* vulneran los mecanismos de defensa de la planta. Así se planteó el objetivo general de esta tesis que fue ampliar el análisis de aislados de *F. fulva*, evaluar los mismos a nivel de los genes de avirulencia y evaluar de esta manera el potencial desarrollo de herramientas para el manejo del moho de la hoja del tomate. En cuanto a los objetivos específicos, estos consistieron en disponer de un análisis morfo-fisiológico y molecular de los aislados de *F. fulva*, e identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas y si hay una dinámica de cambios genéticos en la población del patógeno. Otro objetivo específico fue disponer de una caracterización a nivel de los efectores de *F. fulva* y genes que codifican proteínas extracelulares de manera de conocer no solo que razas del hongo están presentes en la región, sino también, si el sistema se encuentra evolucionando bajo presión de selección. Otro objetivo específico fue conocer la naturaleza química de las melaninas que sintetiza *F. fulva* y su vía de síntesis. Por último se planteó el objetivo de conocer los metabolitos secundarios que sintetiza *F. fulva*, que es hemibiótrofo, y su comparación con el perfil de un patógeno necrotrófico, que eventualmente podrían interactuar con las plantas de tomate y resultar en interacciones compatibles o incompatibles. Por ello en esta tesis en primer lugar, se procedió a aislar e identificar a partir de plantas de tomate con síntomas típicos del moho de la hoja del tomate, creciendo en lotes de producción, a *F. fulva*. Se amplió el número de aislados del hongo y se depositaron en la colección del Centro de Investigaciones de Fitopatología

CIDEFI. Esto se realizó utilizando el medio de cultivo agar-agua en el que el hongo desarrolló un pigmento púrpura. Una vez que se obtuvieron cultivos monospóricos de *F. fulva* en un número adicional de 8 lo que hizo un total de 14 aislados si consideramos los obtenidos y descritos en la mencionada colección, se confirmó la identidad de los aislados amplificando y secuenciando los amplicones de las secuencias intergénicas no transcritas que fueron 100% homólogas a la secuencia del ITS de la cepa tipo de *F. fulva*. Se procedió a analizar el crecimiento y la diversidad genética con marcadores ISSR y se encontró que además mostró una considerable diversidad genética que no estuvo relacionada con el cultivar de origen del aislado ni con el sitio de aislamiento. Los nuevos aislados nuevamente se clasificaron dentro de las dos razas ya descritas anteriormente 0 y 2. Así se procedió a la amplificación de los genes de avirulencia de *F. fulva* y a las proteínas ECP con pares de primers homólogos a las secuencias descritas de los *avr* y de las ECP. La obtención de amplicones del tamaño esperado y la secuencia de los mismos confirmaron la identidad de los aislados que fueron todos representantes de *F. fulva*. Pero además se confirmó que estas dos razas se encuentran evolucionando ya que se describieron cambios en las secuencias de los genes *avr* y *ecp*. Siendo este el primer trabajo que describe la ocurrencia de polimorfismos a nivel de las proteínas Ecp. En cuanto al análisis de los pigmentos que sintetiza *F. fulva* las características químicas y fotoquímicas del pigmento oscuro sintetizado por *F. fulva*, así como la presencia de flaviolina cuando las reductasas fúngicas son inhibidas demuestran que el hongo sintetiza melanina-DHN. Por otro lado, se demostró que el gen *pks1* está implicado en la síntesis de los pigmentos oscuros, puesto que codifica para un dominio KS ya asociado a otras PKS involucradas en la síntesis de melanina-DHN. Por último, en lo que hace al perfil de metabolitos secundarios sintetizados por *F. fulva*, éste sintetiza y libera cuantitativamente menos

compuestos orgánicos volátiles (COVs) que *S. lycopersici*, hongo necrotrófico que provoca mancha gris de la hoja del tomate. *F. fulva* sintetizó un espectro específico y más diverso de COVs, que contrasta con la cantidad de COVs liberada por *S. lycopersici*. La producción de alcoholes furfurilo y compuestos derivados por *F. fulva* y *S. lycopersici* se encontró que estuvo asociado al desarrollo de síntomas en las hojas. Por otro lado, es evidente que *F. fulva* produce compuestos que contribuyen a la colonización de los tejidos. Estos resultados constituyen las bases para futuros estudios destinados al control de estas enfermedades en las zonas de producción de tomate de la Argentina, como el Cinturón Hortícola Platense y Corrientes.

ABSTRACT

Cladosporiosis, also known as tomato leaf mold disease, is caused by *Fulvia fulva* (Syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*, Cooke). Based on the sequence, and morphology, it is located in the Fungi kingdom, in the Ascomycota division, Dothideomycetes class, in the Capnodiales order, and in the Mycosphaerellaceae family. The leaf mold disease predominates in tomato production areas of Argentina in which conditions of high humidity and medium to high temperatures occur, which frequently occur only in some fields and often in greenhouses. The fungus *F. fulva* passes unfavorable environmental conditions and/or stages such as the cold winter season as a saprotroph or in a conidial state or in resistance structures, microsclerotia, on crop residues and / or in the soil for a period of up to one year. When the condition is favorable, the microsclerotia germinate and generate conidia, which act as primary inoculum. The infection of *F. fulva* begins with the dispersal of conidia that, under conditions of high humidity, adhere to the surface of the leaf, producing hyphae that enter the leaf tissues through open stomata and colonize intercellular spaces. The fungus develops in the apoplastic space until it displays conidiophores that appear on the abaxial surface of infected leaves. The *F. fulva*-tomato interaction complies with the gene-to-gene relationship, in which each pathogen avirulence gene product (avr) is recognized by a receptor protein encoded by the corresponding host's dominant resistance (Cf) gene. In recent times, the effector or avirulence proteins of *F. fulva* (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5 and Avr9), as well as the extracellular proteins (Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5 and Ecp6) have been isolated, sequenced and described. *F. fulva* has, at least potentially, the ability to synthesize not only a great diversity of effector proteins that combined generated 17 races of *F. fulva*, which differ in their ability to synthesize effector proteins. On the basis that pathogenicity of *F. fulva* in tomato plants is the result

of the interaction of effectors that interact with tomato hybrids that when *Cf* resistance genes are not detected plants become diseased. Thus, the general objective of this thesis was to broaden the analysis of *F. fulva* isolates, evaluate them at the avirulence gene level and evaluate the way to develop tools for the management of leaf mold from tomato. Regarding the specific objectives, this consisted of having a morpho-physiological and molecular analysis of *F. fulva* isolates; and Identify and characterize the races of the fungus that coexist in the sampled production areas and if there is a dynamic of genetic changes in the population of the pathogen. Another specific objective was to have a characterization at the level of *Fulvia fulva* effectors and genes that encode extracellular proteins in order to know the races of the fungus as well as the if the system is evolving under selection pressure. Another specific objective was to know the chemical nature of the pigments synthesized by *F. fulva* and their synthesis pathway. Finally, the objective was raised to know the secondary metabolites that *F. fulva*, a hemibiotrophic fungus synthesizes and to contrast it with the profile of a necrotrophic pathogen, which could eventually interact with tomato plants and result in compatible or incompatible interactions. Therefore, first, we proceeded to isolate and identify *F. fulva* from tomato plants with typical symptoms of tomato leaf mold, growing in production areas. The number of isolates was expanded and deposited in the collection of the Center for Phytopathology Research CIDEFI. This was done using water agar medium in which the fungus develops a purple pigment. Once monosporic cultures of *Fulvia fulva* were obtained an additional number of 8 isolates made a total of 14 isolates if we consider those obtained and described in Medina et al (2015). The identity of the isolates was confirmed by amplifying and sequencing the amplicons of the non-transcribed intergenic sequences that were 100% homologous to the ITS sequence of the *F. fulva* type strain. Growth and genetic diversity were analyzed with

ISSR markers and it was found that the supplementation of culture media did not result in increased growth of the fungus, which also showed considerable genetic diversity that was unrelated to the cultivar of origin of the fungus or the site of isolation. The new isolates were again classified into the two previously described races 0 and 2. Thus, the *avr* genes of *F. fulva* and the genes coding ECP proteins were amplified with pairs of primers homologous to the described sequences of *avr* and of ECPs. Their sizes and sequences confirmed the identity of the isolates, which were all representatives of *Fulvia fulva*. But it was also confirmed that these two races are evolving, since changes in the sequences of the *avr* and *ecp* genes were described. This is first work describing the occurrence of polymorphisms at the level of Ecp proteins. Regarding the analysis of the pigments synthesized by *F. fulva*, the chemical and photochemical characteristics of the dark pigment, as well as the presence of flaviolin when the fungal reductases were inhibited showed that the fungus synthesizes melanin-DHN. On the other hand, it was shown that the *pkc1* gene is involved in the synthesis of dark pigments, since it codes for a KS domain already associated with other PKS involved in the synthesis of melanin-DHN. Finally, regarding the profile of secondary metabolites synthesized by *F. fulva*, it synthesized and released quantitatively fewer volatile organic compounds (VOCs) than *S. lycopersici*, a necrotrophic fungus that causes gray leaf spot on tomato. *F. fulva* synthesized a specific and more diverse spectrum of VOCs, which contrasted with the amount of VOCs released by *S. lycopersici*, which is a necrotrophic fungus. The production of furfuryl alcohols and compounds derived by *F. fulva* and *S. lycopersici* was found to be associated with the development of symptoms in the leaves. On the other hand, it is evident that *F. fulva* produces compounds that contribute to the colonization of tissues. These studies are the bases for future studies related to the

control of these diseases within their areas of tomato production in Argentina mainly within the horticultural belt around La Plata and Corrientes.

CAPITULO I: Introducción General

I.1. Importancia de la horticultura en Argentina

La producción hortícola Argentina se caracteriza porque se lleva adelante en diversos sitios del país bajo condiciones ambientales contrastantes y por lo diversa de la producción. Encontramos horticultores en todas las provincias del país y sus sistemas de producción son en su mayoría de origen familiar. Es un sector importante en lo social y económico, que contribuye fuertemente a la alimentación cotidiana de la población, tiene capacidad para satisfacer la demanda interna, y participa de manera importante a la conformación del PBI. Buenos Aires, representa un 19,7 % de la producción total de las hortalizas producidas en Argentina (tabla I. 1) (CNA, 2018).

Tabla I.1. Principales provincias productoras de hortalizas en la Argentina.

Provincia	producción de hortalizas (has)	Proporción del total
Mendoza	32.054,40	23,75%
Buenos Aires	26.594,60	19,70%
Córdoba	15.769,50	11,68%
Salta	8.807,20	6,52%
Santiago del Estero	6.690,40	4,96%
Tucumán	6.467,20	4,79%
Santa Fe	5.392,90	3,99%
Catamarca	5.185,30	3,84%
Jujuy	4.525,10	3,35%
San Juan	4.273,80	3,17%
Otras provincias		14,25%

Fuente: Indec. Censo Nacional Agropecuario 2018

La producción hortícola del país oscila entre los 8 y 10 millones de toneladas, de las cuales nueve especies (papa, tomate, cebolla, batata, zapallo, zanahoria, lechuga, poroto, ajo) representan el 65 %; participan con el 20 % otras ocho especies (acelga, mandioca, zapallito, sandía, melón, choclo, berenjena y pimiento), SENASA (2018).

La producción de tomate es de gran importancia a nivel mundial, es el quinto cultivo hortícola considerando el área cultivada a nivel mundial, el tercero en relación

con su volumen de producción y el segundo cuando se considera el rendimiento (hg/ha) y a la producción bruta (USD) (Tabla I. 2).

Tabla I.2. Diez principales hortalizas a nivel mundial de acuerdo con su producción, área cultivada, rendimiento, y producción bruta en USD.

Hortaliza	Producción (tn)	Área cultivada (ha)	Rendimiento (kg/ha)	Producción bruta (millones USD)
Papa	376826967	19246462	195790	111056,98
Tomate	177042359	4782753	370168	95618,15
Cebolla	93168548	4955432	188013	51251,11
Ajo	26573001	1468811	180915	42050,32
Pepino y pepinillo	80616692	2144672	375893	40639,94
Mandioca	277102564	23482052	118006	39012,19
Chiles y pimiento	34497462	1938788	177933	32437,34
Batata	105190501	8623973	121975	26459,33
Zanahoria y nabo	42711830	1168729	365455	24869,45
Berenjena	51288169	1793978	285891	21929,91

Fuente: Food and Agriculture Organization, 2016

El Área productiva hortícola del gran Buenos Aires y La Plata abarca unas 2600 ha con unas 738 Explotaciones hortiflorícolas que producen en total 77000 tn/año (Censo Hortiflorícola de la Provincia de Buenos Aires, 2005) contribuyendo con el 62% de la producción de la provincia de Buenos Aires. Entre las hortalizas, el tomate se consolidó como el más importante de la región ocupando actualmente una superficie de 395 ha, de las cuales el 83% corresponden al cultivo bajo cubierta, de esta el 90% es para el cultivo de tomate y el 10% restante para el cultivo de pimiento, el 17% del resto de la producción de tomate se realiza a campo. Vale la pena aclarar que esta situación se ha visto modificada notablemente en los últimos años, aunque es obvio que el área

de producción destinada al cultivo de tomate y pimiento supera ampliamente las cifras consignadas, se carece de información oficial actualizada.

I.2.1 Producción de Tomate (*Solanum lycopersicum* L)

La importancia del cultivo de tomate también se refleja en el constante crecimiento de su producción a nivel mundial, que paso de 109,2 millones de toneladas (3,8 millones de ha) en el 2000 a 177 millones de toneladas (4,7 millones de ha) en el 2016 (Figura I. 1). Los principales países productores de tomate son China, India, Estados Unidos y Turquía. China triplica la producción de la India y aporta el 30 % de la producción mundial total (Tabla I. 3; FAOSTAT, 2016).

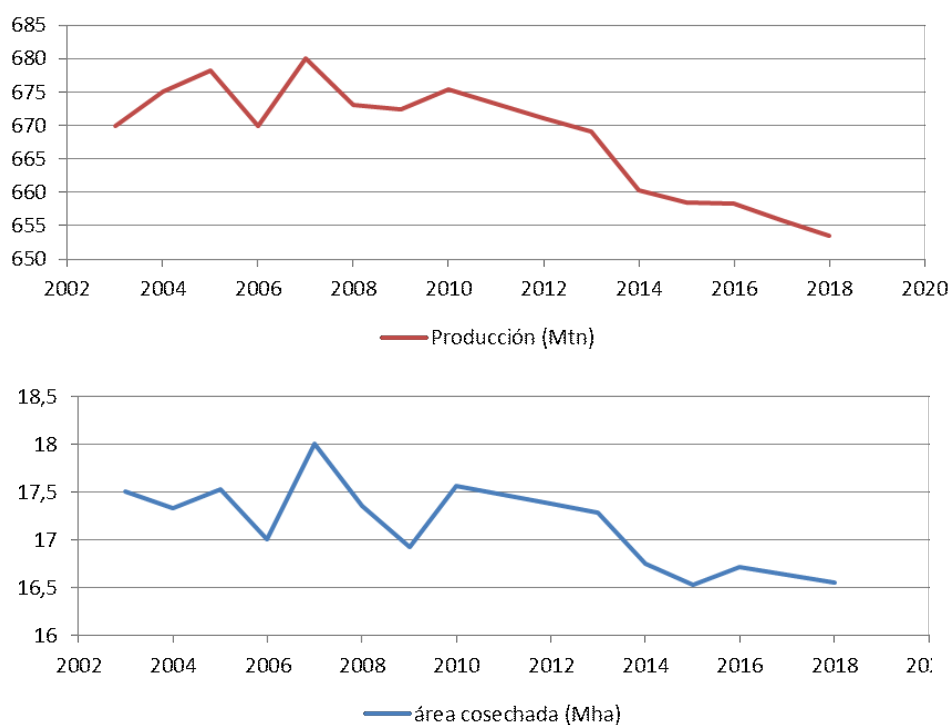


Figura I. 1. Producción y rendimiento de tomates en el mundo desde el 2002. Fuente: Food and Agriculture Organization, 2016. FAOSTAT (2016).

Tabla I.3. Principales países productores de tomate en el mundo

Región	País	Producción (tn)
Mundo	China	56423811
	India	18399000
	Estados Unidos	13038410
	Turquía	12600000
	Egipto	7943285
Sudamérica	Brasil	4167629
	Chile	997174
	Argentina	664009
	Colombia	644642
	Perú	232898

Fuente: Food and Agriculture Organization, 2016.

Argentina es el tercer productor de tomate de Sudamérica, ubicándose después de Brasil y Chile (Tabla I. 3). En el año 2018, el cultivo de tomate en la Argentina ocupó un área aproximada de 16551 ha, que generó 643855 tn de tomate con un valor aproximado de 8870,6 millones de dólares (FAOSTAT. 2018).

Las principales regiones de producción de tomate en el país son: la provincia de Corrientes, en el Noreste; las provincias de Salta y Jujuy, en el Noroeste; la provincia de Mendoza, en Cuyo; el Cinturón Hortícola Platense y el Cinturón Verde de Mar del Plata, en la provincia de Buenos Aires; y el Alto Valle de Río Negro. En estas regiones, se cultiva tomate bajo distintos sistemas de producción, en diferentes épocas del año para generar una producción que abastece la demanda nacional (Tabla I. 4). El tomate para consumo fresco se produce principalmente de las provincias de Corrientes y Buenos Aires, y si bien algo de la producción se realiza a campo, gran parte de la

misma se genera en invernadero. El tomate destinado a la industria se cultiva principalmente en la provincia de Mendoza a campo (Argerich, & Troilo, 2011).

Tabla I.4. Principales regiones productoras de tomate en la Argentina.

Provincia / Región	Mes											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Buenos Aires (invernadero)	X	X	X	X	X	X	X				X	X
Buenos Aires (campo)	X	X	X	X	X	X						X
Santa Fe (temprana)											X	X
Santa Fe (tardía)				X	X							
Tucumán											X	
Río Negro		X	X	X	X	X						
Corrientes (invernadero)			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mendoza	X	X	X	X	X	X						
Salta y Jujuy (NOA)					X	X	X	X	X	X		
Formosa					X	X	X	X	X	X	X	

Fuente: Argerich & Troilo, 2011.

El tomate se cultiva en sitios con temperatura máxima de aproximadamente 25-35 °C, en suelos bien drenados y bajo luz solar plena. Su patrón de crecimiento es indeterminado, pero muchos cultivares modernos son determinados, lo que es adecuado para la cosecha mecánica (Jones, et al., 2014, Argerich & Troilo, 2011).

I.2.1 Ubicación taxonómica y morfología de la planta de Tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., es miembro de la pequeña sección *Lycopersicum*, clado monofilético dentro del género *Solanum* (Figura I. 2. A), familia Solanaceae (Peralta & Spooner, 2001; Peralta, et al., 2008).

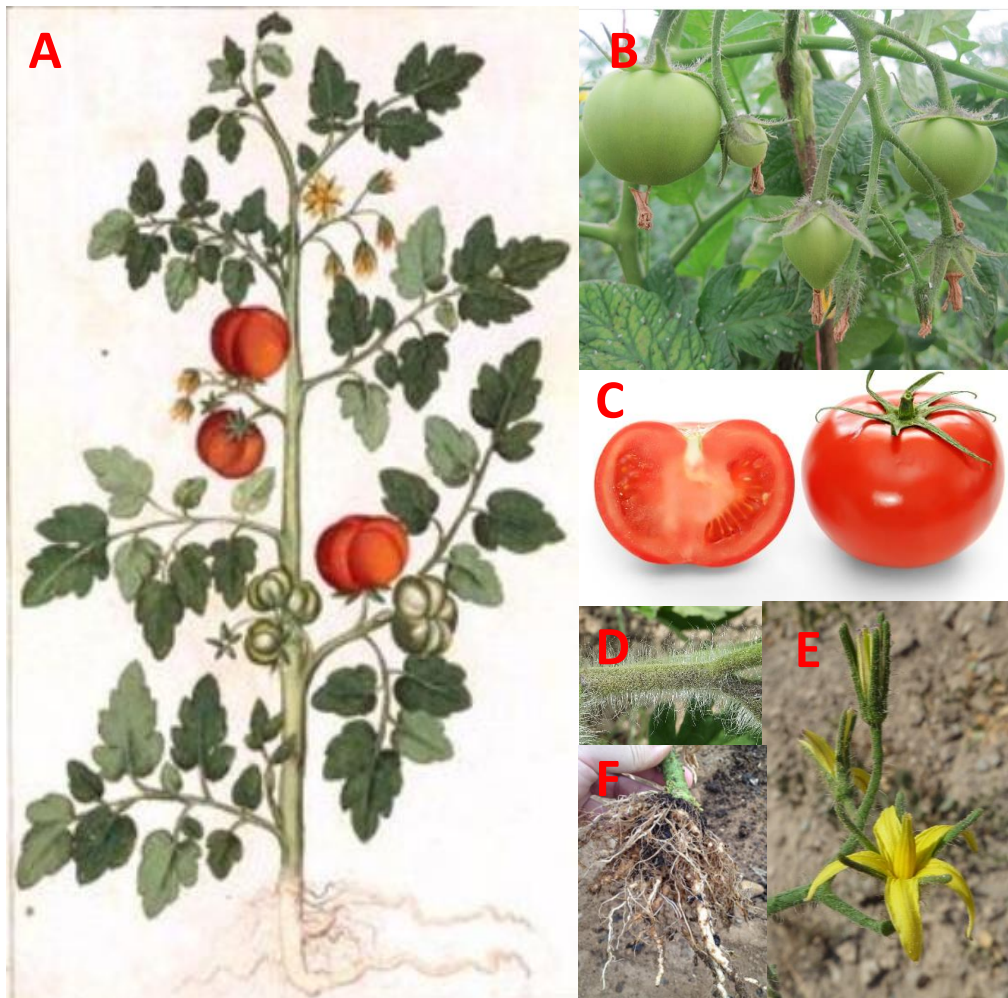


Figura 1.2. A: Esquema de morfología de la planta de tomate, haciendo foco en algunos de los órganos de importancia; B: infrutescencias inmaduras; C: corte trasversal del fruto maduro; D: pubescencia en la planta; E: inflorescencia; y finalmente F: Raíz principal y adventicias.

La planta de tomate posee un sistema radicular pivotante (Figura 1. 2. F), compuesto por una raíz principal que puede llegar al metro de profundidad, provista de una gran cantidad de ramificaciones secundarias que además, son acompañadas por un número considerable de raíces adventicias que se generan en la base del tallo (Argerich & Troilo, 2011). Este es anguloso y pubescente, es decir, recubierto con pelos finos y cortos (Figura 1. 2. D) muchos de los cuales son de naturaleza glandular, y le

confieren su olor característico. Al principio, el tallo es rígido y la planta erguida, sin embargo, a medida que crece, el tallo no tiene la rigidez suficiente y se vuelve rastrero. Aun así, el desarrollo del tallo es variable, algunos cultivares tienen un patrón de crecimiento determinado, o definido y otros de crecimiento indeterminado, o indefinido. En los primeros, una vez producidos varios pisos laterales de inflorescencia, se forma una inflorescencia terminal que resulta en un crecimiento determinado del tallo principal (Figura I. 2. E). Los cultivares de crecimiento indeterminado, las inflorescencias solamente desarrollan en posición lateral y el tallo conserva un meristema apical que es el responsable del continuo crecimiento del tallo (Blancard, 2012; Argerich, & Troilo, 2011).

Las hojas, también pubescentes, son compuestas e imparipinnadas, constituidas por 7 a 9 folíolos lobulados o dentados y presentan pequeños foliolulos en el raquis de la hoja (Blancard, 2012; Argerich, & Troilo, 2011).

Las flores de las variedades cultivadas se agrupan en inflorescencias simples o ramificadas cuyo número varía entre 5 y 12. Las flores son hermafroditas, regulares y péndulas, de polinización autógena (Blancard, 2012; Argerich, & Troilo, 2011).

Los frutos del tomate son bayas compuestas por una pared exterior, el pericarpio, que rodea los lóculos y formadas por semillas y tejidos placentarios separados por paredes internas, los tabiques (Figura I. 2. B, C). Los frutos de las especies salvajes son generalmente pequeños, con menos de 2 cm de diámetro y biloculares, mientras que los de las especies cultivadas son más grandes y multiloculares. Su color, verde cuando es inmaduro (Figura I. 2. B), evoluciona durante la madurez para alcanzar diversos tonos según los cultivares, como pueden ser el crema, amarillo, naranja, rosa, rojo o marrón. (Blancard, 2012; Argerich & Troilo, 2011).

El fruto del tomate está compuesto principalmente por agua (90-95 %), azúcares, ácidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos. (US; 2016).

El sabor del fruto viene dado, en gran parte, por el balance entre los azúcares solubles (principalmente glucosa y fructosa) y los ácidos orgánicos (cítrico y málico). Sin embargo, el sabor del tomate también resulta del aporte de compuestos volátiles (Argerich, & Troilo, 2011).

Por otra parte, su color es consecuencia de la composición y distribución de carotenoides, clorofila y antocianinas (Jones, et al., 2014; Wang & Seymour, 2017).

I.2.2. Enfermedades en Tomate: definición y agentes etiológicos.

Se define como enfermedad a la serie de respuestas invisibles y visibles de las células y tejidos vegetales a un organismo patógeno o factor ambiental, que resulta en cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta y que puede llevar a un deterioro parcial o muerte total de partes de la planta o de toda la planta (Agrios, 2005).

Las enfermedades resultan de la interacción del hospedante (planta), el ambiente (entorno fisicoquímico) y el patógeno o agente etiológico, en un momento y sitio determinado. Esto es tan así, que las plantas suelen convivir con agentes etiológicos, pero solo cuando las condiciones ambientales son predisponentes desarrollan la enfermedad. Esta interacción se representa esquemáticamente mediante el “triángulo de la enfermedad” (Figura I. 3; Agrios, 2005).

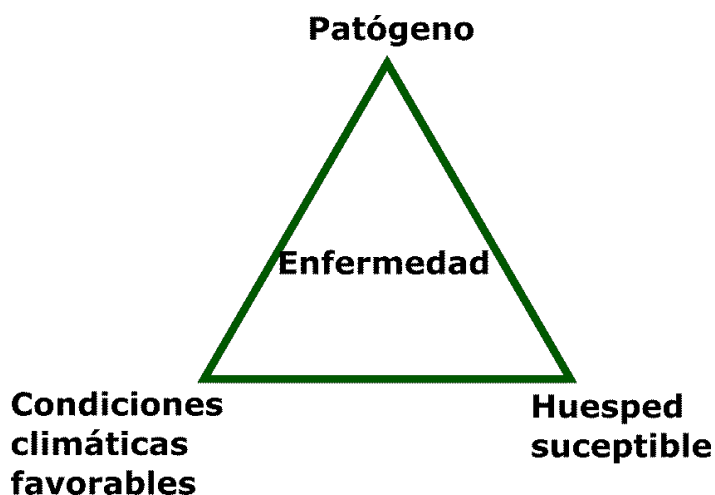


Figura 1.3 Triángulo de la enfermedad.

Las enfermedades de las plantas suelen agruparse según los síntomas que causan (podredumbre de la raíz, marchitez, manchas foliares, etc.), los órganos que afectan (enfermedades de las raíces, vástagos, follaje, etc.) o el tipo de plantas afectadas (enfermedades de cultivos a campo, enfermedades vegetales, enfermedades del césped, etc.). Sin embargo, un criterio útil para agrupar enfermedades es según el agente etiológico que causa la enfermedad puesto que, al indicar la causa de la enfermedad, se sugiere el probable desarrollo y propagación de esta y a su vez, también las posibles medidas de control (Agrios, 2005). Así, de acuerdo con su etiología, las enfermedades de plantas se pueden dividir en: enfermedades parasitarias, de origen biótico y enfermedades no parasitarias, de origen abiótico también llamadas fisiogénicas (Argerich & Troilo, 2011; Agrios, 2005).

Las enfermedades de origen abiótico son el resultado del efecto de factores ambientales sobre los procesos fisiológicos de las plantas, cuando estos superan cierto umbral, la planta desarrolla síntomas. Si bien, la cantidad de factores ambientales que pueden causar enfermedades en plantas es muy amplia, se destacan el exceso de una sustancia tóxica en el suelo o en el aire, el desbalance de una sustancia esencial (agua, oxígeno o nutrientes minerales) o el resultado de algún extremo de

disponibilidad de agua, temperatura, oxígeno, CO₂ o luz (Argerich & Troilo, 2011; Agrios, 2005). Algunos de los desórdenes nutricionales que suelen afectar al tomate son ocasionados por la deficiencia de nitrógeno, calcio, fósforo, entre otros. La planta de tomate es muy sensible a compuestos con actividad fitotóxica, y ante un uso abusivo rápidamente la planta desarrolla síntomas típicos. (Agrios, 2005; Argerich & Troilo, 2011; Blancard, 2012; Jones et al., 2014).

Las enfermedades de origen biótico son provocadas por diversos organismos que se asocian íntimamente con las plantas, nutriéndose y multiplicándose o creciendo a expensas de estas. Es de destacar que el daño que provocan los organismos en las plantas no se explica solo por la competencia por nutrientes. Los agentes causales suelen secretar sustancias o inducir en el hospedante la síntesis de sustancias en respuesta a estímulos del parásito. En estos casos, los tejidos afectados pueden presentar un aumento de la respiración celular, desintegración o colapso celular, división o agrandamiento celular anormal y degeneración de componentes específicos como la clorofila, causando síntomas como marchitamiento, clorosis, necrosis y abscisión (Agrios, 2005).

Las enfermedades parasitarias son causadas por organismos, como los virus y viroides, bacterias, plantas superiores parasitarias, protozoos, nemátodos, hongos y pseudohongos (Agrios, 2005).

I.2.3. Fungi: Características y hábitos tróficos.

Los hongos (reino Fungi) son organismos heterótrofos de organización unicelular o pluricelular y reproducción sexual o asexual, cuyos caracteres distintivos principales son su tipo de nutrición por absorción y su pared celular compuesta por quitina (Agrios

2005). Los pseudohongos (Oomycota, Reino *Straminipila*) se diferencian de los hongos en características tales como poseer pared celular compuesta por celulosa, diferentes vías para la biosíntesis de lisina, mitocondria con crestas tubulares vesiculares, talos vegetativos en gran parte diploides y, a menudo, β_{1-3} glucanos (laminarinas) como su principal compuesto carbonado almacenamiento de energía (James, et. al., 2014; Dick, 2001).

Los patógenos fúngicos y oomicetes se han clasificado por modos de nutrición durante más de 130 años. (de Bary & Garnsey, 1887), pero en los últimos 50 el modelo dominante ha sido una división en tres clases "tróficas", biótrofos, hemibiótrofos y necrótrofos (Thrower, 1966; Lewis, 1973).

Los hongos poseen diversos hábitos, o estilos de vida, que se diferencian en base al tipo de interacción que estos mantienen con sus hospedadores. Los hongos cambian su estilo de vida de acuerdo con los cambios del ambiente (Kogel, 2006; Rai & Agarkar 2014). Recientemente se demostró que todos los fitopatógenos muestran transiciones de hábito de biotrófico a necrotrofico, pero la duración de las diferentes fases de crecimiento varía según el caso; la fase biotrófica es relativamente prolongada para biótrofos, intermedia para hemibiótrofos y corta para necrótrofos (De Wit, 2016).

Sin embargo, más recientemente se propuso una nueva clasificación de los niveles tróficos en función del análisis genómico de las enzimas involucradas en la degradación de carbohidratos (CAZyme), determinado por el modelo CATASrophy (Hane et al., 2020). Donde la clase Saprótrofo se mantiene inalterada, mientras que en los otros niveles tróficos no. Así la nueva clasificación de la alimentación o trofia por el modelo define cuatro divisiones principales para especies asociadas con plantas vivas; Estos son monométrfos (Mo), polométrfos (P), mesótrofos (Me) y vascularótrofos., además dentro de las clases principales se distinguen subclases, así dentro de la clase

mesótrofos, las subclases Mesotrofos intracelular (MeI) y extracelular (MeE), y dentro de los polímetrofos las subclases de rango amplio (PB) y estrecho (PN) de hospedantes. Esto da un total de siete clases discretas de interacciones patogénicas (Figura I. 4). Los Monométofos metabolizan principalmente azúcares simples, los Polímetrofos metabolizan azúcares complejos, y los Mesotrofos tienen características de ambos. Estas clases novedosas son más o menos análogas a los biótrofos, necrotróficos y hemibiotróficos, respectivamente. La clasificación proporciona información sobre las propiedades de estas especies y ofrece una ruta fácil para desarrollar medidas de control para enfermedades recientemente reconocidas. (Hane, et al., 2020).

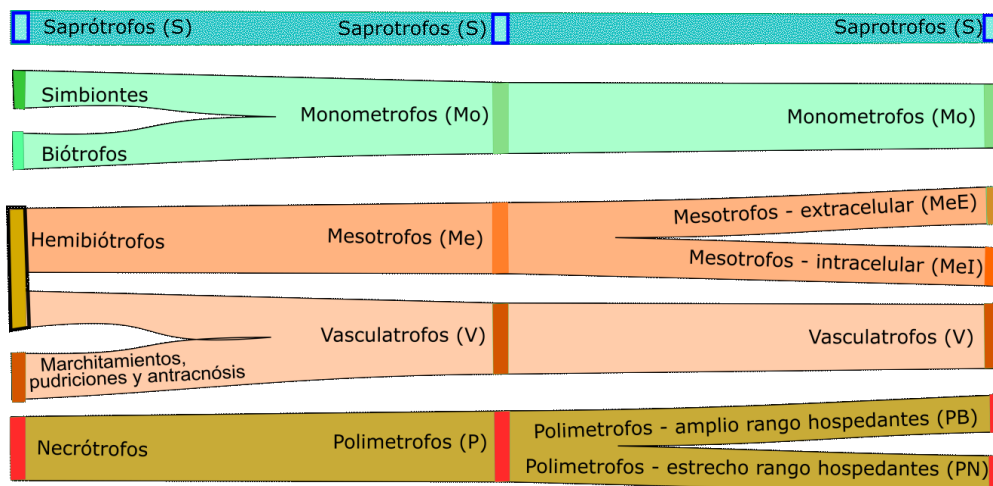


Figura I.4. Comparación de términos tróficos comunes utilizados en la literatura de patología vegetal (izquierda), con nuevo sistema de clasificación propuesto de cinco clases tróficas principales (media) y siete subclases (derecha).

La clase Monométofa (Mo) por el método CATASrophy vinculó filogenéticamente grupos muy dispares de biótrofos y simbiontes tradicionales, incluyendo oomicetes (por ejemplo, *Phytophthora spp.*, *Albugo spp.* y *Hyaloperonospora arabidopsidis*), hongos mohos, tizones (por ejemplo, *Puccinia spp.* y *Ustilago spp.*, y *Melampsora laricispopulina*), oídios (por ejemplo, *Erysiphe necator* y *Blumeria graminis*), y conocidas micorrizas (por ejemplo, *Epichloë spp.*, *Pisolithus spp.*, *Laccaria bicolor*, y

Tuber melanosporum). Se excluyeron de esta clase, las tradicionalmente definidas como biótrofos, *Fulvia fulva* (sin *Cladosporium fulvum*) y *Venturia spp.*, que no desarrollan haustorios. Sin embargo, estudios recientes han concluido que tanto *F. fulva* como *Venturia spp.*, son hemibiotróficos (Stotz, et al., 2014). La clase Mo fue la menos prevista por CATASrophy, ya que las subclases haustorial y no haustorial no podían distinguirse adecuadamente, ni los simbiontes. Los organismos biótrofos y simbiontes tienen un bajo contenido de Cazyme y de genes que codifican metabolitos secundarios. Esto es consistente con una estrategia común de causar un daño mínimo a las células hospedadoras. Las especies de levadura de vida libre también fueron críticamente colocadas en esta clase, probablemente porque presentan un metabolismo biotrófico haustorial paralelo (Hahn & Mendgen, 1997, 2001; Voegelé, et al., 2001) tiene preferencia por los azúcares no polimerizados (Rodrigues et al., 2014). Las levaduras y especies como *Neurospora crassa* son los primeros colonizadores de fuentes ricas de azúcares y aminoácidos, y algunas cepas carecen de enzimas necesarias incluso para sustratos modestamente polimerizados (por ejemplo, sacarosa). Las especies de la clase Mo generalmente tienen el menor número de Cazymes, de acuerdo con esta explicación (Hahn & Mendgen, 2001).

La clase Polímetrofos (P) por el método CATASrophy agrupa Géneros o especies ampliamente aceptados como necrotróficos, entre ellos: *Alternaria spp.*, *Botrytis cinérea*, *Cochliobolus spp.*, *Pyrenophora spp.*, *Parastagonospora nodorum*, *Ascochyta rabiei*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium spp.*, y *Sclerotinia spp.* *Fusarium graminearum* es comúnmente descrito como hemibiótrofo, pero la polimerización es consistente con su amplia gama de hospedadores y por otro lado, su dependencia en las micotoxinas lo redefine en la clase polímetrofos (P). Que incluye otros como, *Sclerotinia spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria brassicicola* y *A. rabiei*. Así la

clase se divide en dos nuevas subclases, polímetrofos de amplio rango de hospedantes (PB) y los polímetrofos de rango estrecho (PN), que pueden distinguirse por el contenido de CAZyme (Choquer, et al., 2007; Andrew, et al., 2012; Baroncelli, et al., 2016), el primero habiendo ampliado el contenido de CAZyme asegurando actividad en múltiples huéspedes (Baroncelli, et al., 2016), permitiendo una menor dependencia de las armas fúngicas, los efectores. *Botrytis cinérea* representa por excelencia la subclase de rango amplio de hospedantes (PB). A la inversa, la subclase PN requieren menos diversidad genética de CAZyme en relación con la subclase PB y se ha informado comúnmente que utilizan efectores específicos en los huéspedes (Stergiopoulos & de Wit, 2009). La subclase PN se ajusta bien a las expectativas convencionales e incluye *Pyrenophora spp.*, *P. nodorum*, *Cochliobolus spp.*, y *Alternaria spp.*, (excepto *A. brassicicola*).

La clase Mesótrofos, involucra a hemibiótrofos y son tradicionalmente los que más cuesta distinguir. Incluyen a la mayoría de las especies dentro de los siguientes géneros *Colletotrichum spp.*, *Venturia spp.*, *Zymoseptoria spp.*, *Fusarium poae*, *Pseudocercospora fijiensis*, *F. fulva*, *Leptosphaeria maculans*. Además, el método apoya una nueva división en dos subclases más, similares a las propuestas anteriores (Perfect et al., 1999) que se basaban en la invasión de tejidos de los huéspedes en intracelulares o extracelulares. En la clase mesótrofos extracelular (MeE) se incluyen *L. maculans*, *Zymoseptoria spp.*, y *P. fijiensis*; estos hongos exhiben una fase latente alargada antes de la necrotrofia y también fueron agrupados apropiadamente, *Venturia spp.*, y *F. fulva*, de acuerdo con sus recientes reclasificaciones como hemibiótrofos (Stotz, et al., 2014). *F. fulva* fue considerado durante mucho tiempo como modelo biotrófico, ya que crece biotróficamente bajo condiciones de invernadero en condiciones controladas con temperatura óptima y humedad relativa (De Wit, 2016), sin

embargo en condiciones invitro donde se ajustan la temperatura (25°C) y la humedad (mayor al 80%) o infección natural puede causar necrosis. Mesótrofos intracelular (Mel) es una subclase que se asignó inicialmente a especies con estructuras de nutrición similares a un apresorio, que se forman en la superficie del hospedador antes de la penetración, como lo hace *Colletotrichum spp.* Casi todos los *Colletotrichum spp.*, fueron clasificados como Mel, con la excepción de *C. gloeosporioides* que se incluyó en la clase vascularótrofa (V). Otras especies con formación de apresorio incluyendo *Magnaporthe oryzae*, *G. graminis*, y *Alternaria spp.*, (excepto *A. longipes*, Mel), fueron colocadas en la clase P. *Fusarium poae* y *F. graminearum* se clasificaron en base a su afinidad en la subclase Mel, apoyados por la formación de estructuras como el apresorio y en que son productoras de micotoxinas. Si bien esta clase se asignó inicialmente a las especies hemibióticas que forman apresorio, sin embargo la subclase no parece estar vinculada a la presencia de este, si bien esta correlacionado con las interacciones entre los huéspedes intracelulares (Hane, et al., 2020).

La clase vascularótrofos (V) contiene patógenos que suelen provocar síntomas de marchitez, antracnosis y putrefacción y se agrupan por separado en las clases Mo, Me o P. La clase V es más similar en contenido de CAZyme a la subclase PB y en ella se ubicaron a *Fusarium spp.*, (excluido *F. graminearum*) y *Verticillium spp.*, a pesar de que ambos provocan "marchitez", presentan varias diferencias, incluyendo: el rango de hospedantes, mientras *Verticillium* tiene un rango de hospedantes más amplio, está adaptado a temperaturas más frías. En tomate, *Fusarium* produce un mayor bronceado y necrosis que *Verticillium*. Por lo tanto, luego se reclasificaron en Polimétrofos, lo que es posible se deba a que se debe investigar más a fondo otras características biológicas (Hane, et al., 2020).

Desde el punto de vista fitopatológico, las especies más importantes son las que desarrollan micelio vegetativo sobre el sustrato del que se nutren y además bajo ciertas condiciones, especialmente cuando las mismas son desfavorables desarrollan esporas o forman estructuras de resistencia, como esclerocios, clamidosporas o esporas sexuales como las oosporas, entre otras. En contraste con los virus, las bacterias e incluso ciertos hongos oportunistas, ingresan y/o invaden, con frecuencia, por aberturas naturales o por heridas. Pero los hongos y eumicetes fitopatógenos disponen de diversas estrategias para atravesar las barreras externas de las plantas y posteriormente, invadir los tejidos vegetales. La principal fuente de inóculo de estos fitopatógenos son sus estructuras de resistencia, como rizomorfos, esclerocios, y clamidosporas o las estructuras de reproducción, como las esporas que pueden provenir tanto de la fase sexual como o de fase asexual como los conidios, las cuales pueden diseminarse a través del viento, agua o por la acción de animales. Entre las micosis de mayor importancia podemos mencionar al mal de los almácigos causado por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, *Sclerotinia spp.* y *Sclerotium spp.* Y por los eumicetes *Pythium spp.* y *Phytophthora spp.*; al moho gris causado por *Botrytis cinerea*; al oídio causado por *Leveillula taurica*, *Oidium neolycopersici* y *O. lycopersici*; a la fusariosis causado por *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*; al cancro de tallo causado por *Alternaria alternata*; al tizón tardío causado por el eumicete *Phytophthora infestans*; al tizón causado por *Phytophthora capsici*; a la podredumbre del tallo y de la raíz causada por *Phytophthora parasitica*; a la raíz corchosa causada por *Pyrenochaeta lycopersici*; a la podredumbre húmeda del tallo causada por *Sclerotinia sclerotiorum*; a la verticilosis causada por *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*; a la antracnosis causada por varias especies del género *Colletotrichum*, como *C. coccodes*, *C. gloeosporioides* y *C. dematium*; a la viruela causada por *Septoria lycopersici*; a la mancha anillada

causada por *Corynespora cassiicola*; a mancha gris de la hoja causada por *Stemphylium solani*, *S. lycopersici* y *S. botryosum* y a la cladosporiosis o moho de la hoja causado por *Fulvia fulva*. (Argerich & Troilo. 2011; Blancard, 2012; Jones, et al., 2014).

I.2.4. Cladosporiosis o Moho de la Hoja del tomate (*Fulvia fulva*)

I.2.4.1 Historia:

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1883 por M. C. Cooke en Inglaterra, sobre muestras de hojas enviadas desde Carolina del Sur, EEUU (Cooke, 1883). El tomate se había llevado a Europa desde América Central en el siglo XVI, pero la enfermedad era desconocida o por lo menos no fue descrita en los 300 años siguientes a su introducción. Es probable que el requisito de alta humedad previniera el desarrollo de la enfermedad en climas más templados en Europa y Norte América, hasta que el cultivo intensivo en invernaderos comenzó a diseminarse. En 1908, la enfermedad estaba presente en todas las áreas de producción de tomate (Makemson, 1918). En la literatura científica se informa que aunque parece ser que *F. fulva* (sin. *C. fulvum*) se originó en el propio hábitat natural de las especies del género *Solanum* (sin. *Lycopersicon*) en Sud América, el cultivo de invernaderos generó las condiciones favorables para el desarrollo del hongo patógeno en las áreas de clima templado.

I.2.4.2 Importancia de la patología

La Cladosporiosis o moho de la hoja de tomate, causada por *Fulvia fulva* (sin *Cladosporium fulvum*) es una enfermedad destructiva que ocurre con frecuencia y se

encuentra ampliamente distribuida en el mundo. En los cultivos protegidos ha llegado a considerarse el patógeno fúngico más relevante en la época estival (Thomma et al., 2005), que ocasionalmente, cuando se dan condiciones de alta humedad, aparece sobre el cultivo a campo. Las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad son alta humedad relativa (90 %) y temperaturas medias de (24 °C), y si bien la patología puede ocurrir con temperaturas de entre 10 °C y 32 °C; no desarrolla cuando la humedad relativa es inferior al 85%.

I.2.4.3 Taxonomía

Fulvia fulva (Sin. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva* Cooke), se clasificó en base a la filogenia y morfología en el reino *Fungi*, dentro del phylum *Ascomycota*, clase *Dothideomycetes*, en el orden *Capnodiales*, y en la familia *Mycosphaerellaceae*; así la morfología de los conidióforos presenta dilataciones nudosas en un solo lado, que pueden desarrollar como ramas cortas laterales. Producen conidios de 16-40 x 5-7 µm, cilíndricos o elipsoides, de superficie lisa, recta o algo curvado, en cadenas normalmente ramificadas y de color verde oliva a pardo (Cooke, 2003) Gracias a que se dispone del genoma *F. fulva* (De Wit et al., 2012) se ha encontrado que *F. fulva* está estrechamente relacionado con varios patógenos del género *Mycosphaerella* (Braun et al., 2003; Crous et al., 2001; Goodwin et al., 2001). Esta relación filogenética además, está apoyada en observaciones morfológicas sobre las interacciones de estos patógenos con sus respectivas plantas hospedadoras. Por ejemplo, estudios citológicos de la interacción entre *Mycosphaerella fijiensis* (el agente causal de la devastadora enfermedad sigatoka negra) y *Musa spp.* (Plátano) reveló que *M. fijiensis*, al igual que *F. fulva*, se comporta como un patógeno biotrófico, ingresando a la hoja por los

estomas, colonizando exclusivamente el espacio intercelular de las células del mesófilo sin formar haustorio (Beveraggi et al., 1995).

1.2.4.4 Ciclo de la enfermedad

El hongo causante del moho de la hoja del tomate sobrevive las etapas desfavorables como la temporada fría del invierno de manera saprótrfica o en estado conidial o en estructuras de resistencia, microesclerocios, sobre los residuos del cultivo y/o en el suelo por un período de un año (Blacard, 2012; Thomma et al., 2005; Figura I. 5). Cuando la condición es favorable el microesclerocio germina y genera conidios, que actúan como inóculo primario. La infección de *F. fulva* comienza con los conidios que en condiciones de alta humedad se adhieren a la superficie de la hoja, produciendo sobre esta, hifas (Bond 1938; Lazarovits & Higgins 1976b; De Wit 1977; Figura I. 5). Estas ingresan a los tejidos de la hoja por los estomas abiertos y colonizan el espacio intercelular (Joosten & de Wit, 1999). El hongo desarrolla en el espacio apoplástico hasta que desarrolla conidióforos que aparecen en la cara abaxial de las hojas infectadas (De Wit 1977; Figura I. 5). Los síntomas generalmente aparecen 10 días después de la inoculación y los mismos se producen por la formación de conidios, en un gran número y pueden propagarse fácilmente de planta en planta por el viento, salpicaduras de agua, herramientas, ropa de los trabajadores y también por insectos, así puede comenzar en las hojas nuevas de la misma planta o plantas cercanas un nuevo ciclo de la enfermedad. No se conoce hasta el momento el ciclo sexual del hongo.

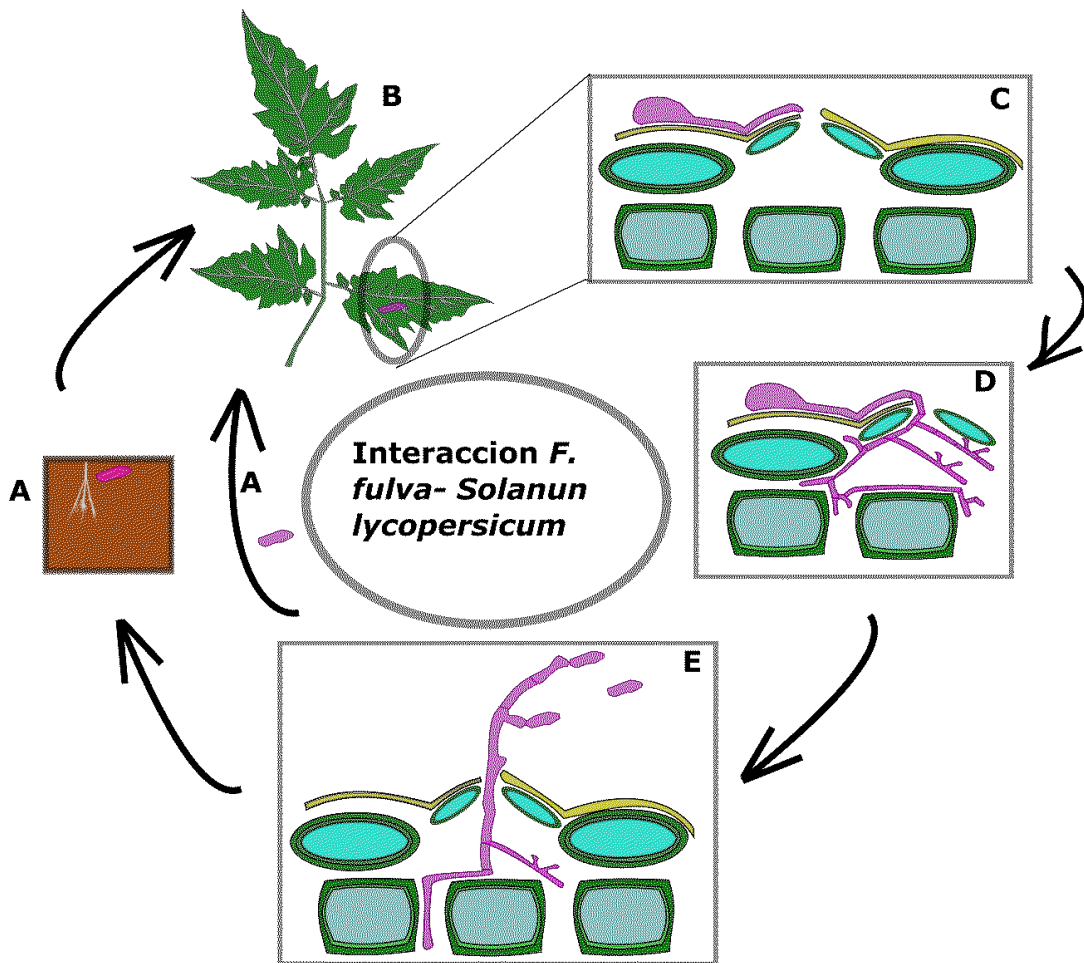


Figura I. 5: Ciclo del moho de la hoja del tomate por el agente patógeno *F. fulva*. A) conidio en reposo en condición no favorable (izquierda) o bien en condiciones favorables (derecha). B) adhesión del conidio al haz de la hoja de tomate. C) germina el conidio y la hifa corredora avanza sobre la superficie de la hoja hacia un estoma abierto. D) proliferación del micelio por toda la cámara estomática y el espacio apoplástico. E) conidióforo saliendo por estoma de cara abacial de la hoja, liberando conidios para repetir el ciclo si las condiciones son favorables.

1.2.4.5 Interacciones compatibles e incompatibles *Fulvia fulva*-Tomate

En condiciones de alta humedad relativa y temperaturas templadas, los conidios de *F. fulva* germinan para generar las hifas en la parte inferior de las hojas de tomate (Joosten & de Wit, 1999; Thomma et al., 2005). Estas ingresan a la hoja por los estomas abiertos. Después de la penetración, las hifas aumentan de diámetro y

colonizan el espacio apoplástico alrededor de las células del mesófilo de las hojas de tomate (Figura I. 6 A) (Joosten & de Wit 1999; Thomma et al., 2005). *F. fulva* no desarrolla estructuras de nutrición, como p.ej. haustorios, pero se nutre de azúcares y aminoácidos que se encuentran disponibles en el espacio apoplástico, incluyendo a la sacarosa y la glutamina. La sacarosa es metabolizada por *F. fulva* por medio de la enzima invertasa que la desdobla en glucosa y fructosa, que además posteriormente son convertidas por medio de la enzima manitol-deshidrogenasa en manitol, que es metabolizado por la planta huésped (Joosten et al., 1990). Aproximadamente 10-14 días después de la penetración, el hongo crece profusamente ocupando el espacio apoplástico, pero además desarrolla una importante cantidad de conidióforos, que aparecen por los estomas de la cara abaxial de las hojas infectadas (Thomma et al., 2005). Sin embargo, en las interacciones incompatibles cuando las hifas del hongo ingresan al espacio apoplástico, en las células del mesófilo el reconocimiento del patógeno induce una respuesta de defensa de la planta que es la respuesta de hipersensibilidad (HR) que restringe el crecimiento del hongo (Figura I. 6B; Joosten & de Wit 1999; Stergiopoulos & de Wit 2009). Durante la infección, *F. fulva* secreta en el espacio apoplástico de los tejidos foliares varias proteínas de bajo peso molecular (21 kDA) (efectores) (Figura I. 6C; Stergiopoulos & de Wit, 2009). Estas son factores de virulencia en plantas de tomate susceptibles a la enfermedad sin genes de resistencia, o bien pueden desencadenar respuestas de defensa en plantas conteniendo genes de resistencia (figura I. 6D).

Cuando un factor de virulencia es reconocido por la proteína que codifica un gen de resistencia, como causa la avirulencia, la proteína se denomina factor de avirulencia (*Avr*). A nivel molecular, la percepción en las plantas de tomate de los efectores de *F. fulva* está mediada por genes de resistencia *Cf* que codifican proteínas de resistencia.

Estas son glicoproteínas extra-citoplasmáticas ancladas en membranas, que pertenecen a la clase de proteínas receptores de las siglas en ingles *receptor-like protein* (RLPs) (Thomma et al., 1997, 2005; De Wit & Joosten 1999; Kruijt et al., 2005). La percepción de los factores *Avr* por las proteínas de resistencia *Cf* correspondientes desencadena respuestas de defensa de la planta, incluyendo la reacción HR (Rivas & Thomma, 2005).

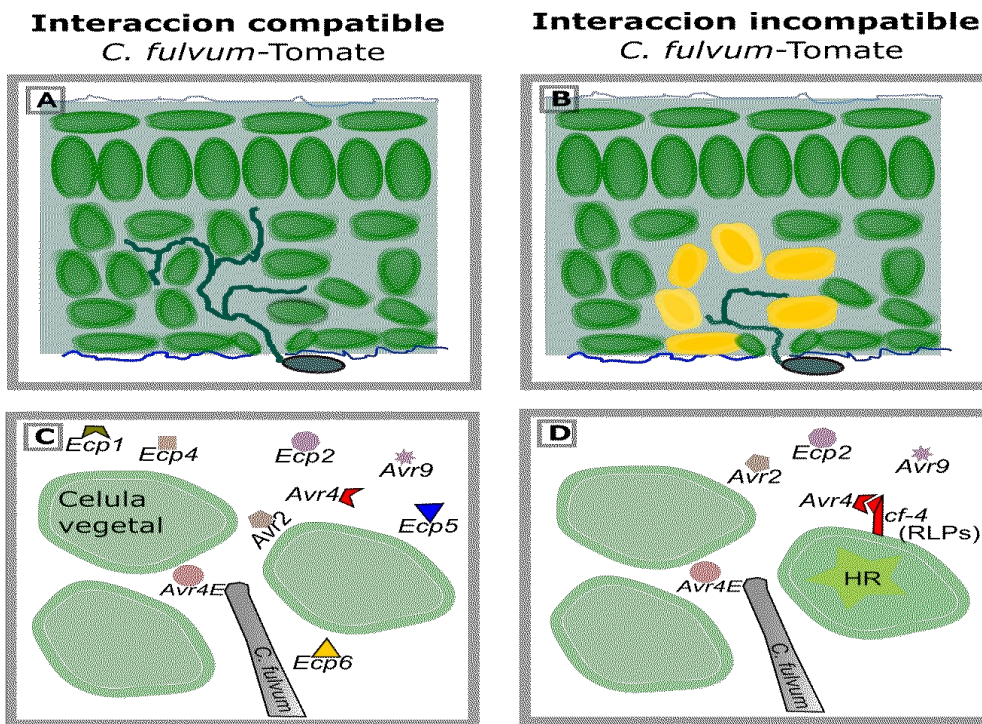


Figura. 16. Infección de hojas de tomate por *Fulvia fulva*. (A) Interacción compatible entre *F. fulva* y tomate. La germinación de los conidios deviene en la formación de una hifa que ingresa por los estomas y coloniza el espacio apoplástico de los tejidos de las hojas de tomate. (B) En una interacción incompatible, la proteína codificada por los genes de resistencia del tomate reconoce la presencia de las proteínas de virulencia del hongo, y de esta manera se induce la respuesta hipersensible (HR), que detiene el crecimiento del hongo. (C) Durante la infección, *F. fulva* secreta varias pequeñas proteínas efectoras ricas en cisteína (*Avr*'s y *Ecp*'s) que interactúan con los mecanismos de defensa del huésped. (D) En las plantas resistentes,

los efectores son reconocidos por las correspondientes proteínas receptoras (RLPs), que activan las respuestas de defensa mediadas por *Cf*, incluyendo la respuesta hipersensible (HR).

El moho de la hoja del tomate afecta fundamentalmente a las hojas, primero las más viejas y luego las jóvenes. Los síntomas consisten inicialmente en manchas cloróticas que toman un color amarillo en el haz (Figura I. 7: A); en el envés de la hoja aparece el signo de la patología, que son los conidióforos y conidios del hongo que son de color pardo oliváceos (Figura I. 7: B; Blacard, 1992; Thomma et al., 2005). Ocasionalmente, los tallos, flores, pecíolos y raramente los frutos son afectados (Ellis, 1971; Holliday & Mulder 1976; Curtis et al., 1994; Fox 1997; Jones et al., 1992, 1997, 2014; Ho et al., 1999). En etapas más avanzadas, los conidióforos emergen por los estomas, a los que con frecuencia los ocluyen, alterando así el intercambio gaseoso y con ello en la respiración de la planta (Butler & Jones, 1949; Chupp & Sherf, 1960). En ataques severos se produce el marchitamiento y muerte de las hojas, lo que genera una defoliación parcial de la planta que puede llegar a morir (Jones, 1997; De Wit et al., 2002).

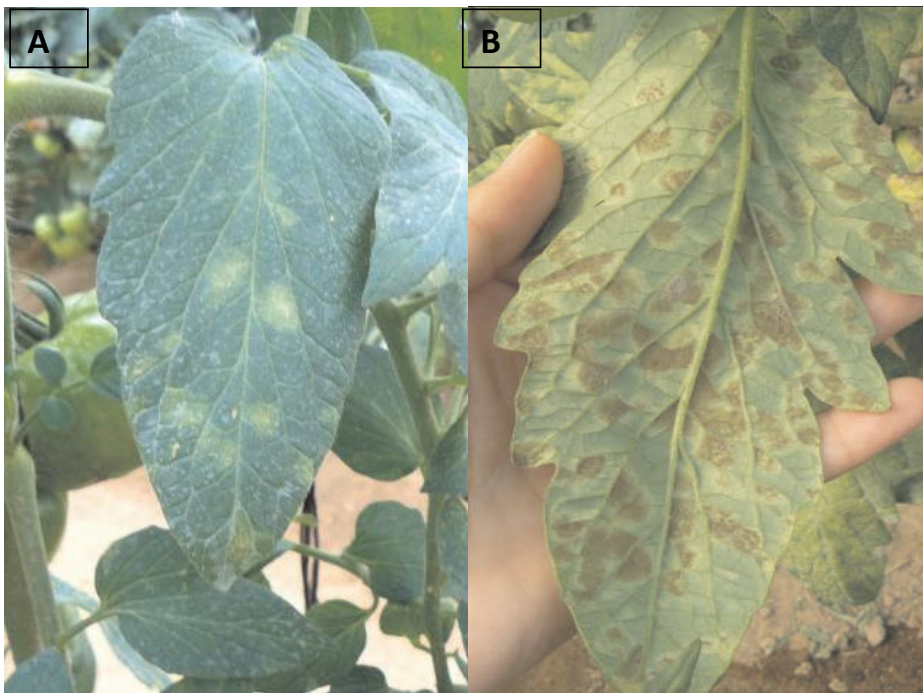


Figura 1.7. Síntomas (A) del moho de la hoja del tomate causado por *F. fulva*, apreciándose en el haz (A) y signo el envés (B) de la hoja, adicionalmente hojas jóvenes y viejas enfermas (C).

A la interacción *Tomate-Fulvia fulva*, se la ha considerado como un patosistema versátil de estudio de las interacciones fitopatógenos con sus hospedantes durante los últimos cincuenta años (Joosten & De Wit 1999). A través de la presión de selección han surgido nuevas cepas de *F. fulva* que ha resultado en el quiebre de la resistencia que resultó de la incorporación de genes de resistencia a los cultivares comerciales de tomate y así debido a modificaciones en las secuencias de los genes *Avr* del patógeno han aparecido nuevas razas virulentas (Joosten et al., 1994). Aunque en estas cepas virulentas de *F. fulva* los genes *Avr* de avirulencia con frecuencia no se encontraban (Van Kan et al., 1991), otros contenían mutaciones puntuales (Joosten et al., 1994) o inserciones de transposones (Luderer et al., 2002b). El estudio de los mecanismos de virulencia de los patógenos fúngicos se hizo factible en la medida que aumentó el acceso a las metodologías biotecnológicas como la secuenciación. De esta manera y debido a que *F. fulva* se constituyó en un sistema modelo se secuenció y en estos

momentos se dispone del genoma *F. fulva* que se encuentra en las bases de datos (De Wit et al., 2012). En cultivares susceptibles, la interacción se caracteriza por un largo estadio biotrófico luego del cual aparecen distorsiones morfológicas; en cultivares resistentes se observan a los siete días de la inoculación, deposiciones de materiales fluorescentes cerca de los sitios en los que ingresó el hongo además, se desarrolla una necrosis temprana de células protectoras, lo que serían reminiscencias de una reacción HR mediada por una relación gen a gen (Beveraggi et al., 1995). Otro ejemplo es la septoriosis del trigo, en este caso el agente causal *Mycosphaerella graminicola*, carece de un mecanismo de penetración activa y por eso su crecimiento es extracelular, y aunque carece de estructuras de nutrición finalmente, el hongo causa, de la misma manera que *F. fulva*, el marchitamiento (Palmer & Skinner, 2002). Otra característica interesante que muchos de estos patógenos tienen en común, es su hábito o ambiente de vida en donde se comportan como epífitos o endófitos pero que en ciertas condiciones, se vuelven patógenos. Vereijsen et al., (2004) describieron que *Cercospora beticola* en plantas inoculadas crece endófitamente en las raíces antes de mutar a un estadio patogénico. *F. fulva* es un patógeno modelo para investigar los mecanismos básicos de patogenicidad debido al contacto limitado que se produce entre el patógeno y el huésped, el no desarrollo de estructuras complejas de alimentación, porque las células huésped no son alteradas, y porque las señales de los dos organismos presentes en el espacio apoplástico se pueden aislar a partir de los de fluidos de lavado intercelulares (Joosten & De Wit 1999; Thomma et al., 2005). Esto ha llevado a la identificación de muchas proteínas secretadas y de los genes que las codifican. Uno de los principales inconvenientes que presentan los estudios de *F. fulva* es que no se ha observado la etapa sexual del hongo, lo que impide realizar cruzamientos y con ello trabajar en el mapeo genético. Sin embargo, en los últimos

años la tecnología de secuenciado permitió conocer detalles del genoma del hongo. *F. fulva* fue el primer hongo del que se identificaron y secuenciaron los primeros genes *avr*, esta interacción modelo condujo a clonar y disponer de la primer secuencia de un gen de resistencia *Cf* (Jones et al., 1992). Actualmente, se dispone de la secuencia de varios genes de resistencia *Cf*, e incluso clústeres completos de genes *Cf* (Kruijt et al., 2005). La secuenciación del genoma del tomate facilitó enormemente la investigación relacionada con los genes de resistencia que se constituyeron en la primera secuencia disponible del genoma de una dicotiledónea, por lo que se constituyó en un modelo para las solanáceas. Los avances en el conocimiento logrados a través del estudio de la interacción Tomate - *F. fulva* generó un modelo que se utilizó para proseguir con estudios en otras muchas interacciones planta-patógeno en general y más específicamente con representantes de *Mycosphaerellaceae*.

Esta interacción de *Fulvia fulva* con el cultivo de tomate se ajusta a la hipótesis gen a gen (Flor, 1942, 1971), Flor propuso que un gen de resistencia dominante del hospedador (R) incita un fenotipo de resistencia a la enfermedad en respuesta a un patógeno portador de un gen de avirulencia dominante (*avr*). Esta interacción entre sus productos génicos activa respuestas de defensa en el hospedador, tal como la respuesta de hipersensibilidad, que es particularmente efectiva en el caso de los patógenos biótropos (Flor, 1942, 1971; De Wit, 2016).

Actualmente, uno de los modelos más utilizados para explicar las interacciones patógeno-hospedador es el modelo *zigzag* propuesto por Jones y Dangl en el año 2006. El modelo *zigzag* distingue cuatro fases. En la primera fase, las plantas reconocen moléculas conservadas del patógeno, denominadas patrones moleculares asociados al microbio (MAMPs, *microbial-associated molecular patterns*) mediante sus receptores denominados receptores de reconocimiento del patógeno (PRRs, *pattern*

recognition receptors), lo que conduce a una resistencia de amplio espectro, denominada inmunidad activada por MAMP (MTI, *MAMP-triggered immunity*). Sin embargo, los patógenos evolucionan desarrollando herramientas para enfermar las plantas y de esta manera superan la MTI, lo que resulta en una susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, *effector-triggered susceptibility*). Estos efectores son proteínas que suelen ser reconocidas por proteínas codificadas por los genes de resistencia. Esto se debe a que cuando los efectores son reconocidos de manera específica por los receptores intracelulares (proteínas R), la reacción es incompatible y la planta no se enferma y se dice que la planta tiene una inmunidad activada por efector (ETI, *effector-triggered immunity*). En la última fase, nuevamente la población de los patógenos es diversa y evoluciona y así alguna nueva variante del patógeno muta en lo que hace a la proteína efectora y así el gen de resistencia deja de reconocerlo o porque se eliminó el gen efector reconocido, o porque el patógeno adquiere nuevos efectores que suprimen la ETI (Figura I. 8; Jones, & Dangl, 2006). Sin embargo, las interacciones entre los efectores de los organismos necrotróficos, p. ej., las toxinas provenientes del metabolismo secundario, con sus respectivos receptores en la planta conducen a la susceptibilidad (dominante), en lugar de la resistencia. Esta paradoja fue denominada relación de gen a gen inversa, por su analogía antagónica con la hipótesis fundacional de Flor (Oliver & Solomon, 2010; Friesen, et al., 2008).

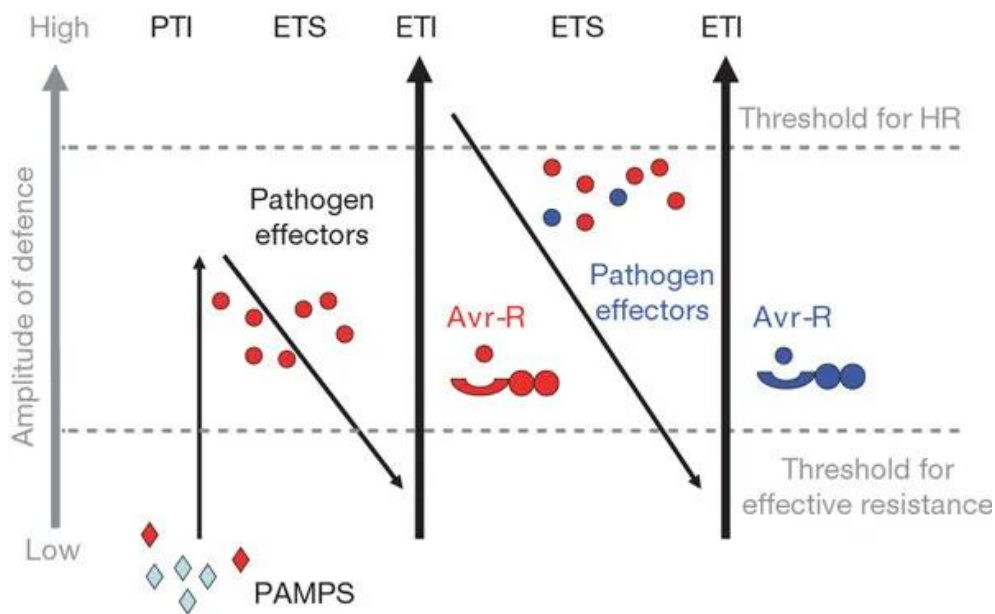


Figura 1.8. Esquema del modelo zigzag. Fuente: Jones & Dangl, 2006.

La interacción *F. fulva*-tomate sigue el sistema gen por gen indicando que cada producto del gen de avirulencia (*Avr*) del patógeno es reconocido por el producto del gen de resistencia *Cf* correspondiente (Stergiopoulos & De Wit 2009). Los diferentes genes *Cf* que codifican proteínas receptoras con motivos ricos en leucina, provienen de especies silvestres de *Solanum*, y se han introducido en los cultivares de tomate utilizados mundialmente (Rivas & Thomma 2005). Esto de alguna manera genera una presión de selección que conduce a la aparición de nuevas razas de *F. fulva* que quebraron la resistencia de los cultivares conteniendo *Cf* introducidos. Las modificaciones de ADN observadas en los genes *avr* de las nuevas razas son el resultado de mutaciones que provocaron el cambio de marco de lectura o mutaciones puntuales que llevaron a la sustitución de aminoácidos en las proteínas *Avr*, pero además también se observó la pérdida de la secuencia completa de un gen *avr* e inserciones de transposones en los genes *avr* (Westerink et al., 2004; Joosten & De Wit, 1999; De Wit et al., 2009). Más recientemente se caracterizaron e incorporaron nuevos genes de resistencia en las variedades comerciales de tomate, pero la presión

de selección sobre las población de *F. fulva* nuevamente llevó a la aparición de nuevas razas (Lida et al., 2015). Se conocen en el mundo diecisiete razas de *F. fulva* (0; 2; 4; 5; 9; 2.4; 2.9; 2.4.5; 2.4.11; 2.5.9; 2.4.5.11; 2.4.5.9.11; 2.4.9.114.9; 4.9; 4.5.9; 4.9.11; 4.11), las cuales varían en su espectro de virulencia ya que los cultivares de tomate difieren en su respuesta (Tabla I 5; modificada de Lida et al., 2015 y Lindhout et al., 1989).

Tabla I 5. Espectro de razas de *F. fulva*. Y se indica con sus iniciales el país en el cual se citó la raza.

genes de resistencia	razas de <i>F. fulva</i>																	
	0	2	4	9	2.4	2.9	2.5.9	4.9	4.5.9	4.11	2.4.11	4.9.11	5	2.4.5	2.4.5.11	2.4.5.9.11	2.4.9.11	
Cf-0	*V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Cf-2	A	V	A	A	V	V	V	A	A	A	V	A	A	V	V	V	V	V
Cf-4	A	A	V	A	V	A	A	V	V	V	V	V	A	V	V	V	V	V
Cf-5	A	A	A	A	A	A	V	A	V	A	A	A	V	V	V	V	V	A
Cf-6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Cf-8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Cf-9	A	A	A	V	A	V	V	V	V	A	A	V	A	A	A	V	V	V
Cf-11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V	V	A	A	V	V	V	V
País donde se citó la raza																		
Holanda (H)		H	H		H						H		H	H	H	H		
Argentina (A)	A	A																
Francia (F)							F											
Polonia (P)										P	P							P
Japón (J)				J	J		J	J				J						

Fuente: Lida et al., 2015; *V, virulento en el cultivar; A, avirulento en cultivar

Considerando todo lo expuesto es clave analizar un mayor número de aislamientos del patógeno, lo cual permitirá definir el número y cuales genes de resistencia deben contener los genomas de las variedades de tomate cultivados en los ambientes de cultivo de la Argentina. Esto permitirá tener estrategias de cultivo de tomate libre o al menos con menores dosis de agroquímicos para el control de este patógeno que además es frecuente en ambientes confinados como los invernáculos.

I.3. Melaninas

Fulvia fulva como otros hongos contienen en el micelio pigmentos de color negro a pardo oscuro, que en general pertenecen a las melaninas.

Las melaninas son metabolitos secundarios compuestos por complejos polímeros heterogéneos de monómeros fenólicos y/o indólicos. Recientemente, los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) mostraron que las melaninas fúngicas tienen subestructuras alifáticas y aromáticas. Sun et al., (2016) utilizando espectroscopia 2D-NMR y correlación cuántica única heteronuclear H-¹³C (HSQC), detectaron en la melanina extracelular de *Auricularia auricula*, ambos tipos de subestructuras, siendo estimada su fórmula molecular equivalente a $[C_{18}(OR)_3H_7O_4N_2]_n$.

La estructura de las melaninas parece variar en complejidad en relación con las condiciones de cultivo y por otro lado su representación, es decir contenido, aumenta a medida que los cultivos de los hongos envejecen. Estos pigmentos anclados en muchos casos en la pared celular establecen enlaces covalentes con las unidades de N-acetilglucosaminas derivadas de la quitina y/o moléculas lipídicas. Los datos de RMN de estado sólido de la melanina de *Cryptococcus neoformans* revelan la supraorganización de las melaninas en gránulos de naturaleza amorfa (Nosanchuk et

al., 2015). Debido a la falta de conocimiento sobre la estructura de otros tipos de melaninas, se deben realizar estudios adicionales para conocer mejor su estructura. Con frecuencia, las melaninas solubles como la piometanina y las melaninas heterogéneas, así como las insolubles, en su mayoría inmovilizadas en la pared celular, también se pueden liberar al medio exterior. En *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* las melaninas asociadas a la pared celular derivan de un conjunto de vesículas especializadas, de forma análoga a los melanosomas de los mamíferos (Rodrigues et al., 2014), las cuales contienen melaninas de masa inferior que son expulsadas al exterior (Nosanchuk et al., 2015; Walker et al., 2010). Sin embargo, la deposición y organización de melaninas en la pared celular de los hongos varía según la especie de hongo considerada, las condiciones de cultivo y/o estructuras diferenciadas por cada hongo (Walker et al., 2010). Esto básicamente sugiere que en los hongos la melanina podría estar jugando más de un papel biológico. Los estudios futuros deberían estar dirigidos no sólo a comprender este rol, sino también a aclarar la forma en que las melaninas son secretadas por los hongos. Mientras que en algunos, la melanina está localizada en una capa estrechamente asociada a la membrana plasmática en el lado interno de la pared celular, como en el apresorio de *Magnaporthe grisea*, en otros como *Cryptococcus neoformans*, se deposita a lo largo del espesor de la pared celular en forma de anillos concéntricos. Alternativamente, la melanina se deposita en las capas más externas de la pared como en las hifas de *Pseudocercospora griseola* o como gránulos en la superficie de las paredes de pseudohifas y formas unicelulares de *Candida albicans* (Walker et al., 2010; Mandal et al., 2007). Muchos hongos acumulan melaninas en las estructuras vegetativas y reproductivas, como las que diferencian los hongos comúnmente definidos como dematiáceos. Las melaninas tales como unas de tipo 1,8-Dihidroxinaftaleno (1,8-DHN)-

y de tipo L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) se han asociado principalmente a los representantes de los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota*, respectivamente. Sin embargo, algunos hongos pertenecientes a ambos grupos taxonómicos pueden sintetizar diferentes tipos de pigmentos oscuros. Además, en muchos casos producen pigmentos determinados en estructuras específicas. En este sentido, algunos hongos sintetizan distintos tipos de melanina y esto está relacionado a las condiciones ambientales y la ontogenia del hongo (Tabla I 6). La presencia de melaninas en hongos adaptados a diferentes ambientes y el hecho de que la misma melanina pueda ser sintetizada por un hongo, independientemente de las condiciones ambientales, sugiere que esta molécula juega diferentes roles biológicos relevantes para la supervivencia y/o tolerancia fúngica.

Tabla I 6. Tipo, localización y rol supuesto de las melaninas en diferentes hongos adaptado de Toledo et al (2017).

Grupo taxonómico*	tipo de Melanina	Localización	Rol supuesto	Reference
<i>Agaricus bisporus</i> ^b (Agaricaceae)	GHB-	Pared de la Basidiospora	?	Butler et al., (1998) Weijn et al., (2013)
	PAP-	?	?	
	DOPA-	?	?	
	Cateciol-	?	?	
<i>Aspergillus terreus</i> ^a (Trichocomaceae)	Asp-	Conidio	Tolerancia a la radiación UV y ambientes ácidos y defensa contra la depredación por amebas	Pal et al., (2013, 2014) Geib et al., (2016)
	DHN-	Caldo Cultivo		
<i>Auricularia auricula</i> ^b (Auriculariaceae)	Feomelanina	Cuerpos fructíferos	?	Sun et al., (2016), Prados-Rosales et al., (2015), Zou et al., (2015)
	DHN-	Cuerpos fructíferos	?	
	Eumelanina-type	medio Extra celular	?	
<i>Bipolaris sorokiniana</i> ^a (Pleosporaceae)	DHN-	Pared de hifas y en los conidios	Morfogénesis y supervivencia	Bashyal et al., (2010) Chand et al., (2014)
<i>Cenococcum geophilum</i> ^a (Gloniaceae, Mytilinidiales)	DHN-	Pared de las hifas	Tolerancia a estrés hídrico	Fernandez & Koide, (2013) Koide et al., (2014)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ^a (Cladosporiaceae)	DHN-melanin like compounds	Pared de hifas y en los conidios	Tolerancia a estrés impuesto por fungicidas en el medio de cultivo	Llorente et al., (2012)
<i>Cryptococcus neoformans</i> ^b (Tremellaceae)	DOPA- (eumelanin)	Vesículas extra celular y en la pared celular	Patogenicidad. Factor de Virulencia. Protección contra el sistema de defensa del huésped (células efectoras inmunes, fagocitosis y daño oxidativo)	Rodrigues et al., (2014), (Wang et al., 1995,2018)
<i>Fusarium graminearum</i> ^a (Nectriaceae)	5-Deoxybostricoidina	Pared del peritecio	Tolerancia a radiacion UV y especies reactivas de oxigeno	Frandsen et al., (2016)
<i>Metarhizium anisopliae</i> ^a (Clavicipitaceae)	DHN-	?	Factor de Virulencia. atracción hidrofobica, absorción de agua, adhesión, conidio germinación y tolerancia a estrés hídrico y oxidativo	Tseng et al., (2014)

Grupo taxonómico*	tipo de Melanina	Localización	Rol supuesto	Reference
<i>Monilinia laxa</i> ^a (Sclerotiniaceae)	DHN-	Todas las estructuras diferenciadas	Patogenicidad. esporogenesis. Sobrevivencia. Tolerancia a estrés ambientales y autólisis	Villarino et al., (2011)
<i>Mucor</i> spp. ^d (Mucorales)	?	Pared exterior de esporangiosporas	?	Orlowski (1991)
<i>Neocallimastix</i> sp. ^e Isolate MC-2 (Neocallimastigaceae)	?	Pared de esporangio maduro resistente	Sobrevivencia	Wubah et al., (1991)
<i>Ophiocordyceps sinensis</i> ^a (Ophiocordycipitaceae)	DOPA-	Caldo de fermentación de cultivos sumergidos	?	Dong & Yao (2012)
<i>Penicillium chrysogenum</i> ^a (Trichocomaceae)	Piomelanina	medio extra celular	Sobrevivencia a la falta de nutrientes y estrés hídrico	Vasanthakumar et al., (2015)
<i>Pseudocercospora griseola</i> ^a (Mycosphaerellaceae)	DHN-	Pared de hifas y conidios	Morfogénesis	Barcena et al., (2015), Saparrat et al., (2009)
<i>Sporothrix schenckii</i> ^a (Ophiostomataceae)	DHN-	Constitutivamente en conidios y células de levaduras	Virulencia relacionada a infección y contra la fagocitosis	Almeida-Paes et al., (2009); Almeida-Paes et al., (2012); Almeida-Paes et al., (2016)
	DOPA-(eumelanina)	Pared de conidios, células de levaduras, y en hifas si L-DOPA está disponible durante el crecimiento fúngico	Virulence related to infection and against phagocytosis. Protección contra drogas antifúngicas	
	Piomelanina	Extracellular medium if L-tyrosine is available during fungal growth	Apagador de estrés oxidativo. Protección contra drogas antifúngicas	
<i>Synchytrium endobioticum</i> ^c (Synchytriaceae, Chytridiales)	Alomelanina como compuestos?	Esporas de reposo	Sobrevivencia	Hampson et al., (1996)

*a, phylum *Ascomycota*; b, phylum *Basidiomycota*; c, phylum *Chytridiomycota*; d, subphylum *Mucoromycotina*; e, phylum *Neocallimastigomycota*. GHB, γ -L-Glutaminil-4-hidroxibenceno. PAP, *p*-Aminofenol. DOPA, L-3,4-dihidroxifenilalanina. DHN, 1,8-dihidroxi-naftaleno.

Mientras que muchos hongos sintetizan las melaninas constitutivamente, otros lo hacen sólo bajo ciertas condiciones de cultivo y/o si se dispone de precursores específicos. Varios hongos sintetizan la melanina a través de un intermediario DHN; otros, como *Tetraploa aristata* (Saparrat et al., 2002), sintetizan un conjunto indefinido de pigmentos negros solubles conocidos como melaninas heterogéneas. Estos tipos de melaninas son considerados como el resultado de mecanismos de detoxificación fúngica de diversos compuestos fenólicos disponibles en el medio extracelular que generan su polimerización (Bell & Wheeler, 1886). Sobre la base de sus precursores bioquímicos, las vías y/o componentes de varias clases de melaninas fúngicas se han descrito como g-glutaminil-3,4-dihidroxi-benceno (GDHB)-, L-DOPA, que se conoce como eumelanina, DHN-melanina, catecol-melanina, piomelanina y p-aminofenol (PAP)-melanina, así como las melaninas heterogéneas. Recientemente, se han reportado dos nuevas melaninas. Una se ha identificado en la cubierta de peritecios de representantes del grupo *Fusarium graminearum*, cuyo monómero corresponde a 5-deoxibostricoidina, que se sintetiza a partir de la reacción de derivados de anhidrofusarubina y amoniaco (Frandsen et al., 2016). La otra melanina recientemente reportada es la Asp-melanina que está presente en la pared de los conidios de *Aspergillus terreus* (Geib et al., 2016). El precursor de esta melanina, que es el 4-hidroxifenilpirruvato, se oxida generando así derivados de la aspulvinona, que luego polimerizan (Geib et al., 2016). Las melaninas fúngicas, y de las plantas, son conocidas como alomelaninas, un término que incluye pigmentos oscuros sintetizados a partir de precursores libres de nitrógeno, como los derivados del catecol y el DHN (Sansinenea & Ortiz, 2015). Además, si en la síntesis de melaninas L-DOPA hay incorporación de cisteína, como en *Auricularia auricula*, se generan compuestos conocidos como feomelaninas (Sun et al., 2016). La vía de síntesis de la DHN-melaninas involucra la

participación de poliketido-sintasas, así como también fenoloxidasas; éstas últimas enzimas comúnmente asociadas a la síntesis de DOPA-melanina (Figura I. 9).

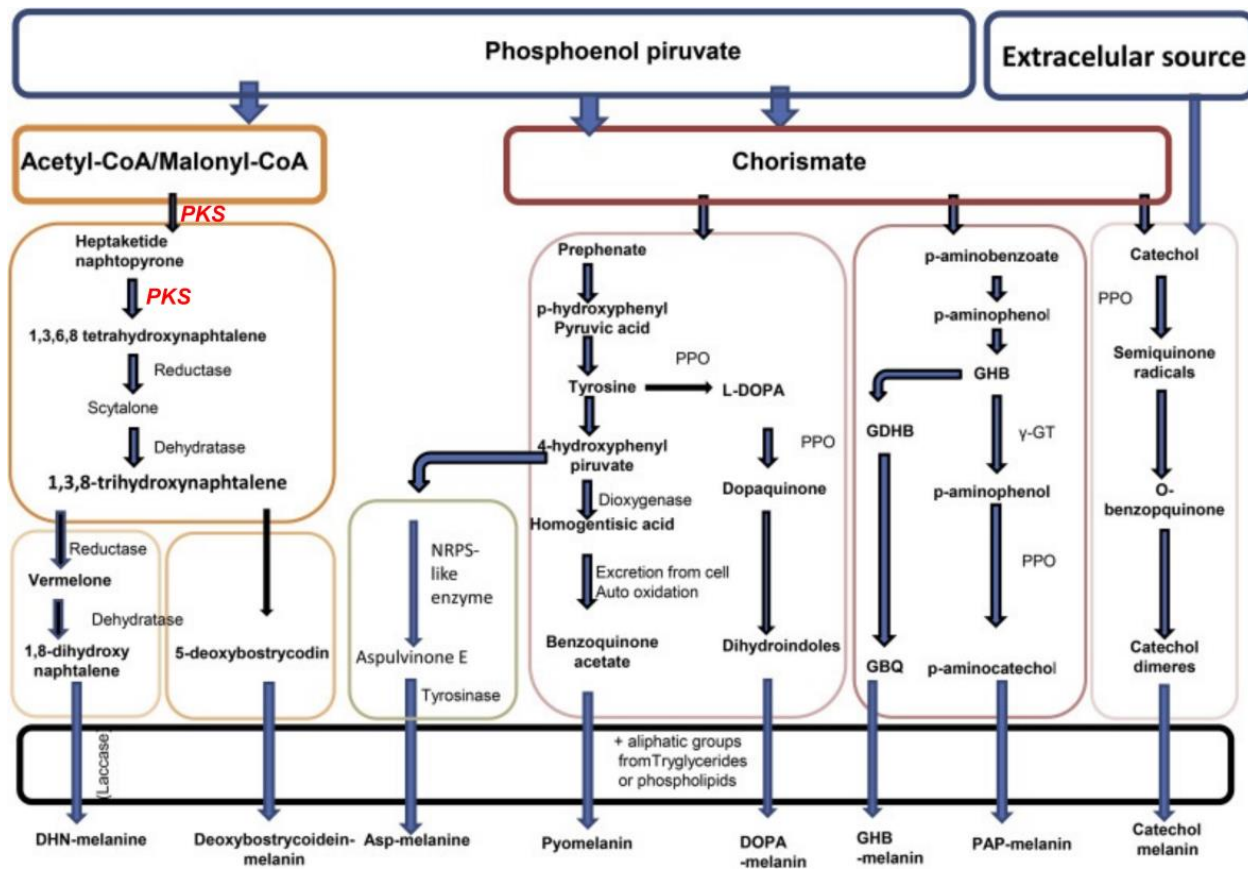


Figura II.9. Vías para la síntesis de diferentes tipos de melaninas en hongos. PPO, polifenol oxidasa. GHB, γ -L-glutamínil-4-hidroxibenceno. GDHB, γ -L-glutamínil-3,4-dihidroxibenceno. Y γ -gammaGT, γ -glutamínilferasa. GBQ, γ -L-glutamínil-3,4-benzoquinona. Figura adaptada de Toledo et al., 2017.

Además, la melanina que se encuentra en conidios de *A. terreus* se sintetiza mediante una vía no canónica, que incluye la participación de una inusual enzima sintasa que genera un péptido no ribosomal y una tirosinasa (Geib et al., 2016). Esta es una peculiaridad teniendo en cuenta que la mayoría de los *Aspergillus* sintetiza principalmente DHN-melanina involucrando una PKS (*policétido sintasa*). Así que las enzimas y mecanismos involucrados en las diferentes vías de síntesis de melanina siguen siendo desconocidos (Figura I. 9).

Las melaninas fúngicas son únicas en que cumplen una miríada de roles biológicos, en morfogénesis, virulencia, transducción de energía y/o almacenamiento de carbono. Sin embargo, en los hongos las melaninas actúan como protectores de especies reactivas de oxígeno, protegiendo la viabilidad celular, aunque no parece ser este su único rol. Asociado a morfogénesis, se encontró que la melanina es un componente estructural clave de la pared conidial de *Aspergillus fumigatus*. Además, se ha relacionado con la expresión de adhesinas, así como a otros factores de virulencia (Pihet et al., 2009), por lo que parece que en este hongo patógeno oportunista de humanos la melanina juega un papel crítico previo a su infección. Además de esto, la melanina de *Bipolaris sorokiniana* se ha asociado a la diferenciación de hifas aéreas y en la conidiogénesis (Bashyal et al., 2010), lo que sugiere que podrían tener otra función. Las melaninas son claves para los hongos en diferentes etapas de su ciclo de vida. Las melaninas son requeridas por muchos hongos como patógenos vegetales, animales y humanos y debido a esto se han asociado con la virulencia. La naturaleza recalcitrante de las melaninas sugiere que podrían estar funcionando como un escudo contra las enzimas hidrolíticas que pueden degradar las paredes de las células fúngicas. Además de esto, las melaninas también podrían secuestrar proteínas y metales claves para el huésped, actuar como agente

oxidante o como una toxina que fotoactiva oxígeno, como se ha demostrado para la DHN-melanina de *Mycosphaerella fijiensis*. En varios patógenos la melanina juega un papel fundamental en la generación de presión osmótica dentro del apresorio, cuando las hifas penetran en las paredes celulares de las plantas, que fue descrito para las especies de *Magnaporthe* y *Colletotrichum* (Lopez-Moya, 2016). En estos patógenos, las mutaciones dirigidas a la inhibición de la melanización condujeron a una reducción de la virulencia. Las melaninas aumentan la tolerancia de los hongos al estrés ambiental, mejorando así su supervivencia. Las melaninas protegen las estructuras fúngicas de la radiación UV, la temperatura, los agentes oxidantes y los antibióticos (Eisenman & Casadevall, 2012). Las melaninas podrían estar jugando también un papel como amortiguador redox extracelular que puede neutralizar oxidantes generados por el estrés ambiental.. De hecho, los pigmentos disipan la energía de la luz ya sea como calor o en reacciones químicas o por especies activas de oxígeno, p. ej., peróxido y oxígeno singlete, que resultan en el consumo de oxígeno molecular. Por lo tanto, la melanina protege a los hongos contra una amplia gama de estreses ambientales, así como de moléculas tóxicas, mejorando de esta manera su capacidad de supervivencia. Sin embargo, el papel protector que desempeña cada melanina en la naturaleza depende de su vía de síntesis, su localización, así como de su interacción con el agente que genera el estrés. Como ejemplo, la supervivencia de conidios de *A. terreus* en ambientes ácidos se ha relacionado con la presencia de la Asp-melanina en la pared, sugiriendo que el pigmento juega un papel ecológico (Geib et al. 2016). Las paredes de células fúngicas melanizadas son relativamente resistentes a la descomposición; debido a esto las melaninas pueden ser interpretadas como un reservorio de carbono en el suelo. La materia orgánica derivada de *Cenococcum geophilum*, hongo ectomicorrízico tolerante a la sequía y que prolifera en hábitats con

estrés hídrico, puede representar hasta un 50% del C orgánico en suelos asociados con este hongo (Fernandez & Koide, 2013). Los pigmentos oscuros como las melaninas también podrían funcionar en la transducción de energía, lo que podría contribuir al crecimiento de los hongos melanizados bajo condiciones oligotróficas en presencia de energías radiantes como la gamma, lo que también sugiere un papel para capturar y utilizar la energía (Dadachova et al., 2007). El amplio espectro de roles que melaninas fúngicas pueden tener sugiere a la vez un potencial para su aplicación en diferentes áreas de la medicina, farmacología y cosmética, entre otros (Dong & Yao, 2012). Por lo tanto, el conocimiento de la biosíntesis, así como el papel que desempeñan las melaninas en los hongos patógenos, así como las enzimas involucradas en la melanización puede ser relevante para diseñar estrategias para manejar fitopatógenos que sintetizan melaninas.

A pesar que *F. fulva* ha sido estudiado intensamente, no está claro el tipo de melanina que sintetiza (Collemare et al., 2014), y si la misma cumple un rol clave en la patogenicidad, tal como ha sido reportado para *Aspergillus nidulans* (Kuo & Alexander, 1967) y *Venturia inaequalis* (Hignett & Kirkham, 1967). Estudios previos analizando el genoma de un aislamiento de este hongo revelaron que éste tiene 10 genes *pks*, entre los cuales se identificó a *pks1*, que codifica para una enzima PKS tipo I no reductora involucrada en la síntesis de diferentes metabolitos secundarios, aunque hasta el momento solo se asoció a la síntesis de cladofulvina (Collemare et al., 2014). Esto sugirió que el hongo no produce melanina DHN, sino una melanina derivada a partir de la tirosina, por medio de la vía metabólica DOPA (Langfelder et al., 2003, figura I. 9). Puesto que en otros hongos como en *Aspergillus niger*, se encontró que una PKS es responsable de la síntesis de varios metabolitos secundarios incluyendo melanina-DHN y varias nafto- γ -pironas (Chiang et al., 2011), en esta tesis se analizará si la PKS 1 de

F. fulva podría ser responsable también de la síntesis de otros metabolitos secundarios como los pigmentos elsinocromo y/o melanina-DHN.

I. 4. Interacción Bioquímica de planta-patógeno.

En las interacciones planta-patógeno, la resistencia se asocia a la activación de mecanismos de defensa en la planta, esto conduce a la ocurrencia de la respuesta hipersensible (HR), que entre otras cosas es el resultado de la presencia de fitoalexinas y compuestos antimicrobianos, de la síntesis de enzimas hidrolíticas y del endurecimiento de las barreras estructurales (Dixón & Harrison, 1994).

Después de que las proteínas codificadas por los genes de resistencia de la planta detectan los efectores codificados por los genes de virulencia del patógeno, aumenta en la planta la expresión de los genes de defensa; esto conduce a un endurecimiento de las paredes de las células y al aumento en la síntesis de fitoalexinas; además se induce la síntesis de proteínas antimicrobianas codificadas por genes *pr*. Estos eventos conducen a que se produzca en la planta un aumento en la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ERO) que provocan la lisis en las células próximas al sitio infectado por el patógeno (Mysore & Ryu, 2004; Thatcher et al., 2005). Ésta lisis inducida se conoce como respuesta hipersensible (HR) y en interacciones incompatibles bloquea el avance del patógeno. La HR no es efectiva con los patógenos necrotróficos, en primer lugar porque estos poseen un grupo de enzimas que detoxifican las EROS que podrían afectar el metabolismo de estos patógenos (Ballaré, 2011; Glazebrook, 2005; Mayer et al., 2001; Mysore & Ryu, 2004; Thatcher et al., 2005; Wiermer et al., 2005). Por otro lado, los organismos necrotróficos viven de tejido muerto por lo que la muerte de células no elimina al patógeno. El proceso de aumento en la

expresión de los genes relacionados con la defensa, está regulado por moléculas como las hormonas vegetales del tipo del etileno, y de las actualmente conocidas hormonas de los procesos fitopatogénicos como el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA). El SA interviene en los mecanismos de defensa de las plantas que detienen a los patógenos biótrofos y hemibiótrofos, mientras que el JA y el etileno son hormonas involucradas en los mecanismos de las plantas que detienen a los patógenos necrotróficos e insectos herbívoros plagas. Existe una comunicación estrecha entre estos dos tipos de procesos, esto es la resistencia a biótrofos conocida como resistencia sistémica adquirida y la resistencia sistémica inducida, esto está regulado por el balance hormonal SA y el JA que además es afectado por el resto de las hormonas vegetales (Ballaré, 2011; Glazebrook, 2005; Mysore & Ryu, 2004; Pieterse, et al., 2009; Thatcher et al., 2005; ; Von Dahl & Bladwin, 2007; Wiermer, et al., 2005.).

La señalización mediada por el SA y el JA juega un papel importante en la prolongación de la respuesta de defensa justamente porque se regulan dos mecanismos distintos. La resistencia sistémica adquirida (SAR) está asociada a una acumulación de SA. En cambio la acumulación de Ac. Jasmónico está asociada a la resistencia sistémica inducida (ISR) mecanismo que actúa protegiendo a la planta de los patógenos necrotróficos (Vallad & Goodman, 2004; Liu, et al., 2008; Korolev, et al., 2008)

En términos generales, la respuesta de la planta de alguna manera se puede dividir en dos etapas: una primera en la que se produce la inducción de los mecanismos de defensa de las células cercanas al sitio o célula afectada por el patógeno, que se puede denominar respuesta local. La otra etapa, consiste en la inducción de los mecanismos de defensa en sitios alejados del sitio en donde interactuó el patógeno. Ésta última es la que provoca la protección sistémica a la planta

ante un amplio rango de patógenos (Ballaré, 2011; Durrant & Dong, 2004; Grant & Llamb, 2006; Hayat, et al., 2010; Sticher, et al., 1997; Vlot, et al., 2008, 2009;). El periodo durante el cual la planta tienen mecanismos para defenderse del ataque de patógenos y la intensidad de la respuesta depende de la especie vegetal y del inductor, ya que algunos efectores inducen SAR en unas especies y en otras no (Durrant & Dong, 2004; Grant & Llamb, 2006; Sticher, et al., 1997; Vlot, et al., 2008, 2009).

Se ha demostrado que los eventos que ocurren durante la respuesta sistémica adquirida están sincronizados y mientras que algunos ocurren previos a la acumulación de SA otros ocurren después. (Figura I. 10).

La activación de las defensas de las plantas se inicia cuando ciertos receptores de la planta reconocen ciertas señales de los patógenos. La Inmunidad activada por PAMPs (PAMP-triggered immunity) se induce tras el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) o Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs) tales como, flagelina, quitina, glicoproteínas, lipopolisacáridos, el factor de elongación Ef-Tu o de moléculas propias de la planta producidas durante los daños causados por la infección de patógenos llamadas, Patrones Moleculares Asociados a Daños (DAMPs) como por ejemplo, oligogalacturónidos derivados de la degradación de la pectina de la pared celular. Los efectores específicos de los patógenos, también conocidos como determinantes de avirulencia cuando los mismos son reconocidos por las Proteínas receptoras codificadas por los genes de Resistencia Específicas (R). Si la planta o el patógeno no poseen el correspondiente gen de resistencia o gen de avirulencia, respectivamente, entonces la respuesta de defensa de la planta no se activa, resultando así en una interacción compatible (Glazebrook, 2005; Mysore & Ryu 2004; Thatcher, et al., 2005; Wiermer, et al., 2005).

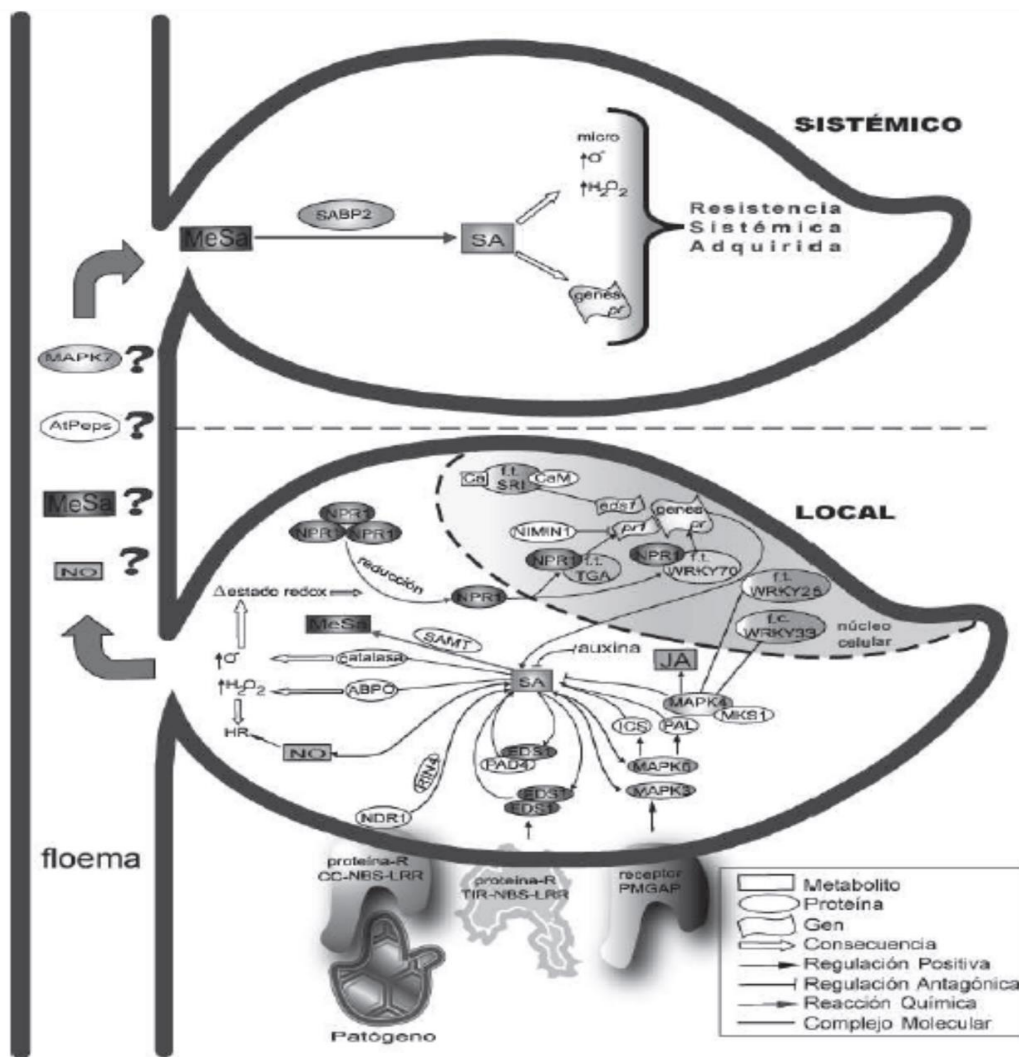


Figura I. 10. Esquema accionario del mecanismo de las respuestas sistémicas, La inducción de Resistencia ocurre en dos etapas, en una primera la planta reconoce el patógeno e induce las respuestas locales de defensa a través de cascadas de señalización que conllevan a la acumulación intracelular de Ácido Salicílico (SA). Esta acumulación induce el aumento de los niveles de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y expresión de genes relacionados a la patogenicidad (*pr*). Esta respuesta local promueve la segunda etapa de resistencia: inducción de resistencia en el tejido sistémico alejado del punto de infección. Se cree que el Salicilato de Metilo (MeSa), algunas Quinasas Activadas por Mitógenos (QAM) y el Óxido Nítrico (NO), entre otros, pueden tener un papel relevante como señales inductoras de la resistencia sistémica. En la RSA hay una estrecha relación entre el AS, el Ácido Jasmónico (AJ), las auxinas, el etileno y las proteínas RP1 y NPR1. Fuente: DIAZ-PUENTES, (2012).

Los genes R que se han identificado hasta el momento codifican proteínas claves para la resistencia a bacterias, virus, hongos, oomicetes e incluso nematodos y patógenos de insectos con muy diferentes estilos de vida, fuera o dentro de la célula de

la planta. A pesar de esta amplia gama de taxones patógenos y sus supuestos moléculas efectoras de patogenicidad, los genes R codifican cinco clases de proteínas de resistencia (Pr) (figura I. 11). La clase más grande de genes R codifica una clase de proteínas con un sitio de *nucleotidebinding* más la región repetitiva rica en residuos de leucina' (NB-LRR) (figura I. 11). Aunque los análisis informáticos no predicen la localización, al menos una proteína NB-LRR está asociada con la membrana plasmática (Boyes, et al., 1998). En el extremo N-terminal pueden contener dos dominios diferentes: un dominio que comparte homología con el dominio citoplasmático del receptor tipo Toll, descrito en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster* Meigen) y con el del receptor de la interleuquina-1 en mamíferos. Dicho dominio se conoce como TIR y a las proteínas como TIR-NBS-LRR (clase TNL). El otro dominio consiste en una hélice súper enrollada (*coiledcoil*, CC), estas proteínas se conocen como CC-NBS-LRR (clase CNL) (Lukasik et al., 2010; Takemoto, et al., 2012; Rairdan & Moffett, 2010). Sin embargo su característica estructural más llamativa es el número variable de LRRs carboxi-terminales. Los dominios LRR se encuentran en diversas proteínas y funcionan como sitios de interacción proteína-proteína, unión péptido-ligando, e interacción proteína-carbohidrato (Jones et al, 1994; Kajava, 1998). Además, cada proteína R contiene un sitio conservado de unión a los nucleótidos (NB), que en otras proteínas es crítico para la unión a ATP o GTP (Saraste, et al., 1990). Las cinco principales clases de proteínas de resistencia a enfermedades vegetales son: proteínas Xa21; CF-X, que poseen dominios transmembrana y LRRs extracelulares; el producto del gen RPW8 recientemente clonado lleva una señal putativa de anclaje en el N terminal; el gen PTO codifica una proteína citoplasmática Ser/Thr quinasa, la cual se asocia a la membrana a través del extremo N-terminal por medio de una

miristoilación, donde se une covalentemente un enlace amida al grupo alfa-amino de un residuo de glicina N-terminal.

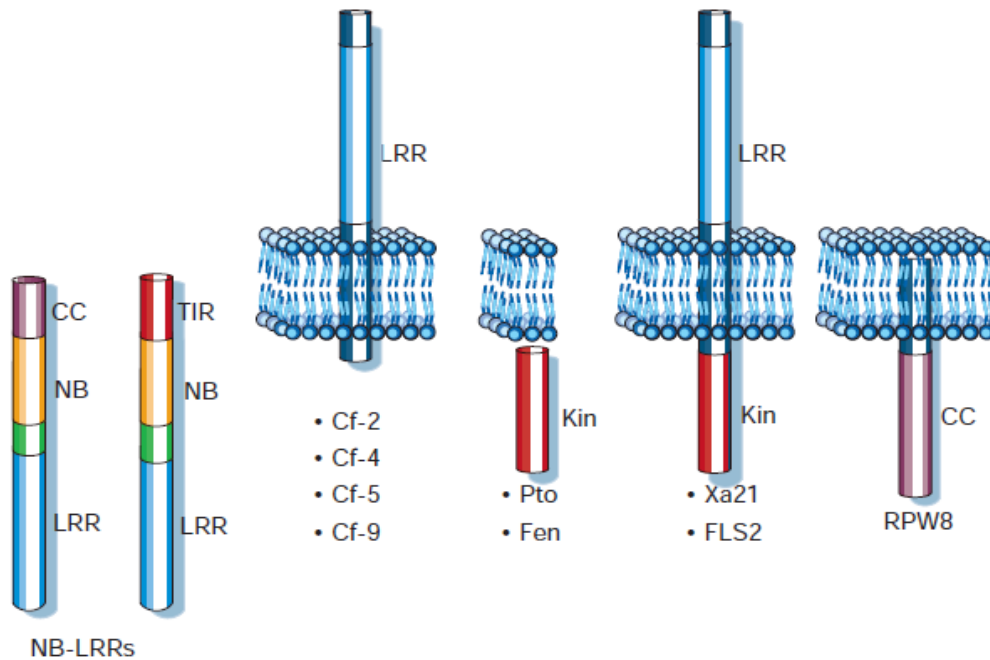


Figura I. 11. Representación de la localización y estructura de las cinco grandes clases de proteínas de resistencia a las enfermedades de las plantas. Las proteínas Xa21 y Cf-X poseen un dominio transmembranal y un dominio extracelular LRRs. El producto del gen RPW8 que ha sido clonado recientemente lleva un ancla de señal putativa en el extremo N terminal. El gen Pto codifica una Ser/Thr quinasa citoplasmática, esta puede asociarse a la membrana a través de su sitio de miristoilación N-terminal. La clase que más predomina dentro de las proteínas R, es la clase NB-LRR, son presumiblemente citoplasmáticas si bien podrían estar asociadas a membranas y pueden tener dos dominios N-terminales distintos (CC o TIR). Fuente: Saraste, et al., 1990

La clase CNL inducen la síntesis de SA a través de las proteínas de resistencia a la enfermedad no específica (NDR1), las cuales codifican para una *proteína de membrana glicosforilada*, que podría regular la señalización de proteínas R a través de la interacción física con proteína de interacción 4 (RIN4, de las siglas en ingles

RPM1-interacting protein 4), actuando aguas arriba del SA. (Tornero, et al., 1997; Forouhar, et al., 2005). Mientras que las proteínas de resistencia (R) de la clase TNL inducen la síntesis de SA a través de las proteínas EDS1 (de las siglas de las ingles, enhanced disease susceptibility 1), codifica para una lipasa. Y los mutantes deficientes en este gen, carecen de la capacidad de producir SA, no producen HR, no inducen SAR, y son susceptibles a infección (Hayat, et al., 2010); y la proteína PAD4 (de las siglas en inglés, Protein arginine deiminase 4) la cual codifica para una lipasa. Donde sus mutantes deficientes en este gen, desarrollan la reacción HR, si bien no sintetizan SA, no disparan la reacción RSA y son moderadamente sensible a infectarse (Hayat, et al., 2010); estas dos proteínas y el SA tienen una autorregulación positiva que conlleva a la acumulación del SA (Durrant & Dong, 2004; Forouhar, et al., 2005; Grant & Lamb, 2006; Sticher, et al., 1997; Vlot, et al., 2008, 2009;).

Uno de los mecanismos más comúnmente estudiados es la cascada de proteína quinasa mitógena activada (MAPK), comprende una clase de quinasas proteicas que desempeñan un papel crucial en los sistemas eucariotas que a menudo vinculan la percepción de estímulos externos con cambios en la organización celular o la expresión génica. Las cascadas MAPK son casetes de señalización conservados que se encuentran en eucariotas unicelulares y multicelulares. La MAPK cumple un rol relevante en la acumulación del SA. Las MAPK3 y MAPK6 tienen una autorregulación positiva del SA. La activación de las MAPK3 y MAPK6 por fosforilación conduce a la inducción de la expresión de los genes *pr1* y *pal* (*Phenylalanine Ammonia Lyase*), importantes para la síntesis de SA (Andreasson, et al., 2005; Brodersen, et al., 2006; Grant & Lamb, 2006; Vlot, et al., 2008).

Otras moléculas como el óxido nítrico (NO), el calcio y la proteína CaM también se ha demostrado que regulan la acumulación del SA. El calcio y la proteína CaM se

unen al factor de transcripción SR1 y suprimen la expresión del gen *eds1* y de esta manera la acumulación de SA. El gen *eds1* codifica para una lipasa donde los mutantes deficientes tienen afectada la resistencia local en la señalización por proteínas de resistencia de la clase TNL no tienen síntesis de SA, no producen HR, no tienen inducción de SAR, y son susceptibles a infección (Hayat, et al., 2010). También se da una regulación positiva en la acumulación de SA con el NO, cuando CaM se une a la proteína 60-CaM (Figura I. 10) (Durrant & Dong 2004; Grant & Llamb, 2006; Sticher, et al., 1997; Vlot, et al., 2008, 2009).

Posterior a la acumulación citoplasmática del SA, una parte de éste es convertida en *Methyl Salicylate* (MeSa) por la SA metiltransferasa. Simultáneamente, otra parte del SA interactúa con las catalasas y las ascorbato peroxidases que bloquean sus actividades, y por lo tanto, aumentan los niveles intracelulares de ERO, los cuales a bajas concentraciones potencian la expresión de genes de defensa (Figura I. 10).

El Gen NPR1 codifica para un regulador positivo de SAR, que actúa aguas abajo del SA que está presente en numerosas especies de plantas en las que además conserva la función. Es requerido para expresión de genes *pr*, SAR y ISR, media el señalamiento cruzado entre SA, JA, y etileno, interviene además en la regulación de la división celular, función del gen es conservada en numerosas especies de plantas. Los mutantes deficientes son sensibles a enfermedad, La sobreexpresión del gen en *Arabidopsis thaliana* aumenta resistencia a *Hyaloperonospora arabidopsidis* y *Pseudomonas syringae*. En arroz aumenta la resistencia a *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (Li, et al., 1999). Cuando los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) son altas estos actúan paralelamente sobre dos procesos el cambio de estado de óxido-reducción de la célula hace que residuos de cisteína en la proteína oligomérica NPR1 se reduzcan, cambiando la configuración a monomérica. Estos monómeros de

NPR1 se dirigen al núcleo, e inducen o reprimen la transcripción de genes que participan en la defensa de la planta. La proteína NIMIN1 (de las siglas en inglés, NIM1-interacting 1) se halla en núcleo de la célula, y actúa reprimiendo la transcripción de *pr1* por eso los mutantes presentan una alta expresión de *pr1*. Por otro lado mutantes en los que se logran niveles de expresión del gen superiores presentan una RSA (respuesta sistémica adquirida) atenuada y mientras que en caso de *A. thaliana* se elimina la resistencia a cepas virulentas de *P. syringae* (Desveaux, et al., 2004). La proteína NIMIN1 regula negativamente a NPR1 al impedir que el complejo NPR1-TGA se una al promotor de los genes *pr* (Figura I. 10) (Durrant & Dong, 2004; Grant & Lamb, 2006; Vlot, et al., 2009).

El segundo proceso que se produce como consecuencia del aumento en los niveles de ERO es la inducción de la HR de la célula, liberando ERO y moléculas antimicrobianas (p. ej. saponinas, fitoalexinas, proteínas PR; Figura I. 10).

En *Arabidopsis*, se ha reportado que el factor de transcripción específico de plantas, ATWRKY70, (de las siglas en inglés *Arabidopsis thaliana* wrky dna-binding protein 70), puede explicar a nivel molecular el antagonismo entre las rutas de señalización de defensa mediadas por SA y JA. Su expresión es activada por SA a través de una vía no dependiente de NPR1, que es reprimida por el ácido Jasmónico. A su vez, niveles de expresión constitutiva altos del factor aumenta la resistencia a patógenos virulentos y conduce a la expresión constitutiva de genes PR normalmente inducida por AS. Por otra parte, la supresión de ATWRKY70 activa los genes de respuesta a JA dependientes de COI1 (un gen que es requerido para la regulación de la defensa mediada por JA) (Li et al., 2016). Todos estos datos sugieren que el factor WRKY70 cumple un rol clave como activador de los genes inducidos por el AS y como

represor de los genes de respuesta a JA, integrando las señales de ambas rutas antagonistas.

I.5.1. Hipótesis general:

La virulencia de *Fulvia fulva* en plantas de tomate se debe a la expresión de efectores que vulneran los mecanismos de defensa del hospedador.

I.5.2. Objetivo general:

Se propone ampliar el análisis de aislados de *Fulvia fulva*, evaluar los mismos a nivel de los genes de avirulencia y evaluar la manera de disparar mecanismos de defensa de la planta que defiendan del patógeno y así con ello desarrollar herramientas para el manejo del moho de la hoja del tomate.

I.5.3. Objetivos específicos:

1.5.3.1 Disponer de un análisis morfo-fisiológico y molecular de los aislados de *F. fulva*; e Identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas y si hay una dinámica de cambios genéticos en la población del patógeno.

1.5.3.2 Disponer de una caracterización a nivel de los efectores de *F. fulva* los efectores y genes que codifican proteínas extracelulares de manera de conocer no solo que razas del hongo están presentes sino también si el sistema se encuentra bajo presión de selección evolucionando.

1.5.3.3. Conocer la naturaleza química de las melaninas que sintetiza *F. fulva* y su vía de síntesis.

1.5.3.4 Conocer los metabolitos secundarios que sintetiza *Fulva fulva* hongo hemibiotrófico y contrastarlo con el perfil de un patógeno necrotrófico

CAPITULO II: Identificación y caracterización molecular de los aislados de *Fulvia fulva* causante del moho de la hoja del tomate.

II.1. Introducción

Fulvia fulva (sin *Cladosporium fulvum*) es un hongo patógeno hemibiotrófico que causa el moho de la hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), enfermedad que afecta principalmente a los tomates cultivados en invernadero, donde prevalecen condiciones predisponentes para que ocurra la enfermedad como humedades relativas altas y temperaturas de alrededor de 20°C (Thomma, et al., 2005).

La interacción *F. fulva*-tomate cumple con la relación gen a gen, en la que cada producto genético de avirulencia de patógenos (*Avr*) es reconocido por una proteína receptora codificada por el gen de resistencia dominante (*Cf*) del huésped (Stergiopoulos & De Wit, 2009). Los genes *Avr* cumplen un rol clave en el patógeno ya que son factores de virulencia que definen dos tipos de situaciones en el tomate. Estos genes se conocen como genes de avirulencia cuando las plantas de tomate con las que interactúa contienen genes de R que codifican proteínas que reconocen a estos efectores. Por otro lado, las proteínas codificadas por los genes de avirulencia actúan como factores de virulencia cuando el aislado carece de genes de resistencia (Cai et al., 2002). Es decir que las plantas de tomate que contienen en sus genomas genes de resistencia que codifican receptores *Cf*, reconocen las proteínas efectoras específicas y desencadenan una respuesta de resistencia (interacción incompatible) que puede estar o no asociada a una respuesta hipersensible (*HR*) (Heath, 2000) y también a la acumulación de calosa, el aumento en la síntesis de fitoalexinas y a la expresión de las proteínas relacionadas con la patogénesis (De Wit, 1982; De Wit, 1992), ambas respuestas de la planta resultan en el control de patógenos biotróficos y hemibiotróficos como *F. fulva* (De Wit, et al., 2009; Wulff, et al., 2009; De Wit, 2016). En los últimos tiempos se han aislado muchas proteínas efectoras o de avirulencia de *F. fulva* (*Avr2*,

Avr4, *Avr4E*, *Avr5* y *Avr9*), como también proteínas extracelulares (*Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4*, *Ecp5* y *Ecp6*) (Laugé, et al., 1997; Van Esse, et al., 2007; Bolton, et al., 2008; Van Esse, et al., 2008; Stergiopoulos & De Wit, 2009; De Wit, et al., 2009; De Jonge, et al., 2012; De Wit, et al., 2012; Ökmen, et al., 2013; Mesarich, et al., 2014). *F. fulva* tiene, al menos potencialmente, la capacidad de sintetizar no solo una gran diversidad sino una diversa combinación de proteínas efectoras generando de esta manera un espectro de virulencia amplio y diverso, se conoce la existencia de 17 razas de *F. fulva* las cuales defieren en su capacidad para sintetizar proteínas efectoras (Tabla I 5; modificada de Lida, et al., 2015 y Lindhout, et al., 1989). La identificación de estas razas del agente patógeno se realiza con un set de cultivares de tomate que contienen genes de resistencia *Cf* que codifican proteínas receptoras que reconocen e interactúan con las proteínas efectoras de *F. fulva*. Por otro lado, sobre la base del conocimiento de las secuencias de los genes que codifican las proteínas efectoras, es posible identificar los genes de avirulencia del hongo a través de técnicas moleculares.

Los receptores de las plantas de tomate que conducen al reconocimiento del patógeno y con ello a la resistencia, imponen una alta presión de selección sobre los patógenos, que sufren cambios en la secuencia génicas de los efectores *Avr*. Este proceso evolutivo conduce a que los receptores de las plantas no puedan reconocer los efectores *avr*, que conservan su función, lo que se ha encontrado en muchos patosistemas, incluyendo la Interacción *F. fulva*-tomate. A estos cambios genéticos se adiciona, la transferencia horizontal de genes, que podría contribuir a aumentar la agresividad de los patógenos, ya que esto podría expandir el rango de cultivares susceptibles. (Stergiopoulos & De Wit, 2009).

Los métodos moleculares se han utilizado ampliamente para estudiar y analizar la diversidad genética de las poblaciones de patógenos. Con respecto a *F. fulva*, se ha

estudiado la variabilidad genética utilizando técnicas de marcadores dominantes como ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, *Amplified fragment length polymorphism*) y secuencias simples internas repetidas (ISSR, *Inter Simple Sequence Repeat*). Los RAPD y los AFLP tienen gran potencial para la estimación de la variabilidad genómica a través de la medición de la diversidad nucleotídica, la cual es definida como el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias de ADN elegidas al azar en una población. Esto se debe a que estos marcadores muestrean gran número de sitios no ligados. Ambas técnicas producen perfiles específicos individuales a partir de un ADN molde por la amplificación de fragmentos anónimos de sitios esparcidos por todo el genoma. La individualidad refleja la diversidad nucleotídica en los sitios complementarios al cebador (RAPD) o en la de restricción y sitios de extensiones del cebador (AFLP). Debido a que los RAPD y los AFLP examinan loci a lo largo del genoma y permiten obtener cantidades enormes de información, los estudios con los cebadores múltiples pueden dar una estimación robusta de diversidad genética de la población, relativamente imparcial de la variación genómica local, comparadas con la estimación que pudiera tenerse a partir de los datos de las secuencias (Borowsky, et al., 2001). Aunque, en general, es mayor la variabilidad interespecífica encontrada que la intraespecífica, y no siempre la similitud de las secuencias de los organismos está asociada al origen geográfico o el hospedante de procedencia, los análisis por RAPD, si bien tienen el inconveniente de su falta de reproducibilidad, suelen ser más eficientes para detectar variabilidad genética entre aislamientos que otros marcadores (Baires-Varguez, et al., 2007; Jun-Zhi, et al., 2005; Mitina, et al., 2008). Las secuencias repetidas intersatelitales (ISSR) se localizan entre microsatélites, que son secuencias de uno a cinco nucleótidos

repetidos en tándem que ocurren con una alta frecuencia en el genoma de las plantas, hongos y animales preferentemente (Condit & Hubbell, 1991). Mediante los microsatélites se puede determinar la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues presentan ventajas como herramientas para el análisis de la variabilidad como su codominancia, multiallelismo y su alta heterocigosis. El alto nivel de polimorfismo que detecta la amplificación con microsatélites permite discriminar entre individuos altamente emparentados. Además de que los microsatélites son altamente polimórficos, la reacción de ISSR requiere utilizar una muy pequeña cantidad de ADN, similar a las reacciones de RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicos y la extensión de los amplicones es función directa de la distancia existente entre los microsatélites (referencia).

Desde la década de 1930, se han introducido en los cultivares de tomate diferentes genes de resistencia (*Cf*) a *F. fulva*. (Lindhout, et al., 1989; Rivas & Thomma, 2005). Esto provocó un aumento de la presión de selección sobre la población del patógeno, que indujo cambios en las proteínas efectoras. Con respecto a esto, la pérdida de genes o la pseudogenización también contribuyen a la adaptación de patógenos fúngicos a un estilo de vida biotrófico como es el de *F. fulva*. Un indicador de esto podría ser el limitado número de proteasas que se expresan durante la infección en relación al alto número de secuencias de proteasas que se encuentran en el genoma de *F. fulva* (Karimi, et al., 2019).

La patogenicidad de *Fulvia fulva* es una función de un conjunto de proteínas que se expresan durante la invasión y colonización de la planta de tomate. Las mismas forman parte del arsenal de factores de virulencia con el que el hongo afecta a la planta

como por ejemplo, *F. fulva* efector *Avr2* que actúa de manera contraria a los efectores *Avr4* y *Ecp6* que aparentemente cumplen un rol en la protección a las defensas de la planta (Rooney, et al., 2005; Van Den Burg, et al., 2004; De Jonge, et al., 2010). Hasta el momento se han identificado cinco efectores conocidos como *Avr* que sintetiza *F. fulva* estos incluyen cinco genes *Avr* (*Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, *Avr5* y *Avr9*) y seis (*Ecp*) genes que codifican proteínas extracelulares (*Ecp*) (*Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4*, *Ecp5*, *Ecp6* y *Ecp7*; Stergiopoulos & de Wit, 2009). Los diferentes efectores que sintetiza *F. fulva* tienen diferentes funciones todas las cuales están relacionadas con la virulencia en el tomate, sin embargo hasta el momento solo se han descrito las funciones intrínsecas de sólo tres proteínas efectoras de *F. fulva* (*Avr2*, *Avr4* y *Ecp6*) si bien se ha comprobado que el resto de los *avr* cumplen roles claves en la virulencia sus funciones específicas aún se desconocen.

La proteína efectora *Avr2* madura contiene 58 aminoácidos con ocho residuos de cisteína que participan en la formación de cuatro puentes disulfuro (Luderer, et al., 2002b) que contribuyen a su estabilidad. Esta es secretada al apoplasto, que debido al contenido de enzimas hidrolíticas, entre ellas proteasas es un ambiente recalcitrante para la estabilidad de la proteína. El efector *Avr2* es un factor de virulencia con potencial para inhibir varias proteasas cisteínicas extracelulares de la planta, incluyendo Rcr3 (figura II. 1; requerido para la resistencia a *F. fulva* 3), Pip1 (*Phytophthora-inhibited protease*), aleuroina y TDI65 (tomato-drought induced) (Kruger, et al., 2002; van Esse, et al., 2008). Estudios de mutación en Rcr3 mostraron que esta proteína actúa en la defensa de la planta contra *Phytophthora infestans*, que secreta proteínas *EPIC1* y *EPIC2B* que también se unen e inhiben Rcr3 (Song, et al., 2009). La inhibición de un conjunto de proteasas cisteínicas de las plantas contribuye a la virulencia de diferentes patógenos. La expresión heteróloga de *Avr2* en tomate y

Arabidopsis thaliana resultó en una mayor susceptibilidad a diferentes patógenos fúngicos, como *Botrytis cinerea* y *Verticillium dahliae* (Van Esse, et al., 2008).

El gen *Avr4* codifica una pre-proteína de 135 aminoácidos, que es procesada en el extremo N- y C-terminal una vez que la misma fue secretada en el apoplasto. En su forma madura, *Avr4* contiene 86 aminoácidos con ocho residuos de cisteína que están involucrados en la formación de puentes de disulfuro (Joosten, et al., 1994). *Avr4* es una lectina de unión a la quitina que protege las paredes celulares fúngicas de las quitinasas vegetales, proporcionando un papel defensivo durante la infección (figura II. 1). En ensayos in vitro se demostró que *Avr4* se une a la quitina de la pared celular de *Fusarium solani* y *Trichoderma viride* protegiendo a estas de las quitinasas vegetales (van den Burg, et al., 2004; 2006). Además, el silenciamiento del gen *Avr4* en *F. fulva* provocó una reducción en la virulencia del hongo (van Esse, et al., 2007). Se supone que muchas otras especies de hongos podrían llevar genes homólogos a *Avr4*. De hecho, recientemente se han identificado genes homólogos de *Avr4* en varios hongos pertenecientes a los *Dothideomycetes*, incluyendo *Mycosphaerella fijiensis*, genes que también protegen los hongos de la acción de las quitinasas vegetales (Stergiopoulos, et al., 2010).

El gen *Ecp6* codifica una proteína (228 aminoácidos) que contiene tres dominios de unión a carbohidratos-LysM (Bolton, et al. 2008). *Ecp6* de la misma manera que la proteína *Avr4* se une específicamente a la quitina (de Jonge, et al., 2010). Sin embargo, esta unión no protege al hongo de la acción de las quitinasas sintetizadas por las plantas. Otros experimentos revelaron que la proteína *Ecp6* une pequeños fragmentos de quitina que son liberados de la pared celular de hongos en la planta, y al hacerlo evita que estos fragmentos sean reconocidos por los receptores de quitina presentes en la membrana plasmática de la planta (Figura II. 2; de Jonge, et al., 2010).

Prevenir el reconocimiento de la quitina es importante porque silenciar el gen *Ecp6* reduce la virulencia en *F. fulva* (Bolton, et al., 2008). Sánchez-Vallet, et al, (2013), demostró la estructura cristalina de Ecp6 a una resolución de 1.6 Å, revelando un novedoso mecanismo de unión de quitina por los dominios LysMs. El sitio de unión compuesto por los dominios LysM1-LysM3 que muestra una ultra alta afinidad de unión a quitina (HABS), explicaría cómo los efectores extracelulares superan a los receptores del huésped por acoplarse a la quitina. En diferentes especies fúngicas se han identificado genes homólogos a Ecp6 (de Jonge & Thomma, 2009), lo que sugiere que esta es una función importante en la prevención de la inmunidad activada por quitina en muchas interacciones planta-hongo. En consecuencia, estudios más recientes mostraron que *Zymoseptoria tritici* (sin. *Mycosphaerella graminicola*) secreta tres efectores LysM que se identificaron como Mg1LysM, Mg3LysM y MgxLysM (Marshall, et al., 2011). De la misma manera que la proteína Ecp6 de *F. fulva*, tanto Mg1LysM como Mg3LysM se unen a la quitina. Sin embargo, a diferencia de Ecp6, los efectores de *Z. tritici* LysM protegen a los hongos de la actividad de las quitinasas vegetales, semejante a lo que ocurre con el *avr4* en *F. fulva*, mientras que el otro efector de *Z. tritici* Mg3LysM previene la inmunidad activada por quitina en concordancia a Ecp6 en *F. fulva*. Sin embargo, sólo el mutante de delección Mg3LysM mostró una significativa reducción en su virulencia, lo que muestra la importancia de evitar la inmunidad activada por la quitina durante la infección (Marshall, et al., 2011). Se ha identificado en el arroz una proteína que tiene una alta afinidad para unirse a la quitina, un α -1,4-polímero de N-acetilglucosamina que es el componente estructural más abundante de la pared celular de los hongos. El receptor para este oligosacárido (CEBiP) es una proteína transmembranal, con dos dominios extracelulares de Lys y una cola citoplasmática corta (Figura II. 1). Silenciar la expresión de CEBiP, conlleva a la

reducción de la especificidad en la unión y de la respuesta que desencadena la quitina en cultivos celulares de arroz (Zipfel, 2008).

El gen *Avr4E* codifica una proteína rica en cisteína (6 cisteínas) que contiene 101 aminoácidos en su forma madura (Westerink, et al., 2004) pero su función aún no se ha descrito.

El gen *Avr9* codifica una proteína de 63 aminoácidos que es secretada y procesada gradualmente en un péptido maduro de 28 aminoácidos que contiene seis residuos de cisteína que forman puentes disulfuro y con esto una estructura de nudo de cistina (Van Kan, et al., 1991; van den Hooven, et al., 2001). Nekrasov, et al., (2006), demostraron que la quinasa inducida por *Avr9/Cf-9* (ACK1, *Avr9/Cf-9* induced kinase 1) interactúa con la proteína tioredoxina-*Cf-9* (CITRX, de las siglas en inglés, *Cf-9* interacting thioredoxin), en planta. También mostraron que la quinasa ACIK1 interactúa con el dominio citoplasmático de *Cf-9* en presencia de CITRX. En conjunto, estos datos sugieren que CITRX podría servir como un adaptador de reclutamiento de ACIK1 quinasa para el dominio citoplasmático de *Cf-9* durante la respuesta de defensa inducida *Avr9* (figura II.1). Por lo tanto, es muy probable que CITRX se encuentre en el citoplasma donde podría interactuar con el terminal C de *Cf-9*.

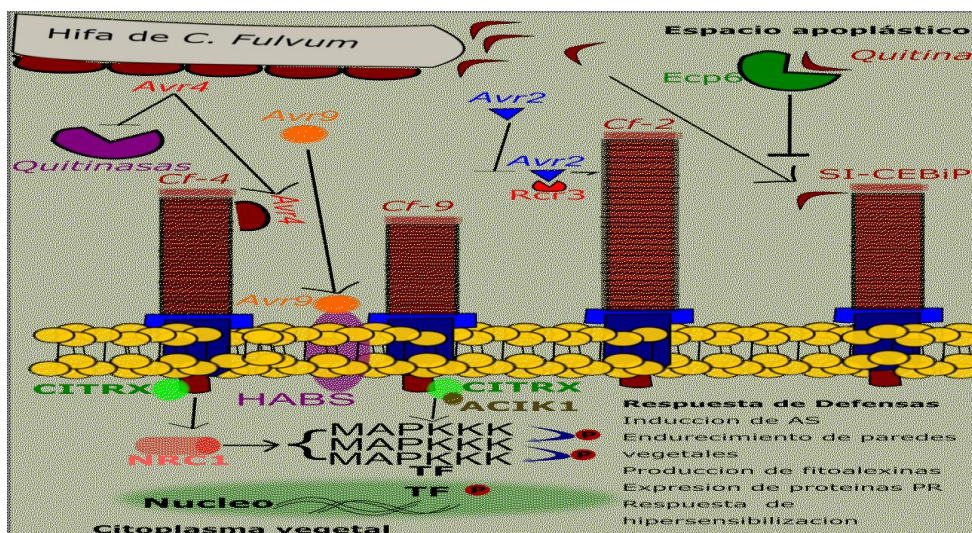


Figura II. 1 Interacción efector *Avr-Cf* mediando la defensa en el tomate. El efector *Avr4* se une a la quitina de la pared celular fúngica para proteger el hongo contra las quitinasas vegetales. En presencia de la proteína *Cf-4*, *Avr4* desencadena respuestas de defensa mediadas por *Cf-4*. El efector *Avr9* se une al sitio de enlace de alta afinidad (HABS, high affinity binding site), que se encuentra en la membrana plasmática de la célula vegetal. Muy probablemente, el complejo *Avr9-HABS* es reconocido por la proteína *Cf-9* y desencadena la señalización de defensa aguas abajo. En ausencia de *Avr9*, *ACIK1* y *CITRX* muy probablemente forman un complejo. En el reconocimiento *Avr9-HABS*, *ACIK1* fosforila *CITRX*, que desestabiliza y libera el complejo de la proteína *Cf-9* y resulta en la activación de la señalización de defensa aguas abajo. El efector *Avr2*, un inhibidor de la cisteína proteasa, se une e inhibe una proteasa cisteínicas requerida para la resistencia a *F. fulva* (*Rcr3*) En presencia de la proteína *Cf-2*, el complejo *Avr2-Rcr3* puede ser reconocido e induce respuestas de defensa mediadas por *Cf-2*. Los fragmentos de quitina son PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) y pueden ser reconocidos por *CEBiP* y desencadenar respuestas de defensa basal. Sin embargo, el efector *Ecp6* tiene la capacidad de unirse a fragmentos de quitina y evita estos fragmentos de quitina sean reconocidos. Abreviaturas: *Rcr3* (requerido para *F. fulva* resistencia 3); HABS (sitio de enlace de alta afinidad (high affinity binding site)); *CITRX* (*Cf-9*-interactúa con thioredoxin); *ACIK1* (*Avr9/Cf-9*-induce quinasas); *NRC1* (NB-LRR proteínas requeridas para HR asociado a la muerte celular-1); *MAPK*, *MAPKK*, y *MAPKKK* (mitogen-activated protein kinase); *TF* (factor de transcripción). Figura modificada de Stergiopoulos et al., 2009.

Las seis proteínas efectoras *ECP* identificadas en fluidos apoplásticos de hojas de tomate infectadas con *F. fulva*, *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4*, *Ecp5* y *Ecp7* aún no han sido caracterizadas funcionalmente. Sin embargo, su presencia en todas las razas de *Fulvia fulva* descritas hasta el momento sugiere que cumplen un rol clave en su virulencia y probablemente también en las actividades metabólicas del hongo. De hecho, la eliminación de *Ecp1* y *Ecp2* redujo severamente la virulencia de *F. fulva* (Lauge et al.,

1997). Por otro lado, el gen *Ecp2* se ha encontrado también en diferentes representantes de los Dothideomycetes, incluyendo *Mycosphaerella fijiensis*, lo que sugiere que también podría ser importante en la virulencia de otros hongos (Stergiopoulos et al., 2010).

En *F. fulva*, se han clonado cuatro genes *Avr* (*Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* y *Avr9*), todas estas secuencias codifican proteínas que desencadenan HR en plantas de tomate que llevan los genes *Cf* específicos; *Cf-2*, *Cf-4*, *Hcr9-4E* y *Cf-9*, respectivamente (Joosten, et al., 1994; Luderer, et al., 2002a; Van Kan, et al., 1991; Westerink, et al., 2004). Además, siete genes *Ecp* codifican proteínas que desencadenan HR en especies silvestres de *Lycopersicum* que llevan los genes *Cf-Ecp* (Laugé, et al., 1998; 2000; Bolton, et al., 2008). Recientemente, Iakovidis et al, (2019) describieron los genes que codifican receptores para el reconocimiento de la proteína codificada por *Ecp5* encontrando varios loci en el genoma del tomate. Se han descrito varios tipos de mutaciones en los genes *Avr* de *F. fulva*, incluyendo deleciones y cambios que pueden conducir a que no se sintetice la proteína o que la misma pierda estabilidad con lo cual las proteínas efectoras no son reconocidas por sus receptores *Cf* (Westerink, et al., 2004; Van Kan, et al., 1991). Al respecto, Stergiopoulos, et al., (2007) encontró que las variaciones de nucleótidos en los genes *Ecp* se produjo en una menor frecuencia que en los genes *Avr*. Estas variaciones genéticas son en su mayoría sustituciones o modificaciones que ocurren fuera de la secuencia de la proteína (Stergiopoulos, et al., 2007), lo que podría explicarse por el hecho de que los genes *Cf-Ecp* no se han introducido en gran cantidad de variedades comerciales por lo que no hay presión de selección por ende no generan cambios en sus efectores (Laugé, et al., 1998).

Además de las proteínas efectoras, los hongos patógenos también sintetizan metabolitos secundarios (MS) que desempeñan un papel crucial para vencer los mecanismos de las plantas hospedantes durante la infección y colonización. Los patógenos sintetizan tanto MS, algunos de los cuales son toxinas hospedante específicos y otras son toxinas hospedantes no específicas (Collemare & Lebrun, 2011). La mayoría de las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios en *F. fulva* durante el desarrollo del micelio en la planta así como en condiciones in vitro continua siendo desconocida (Griffiths et al., 2016). Sin embargo, se conoce que la síntesis de cladofulvina se encuentra regulada por múltiples factores como ser la inducción de distintos genes (*VeA*, *LaeA* o *HdaA*) (Griffiths et al., 2016) o la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Collemare et al., 2014; Griffiths et al., 2016, 2018)). Su síntesis es activa durante la fase de pre-penetración y al final del ciclo de infección, momento en el que el hongo comienza a esporular; en tanto que es reprimida durante la etapa biotrófica temprana, que es cuando el micelio se desarrolla en el espacio apoplástico (Davies & Hodge, 1974; Griffiths, et al. 2018).

Si se procede a extraer ADN genómico total de un tejido la muestra contiene ADN de la planta y de los organismos interactuando con el tejido, el mismo se puede visualizar como una banda en una electroforesis en gel de agarosa (Fermentas, 2006). Este ADN genómico puede utilizarse como molde para llevar adelante la amplificación de ADN por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), procedimiento que permite obtener una gran cantidad de copias de ese fragmento de interés. La reacción en cadena de la polimerasa se puede resumir en que: sobre la base de una cadena de ADN molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización,

hibridación y elongación (Figura II. 2). En una primera etapa, el ADN se desnatura a alta temperatura 94 °C, separando así las dos cadenas complementarias. El siguiente paso, la hibridación (annealing) consiste en reducir la temperatura que se ajusta entre 35 y 60°C para que los cebadores (primers) se unan a sitios complementarios del ADN molde. La última etapa, es de extensión, y en esta la polimerasa *Taq* (*Thermus aquaticus*) incorpora nucleótidos en el sentido 5' - 3' añadiendo en el extremo 3' libre. Esto ocurre a 72 °C que es la temperatura óptima de la polimerasa *Taq*. *Thermus aquaticus* es una bacteria hipertermófila que vive en ambientes de alta temperatura en donde sus sistemas enzimáticos son estables y en esto radica la importancia de la enzima. Estas tres fases entonces conforman un ciclo de reacción el que se repite entre 30 y 40 veces lo que depende del tamaño de fragmento a amplificar. La reacción se realiza en un termociclador que como su nombre lo indica es una máquina que permite realizar ciclos de diversas temperaturas que cambian en intervalos de tiempo muy cortos. Los ciclos de amplificación ocurren luego de un periodo inicial único de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos y al final de la reacción también se adiciona un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. (Figura II. 2).

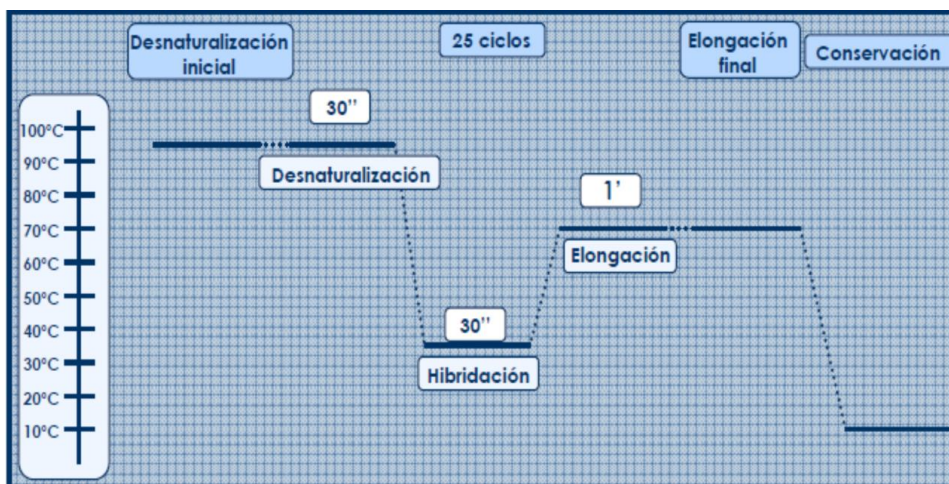


Figura II. 2 Perfil térmico típico de una PCR. Los tiempos de cada fase son orientativos.

La temperatura de hibridación puede variar en función de la especificidad de la reacción.

La especificidad de la PCR depende, fundamentalmente, de la temperatura empleada en la fase de hibridación y de la fuerza iónica del buffer de reacción que afecta la estabilidad de la doble hebra. Como ya se mencionó, cada cebador tiene una temperatura de hibridación y para el caso de los genes *avr* es semejante, esto permite amplificar, una misma reacción, todos los efectores, de esta manera se dispone de una herramienta de diagnóstico rápido, que es una PCR Multiplex (Medina, et al., 2015).

Los cultivares híbridos de tomate cultivados en Argentina son susceptibles a *F. fulva* patología que provoca pérdidas económicas significativas en los cultivos en invernadero en las provincias de Corrientes y Buenos Aires (Rollán. et al., 2013). En el resto de las regiones productoras de tomate del mundo la patología se maneja utilizando cultivares de tomate con genes de resistencia a la enfermedad. En el centro de investigaciones de fitopatología se trabaja con *Fulvia fulva* y en trabajos previos Medina, et al (2015), determinaron que los aislados disponibles hasta ese momento eran representantes de dos razas la "0" y la "2". Sin embargo, es necesario conocer con mayor profundidad la diversidad y la composición de la población de *Fulvia fulva* con el fin de proceder a un manejo exitoso de la enfermedad en la producción.

II.1.1. Hipótesis del capítulo:

II.1.1.1. Los aislados obtenidos de material vegetal con síntomas típicos del moho de la hoja del tomate provenientes de una importante región productora de tomate de Argentina son aislados de *Fulvia fulva*.

II.1.1.2. Los aislados de *Fulvia fulva* difieren en su genotipo.

II.1.2. Objetivos del capítulo:

II.1.2.1. Objetivo general:

Conocer la cantidad de razas, su diversidad genética y la dinámica de cambios a nivel del genoma en la población de *Fulvia fulva*

II.1.2.2 Objetivos específicos:

II.1.2.2.a) Disponer de una caracterización morfológica y molecular de los aislados de *F. fulva* provenientes del cinturón hortícola del Gran La Plata.

II.1.2.2.b) Conocer la diversidad genética por *ISSR*.

II.2.2.2.c) Conocer la estabilidad genética de los genes *Avr* y *Ecp*

II.2.2.2.d) Establecer las relaciones de las secuencias de los genes de avirulencia y ECP con los de razas provenientes de otros sitios del mundo

II.2. Materiales y métodos

II.2.1. Material biológico

A partir de recorridas de quintas de producción en el Cinturón Hortícola Platense y de Corrientes, se recolectaron hojas con sintomatología típica del moho de la hoja del tomate. Las muestras se embolsaron individualmente registrándose el cultivar y el tipo de producción del cual provenían, para luego realizar el aislamiento del patógeno en el laboratorio. Se realizaron aislamientos directos del/los potenciales agentes patógenos siguiendo procedimientos ya utilizados en el laboratorio (Rollan, et al., 2013). A partir del signo de la enfermedad en donde afloran micelio conteniendo conidios, se tomaron con un ansa esporas de *F. fulva* que se transfirieron bajo campana de flujo laminar a medio agar agua (AA), después de siete días a 25°C desarrollan micelio con una pigmentación púrpura que diferencia al hongo de otras especies de *Cladosporium spp.* Luego, las colonias fúngicas se repicaron en medio agar-extracto de papa-glucosa (PDA), hasta la obtención de cultivos monospóricos (Figura II.3).

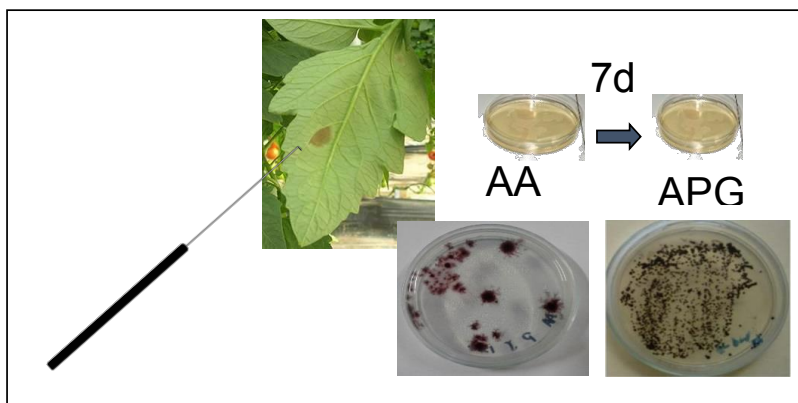


Figura II. 3. Esquema de aislamiento directo a partir del signo del patógeno que se lo visualiza en el envés de la hoja de tomate con sintomatología típica del moho de la hoja del tomate.

Utilizando a un representante de los cultivos puro se determinó la velocidad de crecimiento de la cepa, comparando la dimensión de la colonia en fotografías tomadas a distintos intervalos de tiempos (15, 30 y 60 días). Se determinó el área en mm^2 con el programa *APS asses 2.0*, conociendo así el tiempo y el área de crecimiento es posible obtener la velocidad media de crecimiento ($V_{mc} = \text{área}/\text{tiempo}$), como también generar una curva de evolución del crecimiento.

II.2.2. Análisis molecular de la diversidad de *Fulvia fulva*

II.2.2.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico total

A partir de los cultivos monospóricos se procedió a aislar el ADN genómico total siguiendo el Protocolo *Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega* de cada uno de los aislados. El ADN se cuantificó en base a la comparación de la intensidad de la banda del marcador molecular control de concentración conocida (Genoma del fago Lambda digerido con Hind III - Promega Biotech). Las mismas se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 0.7% P/V suplementado con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de UV (Sambrook, et al., 1989). Los geles se fotodocumentaron utilizando el analizador de imágenes *SYNGENE* y el software *GENETOOLS*.

II.2.2.2. Caracterización molecular por Marcadores moleculares: ISSR.

Se utilizaron los marcadores moleculares que mejor diferenciaron las cepas de *F. Fulva* (AA5, AN, GA5, IA5, BA3, FA5 y LA5; Tabla II. 1.; Franco, et al., 2017). La

reacción se llevó a cabo utilizando 12 ng de ADN molde; 2,5 mM de cloruro de magnesio; 1 μ M de primer; 0,2 mM de dNTP; 1X de Buffer; 1,25 unidades de T-plus DNA polimerasa, en un volumen final de 25 μ l.

El ciclo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min y 33 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C, aneling de 75 s 48°C (*primers AA5-AN-GA5-IA5-BA3*) o 53°C (*primers FA5-LA5*), y una extensión de 4 min a 72°C y a esto se le adicionó un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C.

Los fragmentos de ADN, productos de la amplificación por ISSR-PCR se resolvieron por electroforesis en geles de 1% de agarosa a los que se adicionó Bromuro de Etidio 5 μ l de una solución (10 μ g.ml⁻¹). La observación de las bandas se realizó en un Transiluminador SYNGENE con el que se foto documentó. El software GENETOOLS se utilizó para comparar y analizar los polimorfismos. Los análisis de similitud y las distancias genéticas de los aislados generados en función de los patrones de bandas ISSR se determinó el índice de similitud Dice. Si una banda está presente, se puede asumir que los loci donde se alinea el iniciador en ambos lados de la banda están presentes, se utilizó como out-group una cepa de *Stemphylium lycopersici* CIDEFI216.

Tabla II. 1 *Primers* ISSR representando su secuencia y temperatura de aneling.

Primer	Secuencia	Temperatura aneling
AA5	GAG(AAG) ₅	48°C
AN	(CAA) ₅	48°C
GA5	TCA(GT) ₈	48°C
IA5	ACA(CAA) ₅	48°C
BA3	(AC) ₈ CT	48°C
FA5	TAC(GA) ₅	53°C

II.2.3. Amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Space).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó utilizando los *primers ITS4* e *ITS5* (White et al., 1990; Tabla II. 3), siguiendo la metodología descrita por Franco, et al., (2017). Las PCRs se realizaron en una mezcla de reacción de 15 µl conteniendo 50 ng de ADN molde, 0,3 µM de cada cebador directo e inverso, 1,5 µl de buffer de reacción 10X (KCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 a 25 °C; 1 % de Tween 20), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP y 1 unidad de Taq polimerasa (todo Inbio Highway®, Buenos Aires, Argentina). Para amplificar el fragmento ITS, se utilizó el siguiente programa: 5 min a 94°C, seguidos de 33 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 56°C y 1 min a 72°C, seguido de un paso de extensión final de 72°C durante 5 min. La amplificación se realizó utilizando un MiniCycler PTC-0150 (MJ. Research, Watertown, MA, EE. UU.). Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % a los que se adicionó bromuro de etidio. Los geles se visualizaron por irradiación con luz UV, las imágenes se capturaron con GeneSnap y el ADN se cuantificó con el analizador de imágenes GeneTools (SynGene). Los productos de PCR se purificaron por precipitación con isopropanol y se secuenciaron en MacroGen (Seúl, Corea). Luego, de analizar las secuencias y confirmar la calidad de las mismas, estas se depositaron en el *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* (Tabla II.2.)

Tabla II. 2: Números de acceso al *GenBank* de los genes de los aislados nuevos de la colección CIDEFI de *Fulvia fulva*, discriminando a los ya estudiados por Medina et al., (2015)

aislado/gen	<i>ecp1</i>	<i>ecp2</i>	<i>ecp4</i>	<i>ecp5</i>	<i>avr2</i>	<i>avr4</i>	<i>avr4e</i>	<i>avr9</i>	<i>its</i>	<i>ks</i>
CIDEFI300	MK503383	MK388001	MK388015	MK388029						MK144330
CIDEFI301	MK387988	MK388002	MK388016	MK388030						
CIDEFI305	MK387989	MK388003	MK388017	MK388031						
CIDEFI307	MK387990	MK388004	MK388018	MK388032						
CIDEFI318	MK387991	MK388005	MK388019	MK388033						
CIDEFI320	MK387992	MK388006	MK388020	MK388034						
CIDEFI322	MK387993	MK388007	MK388021	MK388035	no amplificado	MK313783	MK308682	MK308690	MK405707	
CIDEFI323	MK387994	MK388008	MK388022	MK388036	no amplificado	MK313784	MK308683	MK308691	MK405708	
CIDEFI325	MK387995	MK388009	MK388023	MK388037	no amplificado	MK313785	MK308684	MK308692	MK405709	
CIDEFI326	MK387996	MK388010	MK388024	MK388038	MK308679	MK313786	MK308685	MK308693	MK405710	
CIDEFI327	MK387997	MK388011	MK388025	MK388039	no amplificado	MK313787	MK308686	MK308694	MK405711	
CIDEFI329	MK387998	MK388012	MK388026	MK388040	no amplificado	MK313788	MK308687	MK308695	MK405712	
CIDEFI330	MK387999	MK388013	MK388027	MK388041	MK308680	MK313789	MK308688	MK308696	MK405713	
CIDEFI332	MK388000	MK388014	MK388028	MK388042	MK308681	MK313790	MK308689	MK308697	MK405714	

Tabla II. 3. *Primers* homólogos al extremo 5' y 3' de las secuencias de los genes *ITS*, *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, *Avr9*, *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4* y *Ecp5* utilizados en esta investigación. En la tabla se presentan las secuencias en sentido 5'-3', las temperaturas de anelling (T°a) y el tamaño del amplicon generado.

Primer	Secuencia en sentido 5' a 3'	T°a	Amplicon	Referente
<i>ITS-4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	56 °C	560pb	White <i>et al.</i> , 1990
<i>ITS-5</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			
<i>Avr2-F</i>	CATCAGCATATCCTCTTCCATCC	63 °C	570pb	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007
<i>Avr2-R</i>	CAGTACGTTCAAAAGCAGATAAGG			
<i>Avr4-F</i>	ACGGTAGGTCTGTACACGAGCC	65 °C	806pb	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007
<i>Avr4-R</i>	ACCGAACTGGGTCATGGAATG			
<i>Avr4E-F</i>	GCCCGGTATATCGCTGTGC	53.5 °C	640pb	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007
<i>Avr4E-R</i>	CGGAACCCCTGGCTGAGA			
<i>Avr9-F</i>	AATACAACCTTGAAACAGCTAGG	62.5 °C	710pb	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007
<i>Avr9-R</i>	GGACTCTACGGGGCTTGG			
<i>Ecp1-F</i>	ACCAGGATAAGTTCGCAGTC	55°C	1327pb	Diseñado
<i>Ecp1-R</i>	GCCTCCGCGATGCTTCCT			
<i>Ecp2-F</i>	GTCCAAGGATCGTGTCTCAAG	60°C	799pb	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007
<i>Ecp2-R</i>	TTCTAGCAAACCCGTCTGA			
<i>Ecp4-F</i>	AATTCCAACCTCCCTCCTCG	64 °C	508pb	Diseñado
<i>Ecp4-R</i>	TTGCTCAAGCCCAGACAG			Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007
<i>Ecp5-F</i>	TATGAACACTTTTACTCTACTC			
<i>Ecp5-R</i>	CGCGTCGCCTGATAGAT	64 °C	882pb	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007

II.2.4. Amplificación de los genes *Avr*

Las reacciones de amplificación destinados a amplificar los genes de avirulencia consistieron en utilizar los cebadores descritos por Stergiopoulos *et al.* (2007) con modificaciones. Como la eliminación de la secuencia universal MP13 (Tabla II. 3), Las PCRs se realizaron en una mezcla de reacción de 15 µl que conteniendo 50 ng de ADN molde, 0,3 µM de cada cebador directo e inverso, 1,5 µl de buffer de reacción 10X (KCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 a 25 °C; 1 % de Tween 20), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2

mM de dNTP y 1 unidad de Taq polimerasa (todo Inbio Highway®, Buenos Aires, Argentina). Se procedió a realizar las reacciones de con los pares de *primers* homólogos a los extremos 5" y 3" de los genes *avr* Tabla II. 3. (Stergiopoulos, et al., 2007) en un volumen final de 15 µl en un termociclador (gradiente modelo multigene; Labnet International, In). El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min; seguida de 40 ciclos de 30 s a 94 °C; una etapa de hibridación de 1 min a 63, 65, 53,5 y 62,5 °C para *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* y *Avr9*, respectivamente; y 1 min de extensión a 72°C según el procedimiento descrito por Medina, et al., (2015). Los productos de PCR se resolvieron en electroforesis en geles de agarosa al 1 % a la que se le adicionó bromuro de etidio. Los geles se visualizaron mediante iluminación UV, las imágenes se capturaron con GeneSnap y se cuantificó la cantidad de ADN amplificado con el analizador de imágenes GeneTools (SynGene). Los productos de PCR se precipitaron con isopropanol y se secuenciaron en MacroGen (Seúl, Corea). Las secuencias se depositaron en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *GenBank*. En la tabla II.2 se presentan los correspondientes números de acceso (tabla II. 2).

II.2.5. Identificación molecular de las razas de las cepas

La identificación molecular de la raza se puede determinar en base a la reacción de un set de cultivares de Tomate *MoneyMaker* en el que se testean los aislados, procedimiento que demanda cierto tiempo. Por otro lado, también se puede realizar detectando la presencia o ausencia de la secuencia de los genes *avr*, lo que además se puede resolver en una sola reacción, que se conoce como multiplex. Como resultado de la misma se determina la presencia o ausencia de las bandas correspondientes a cada gen *avr*. (Medina, et al., 2015). Las secuencias genéticas de

los *Avr* se depositaron en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) *GenBank* (Tabla II. 2). La Multiplex se realizó en un volumen final de 15 µl en un termociclador programado de acuerdo a lo descrito anteriormente. La única temperatura que se alteró fue la de hibridación que se cambió a 58,4 °C. Las reacciones se realizaron con ADN genómico aislado de cultivos monospóricos (40 a 60 ng) o tejido foliar con sintomatología típica del moho de la hoja del tomate (100 ng), 1.5 mM MgCl₂ (Inbio Highway), 0.20 µM cada uno de los pares de (correspondiente para *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, y *Avr9*), 0.2 mM dNTPs (Inbio Highway), y 1 U of Tac-Plus DNA polimerasa (Inbio Highway) en 1× del buffer de reacción (Inbio Highway). Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1% de agarosa (Invitrogen). Los geles se visualizaron mediante iluminación UV, las imágenes se capturaron con GeneSnap y las razas se determinaron en base a la presencia de las bandas de los genes de avirulencia

II.2.6. Amplificación de los genes *Ecp*.

También se realizaron reacciones de amplificación tendientes a generar los amplicones de los genes que codifican las proteínas extracelulares que sintetiza *F. fulva*. Así se realizaron reacciones de amplificación en un volumen final de 15µl en un termociclador (gradiente modelo multigene; Labnet International, In) en el que se utilizó el siguiente programa: una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 5 min; seguida por 25 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s de hibridación a 55, 60, 64 y 64 °C para *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4* y *Ecp5*, respectivamente (Stergiopoulos, et al., 2007); y una extensión de 1 min a 72 °C, todas las reacciones incluyeron una extensión final a 72 °C durante 7 min. Las mezclas de reacción contuvieron 40 ng de ADN molde de cultivos monospóricos, 1,5 mM MgCl₂ (Inbio Highway), 0,40 mM de cada *Primers*

(correspondiente a *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4* y *Ecp5*, respectivamente; Tabla II. 3), 0,2 mM de dNTPs (Inbio Highway) y 1 U de polimerasa de ADN T-Plus (Inbio Highway) en búfer de reacción 1X (Inbio Highway). La identificación y procesamiento de los amplicones generados con la reacción se describió anteriormente y las secuencias de los genes *Ecp* obtenidas se depositaron en el NCBI *GenBank* (Tabla II. 2).

II.2.7. Polimorfismo dentro de los genes *Avr* y *Ecp*

Los polimorfismos de los genes *Avr* y *Ecp* de los aislados de *F. fulva* (Tabla II. 4) se identificaron comparando secuencia de nucleótidos de aislados de *F. fulva* disponibles, principalmente de Holanda y Japón. Existen varios tipos de polimorfismos a nivel de las bases nucleotídicas: SNP (*single nucleotide polymorphisms*), Indel (inserciones y deleciones) y corrimiento del marco de lectura. Mientras que el SNP consiste en cambios en la secuencia nucleotídica, que pueden ser transversiones cuando cambian bases purinas por pirimidinas o viceversa, o pueden ser transiciones si cambian dentro de las purinas o dentro de las pirimidinas, (figura II. 4). Cuando estos cambios ocurren en la secuencia nucleotídica que codifica puede provocar un cambio del codón del aminoácido correspondiente, lo que provocaría un cambio en la secuencia proteica. Este es conocido como SNP no sinónimo, o puede ser solo una mutación, que no provoca cambios en la secuencia proteica, a esto se lo conoce como SNP sinónimo. Las *indel*, son mutaciones que pueden agregar o quitar una o varias bases lo que podría provocar un corrimiento del marco de lectura de la secuencia proteica. Las secuencias de ADN se alinearon con ClustalW (Thompson, et al., 1994) mientras que la alineación múltiple de las proteínas codificadas por las secuencias

descritas se hizo usando Muscle (Edgar R. 2004) en Geneious v9.1.2 (Kearse, et al., 2012). La diversidad de nucleótidos se calculó utilizando el *software* ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). La relación entre las tasas de sustitución de nucleótidos no sinónimas (Ka) y sinónimos (Ks) es un indicador de las presiones selectivas sobre los genes y se calculó a través del servicio Ka/Ks proporcionado por la *University I Bergen* (services.cbu.uib.no/tools/kaks).

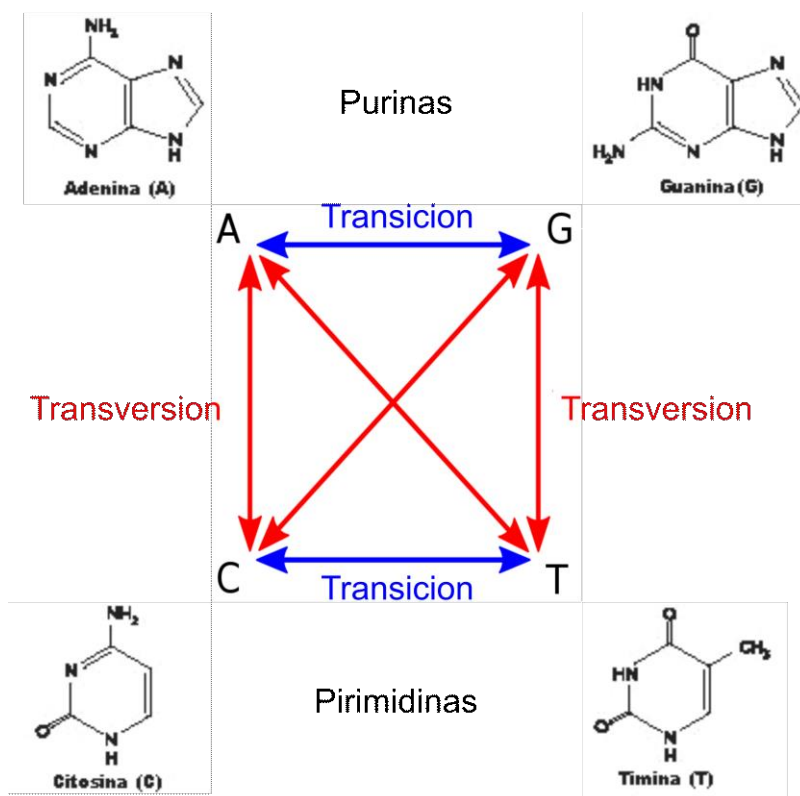


Figura II.4 Definición de transiciones y transversiones.

II.3. Resultados:

II.3.1. Material biológico.

A partir de las muestras obtenidas de los diversos establecimientos de producción de cultivos de tomate con síntomas típicos de la enfermedad del moho de la hoja se

obtuvieron por aislamiento directo, ocho nuevos aislados de *F. fulva*. Las muestras de plantas enfermas fueron recolectadas en diferentes sitios de las dos principales zonas de producción de tomate de la Argentina, el Cinturón Hortícola Platense y Corrientes. (Tabla II. 4). Los cultivos monospóricos de los aislados identificados se incorporaron a la colección de hongos del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), siendo el total de 14 aislados, se mantuvieron en PDA a 4°C; Además, también se incluyeron 6 aislados descritos anteriormente (Medina, et al., 2015).

Tabla II. 4. Aislados de *F. fulva* utilizados y su fuente geográfica de muestreo, así como cultivares de tomate de origen.

CEPARIO n°	Cultivar	Localidad	año de aislado	Tipo de producción	Cita
CIDEFI 300	Elpida	Los Hornos, La Plata	abr-11	Convencional bajo cubierta	Medina, et al., 2015
CIDEFI 301	Elpida	Abasto, La Plata	abr-11	Orgánico bajo cubierta	Medina, et al., 2015
CIDEFI 305	Colibri	Arana, La Plata	oct-11	Convencional bajo cubierta	Medina, et al., 2015
CIDEFI 307	Cherry	Corrientes	ene-12	Convencional bajo cubierta	Medina, et al., 2015
CIDEFI 318	Elpida	Etcheverry, La Plata	jun-12	Convencional bajo cubierta	Medina, et al., 2015
CIDEFI 320	Keitor	Corrientes	ago-13	Convencional bajo cubierta	Medina, et al., 2015
CIDEFI 322	Yigido Verde	Abasto, La Plata	nov-15	Orgánico bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 323	Cebra	Abasto, La Plata	nov-16	Orgánico bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 325	Elpida	Gorina, La Plata	mar-16	Convencional bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 326	Pantano	Abasto, La Plata	abr-16	Orgánico bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 327	Banano	Abasto, La Plata	abr-16	Orgánico bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 329	Banano	Abasto, La Plata	may-16	Orgánico bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 330	Elpida	Los Hornos, La Plata	may-16	Convencional bajo cubierta	Este estudio
CIDEFI 332	Elpida	Abasto, La Plata	jun-16	Convencional bajo cubierta	Este estudio

Fulvia fulva es un hongo que crece lentamente, aún en condiciones óptimas de cultivo como puede ser un medio rico y condiciones de temperatura ideales. Por eso los

aislamientos desarrollaron una colonia con dimensiones de 50 mm de diámetro en un período de al menos 20 días de incubación a 25°C. Esto hizo que la obtención de cultivos monospóricos demandara bastante tiempo. Se integró el crecimiento a lo largo del tiempo y se encontró que este es representado por una función exponencial y se observó que no llega a la fase estacionaria del crecimiento, probablemente este asociado a la velocidad de crecimiento del hongo (Figura II. 5).

Se determinó la velocidad de crecimiento para el aislado CIDEFI332, presentó una tasa de crecimiento, expresada como el incremento de área de la colonia en un periodo de 24 h ($\text{mm}^2/\text{día}$), $Y=72,034 \cdot e^{0,0567X}$; donde Y representa el crecimiento en superficie ($\text{mm}^2 \cdot \text{día}^{-1}$) y X los días de la incubación (Figura II. 5). Para esto se realizaron determinaciones de área a los 15, 30 y 60 días (Figura II. 6). En cada uno de los muestreos se foto documentó y determinó el área de crecimiento con el programa APS asses 2.0.

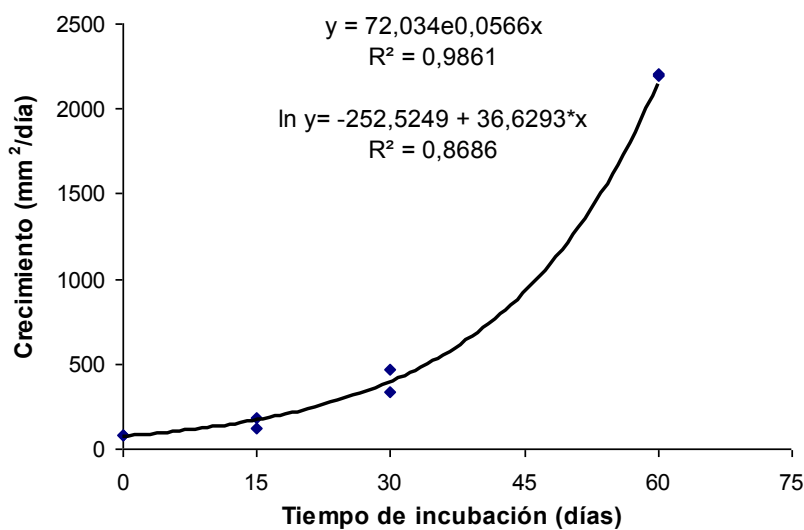


Figura II. 5. Crecimiento de la cepa CIDEFI332; A: a los 15 días de inoculación; B: a los 30 días de inoculación; C a los 60 días de inoculación.

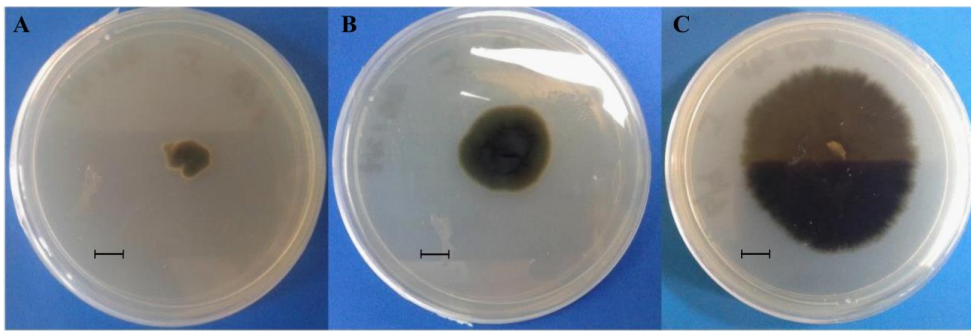


Figura II. 6. Crecimiento de la cepa CIDEFI322; A: a los 15 días de inoculación; B: a los 30 días de inoculación; C a los 60 días de inoculación; la barra indica 10 mm.

II.3.2. Análisis de la Diversidad Genética.

La diversidad entre todos los aislados se determinó comparando las huellas digitales (*fingerprints*) generadas con la reacción ISSR-PCR (Bornet & Branchard, 2001). Los patrones de bandas ISSR-PCR obtenidos se organizaron en una matriz de datos binarios, con una puntuación de 0 para la ausencia y de 1 para la presencia. En la Figura II. 7 se observan los *fingerprints* obtenidos con cada uno de los *primers* seleccionados. Los siete *primers* seleccionados amplificaron 175 bandas cuyos tamaños oscilaron en un rango de 200 pb hasta 6500 pb. De todos estos, 54 ampliaciones fueron polimórficas, y explican el 30,9% de la diversidad genética (Tabla II. 5), El promedio de bandas polimórficas generado por cebador fue de 8, siendo el primer AA5 el que generó más bandas, sumando un total de 14.

En total, se identificaron 54 amplicones polimórficos (30,86%). Con ellos se construyó un dendrograma usando el algoritmo UPGMA y para calcular los valores de similitud y las distancias genéticas se utilizó el índice de similitud Dice. Todos los aislados de *F. fulva* se agruparon con un coeficiente de similitud de 0,829 (Figura II. 8). Con un nivel de 0,883, los aislamientos se subdividieron en tres grupos.

En el dendrograma (Figura II. 8) observamos que los aislados CIDEFI 305 y CIDEFI 325 se agrupan con un índice de similitud de 0,944, estos se obtuvieron en dos localidades distintas en cultivares distintos. Los aislados CIDEFI 307, CIDEFI 329, CIDEFI 300, CIDEFI 320 y CIDEFI 322 tal cual muestra el dendrograma tienen un mayor nivel de similitud. Los aislados CIDEFI 318, CIDEFI 330 y CIDEFI 332 se agrupan juntos con un nivel de similitud de 0,975 %, estos aislados son todos raza 0 y además fueron aislados del cultivar de tomate Elpida. El aislado CIDEFI326 a pesar de que también es raza cero, es más diverso y no se agrupó con los aislados descritos anteriormente.

Tabla II. 5: Análisis de ISSR, indicando tamaño de bandas, número de bandas promedio y bandas polimórficas, además se indica el % de polimorfismo por cebador y el polimorfismo total.

Reacción	Tamaño de bandas (pb)	Número de bandas promedio	Bandas polimórficas	% polimorfismo por primers
AA5	250 – 1000	25	14	56,00%
AN	500 – 4361	21	10	47,62%
GA5	300 – 6557	35	8	22,86%
FA5	200 – 4361	24	7	29,17%
LA5	300 – 4361	19	7	36,84%
IA5	400 – 4361	30	5	16,67%
BA3	250 – 4361	21	3	14,29%
TOTAL		175	54	
	% polimorfismo	30,86%		

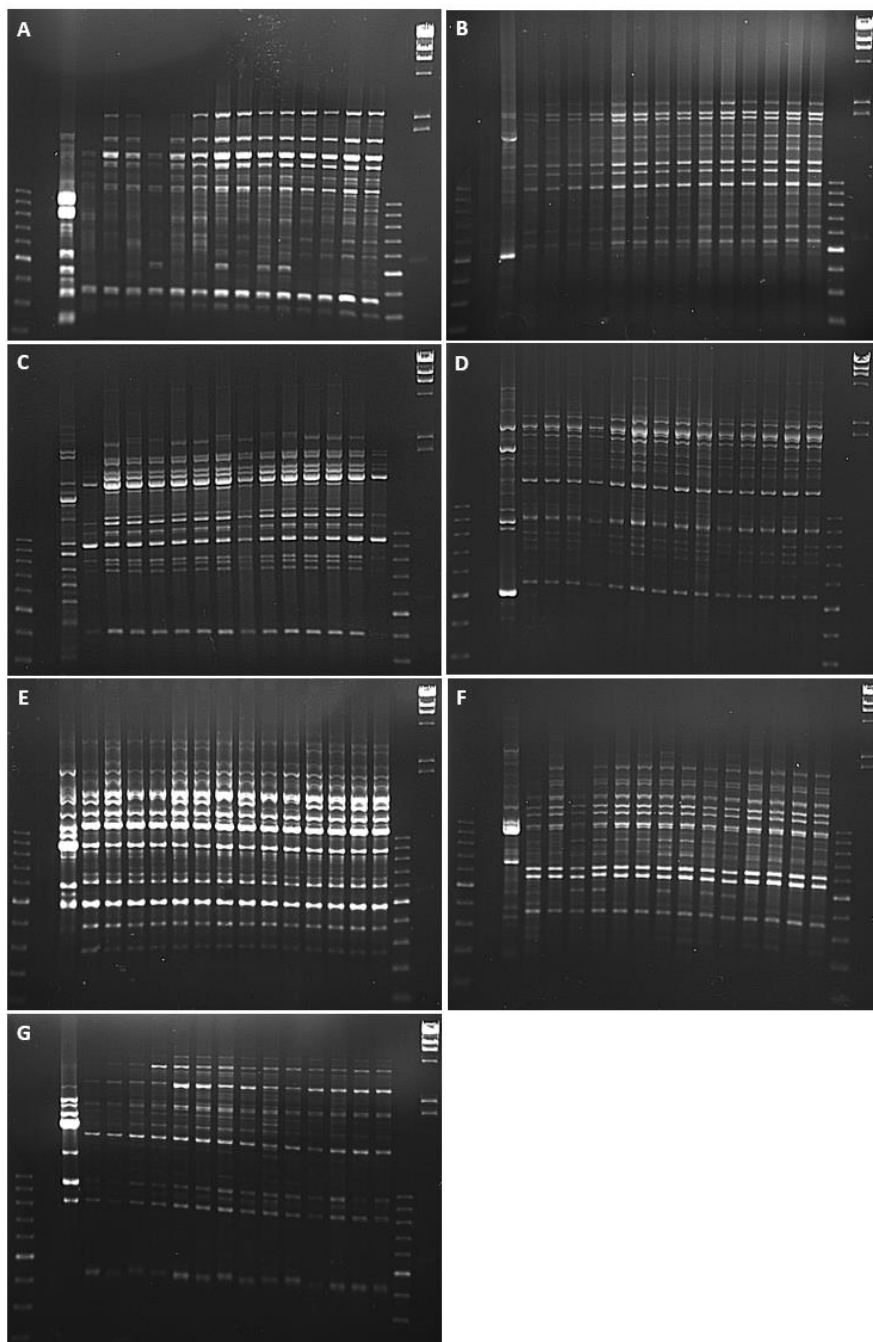


Figura II. 7. Reacción ISSR. A: *Primer AA5*; B: *Primer AN*; C: *Primer GA5*; D: *Primer IA5*; E: *Primer BA3*; F: *Primer FA5*; G: *Primer LA5*. Calle 1: Marcador molecular 100-1000 pb; Calle 2: Control negativo (sin DNA) ; Calle 3: Control positivo (*out-group*) CIDEFI 216; Calle 4: CIDEFI 301; Calle 5: CIDEFI 305; Calle 6: CIDEFI 325; Calle 7: CIDEFI 326; Calle 8: CIDEFI 327; Calle 9: CIDEFI 329; Calle 10: CIDEFI 330; Calle 11: CIDEFI 300; Calle 12: CIDEFI 332; Calle 13: CIDEFI 318; Calle 14: CIDEFI 320; Calle 15: CIDEFI 307; Calle 16: Marcador molecular 100-1000pb; Calle 17: Marcador molecular Lambda Hind III.

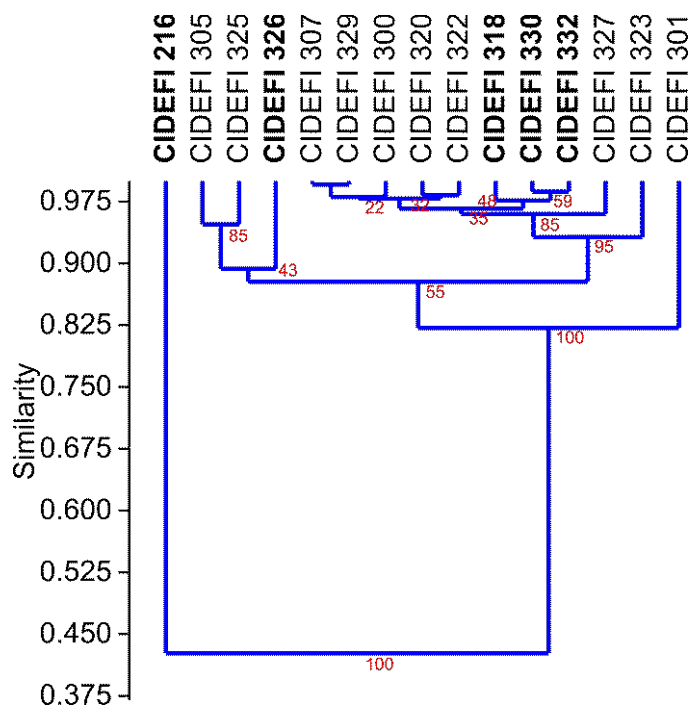


Figura II. 8. Dendrograma, basado en el análisis ISSR-PCR, que describe la variabilidad genética existente entre los aislados de *Fulvia fulva*. Se destaca la raza 0 en negrita y out-group CIDEFI 216, el resto son raza 2, como se indica en el punto II.3.3 y se encuentran en formato sin negrita, se utilizó un *boot number trap* de 1000 y un coeficiente de correlación cofenético de 0,9948.

II.3.3. Identificación de Razas de *Fulvia fulva* aisladas de hojas de tomate que muestran síntomas típicos del moho de la hoja del tomate

El análisis de las secuencias de *ITS*, realizado mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), mostró que las secuencias de los espaciadores internos del RNA tienen un 99% de similitud con las secuencias correspondientes a *Fulvia fulva* y también con hongos del género *Mycosphaerella buckinghamiae* (número de secuencia EU707855.2), *Mycosphaerella africana* (número de secuencia AY626981.1), *Mycosphaerella* sp. (número de secuencia KM409653.1) y *Mycosphaerella microsora* (número de secuencia EU167599.1). Si bien estos resultados sugieren que los aislados son representantes de *Fulvia fulva*, esto requiere

que sea confirmado con secuencias génicas adicionales, entre las que podemos considerar a los genes de avirulencia y también a los genes que codifican las proteínas extracelulares de *Fulvia fulva*.

Debido a las razones descriptas en el párrafo anterior se procedió a amplificar, con un set de *primers* específicos los genes *Avr*. De esta manera se confirma la identidad de los aislados ya que los *Avr* son específicos de *Fulvia fulva* y por otro lado se determinan la raza del hongo en base a la presencia o ausencia. En la tabla II. 5, se presentan los resultados de las amplificaciones realizadas, indicando como positivas aquellas que amplifican la secuencia que codifica el efector *avr*, lo que conducirá a determinar finalmente la raza (Tabla II. 6).

Tabla II. 6. Identificación de las razas por amplificación de genes.

Cepa	<i>Avr 2</i>	<i>Avr 4</i>	<i>Avr 4e</i>	<i>Avr 9</i>	Raza
CIDEFI300		+	+	+	2
CIDEFI301		+	+	+	2
CIDEFI305		+	+	+	2
CIDEFI307		+	+	+	2
CIDEFI318	+	+	+	+	0
CIDEFI320		+	+	+	2
CIDEFI322		+	+	+	2
CIDEFI323		+	+	+	2
CIDEFI325		+	+	+	2
CIDEFI326	+	+	+	+	0
CIDEFI327		+	+	+	2
CIDEFI329		+	+	+	2
CIDEFI330	+	+	+	+	0
CIDEFI332	+	+	+	+	0

La amplificación de los genes de avirulencia cuando se utilizó como molde ADN genómico de los aislados descritos confirmó que los aislados son *Fulvia fulva*. En las reacciones se incluyó un control negativo que consistió en ADN genómico de *Stemphylium lycopersici* (CIDEFI 216) el cual no actuó de molde para la amplificación de ningún avr. El ADN genómico de los aislados permitieron amplificar los avr que confirmaron nuevamente que todos los aislados se agruparon en alguna de las dos razas ya descritas en Argentina. La raza 0 que contiene la secuencia de todos los Avr y la raza 2 cuyo genoma contiene la secuencia de todos los avr excepto la del Avr2. Las cepas CIDEFI300, CIDEFI301, CIDEFI305, CIDEFI307, CIDEFI320, CIDEFI322, CIDEFI323, CIDEFI325, CIDEFI327, CIDEFI329 se confirmó pertenecen a la raza 2; y las cepas CIDEFI318, CIDEFI326, CIDEFI330, CIDEFI332 a la raza 0 (tabla II. 5).

II.3.4. Polimorfismos en los genes Avr

Se realizó el análisis de las secuencias de los genes Avr para lo cual se alinearon las secuencias, incluidas aquellas disponibles en bases de datos públicas. De esta manera se identificaron polimorfismos en las secuencias correspondientes a los diversos aislados (Figura II. 9).

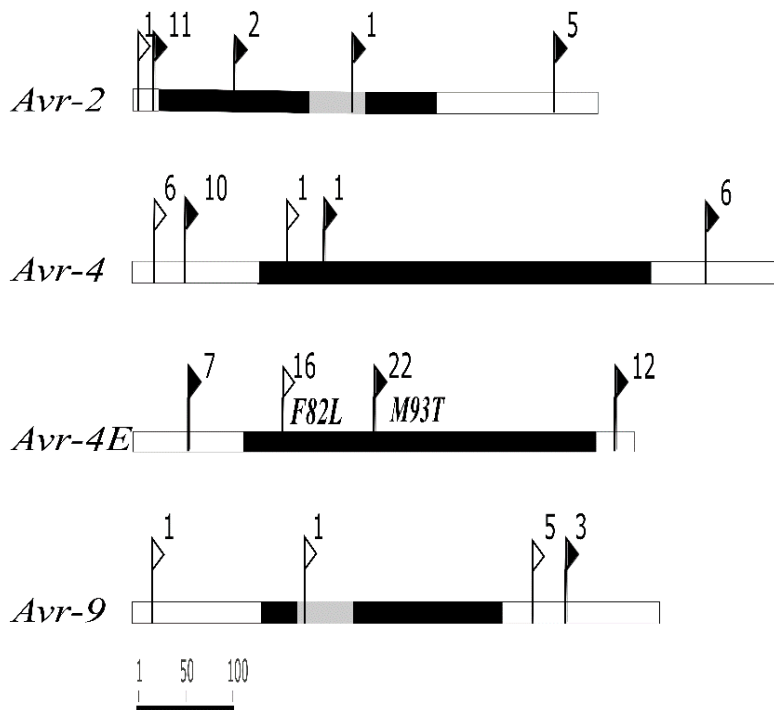


Figura II. 9. Variación de secuencia a nivel de nucleótido en genes efectores de avirulencia *F. fulva* (*Avr*). Las secuencias codificantes se muestran como cajas negras los intrones como cajas grises. Las secuencias no codificantes se muestran como cuadros blancos. El número de modificaciones en los aislados descritos por Medina., et al., (2015) se indican por banderas negras y por banderas blancas para los aislados descritos en este estudio. De las modificaciones no sinónimos, los cambios en la secuencia de aminoácidos se indican por el aminoácido (aa) y la posición aa.

Analizamos un fragmento de 486 pb que corresponde a la secuencia parcial del *Avr2*, este fue 100 % homólogo a la secuencia del mismo fragmento de la secuencia completa del gen de 1606 pb de un aislado europeo (números de acceso de NCBI: AJ421628) y otra japonés (número de acceso KM880020, respectivamente). En los aislados presentados en este estudio sólo se encontró un cambio en la secuencia que codifica el *Avr2*. Se identificó polimorfismo de nucleótido único (SNP) debido a una transversión (26A>C) en la secuencia del extremo 5' del *exón-1* localizada escaleras arriba del codón de inicio del gen de la cepa de CIDEFI 330.

El análisis de la secuencia de 678 pb que corresponde a un fragmento parcial del gen *Avr4* que posee un total de 1194 pb. La secuencia se contrastó con las descritas por Joosten, et al., (1997; Número de acceso: Y08356) de aislados de Holanda y de Japón (Li, et al., 2015 Número de acceso KM880021). Se identificaron siete polimorfismos en secuencias no codificantes, que consistieron en 5 simples de único nucleótido (SNP) que comprendieron transiciones de nucleótidos (79G>A) y una deleción (70delC). Además, se detectó una transición de nucleótidos (357G>A) en la secuencia codificante de la proteína *Avr4* del aislado CIDEFI 325, que es una modificación sinónima, por lo tanto no se altera la secuencia aminoacídica de la proteína.

El análisis del fragmento de 520 pb que es una secuencia parcial del *Avr4E* que tiene un largo total de 2645 pb, fue contrastada con las secuencias parciales del mismo gen de un aislado europeo (Número de acceso del NCBI AY546101). Los aislados de la Argentina presentaron dieciséis polimorfismos que se ubicaron en la fragmento de ADN que codifica la proteína. Es interesante destacar que, todos los aislados argentinos presentaron un polimorfismo de nucleótido único por transición (364C>T; 398C>T), lo que generó modificaciones no sinónimas, es decir que se alteró la secuencia aminoacídica de la proteína. Esta modificación consistió en una sustitución de fenilalanina por Leucina (F82L), y la otra consistió en una sustitución de un Metionina por Treonina (M93T).

El análisis de la secuencia parcial de 550 pb del gen *Avr9* de los aislados argentinos se contrastó con la misma secuencia del *Avr9* cuya secuencia completa es de 1836 pb la que corresponde a un aislado europeo (número de acceso del NCBI: X60284) y otra a un aislado japonés (número de acceso del NCBI: KM88022). Se destaca que gran parte de los polimorfismos descriptos ocurrieron en la secuencia de

bases que no codifican la proteína. Se encontró un polimorfismo de nucleótido único en la secuencia no codificante del *Avr9* de CIDEFI 326 (18G>T) y otro dentro de la secuencia del *intron* del aislado CIDEFI 325 (225A>T), ambos como resultado de transversiones. La mayoría de las mutaciones ocurrieron en la secuencia del *exón-2* correspondiente al *Avr9*. Dos polimorfismos de nucleótidos únicos consistieron en una transición y una transversión de un nucleótido: 497G>C y 516T>G y tres inserciones (503-504*ins*T; 516-517*ins*G y 534-535*ins*A) que ocurrieron en la secuencia del aislado CIDEFI 332. Estos cambios no provocaron cambios en la secuencia proteica ya que ocurrieron luego del codón de parada (382_384). Basándose en el análisis de diversidad de nucleótidos, el gen *avr 2* presentó el mayor número de cambios con la secuencia analizada (Tabla II.7), pero como no condujeron a sustituciones de aminoácidos, no podemos inferir si ocurren en respuesta a las fuerzas evolutivas. En contraste con esto, dentro de la secuencia genética *avr9* las sustituciones observadas por Medina et al. (2015) muy probablemente se debieron a la presión selectiva positiva ya que para la secuencia del efector *Avr9* ω era mayor que 1.

Tabla II.7 Índices calculados de diversidad molecular basados en la variación de secuencia en los genes efectores *Avr* de *F. fulva*

Genes	Na	Parametros nucleotídicos de diversidad			
		Diversidad nucleotídica	π	θ_s	(ω)
<i>Avr2</i>	8	0.005658 (0.003810)	27.500	154.270	/
<i>Avr4</i>	19	0.002459 (0.016880)	16.670	400.562	0
<i>Avr4E</i>	19	0 (0)	0.0000	0.00000	0
<i>Avr9</i>	19	0.002050 (0.001569)	11.110	145.368	15.464

Na: Número de aislados utilizados para el análisis. π : Diversidad de nucleótidos basada en el número medio de diferencias de nucleótidos entre dos secuencias aleatorias estimadas para toda la longitud de las secuencias analizadas sólo para sustituciones no sinónimos y sinónimos. θ_s : La estadística del número de sitios segregadores, estimada para toda la longitud de las secuencias analizadas, para la sustitución no sinónimo y sinónimo. (ω) = K_a/K_s = relación entre las tasas de sustitución de nucleótidos no sinónimos (K_a) y sinónimos (K_s), es un indicador de las presiones selectivas sobre los genes.

II.3.5. Polimorfismos de los genes *Ecp*.

También se evaluaron los polimorfismos en las secuencias de los genes que codifican las proteínas extracelulares conocidas como *Ecp* secuencias que se contrastaron con las proteínas disponibles de otros aislados. Cabe destacar que en este caso no se disponen de un número relevante de secuencias anotadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology information*) por ello se trabajó con todas las disponibles en las bases de datos públicas (Figura II. 10).

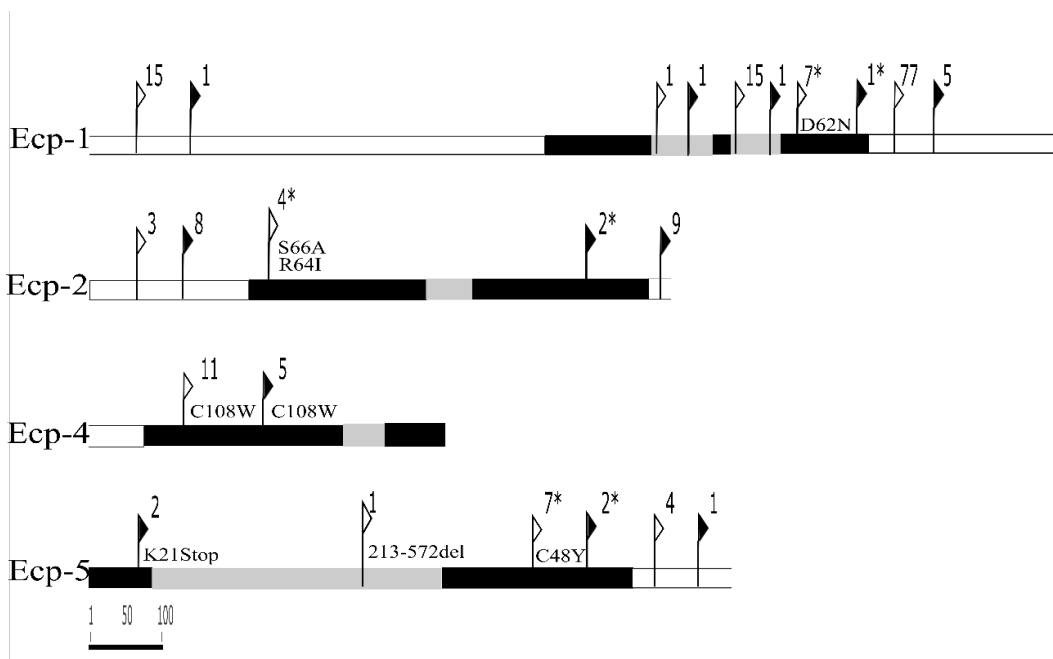


Figura II. 10. Variaciones de las secuencias génicas de los genes que codifican efectores de *F. fulva* (*Ecp*). Las secuencias codificantes se muestran como cajas negras y los intrones como cajas grises. Las secuencias no codificantes se muestran como cuadros blancos. El número de modificaciones en los aislados descritos por Medina, et al., (2015) se indican con banderas negras y con banderas blancas para los aislados descritos en este estudio. De las modificaciones no sinónimos, los cambios en la secuencia de aminoácidos se indican por el aminoácido (aa) y la posición aa. Los asteriscos (*) indican la inserción o eliminación que provoca un cambio del marco de lectura.

La secuencia parcial del gen que codifica la proteína *Ecp1* que tiene un largo de 1357 pb se comparó con la única secuencia del gen completo disponible en el NCBI cuya secuencia tiene 1646 pb y corresponde a un aislado de Holanda (número de acceso: Z14023). Los aislados argentinos presentaron ciento veinticuatro polimorfismos en la secuencia. Curiosamente, 116 de estos cambios ocurrieron en la parte del gen que no codifica la proteína efectora. Todos los aislados contuvieron dos inserciones de nucleótidos (120-121*insC* y 487-488*insG*), excepto la secuencia de los aislados CIDEFI 322 y CIDEFI 301 que sólo presentaron la primera inserción. La cepa CIDEFI 307, presentó dos SNP (94A>T y 98A>G) y una eliminación (217*delG*) en la secuencia del gen en la región no codificante. En la secuencia no codificante del gen correspondiente al aislado CIDEFI 318 se encontró un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en el que una citosina es reemplazada por una adenina (523C>A). Los aislados fúngicos CIDEFI 307 y CIDEFI 322 en la secuencia de esta proteína contuvieron un SNP y una inserción, respectivamente. En el caso de la primera una citosina reemplazo a una timina y en el segundo caso se detectó la inserción de una base de timina (827C>T y 801-802*insT*) en la secuencia del *intron-1*. Todos los aislados, excepto CIDEFI 305 y CIDEFI 323, presentaron un SNP como resultado de una transición en la posición 916 en la que una citosina fue reemplazada por una timina (916C>T) y la eliminación de una citosina en la posición 944, respectivamente, en la secuencia del *intron-2*. Además, el aislado CIDEFI 329 presentó en la secuencia del gen, dos transversiones adicionales en la posición 945 y 950 en donde una guanina reemplazo a una citosina y una citosina reemplazó a una adenina, respectivamente. La secuencia del aislado CIDEFI 329 contiene en el sitio 965 una transición de una guanina por una adenina y tres transversiones en los sitios 970, 971 y 974 en los que la T reemplazó a una G, la A a la

T y la C a la G, respectivamente. Mientras que la transición resultó en una modificación sinónima, las transversiones provocaron cambios no sinónimos, en donde un ácido aspártico fue reemplazado por una asparagina (D62N). Además, en la misma secuencia del aislado CIDEFI 318 se encontró una inserción de una guanina en el sitio 1022 (1022-1023*insG*) y dos más de una Adenina y una Guanina (979-980*insA* y 1004-1005*insG*) en la secuencia del gen del aislado CIDEFI 329, que causaron un cambio del marco de lectura después del aminoácido 64 de la secuencia de la proteína. Mientras que los aislados estudiados y descritos por Medina, et al., (2015) presentaron ocho SNP y una inserción y delección (*indel* (inserción/delección) después del codón de finalización de codificación, los nuevos aislados descritos en este trabajo contuvieron dieciocho *indels* y cincuenta y siete SNPs en la misma región.

El análisis de la secuencia parcial del gen *Ecp2* de 811 pb correspondiente a los aislados de la colección CIDEFI, se comparó con la única secuencia disponible del gen que tiene un largo total de 1628 pb (NCBI número de acceso: Z14024). Se encontraron un total de veintiséis polimorfismos. Veinte de estos se encontraron en regiones no codificantes y del total solo tres se identificaron en secuencias pertenecientes a los nuevos aislados incluidos en este trabajo. Por otro lado, también se encontraron delecciones en la secuencia no codificante tanto de los aislados ya descritos por Medina et al., (2018) como los nuevos aislados de *F. fulva* tales delecciones que corresponden a las bases ubicadas en las posiciones que se consignan (23~~deT~~; 24~~deIG~~; 25~~deIA~~; 25~~deIC~~; 26~~deIA~~; 31_33~~deITAC~~; 75~~deIG~~; 75~~deIG~~, 78~~deIA~~). Además, se encontraron inserciones, dos de ellas en la secuencia que codifica la proteína en las cepas CIDEFI 300 y CIDEFI 301, respectivamente, en las posiciones 664_665*insA* y 681_690*insG*). El análisis predijo un cambio en el marco de lectura (>130 y >137). CIDEFI 326 fue el aislado que presentó las secuencias con la mayor cantidad de

cambios en el fragmento de ADN que codifica la proteína. Tuvo dos SNP que condujeron a mutaciones sinónimas, una en la secuencia de péptidos señal en la base 258 de la secuencia una Timina reemplazó a una citosina (258T>C) y dentro de la secuencia del *exón-1* en la posición 306, una Citosina reemplazó a una Adenina. Además, el *exón-1* presentó dos SNP como resultado de una transversión de nucleótidos que provocaron cambios no sinónimos en la posición 410 de la secuencia donde una Guanina reemplazó a una Timina y en la posición 415 una Timina reemplazó a una guanina. De esta manera la Arginina fue sustituida (410G>T y 415T>G), por Isoleucina (R64I) y la Serina por Alanina (S66A).

Dentro de la secuencia parcial de 483 pb del gen *Ecp4* se detectaron dieciséis polimorfismos en relación al fragmento de ADN de 508 pb de un aislado europeo (EF104526). Excepto por la secuencia del aislado CIDEFI 318, se detectó una transversión dentro de esta secuencia, (373G>T), que dio lugar a un cambio no sinónimo, donde la Cisteína fue reemplazada por Triptófano (C108W). El Aislamiento CIDEFI 326 presentó tres inserciones de nucleótidos individuales (388-389*insA*, 401-402*insA* y 417-418*insT*), que condujeron a un cambio no sinónimo, donde la primer inserción generó que una Glicina se reemplazara por Valina (G109V) y las siguientes inserciones generaron un cambio del marco de lectura (>113).

La secuencia de 883 pb de *Ecp5* de los aislados argentinos presentó diecisiete polimorfismos distribuidos un 36% en la fragmento no codificante y el 64% en la secuencia de la proteína, siempre tomando como eje de la comparación la secuencia de 883 pb del mismo gen del aislado europeo (EF104527). Las secuencias *Ecp5* de CIDEFI 300 y CIDEFI 301 presentaron cambio de codones en la posición 65 de la secuencia un SNP que generó un cambio donde la Adenina fue reemplazada por la Timina (65A>T), el codón resultante TAG es un codón de stop prematuro (>21), como

se muestra en la Figura II. 11, lo que podría conducir a una proteína truncada. Los aislados CIDEFI 322, CIDEFI 323, CIDEFI 327 y CIDEFI 329 presentaron en la región codificante de la proteína una delección en la posición 516, una guanina fue eliminada (516delG), lo que derivó en un cambio en el marco de lectura. Los aislados CIDEFI 318, CIDEFI 325, CIDEFI 330 y CIDEFI 332 presentaron en la secuencia de la proteína una transición en la posición 641 en la que una Guanina reemplazó a una Adenina (541G>A) mutación no sinónima en la que una Cisteína fue reemplazada por una Tirosina (C48Y). En la misma región de la secuencia el aislado CIDEFI 307 presentó una inserción de una guanina en la posición 691 que provocó un cambio en el marco de lectura que generó un stop prematuro de la proteína. Además, en los aislados CIDEFI 305 (866delA), CIDEFI 332 (863delA y 866delA) y CIDEFI 327 (866delA) se detectaron eliminaciones de Adenina después del codón de stop, respectivamente. Por último, CIDEFI 326 presentó una delección de un fragmento de la secuencia de 358 pb (Figura II. 12), correspondiente al *intron* terminal de 3' y al inicio de 5' del exón-2 del gen *Ecp5* (213-572del). Basándose en el análisis de diversidad de nucleótidos, el gen *ecp1* fue el efector extracelular donde más se produjeron los cambios dentro de las secuencias analizadas y también presentó los sitios que más segregan (Tabla II. 8). Curiosamente, mediante el análisis de la relación Ka/Ks, parece que *Ecp1* y *Ecp2* están bajo una presión negativa para que la secuencia de proteínas se conserve mientras que *Ecp4* y *Ecp5* están bajo presión positiva (Tabla II. 8).

Tabla II.8 Índices calculados de diversidad molecular basados en la variación de secuencia en los genes efectores *ecp* de *F. fulva*.

Genes	Na	Parametros nucleotídicos de diversidad			
		Diversidad nucleotídica	π	θS	(ω)
<i>Ecp1</i>	14	0.018247 (0.009580)	247.250	294.405	0.7045
<i>Ecp2</i>	14	0.006648 (0.003827)	53.850	440.233	0.3414

<i>Ecp4</i>	14	0.001171 (0.001131)	0.5710	0.31445	21,952
<i>Ecp5</i>	13	0.002178 (0.001486)	19.230	0.64449	23,095

Na: Número de aislados utilizados para el análisis. π : Diversidad de nucleótidos basada en el número medio de diferencias de nucleótidos entre dos secuencias aleatorias estimadas para toda la longitud de las secuencias analizadas sólo para sustituciones no sinónimos y sinónimos. θ_s : La estadística del número de sitios segregadores, estimada para toda la longitud de las secuencias analizadas, para la sustitución no sinónimo y sinónimo. $(\omega) = K_a/K_s =$ relación entre las tasas de sustitución de nucleótidos no sinónimos (K_a) y sinónimos (K_s). es un indicador de las presiones selectivas sobre los genes

```

      1      10      20      30      40      50
EF104527 MNTFTLLLAT LPLLAYGRGD NKPQGFNYIC EDIPCEEGV DSWILQACIG ...
CIDEFI 300 MNTFTLLLAT LPLLAYGRGD N
CIDEFI 301 MNTFTLLLAT LPLLAYGRGD N

```

Figura II. 11. Alineación de la secuencia aminoacídica pronosticada del gen *Ecp5* de la cepa CIDEFI 300 y CIDEFI 301 con la secuencia disponible EF104527 correspondiente a la secuencia aminoacídica de *Ecp5* (115 aa) utilizada como referencia en este estudio.

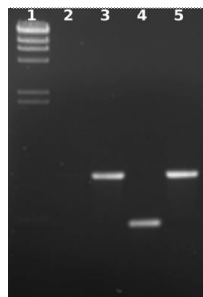


Figura II. 12. Gel de agarosa (1 % p/v) del producto de amplificación del gen *Ecp5* (882 pb). Línea 1: marcador de peso molecular. Línea 2: control negativo. Línea 3: Producto amplificado a partir de la cepa CIDEFI 305. Línea 4: Producto amplificado a partir de la cepa CIDEFI 326. Línea 5. Producto amplificado a partir de la cepa CIDEFI 322.

II.3.6 Cambios en la estructura de las proteínas

Las mutaciones no sinónimas, incluidos los *indels* y las grandes deleciones, pueden alterar los motivos de las proteínas y probablemente con ello su actividad biológica. La Figura II.13 muestra los motivos proteicos que surgen del análisis de las

secuencias con softwares específicos y los cambios que pueden sufrir como resultado de los polimorfismos, la proteína *Avr4E* es afectada por los cambios de nucleótidos. Todos los aislados de Argentina presentaron, mutaciones no sinónimas, donde una fenilalanina fue remplazada por leucina (F82L), y adicionalmente la Metionina lo fue por Treonina (M93T). Los motivos proteicos generados con los algoritmos sugieren que los cambios podrían provocar un reemplazo de una hélice alfa por una hebra beta, como se muestra en la Figura II.13.

En la proteína *Ecp1*, la inserción de nucleótidos encontrada en la secuencia de *Ecp1* de CIDEFI 318 provocó cambios del marco de lectura que cambiarían el motivo proteico generado con los algoritmos utilizados (82**, Figura II. 13). Además, las transversiones dieron lugar a modificaciones no sinónimas de la secuencia de nucleótidos del aislado CIDEFI 329 (D62N), además de dos inserciones que generaron cambios del marco de lectura conllevando al cambio del motivo proteico pronosticado (64**, Figura II. 13).

En cuanto a la proteína *Ecp2*, las dos inserciones encontradas en la secuencia que codifica la proteína en el aislado CIDEFI 300 y CIDEFI 301 podrían provocar un cambio del marco de lectura (>130 y >137) y, por lo tanto, un cambio en el motivo C-terminal (Figura II. 13). Los polimorfismos de nucleótido simple encontrados en la secuencia *Ecp2* de CIDEFI 326 que dieron lugar a cambios no sinónimos podrían introducir una hélice alfa (Figura II. 10).



Figura II. 13. Motivos de proteína a partir de la secuencia de los genes de avirulencia (*Avr*) y de proteína extracelular (*Ecp*). Los motivos de hélice alfa se muestran en rosa; las hebras beta se muestran en amarillo; las bobinas se muestran en azul y los giros se muestran en gris. Los cambios no sinónimos se redactan en rojo. El cambio de marco de lectura se muestra con doble asterisco. *Avr4e*_CIDEFI se refiere a toda la colección CIDEFI para el gen *Avr4e*. *Ecp5* CIDEFI 318 se refiere a CIDEFI 318, CIDEFI 325, CIDEFI 330 y CIDEFI 332 para el gen *ecp5*. *Ecp5* CIDEFI 322 se refiere a CIDEFI 322, CIDEFI 323, CIDEFI 327 y CIDEFI 329 del gen *ecp5*. AY546101, Z14023, Z14024, EF104526, EF104527 son secuencias de referencia europeas incluidas en el análisis.

Es de destacar que todos los aislados argentinos, excepto CIDEFI 318, contuvieron en su genoma un cambio no sinónimo en la secuencia que codifica la

proteína Ecp4 (C108W, Figura II. 13). Además de esto, el aislado CIDEFI 326 podría tener un cambio relevante en el motivo C terminal de la proteína, como resultado de tres inserciones (388-389*insA*, 401-402*insA* y 417-418*insT*) que provocaron la primera un cambio no sinónimo (G109V) y las siguientes un cambio del marco de lectura (>113).

Una inserción encontrada en la secuencia de la proteína Ecp5 del aislado CIDEFI 307, sugiere que la proteína generada por el algoritmo podría tener un cambio en el marco lectura en la secuencia proteica, así como la introducción de un codón de stop que generaría una proteína truncada (Figura II. 13; >98). Por otro lado, las mutaciones no sinónimas encontradas en la secuencia que codifica la proteína Ecp5 de los aislados CIDEFI 318, CIDEFI 325, CIDEFI 330 y CIDEFI 332 (C48Y) provocan un cambio del marco de lectura de la secuencia proteica (Figura II. 11.). Finalmente, como resultado de deleciones en la secuencia del gen *Ecp5* el algoritmo predijo un cambio del marco de lectura (40**) en los aislados CIDEFI 322, CIDEFI 323, CIDEFI 327 y CIDEFI 329, dando lugar a cambios considerables en los motivos proteicos pronosticados (Figura II. 13, donde sólo mostró CIDEFI 322).

II.4. Discusión:

Los aislados de *Fulvia fulva* (*syn Cladosporium fulvum*) recolectados y aislados a partir de cultivos de tomate de las zonas de producción en Argentina pertenecen a las razas 0 y 2 (Medina, et al., 2015). En este trabajo encontramos que los nuevos aislados descritos también pertenecen a estas dos razas que además albergan una considerable diversidad genética, que no estuvo relacionada ni con el cultivar de

tomate ni con el área de recolección. Si analizamos el clúster que agrupa a los aislados CIDEFI 307, CIDEFI 329, CIDEFI 300, CIDEFI 320, CIDEFI 322, vemos que se congregan bajo un índice de similitud de 0,975. Todos son definidos como raza 2 y no hay una relación clara entre cultivar y zona del cual provienen, aunque CIDEFI 307 y CIDEFI 320 provienen de la misma localidad (Corrientes) y CIDEFI 307 y CIDEFI 300 del mismo cultivar (Elpida). La identificación de razas de un patógeno es fundamental para desarrollar una estrategia para el manejo de la patología mediante genes de resistencia. La identificación de las razas de *F. fulva* se puede hacer inoculando aislados en un conjunto de cultivares diferenciales de tomate cv *Money Maker* que llevan los genes de resistencia conocidos como *Cf* (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9*; Rollán et al. 2013). Sin embargo, recientemente Medina, et al., (2015) desarrollaron un método para identificar a través de la amplificación múltiple de secuencia génica las razas de *F. fulva*. Los amplicones que se generan con la mencionada reacción multiplex se pueden secuenciar y de esta manera es posible detectar mutaciones que transforman a las proteínas *avr* tornando así a estas proteínas en no visibles para las proteínas codificadas por los genes de resistencia *Cf*. La población argentina de *F. fulva* muestreada está compuesta por cepas que pertenecen a la raza 0 o a la raza 2 (Medina, et al., 2015; Lucentini et al., 2021), lo que sugiere que en Argentina los híbridos comerciales de tomate mas utilizados en la producción, no disponen de los genes de resistencia *Cf-4*, *Cf-5*, y *Cf-9*.

A pesar de que muchos polimorfismos se encontraron dentro de las secuencias parciales de genes *Avr*, el gen *Avr4E* fue el único que presentó una variación no-sinónimo dentro de la secuencia proteica, que se encontró además en todos los aislados de Argentina, sugiriendo que la cepa parental probablemente ya contenía esta mutación y que los cambios genéticos adicionales que se produjeron en las cepas de la

colección CIDEFI ocurrieron luego. Dos mutaciones puntuales condujeron a 2 sustituciones de residuos aminoacídica en la proteína Avr4E, tales cambios ya se han reportado en aislados del hongo provenientes de otros países (Westerink, et al., 2004; lida, et al., 2015). Westerink, et al., (2004) encontró que la sustitución de fenilalanina por leucina dentro de la proteína Avr4E fue suficiente para que el *avr* no fuese reconocido por *Cf-4E*. Además, lida, et al., (2015) demostró que en los aislados japoneses ocurrieron dos sustituciones en la proteína Avr4E, la primera fue similar al cambio no sinónimo encontrado en los aislados de Argentina incluidos en esta tesis, mientras que en la otra sustitución una Metionina fue reemplazada por un aminoácido aromático, Tirosina. En los aislados analizados en este trabajo, la Metionina fue reemplazada en cambio por Treonina. Esta sustitución en la secuencia de la proteína Avr4E, donde un aminoácido hidrófobo (Metionina) fue reemplazado por uno hidrófilo (Treonina) es posible que modifique la función del péptido, sugiriendo que el sitio probablemente está bajo selección positiva (Stergiopoulos, et al., 2014).

Los genes *Ecp* codifican proteínas que han sido consideradas factores de virulencia, aunque aún se encuentra en estudio el rol que cumplen estas proteínas (Stergiopoulos, et al., 2010). Sin embargo, estas juegan un papel esencial ya que su eliminación resulta en mutantes de *F. Fulva* menos virulentos (De Wit, et al., 2009; De Wit, et al., 2012; Iakovidis, et al., 2019). Stergiopoulos, et al., (2007), destacó que la frecuencia de pérdida de estos genes en las poblaciones del patógeno es baja, por lo cual la presencia de ellos en las poblaciones argentinas del hongo no sorprende. El papel biológico de una de estas proteínas la Ecp6 ha sido descrito, la proteína codifica tres dominios de lisina que altera la inmunidad desencadenada por la quitina (Bolton, et al., 2008; de Jonge, et al., 2010; Sánchez, et al., 2013). Mesarich, et al., (2017) predijo que Ecp1 y Ecp5 serían proteínas ricas en residuos de Cisteínas y que estos residuos

formarían enlaces disulfuro intramoleculares, que contribuyen a la estabilidad de la proteína en el apoplasto de la hoja y con esto a la actividad de esta proteína sobre las proteasas que se encuentran en este espacio. En cuanto a la función de las otras proteínas Ecp, los mutantes fúngicos en donde *Ecp1* o *Ecp2* no se expresan, se afectó la virulencia del hongo (Laugé, et al., 1997). Sobre esta base, se puede inferir que CIDEFI 318 y CIDEFI 329 podrían ser menos virulentas debido a los cambios observados en la secuencia de la proteína Ecp1. Además, el cambio de Aspartato por Asparagina en la secuencia de la proteína del aislado CIDEFI 329 que generó el algoritmo utilizado sugiere que el reemplazo de un aminoácido electrofílico por uno hidrófilo alteraría la función del péptido.

Stergiopoulos, et al., (2014) también encontró polimorfismos en el gen *Ecp2* de *Mycosphaerella fijiensis*, ellos encontraron un cambio en la posición 66, donde la Alanina fue sustitutiva por histidina o Glicina. En este estudio encontramos que una Serina, aminoácido hidrófilo, fue reemplazado en esta posición por Alanina, que es un aminoácido hidrófobo, lo que podría afectar el plegado de la proteína y probablemente su actividad. Los cambios descritos podrían provocar cambios en la virulencia de CIDEFI 300 y CIDEFI 301, ya que podría verse afectada debido al cambio en el motivo C- terminal de *Ecp2*. En base a lo expuesto es clave evaluar la virulencia de los aislados descritos pero además sería importante realizar mutaciones dirigidas con el fin de evaluar el impacto de esos cambios en la virulencia del agente etiológico.

En cuanto a la proteína Ecp4, Mesarich, et al., (2017) encontraron que los residuos de Cisteína son en su mayoría conservados. Curiosamente, en los aislados argentinos un residuo de Cisteína en la posición 108 fue reemplazado por Triptófano, un cambio que podría afectar su agresividad. Además, la proteína Ecp4 del aislado CIDEFI 326 es probable que no tenga actividad biológica como resultado de la falta del

codón de stop, en consecuencia, la aptitud del aislado para interactuar con el tomate, podría haber sido negativamente afectada.

La proteína extracelular Ecp5, tiene 6 residuos de cisteína y se reportó que esta proteína es uno de los efectores de *F. fulva* menos polimórficos (Stergiopoulos, et al., 2007; De Wit, et al., 2009). Iakovidis, et al., (2019) encontró que las proteínas ECP inducen la segregación de HR como un rasgo monogénico, mapeando así loci en el genoma del tomate. Así identificaron al menos tres loci dentro de los cromosomas del tomate que podrían albergar genes distintos de *Cf-Ecp5*. Sobre la base del análisis de la secuencia de nucleótidos y estudios predictivos de aminoácidos, podemos inferir que el cambio de Cisteína por Tirosina, así como el codón de stop prematuro que genera una proteína Ecp5 truncada y el cambio de marco de lectura que cambia el motivo N-terminal o C-terminal es probable tenga un efecto negativo sobre la capacidad de *F. fulva*, para infectar y colonizar el espacio apoplástico.

Por último, la gran cantidad de cambios a nivel genético como resultado de los polimórficos únicos simples e indels identificados en las secuencias no codificantes de los genes que codifican las proteínas Ecps podrían estar asociados a que generan hongos con ventajas adaptativas en los ambientes de los que se recolectaron.

II.5. Conclusión

Los cultivares de tomate argentinos se ven afectados por sólo dos razas de *F. fulva* cuyas poblaciones están bajo un proceso evolutivo. Los representantes de estas dos razas presentan varios polimorfismos en los efectores, que no están limitados a los genes avr, probablemente porque, basándose en datos de campo, los cultivares

resistentes no están disponibles. Las variaciones encontradas en las secuencias genéticas de *avr2*, *avr4* y *avr9* dentro de los aislados CIDEFI eran neutras para la patogénesis en el tomate.

Este es el primer informe que muestra polimorfismos dentro de los genes *ecp* y los cambios observados en los aislados argentinos sugieren que podrían no ser factores tan relevantes de la patogénesis. Parece haber diferentes fuerzas evolutivas actuando sobre genes *ecp*, ya que, mientras que *ecp1* y *ecp2* parecían estar bajo una presión negativa para los cambios, lo que sugiere que probablemente podrían desempeñar un papel biológico clave, *ecp4* y *ecp5* están bajo una presión selectiva positiva, reflejada por los cambios de aminoácidos y péptidos predichos no funcionales generados por el cambio de marco y los codons de stop prematuros. Todavía se deben realizar estudios adicionales sobre virulencia y agresividad de los aislados descritos con el fin de evaluar el efecto de los polimorfismos dentro de los genes *ecp*.

Por lo tanto, probablemente el medio ambiente y las prácticas de manejo son los factores más importantes que impulsan la evolución de estas razas en Argentina y esto explica por qué la población de patógenos está evolucionando pero no a nivel patógeno o de raza

CAPITULO III: Pigmentación de *Fulvia fulva*: Identificación de un intermediario clave en la síntesis de melanina-dihidroxinaftaleno.

III.1. Introducción

Fulvia fulva es el agente causal del moho de la hoja de tomate, y al igual que otros hongos producen pigmentos oscuros (Griffiths, et al., 2018). *F. fulva* pertenece a la familia Mycosphaerellaceae, que está filogenéticamente relacionada con los géneros *Stromatoseptoria*, *Hyalocercosporidium* y *Dothistroma* (Videira, et al., 2017). Cuando estos hongos se cultivan *in vitro*, sintetizan pigmentos pero que cambian cuando se altera el medio de cultivo, y pueden ser utilizados en algunos casos como un elemento de diagnóstico y/o proporciona información adicional sobre hongos relacionados filogenéticamente (Saparrat, et al., 2009; Kowalski, et al., 2016). Aguilera, et al., (2017) observaron limitaciones en el uso de la coloración de las colonias de dos especies de *Mycosphaerellaceae* cuando estas se desarrollaron en cultivos agarizados y porque los medios afectaron su capacidad para sintetizar pigmentos, lo que podría relativizar el rol de los pigmentos en elemento la diferenciación e identificación taxonómica.

Se han descritos varios pigmentos y otros cromóforos que tienen los hongos; aunque sus funciones biológicas siguen en discusión (Toledo, et al., 2017). Collemare, et al., (2014) y Griffiths, et al., (2016; 2018) informaron que *F. fulva* sintetiza cladofulvina, principal metabolito secundario de este hongo que se detecta en cultivos *in vitro*. Además, el genoma de estos hongos contiene varios genes ortólogos que codifican enzimas involucradas en la síntesis de otros pigmentos químicamente relacionados a estructuras tipo perilenquinona como elsinocromo y la toxina cercosporina (Griffiths, 2015). El gen *pks1* de *F. fulva*, con mínima expresión en diversas condiciones de cultivo (Griffiths, et al., 2016), fue identificado primero en base a su homología con un clúster de genes relacionado a la síntesis del pigmento elsinocromo de *Elsinoë fawcettii* (Collemare, et al., 2014). El gen *tsf1* codifica un factor

de transcripción específico de la vía de síntesis del elsinocromo (Figura III. 1; Chung et al., 2008; Collemare, et al., 2014;). Para regular y definir claramente el rol que tiene el producto del gen *pks1* en *F. fulva*, se transformó una cepa salvaje con un plásmido portador del gen *TSF1* fusionado con la región promotora del gen *Avr9* que es regulado por nitrógeno (van de Ackerveken, et al., 1992). La variante resultante *OE-TSF1* no mostró ninguna diferencia fenotípica con la cepa salvaje, aunque no resultó patogénico para las plantas de tomate (Griffiths, et al., 2018). El pigmento que se acumula en la pared celular del hongo, podría ser reconocido por las células vegetales, lo que conduciría a la activación de las defensas vegetales y/o resistencia (Griffiths, et al., 2018). Esta activación en la planta podría afectar la virulencia de otros patógenos vegetales independientemente de si el pigmento es o no un factor de patogenicidad.

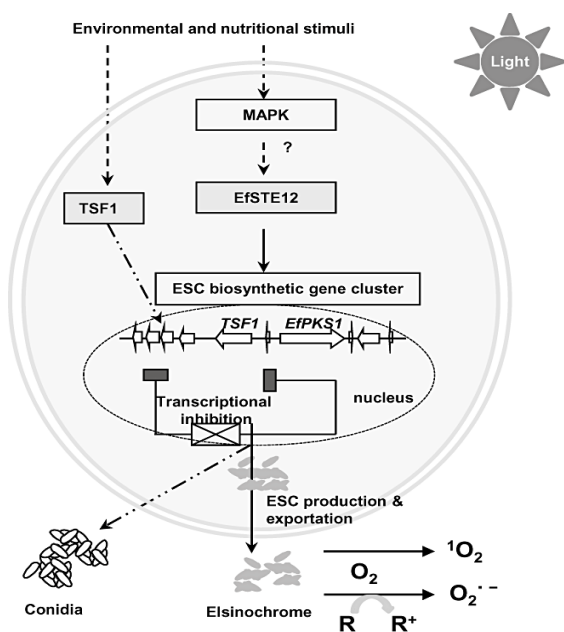


Figura III 1. Vías propuestas que implican dos activadores transcripcionales, *tsf1* y *EfSTE12*, que conducen a la producción de elsinocromo (ESC) y conidios en *Elsinoë fawcettii*. En la exposición a la luz, ESC asume un estado de triplete activado que reacciona con el oxígeno para producir superóxido (O_2^-) a través de un sustrato reductor (R) u oxígeno singlete (1O_2) a través de una reacción de relay de energía. Una cruz indica un efecto inhibitorio para la biosíntesis ESC, presumiblemente al bloquear la expresión de *TSF1* y por lo tanto de los genes biosintéticos elsinocromo. Un rectángulo lleno indica la actividad inhibitoria de la expresión de los genes biosintéticos ESC. *TSF1* también se requiere para la conidiación. La regulación de la

biosíntesis ESC por EfSTE12 pasa por alto TSF1 y es probablemente controlado por una proteína quinasa activada (MAPK) mediada vía de señalización. Fuente: Chung et al, (2008).

Fulvia fulva al igual que otros géneros de la familia de Mycosphaerellaceae como *Pseudocercospora griseola* y *Stromatoseptoria castaneicola*, cuando se cultiva *in vitro*, diferencian un micelio oscuro debido a la presencia de pigmentos oscuros (Videira, et al., 2017; Bárcena, et al., 2018). Sin embargo, *Hyalocercosporidium desmodii* y *Dothistroma spp.*, que están filogenéticamente relacionados con *F. fulva*, se caracterizan por tener un micelio de coloración pardo claro y conidios hialinos (Videira, et al., 2017). Collemare, et al., (2014) no asignaron en el genoma disponible de *F. fulva* ningún gen que corresponda a un clado relativo a la síntesis de melaninas 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), lo que sugirió que la pigmentación oscura de este hongo probablemente estaba asociada a melaninas derivadas de la tirosina de la vía DOPA (Langfelder et al., 2003). Puesto que Chiang et al., (2011) identificó una policétido sintasa 1 (*pks1*) involucrada en la síntesis de melanina-DHN en *Aspergillus niger*, que también es responsable de la biosíntesis de varios nafto- α -pirones, en este capítulo se analizará si el gen *pks1* en *F. fulva* está también relacionado a la síntesis de elsinocromo y/o melanina-DHN. Este gen codifica una enzima formada por varios dominios como se muestra en la figura III.2, y que presenta en comparación con otras PKSs una región conservada, la región KS, ceto-sintasa, cuya secuencia se ha utilizado con frecuencia en análisis filogenéticos (Medina, et al., 2018).

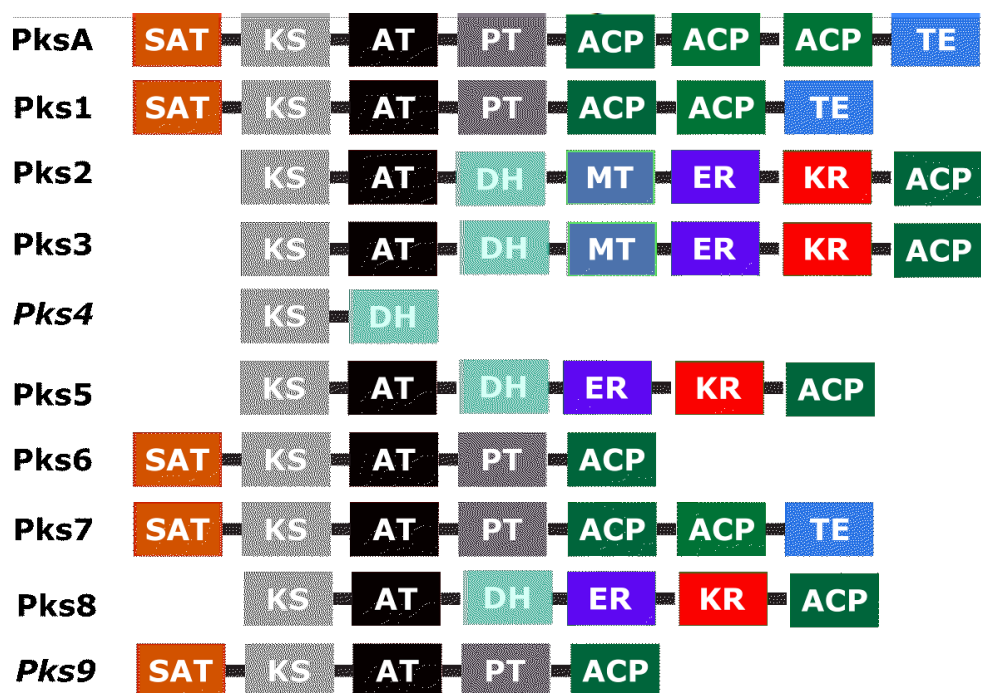


Figura III.2: Organización de los dominios de las enzimas PKS de *F. fulva*; SAT: unidad de arranque (*starter unit*); ACP transcilasas; KS: *ceto-sintasa*; AT: *acetil transferasa*; PT: producto templat; ACP: proteína carrier acetila; TE: thiolesterasa; DH: deshidratasa; ER: enonil reductasa; KR: seto-reductasa; MT: C- o N Metil transferasa; en cursiva de anotaron las proteínas predichas no funcionales.

Los pigmentos oscuros conocidos como melaninas son polímeros complejos compuestos de estructuras alifáticas y aromáticas de tipo fenol o indol, sintetizadas por una amplia gama de organismos (Toledo, et al., 2017). En los hongos, se han relacionado con diferentes procesos fisiológicos como la morfogénesis, la patogénesis y/o las estrategias de supervivencia (Bell & Wheeler, 1986; Elliott, 1995; Henson, et al., 1999; Nosanchuk & Casadevall, 2003; Cordero & Casadevall, 2017). Debido a su insolubilidad en agua y solventes orgánicos, así como su carácter amorfo (no susceptibles a estudios cristalográficos), las melaninas solo se pueden caracterizar utilizando algunas metodologías específicas de estudio. Entre éstas se pueden mencionar aquellas que implican su previa solubilización en álcalis fuertes a alta temperatura, seguido del análisis de las radiaciones electromagnéticas que emite, y a través del análisis de la pigmentación de cultivos del organismo en presencia de

inhibidores e inductores de pigmentos específicos, lo que conduce a inferir con cierta certeza la naturaleza química de los mismos y su vía de síntesis (Saparrat, et al., 2009; Fernandes, et al., 2016; Bárcena, et al 2018).

El papel de la melanina dentro de los patógenos todavía no está claro, en particular no se conoce en detalle el proceso de melanización en *F. fulva* (Collemare, et al., 2014; Griffiths, et al., 2015). Por lo tanto, es importante realizar estudios tendientes a dilucidar la naturaleza de los compuestos responsables de la pigmentación oscura de *F. fulva* y su vía de síntesis.

III.1.1. Hipótesis del capítulo

III.1.1.1. La pigmentación de las estructuras diferenciadas por *F. fulva* se debe a la síntesis de melanina que resultan de la polimerización de policétidos.

III.1.1.2. El genoma de *F. fulva* es fuente de genes *pks* que codifican enzimas claves en la síntesis de metabolitos secundarios, incluida la melanización.

III.1.2. Objetivos del capítulo

III.1.2.1. Objetivo general:

Conocer la naturaleza química de los pigmentos oscuros sintetizados por *F. fulva*.

III.1.2.2 Objetivos específicos:

III.1.2.2.1 Conocer el efecto de los agentes químicos que modulan la síntesis de melaninas en el crecimiento y la pigmentación de un aislado representativo de la raza 2 de *F. fulva* en cultivo agarizado.

III.1.2.2.2 Disponer de la caracterización de los pigmentos oscuros sintetizados por un aislado de la raza 2 de *F. fulva* en relación a su interacción con la radiación UV-visible y su comparación con una melanina DOPA de referencia.

III.1.2.2.3 Conocer cuáles son las secuencias del dominio KS de una enzima PKS involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios en *F. fulva* y relacionarlas con las secuencias de otros hongos.

III.2. Materiales y métodos

III.2.1. Material Biológico

Un cultivo monospórico de la raza 2 de *F. fulva* se obtuvo a partir de un fragmento de hoja de tomate con sintomatología típica del moho de hoja de tomate (Medina, et al., 2015). Este aislado fúngico (CIDEFI 300) se encuentra depositado en la Colección de Cultivos del Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. El hongo fue cultivado en un medio de agar dextrosa de papa (APG) y los cultivos se almacenaron a 4°C.

III. 2.2. Extracción de los pigmentos oscuros

Los pigmentos del hongo se extrajeron de un cultivo desarrollado en APG a 25 °C durante 21 días (Gadd, 1982). La masa del micelio fue recogida con una anza, lavada con agua caliente, y luego se secó en un horno a 80 °C hasta peso constante. La biomasa se congeló en nitrógeno líquido y se molió en un mortero. El polvo obtenido se almacenó a 25 °C. Los pigmentos se extrajeron a partir de alícuotas de 100 mg de biomasa fúngica seca, que se suspendieron en 5 ml de 1 M NaOH, que se trató en autoclave a 121°C y una atmosfera de presión durante 20 min (Saparrat, et al., 2009). La mezcla autoclavada se centrifugó a 5.000 x g durante 10 min, el sobrenadante se recogió y se ajustó el pH a 2 añadiendo HCl 3M, según sea necesario. Con el fin de precipitar la melanina, la mezcla obtenida fue incubada durante toda la noche a 4 °C. Los pigmentos oscuros (sólidos) se recuperaron centrifugando a 5.000 x g durante 10

min, luego se lavó con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado fue neutro. Luego, el particulado obtenido se secó en un horno a 40 °C durante la noche y se purificó realizando una hidrólisis ácida usando HCl 6 M a 100 °C durante 2 h para eliminar carbohidratos y proteínas siguiendo a Beltrán-García et al., (2014). Los residuos no hidrolizables se recuperaron por centrifugación a 5.000 x g durante 10 min, y luego los lípidos se eliminaron realizando tratados sucesivos con etanol y cloroformo. El residuo obtenido se secó a temperatura ambiente (25°C).

III.2.3. Análisis espectroscópico

Los pigmentos oscuros purificados de *F. fulva* CIDEFI 300, se disolvieron en 1 M NaOH y se procedió a analizar el comportamiento fotoquímico de la solución, el control fue una solución alcalina de una melanina comercial (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA). Ambas soluciones se filtraron con una membrana de tamaño de poro de 0,45 µm y luego se determinaron los espectros de absorción UV-Vis entre 200 y 800 nm en celdas de cuarzo con longitud de trayectoria óptica de 1,0 cm, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1800 a temperatura ambiente. También se analizaron las matrices de excitación/emisión de fluorescencia (MEEF) de ambas soluciones equilibradas con aire utilizando celdas de cuarzo y un espectrofluorómetro *Near-IR Fluorolog-3 Research Spectrofluorometer*. Cada solución fue irradiada con una fuente de xenón de 450 W a través de un monocromador de excitación (FL-1004). Después de pasar por un monocromador de emisión (iHR320), la fluorescencia se registró a los 90°C del haz incidente utilizando un detector R928P a temperatura ambiente. Las MEEF se generaron por recolección de los espectros de emisión de fluorescencia entre 260 y 650 nm generados por la excitación de las soluciones entre 240 y 580 nm (cada

5 nm) y se graficaron usando el software Sigma Plot (Medina, et al., 2018).

III.2.4. Análisis del efecto de diferentes agentes químicos que modulan la síntesis de melaninas en el crecimiento y la pigmentación.

La ruta metabólica de la síntesis de pigmentos oscuros en el hongo se infirió cultivando el hongo en presencia de inhibidores, inductores y otros compuestos que alteran pasos claves de la melanización en los hongos (Tabla III.1). En este sentido, se suplementó a un medio de cultivo agarizado basal (APG, control) uno de los tres inhibidores reportados de la melanización (tricyclazol, sulcotriona, o ácido kójico), sobre el cuál se inoculó la cepa CIDEFI 300. Específicamente, se utilizaron 50 y 100 ppm de tricyclazol (5-metil-1,2,4-triazolo[3,4-b]-benzotizol, Scientific Analytical Solutions, Estados Unidos, en solución de etanol) para evaluar la posible inhibición de la síntesis de melanina de tipo 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), 100 ppm de sulcotriona (Riedel-de Ha-en, Seelze, Alemania, disuelta en agua) para indagar si hay posible inhibición en la síntesis de piomelanina, y 100 ppm de ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona, Parafarm, Argentina, disuelto en agua) como inhibidor de la síntesis DOPA-melanina. También se analizó el efecto de la adición de inductores de melanina con compuestos como L-tirosina y L-DOPA, que se añadieron al APG a 10 mM y 1 mM, respectivamente. Además, se evaluaron las combinaciones de L-tirosina (10 mM) con ácido kójico (100 ppm) o L-tirosina (10 mM) con sulcotriona (100 ppm; tabla III. 1). Las placas se inocularon con una suspensión conidial del aislado CIDEFI 300, siendo incubadas en la oscuridad a 25 °C durante 21 días, momento en el que se analizó la pigmentación de la colonia diferenciada (fenotipo) y del medio extracelular asociado. Se realizaron tres placas de réplica por tratamiento, incluidas las placas de control libres

de inhibidores y/o inductores.

Tabla III.1 Agentes químicos usados y su mecanismo de acción en la melanización.

Tratamiento químico	Mecanismo de acción
Control (APG)	-
+ Ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona)	Inhibidor de tirosinasas involucradas en la síntesis de la melanina DOPA mediante el secuestro del cobre de estas enzimas.
+ Tricyclazole (5-metil-1,2,4-triazol (3,4) benzotiazol)	Inhibidor de reductasas involucradas en la síntesis de melanina DHN.
+ Sulcotriona (2-(2-cloro-4-metilbenzil)-ciclohexano-1,3-diona)	Inhibidor de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasas. Síntesis de piomelaninas.
+ Dopa (dihidroxifenilalanina)	Inductor de melanización
+ L-Tirosina	Inductor de melanización.
+ Ácido kójico + L-Tirosina	?
+ Sulcotriona + L-Tirosina	?

III.2.5. Extracción e identificación de los intermedios de la vía de melanina por UV-MALDI MS

Los metabolitos de cultivos del aislado CIDEFI 300 en APG control y suplementado con 50 ppm de tricyclazol después de 21 días de incubación fueron extraídos con etil-acetato siguiendo el protocolo de Wheeler y Klich (1995) y las soluciones resultantes se analizaron por espectrometría UV-MALDI MS (*matrix-assisted ultraviolet laser desorption / ionization mass spectrometry*), que se realizó en el espectrómetro de masas TOF/TOF de Bruker Ultraflex Daltonics, tal como se describe

en Bárcena et al. (2015). Como referencia se utilizó una solución etanólica fresca de tricyclazol estándar (50 ppm). Se utilizaron dos matrices MALDI: 2,5- ácido dihidroxibenzoico (ácido gátrico), GA y piridoindole 9H-[3,4b] (norharmame, nHo). Los espectros de masa se adquirieron en un modo iónico positivo lineal y con el dispositivo LIFT en el modo MS/MS. Los espectros se obtuvieron y analizaron con los programas FlexControl y FlexAnalysis, respectivamente.

III.2.6. Identificación de secuencias génicas que codifican el dominio KS de PKSs involucradas en la síntesis de pigmentos oscuros.

III.2.6.1. Amplificación de secuencias nucleotídicas que codifican el dominio KS.

Para identificar secuencias génicas que codifican dominios Ks de PKSs se procedió a realizar reacciones de amplificación con pares de primers homólogos a secuencias de PKS disponibles en la base de datos NCBI. La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador según un programa que consistió en una desnaturalización inicial por 5 min a 94°C seguido de 35 ciclos de una fase desnaturalización a 94°C por 1 min, una fase de ensamble a 55°C por 1 min, y una fase de extensión a 72°C por 2 min, y finalizados los ciclos una extensión final a 72°C por 10 min (Llorente, et al., 2012). La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 15 µl conteniendo: 0,2 mM de dNTPs, 0,15 ng de cada Primer (KS1-F, 5'-GAYCCIMGITYTTYAAYATG-3'; KS1-R, 5'-GTICCGTICCRTGCATYTC-3'), 1 U de DNA polimerasa (0,15 µl) (Taq, Highway), 2,5 mM de cloruro de magnesio y 40 ng/µl de ADN genómico del aislado CIDEFI300 como molde.

El producto de la PCR se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa al

1 % (w v⁻¹) con un 10 % de bromuro de etidio (v v⁻¹). Se utilizó un marcador molecular de ADN de 100 a 1.000 pb (Inbio Highway) para estimar el tamaño de los amplicones. Este fue purificado como lo describió Sambrook, et al., (1989), se precipitó y se secuenció en MACROGEN Inc. (Seoul, South Korea). La secuencia de dominio KS se depositó en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) con un número de acceso de GenBank (Número de acceso: MK144330).

III.2.6.2. Análisis filogenético de los dominios KS

El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el software MEGA7 (Kumar, et al., 2016). El análisis incluyó secuencias de aminoácidos para dominios KS de proteínas PKS de 24 hongos pertenecientes al phylum Ascomycota (Tabla III. 2), incluyendo el dominio KS de PKS1 de *F. fulva* CIDEFI 300. Las secuencias se alinearon utilizando los parámetros predeterminados del algoritmo ClustalW (Thompson, et al., 1994). La alineación se comprobó visualmente y se optimizó manualmente. El análisis filogenético se realizó bajo criterios de máxima probabilidad (Jones, et al., 1992). La estabilidad de los agrupamientos (clados) se evaluó sobre la base de 1000 réplicas de arranque.

Tabla III 2. Nombres de taxa fúngicas, números de acceso y referencias para secuencias de los dominios KS utilizadas en el análisis filogenético.

Organismos	Número de Acceso	Referencia
<i>Aspergillus flavus</i>	AAS90093.1	Ehrlich, et al., 2004
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AAC39471.1	Tsai, et al., 1998
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_746435.1	Nierman, et al., 2005
<i>Aspergillus nidulans</i>	AAC49191.1	Brown, et al., 1996
<i>Aspergillus nidulans</i>	CAA46695.2	Mayorga & Timberlake, 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_657754.1	Galagan, et al., 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001217072.1	No publicado.
<i>Cercospora nicotianae</i>	AAT69682.1	Chung, et al., 2003
<i>Cladosporium</i>	JN205332.1	Llorente, et al., 2012

<i>cladosporioides</i>		
<i>Colletotrichum lagenaria</i>	BAA18956.1	Takano, et al., 1995
<i>Elsinoe fawcettii</i>	ABU63483.1	Chung & Liao, 2008
<i>Fulvia fulva</i>	MK144330	Medina & Lucentini, et al., 2018
<i>Gibberella zeae</i>	ABB90282.1	Kim, et al., 2005
<i>Gibberella zeae</i>	XP_390640.1	No publicado.
<i>Glarea lozoyensis</i>	AAN59953.1	Zhang, et al., 2003
<i>Hypomyces subiculosus</i>	ACD39762.1	Reeves, et al., 2008
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_003715434.1	Dean, et al., 2005
<i>Monascus purpureus</i>	BAD44749.1	Shimizu, et al., 2005
<i>Nectria haematococca</i>	AAS48892.1	Graziani, et al., 2004
<i>Nodulisporium</i> sp.	AAD38786.1	Fulton, et al., 1999
<i>Podospora anserina</i>	XP_001910795.1	Espagne, et al., 2008
<i>Pseudocercospora griseola</i>	ALF44675.1	No publicado.
<i>Sordaria macrospora</i>	CAM35471.1	Engh, et al., 2007
<i>Wangiella dermatitis</i>	AAD31436.1	Ye, et al., 1999

III.3. Resultados

III.3.1. Análisis espectroscópico

Cultivos de CIDEFI 300 produjeron pigmentos oscuros que fueron solubilizados en pH alcalino a alta temperatura (solución NaOH a 121 °C durante 20 min). Los pigmentos aislados fueron insolubles en 3M HCl, así como en agua, y solventes orgánicos como acetona, cloroformo y etanol. Los pigmentos se decoloraron en presencia de 6 M de H₂O₂. En la figura III. 3 se presentan los espectros UV-vis del pigmento aislado de CIDEFI300 y una melanina comercial. Se encontró que soluciones alcalinas de ambas melaninas poseen un máximo de absorción en 254 nm. La mayor

resolución del espectro corresponde al extracto de CIDEFI300 debido a que la muestra contiene menos impurezas que la melanina comercial Sepia. Los espectros de absorción y emisión de soluciones alcalinas obtenidas de MEEF para longitudes de onda de excitación entre 300 nm y 450 nm del pigmento oscuro de *F. fulva* (a) y melanina comercial (b) se presentan en la Figura III. 4. La principal banda del espectro de emisión pasó de 400 nm a 480 nm a medida que la longitud de onda de excitación aumentó de 300 nm a 450 nm, lo que fue similar para los pigmentos de CIDEFI 300 y la muestra comercial de melanina.

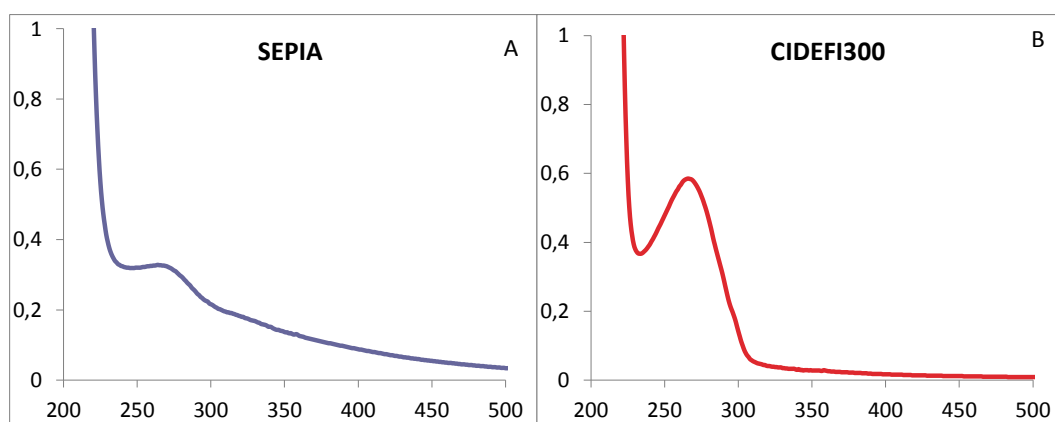


Figura III.3. Espectros de absorción UV-Vis de soluciones alcalinas (1 N de NaOH) A: una melanina comercial (Sepia) y B: los pigmentos oscuros extraídos del aislado CIDEFI 300.

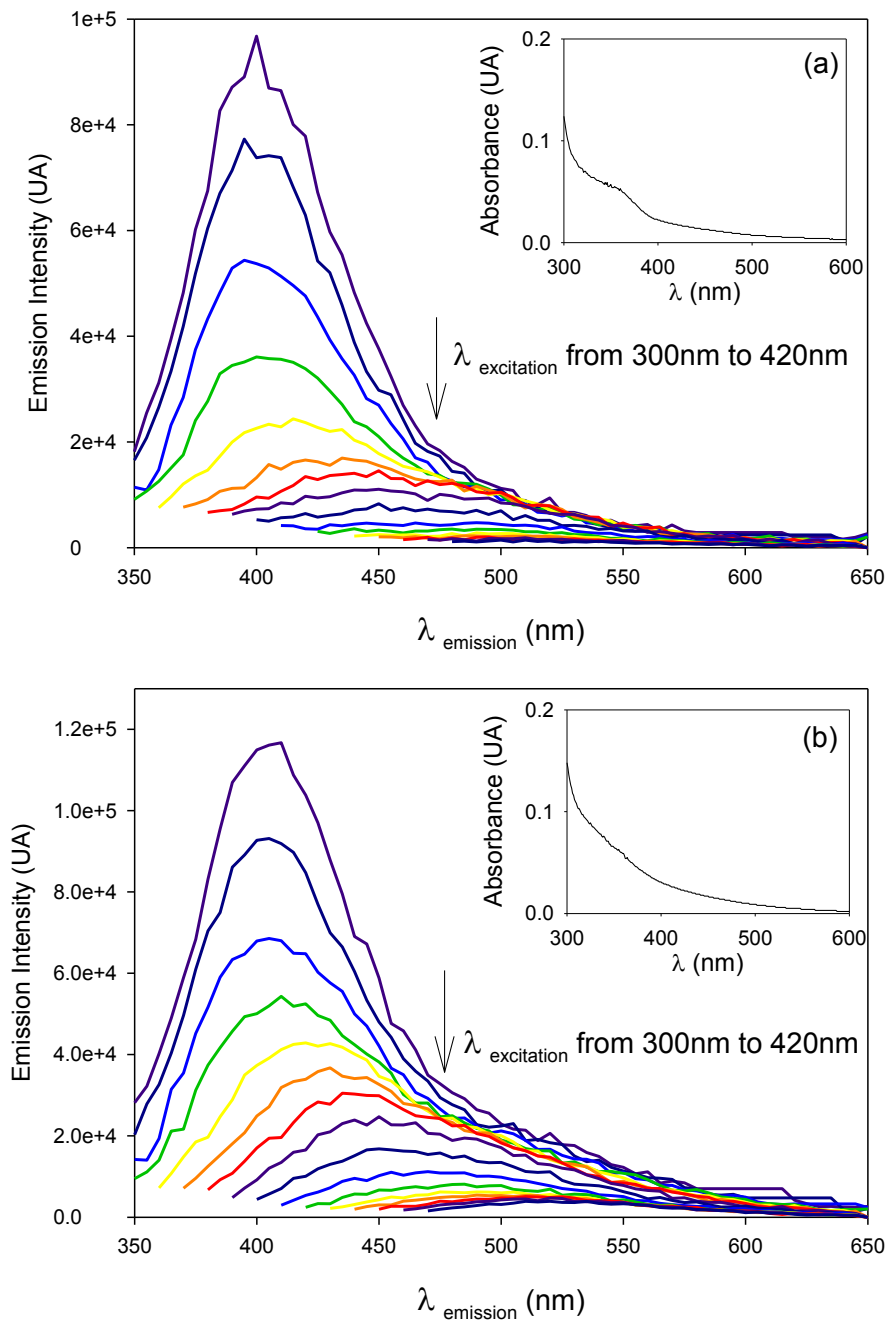


Figura III.3 Espectros de intensidad de emisión de los pigmentos oscuros extraídos del aislado CIDEFI300 (a) y de una melanina comercial (Sepia, b). Inserción: espectros de absorción. Fuente: Medina & Lucentini et al., 2018.

III.3.2. Efecto de diferentes agentes químicos que modulan la síntesis de melaninas en el crecimiento y la pigmentación de la colonia del representante de la raza 2 de *F. fulva*

Aunque la suplementación con tricyclazol a 100 ppm impidió el crecimiento del hongo, ninguno de los otros compuestos probados alteró el crecimiento o pigmentación de la cepa CIDEFI 300 (Tabla III.2). Sólo el tratamiento con 50 ppm de tricyclazol inhibió la síntesis de melanina, ya que las colonias desarrolladas presentaron una coloración marrón distinta y además secretaron al medio, pigmentos de color marrón rojizo (Figura III. 5). Los espectros de masa UVMALDI de extractos de colonias correspondientes a cultivos agarizados de 21 días de *F. fulva* CIDEFI 300 sobre APG (control) y en presencia de 50 ppm de tricyclazol se muestran en la Figura III.6a y b, respectivamente. En presencia de 50 ppm de tricyclazol, se detectó una señal en m/z 1/4 206.27, que se corresponde con la masa molecular de la flaviolína (2, 5,7-trihidroxi-1,4-naftoquinona; masa exacta 206.02), la cual es un producto de oxidación del 1, 3, 6,8- tetrahidroxinaftaleno (1, 3, 6, 8 THN). Curiosamente, los extractos de muestras de cultivos control carecieron de dicha señal (Figura III. 6a). Como era de esperar, además se detectaron en una solución etanoica de 50 ppm de tricyclazol los iones protonitizados (m/z 1/4 190.15), sódicos (m/z 1/4 212.14) y tricyclazol potásico (m/z 1/4 228.21) (Figura III. 6c).

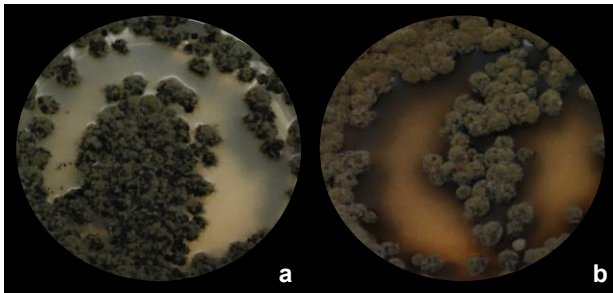


Figura III. 5 Cultivos de cepa *F. fulva* CIDEFI 300 cultivado en APG control (a) y suplementado con 50 ppm de tricyclazol (b) durante un período de 21 días.

Tabla III 2. Crecimiento y pigmentación de las colonias del aislado CIDEFI300 en APG suplementado con diversos inhibidores o inductores de la melanización.

Tratamiento	Crecimiento a los 21 días de la inoculación	Observación
Ácido cójico+tirosina	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.
Tirosina	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.
Tricyclazol	**	No creció con 100 ppm, pero si con 50 ppm cuyo medio se tornó anaranjado. (figura III. 5)
Sulcotriona+tirosina	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.
Sulcotriona	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.
Ácido cójico	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.
L-Dopa	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.
Control	+	Creció y Pigmento verde en superficie negro en el envés.

+ creció **no creció con 100 ppm pero si con 50 ppm además se cambió la pigmentación

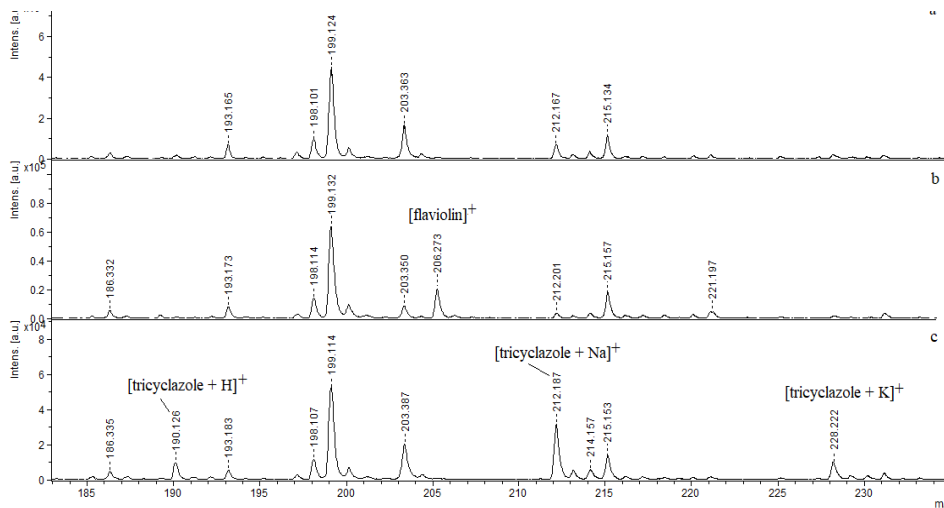


Figura III. 6 Espectros de masa MALDI de iones positivos de extracto de etil-acetato correspondientes a cultivos de 21 días de *F. fulva* CIDEFI 300 cultivados en APG control (a); suplementado con 50 ppm de tricyclazol con asignación máxima para [flaviolín]⁺ (m/z ¼ 206; b); y de una solución etanólica de tricyclazol estándar de 50 ppm con asignación a los picos máxima para [Tricyclazol + H]⁺ (m/z ¼ 190), [Tricyclazol + Na]⁺ (m/z ¼ 212), Y [Tricyclazol + K]⁺ (m/z ¼ 228; c). Matriz: ácido gentísico.

III.3.3. Análisis filogenético

Amplificamos un fragmento de 415 pb correspondiente a una secuencia del gen *ks1*, que contiene la secuencia del dominio KS completa. En la figura III.7 se muestra el segmento secuenciado alineado al *contig* correspondiente del genoma de *F. fulva* tomado de la base de datos *GenBank*. En amarillo se representa parte del dominio KS, dentro de él se determinó qué parte correspondía a Pks1. Encontramos que el dominio KS obtenido de CIDEFI 300 fue 100 % homólogo a la secuencia descrita por De Wit, et al., (2012).

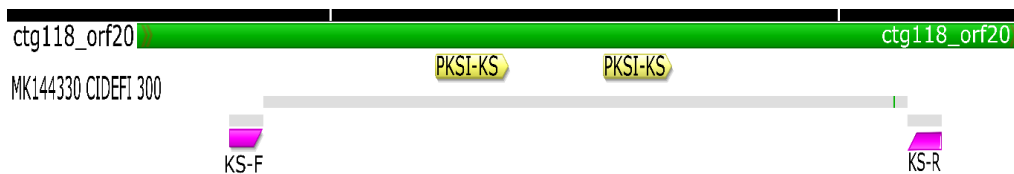


Figura III. 7. Alineamiento del segmento secuenciado al *contig* 118_orf20 del genoma de *F. fulva*, disponible en la base de datos *GenBank*. KS-F y KS-R representan al *primer forward* y *reverse*, respectivamente.

El análisis mostró que existe una estrecha asociación filogenética del dominio KS de pks1 de CIDEFI 300 con las secuencias de otros *Dothideomycetes*, particularmente los incluidos en las órdenes *Capnodiales* (*Davidiellaceae* y *Mycosphaerellaceae*) y *Myriangiales* (*Elsinoaceae*), que por cierto se han asociado previamente con la síntesis de DHN-melanina y elsinocromo (Figura III. 8). Además de esto, todos los dominios KS analizados se agruparon en un grupo de hongos representantes de *Dothideomyceta* y *Sordariomyceta*. Que se asocian por su capacidad para sintetizar melanina DHN

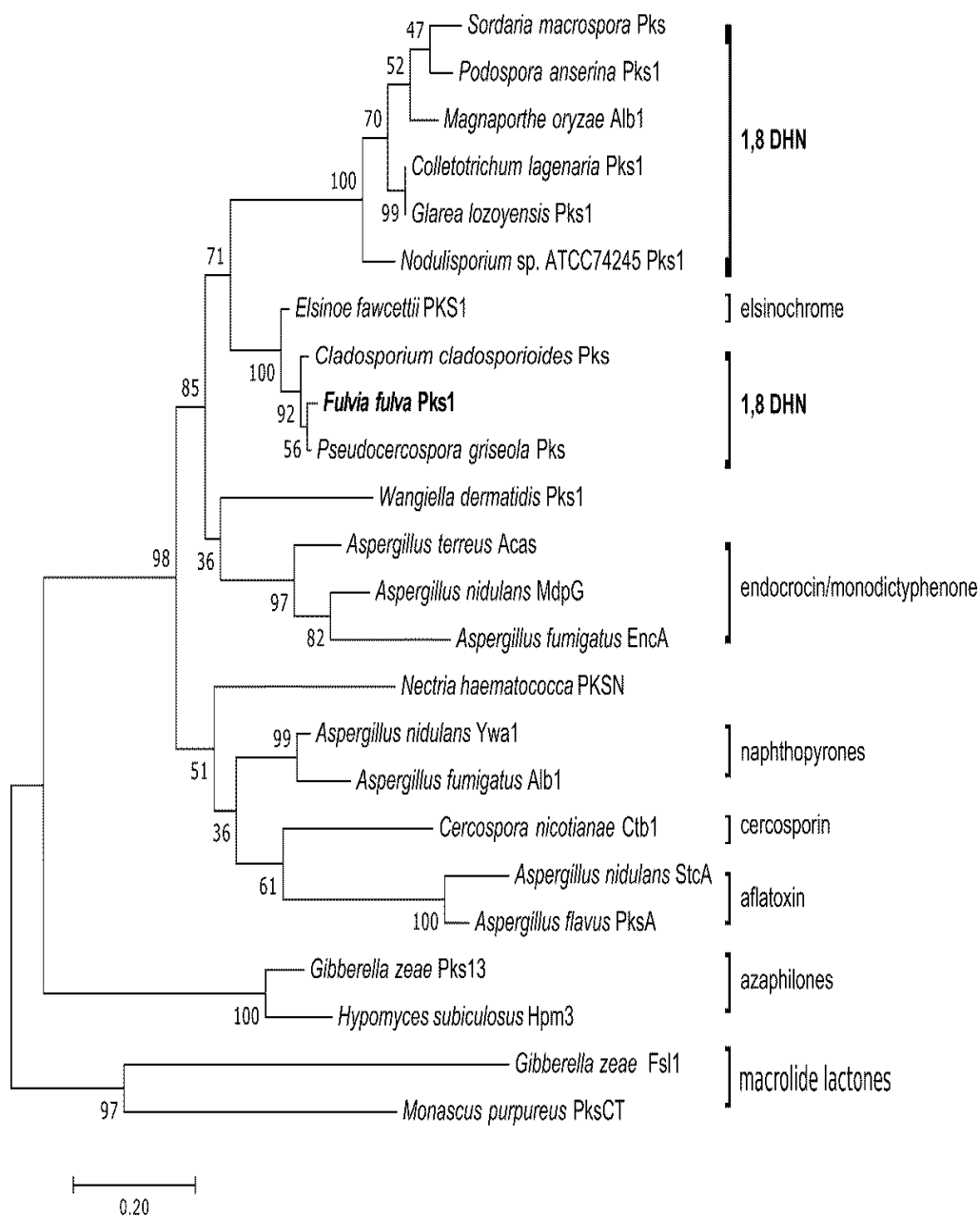


Figura III. 8. Análisis filogenético molecular por método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva se infirió mediante el uso del método de máxima verosimilitud basado en el modelo de matriz JTT. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 24 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían huecos y los datos que faltaban. Hubo un total de 178 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se condujo en el programa MEGA7.

III.4. Discusión

Las melaninas son metabolitos secundarios compuestos por una compleja matriz de polímeros heterogéneos, cuyas propiedades son una función de su estructura química y fuente de origen (Toledo, et al., 2017). Las melaninas se caracterizan por ser solubles a pH alcalino y porque son susceptibles a ser oxidadas por agentes oxidantes. Además de esto, otra herramienta útil para la identificación de las melaninas es el espectro de absorción cuando interactúan con la radiación electromagnética como la UV-visible, ya que tienen un espectro de absorción inusualmente amplio, que es típico de los pigmentos oscuros que absorben casi todas las longitudes de onda visibles. Este espectro aumenta monotonamente en una relación inversa con la longitud de onda de la banda.

Nuestros resultados demuestran que los pigmentos oscuros sintetizados por la cepa *F. fulva* CIDEFI 300 son melaninas debido a que: son solubles a pH alto (1M NaOH) e insolubilidad a pH bajo (4M HCl) en agua o disolventes orgánicos (Montes-Ávila et al., 2018). Por otro lado el espectro de absorción fue similar a los de las melaninas comerciales y sintéticas (Bell & Wheeler, 1986; Nighswander-Rempel, et al., 2005 a, b; Kayatz, et al., 2001; Meredith & Riesz, 2004; Selvakumar, et al., 2008; Ozturk, et al., 2017; Wheeler & Klich., 1995). Por último el espectro de emisión es similar a los espectros reportados para la melanina sintética (Gallas & Eisner, 1987; Perna, et al., 2009; Meredith & Riesz, 2004; Nighswander-Rempel, et al., 2005a). No obstante, se deben realizar estudios adicionales para confirmar, con mayor precisión, las identidades químicas de todos estos pigmentos fúngicos oscuros.

Los hongos sintetizan melanina por diversas vías metabólicas (Toledo, et al., 2017). Inhibidores e inductores de vías putativas de síntesis de melanina son clave

para dilucidar estas rutas, e inferir así la naturaleza química del pigmento (Saparrat, et al., 2009; Toledo, et al., 2017). Aunque la síntesis de DHN-melanina es típica entre los representantes de *Ascomycota*, se ha encontrado que varias familias de hongos pertenecientes a este *phylum* sintetizan otros tipos de melaninas como DOPA-melanina en *Aspergillaceae* (Pal, et al., 2013), *Davidiellaceae* (Llorente, et al., 2012) Y *Mycosphaerellaceae* (piomelanina; Keon & Hargreaves, 1998). La síntesis de pigmentos oscuros en cultivos de *F. fulva* fue inhibida sólo en medio de cultivo suplementado con triciclazol que además hizo que el hongo secretara, un pigmento rojizo en el medio. Se planteó así la hipótesis de que estos compuestos son probablemente el resultado de la actividad inhibitoria del triciclazol sobre la actividad de las reductasas fúngicas (Zeng, et al., 2012), efecto que ya ha sido descrito en cultivos de *Cladosporium cladosporioides* y *Pseudocercospora griseola* (Barcena, et al., 2015; Llorente et al., 2012). Estos hallazgos sugieren que el principal cromóforo oscuro de las colonias de *F. fulva* sería la melanina que se sintetiza a través de la vía DHN, como se describe para otros hongos típicos de *Ascomycota*.

El análisis de espectrometría de masas UV-MALDI de un extracto de etil-acetato de cultivos agarizados suplementados con triciclazol sugiere que el hongo sintetiza DHN-melanina, y que el triciclazol (50 ppm) condujo a la acumulación de subproductos oxidados de la vía de síntesis como la flaviolina. Esto es probablemente debido a la autoxidación de 1, 3, 6,8-THN, un metabolito intermedio en la vía de la DHN-melanina, que podría generarse como resultado del efecto inhibitorio del triciclazol sobre las reductasas (Zeng, et al., 2012). Es importante destacar que, no se detectó ninguna traza de 2-hidroxi juglona (2-HJ), lo que sería una evidencia adicional que diagnosticaría que el pigmento producido por *Fulvia fulva* es DHN-melanina (Butler & Day, 1998).

El tipo y la cantidad de compuestos resultantes de la inhibición de la síntesis de melanina-DHN dependen de la concentración del tricyclazol y del hongo en estudio (Lazarovits & Stoessl, 1988). El tricyclazol en una concentración de 100 ppm parece ser tóxico para *F. fulva*, ya que el hongo no creció en medios de cultivos suplementados con esta cantidad del compuesto. La ausencia de trazas de 2-HJ podría deberse a que el fungicida inhibió diferencialmente reductasas específicas. Los resultados de este estudio sugieren que las reductasas de *F. fulva* catalizan la conversión de 1, 3, 6, 8 -THN a escitalona, y estas enzimas son más sensibles al tricyclazol que las que generan vermélona. Además Kogej, et al., (2004) y Bárcena, et al., (2015) encontraron que las reductasas involucradas en los diferentes pasos de la síntesis de melanina en *Colletotrichum lagenarium*, *Magnaporthe grisea* y *Pseudocercospora griseola f. mesoamericana* difieren en su sensibilidad al tricyclazol. Todo esto en conjunto sugiere que *F. fulva* sintetiza pigmentos oscuros que son principalmente DHN-melanina, pero además sintetiza otros pigmentos como la cladofulvina, que es el principal metabolito secundario que este hongo produce cuando se cultiva en condiciones de estrés (Collemare, et al., 2014; Griffiths, et al., 2016; 2018). Sin embargo, en estos estudios no se detectó cladofulvina, probablemente porque su síntesis es reprimida por glucosa, que es el principal compuesto carbonado disponible en el medio de cultivo en que se creció a *F. fulva* CIFEFI 300.

Las policétido-sintetasas (PKS) son multi-enzimas claves que contribuyen a la biosíntesis de metabolitos como pigmentos, incluyendo melanina-DHN, y toxinas (Llorente, et al., 2012). El genoma de *F. fulva* contiene un total de 23 genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios (De Wit, et al., 2012), de los cuales 10 son PKS (Collemare, et al., 2014). Esto sugiere que el hongo puede sintetizar pigmentos como aquellos con estructuras similares a las toxinas tipo perilenquinona,

elsinocromo y cercosporina (Griffiths, 2015). Sin embargo, en cultivos in-vitro de *F. fulva* sólo se han identificado cladofulvina y melaninas (Agosti, et al., 1962; Davies & Hodge, 1974; Collemare, et al., 2014). Los resultados de este trabajo sugieren que *F. fulva* sintetiza, por medio de la vía de los pentacétidos, compuestos similares a melanina-DHN como otros hongos del phylum Ascomycota. El primer paso de esta síntesis implica la catálisis por una PKS tipo I no reductor, enzima que desempeña un papel clave en la biosíntesis de melanina-DHN, así como de otros metabolitos secundarios como las aflatoxinas (Thywiben, et al., 2011). Análisis filogenéticos previos sugirieron que *CfPKS1* es un ortólogo de *EfPKS1*, que codifica la nrPKS proteína que es requerida para la producción de elsinocromo (Ozturk, et al., 2017; Collemare, et al., 2014; Chung & Liao, 2008). El clúster génico que codifica para la síntesis del elsinocromo, con excepción del gen *Ect1* (coficiala proteína transportadora) también está presente en *F. fulva*, (Collemare, et al., 2014; Chung, et al., 2008). Sin embargo, el mismo análisis filogenético mostró que *CfPKS1* y *EfPK1* son ortólogos de las sintasas 4THN implicadas en la biosíntesis de la melanina-DHN, lo que también se observó en otros análisis filogenéticos (Ozturk, et al., 2017, Chooi, et al., 2017). Dado que las PKSs pertenecientes a un determinado clado (monofilia) tienden a estar involucradas en la síntesis de los mismos productos, las estructuras químicas diferenciales de la melanina-DHN y el elsinocromo se oponen a la filogenia de sus respectivas nrPKSs. Mientras que el ortólogo que codifica a la enzima 4THN sintasa en *Colletotrichum lagenarium* se ha caracterizado en detalle; *CfPKs1* se ha asociado a la síntesis del hexaceturo 2-acetil-1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (ATHN) que es cíclico y desacilado por el dominio TE bi-funcional de la enzima para generar 4THN (Vagstad, et al., 2012).

Okmen, et al., (2014) describieron que los mutantes negros de *F. fulva*, obtenidos por una delección del regulador transcripcional conservado *CfWor1*, no sintetizaron

cladofulvina, aunque el gen *pks1* fuera inducido; por lo tanto este fenotipo se asoció con la síntesis de un pigmento negro desconocido (Okmen, et al., 2014). Aunque las PKS de tipo I de los hongos tienen varias clases de dominios funcionales (SAT, unidad de arranque (starter unit); ACP, transcilasas; AT, acetil transferasa; PT, producto molde; ACP, proteína carrier que acetila; TE, tioesterasa; DH, deshidratasa; ER, enonil reductasa; KR, ceto-reductasa; MT, C- o N-Metil transferasa; KS: ceto-sintasa), el dominio KS es un dominio altamente conservado dentro de estas enzimas multifuncionales, que podría utilizarse para la identificación de nuevos genes *pks* y/o genes homólogos (Bingle, et al., 1999; Llorente, et al., 2012). El análisis filogenético realizado sugiere que en el genoma de *F. fulva pks1* podría desempeñar un papel clave en la síntesis de melanina y el sinocromo, aunque no hay informes sobre la síntesis del segundo pigmento en cultivos de *F. fulva*. En un estudio reciente, Ebert, et al., (2018) compararon y caracterizaron grupos de genes que codifican para la síntesis de perilenquinona y DHN-melanina en Ascomycota y revelaron que los genes implicados en la síntesis de el sinocromo están relacionados con aquellos asociados a la producción de melanina-DHN y que el gen *pks1* de *Elsinoe fawcettii* se agrupa estrechamente con PKSs implicadas en la síntesis de melanina tipo-DHN. Además, en *Aspergillus niger*, solo una PKS se ha asociado con la síntesis de dos clases diferentes de policétidos, melanina-DHN y nafto-pironas (Chiang, et al., 2011). El gen *CpPks1*, que corresponde a una nrPKS en *Cladosporium phlei*, un ortólogo de *CfPks1* y *EfPks1*, se asignó a la síntesis de phleicromo (So, et al., 2015). Del mismo modo, Griffiths, et al., (2018) sugirieron que *CpPks1* está involucrado en la producción de melanina DHN y un metabolito similar a cercosporina que es responsable de la síntesis de phleicromo. Todo lo anterior sugiere que la diafonía y las interdependencias entre los grupos de genes podrían ser más importantes de lo que se pensaba (Bergmann, et

al., 2010). Por lo tanto, los resultados de este trabajo sugieren que *F. fulva* tiene una vía pentacétida que es clave en la síntesis de melanina-DHN, que es el pigmento oscuro sintetizado por *F. fulva*.

El tricyclazol, un inhibidor específico de la síntesis de melanina-DHN, ha sido utilizado para manejar enfermedades de plantas causadas por hongos que sintetizan este tipo de melanina. Griffiths, et al., (2018) con el fin de analizar la regulación de *CfPKS1* transformó una cepa *F. fulva* con un plásmido que contenía *CfSF1* fusionado con la región promotora del gen *F. fulva Avr9* regulado por nitrógeno. El transformante obtenido OE.*CfTSF1* no mostró ninguna diferencia con la cepa salvaje *in vitro*. Sin embargo, este sintetizó grandes cantidades de melanina que se acumularon en cantidades fuera de lo habitual en las paredes del hongo que además no enfermó a las plantas de tomate. Este fenotipo pigmentado se relacionó con la reducción de la sensibilidad del hongo a gradientes quimiotácticos y a la morfogénesis evitando la remodelación del ápice hifal (Riquelme, 2013). Un análisis *in planta* de las paredes celulares de *F. fulva* conduciría a comprobar esta hipótesis. Alternativamente, la melanina DHN que se acumula en la pared celular podría ser reconocida por las células vegetales, lo que conduciría a la activación de defensas vegetales y resistencia en una vía similar a la activación vegetal por PAMPs (Pathogen associated molecular patterns), lo que podría ser perjudicial para la virulencia de otros patógenos vegetales independientemente de si la melanina DHN es o no un factor de patogenicidad. No obstante, se necesitan más investigaciones en *F. fulva* y otros hongos fitopatógenos pigmentados para dilucidar estos mecanismos.

III.5. Conclusión

Las características químicas y fotoquímicas del pigmento oscuro sintetizado por *F. fulva*, así como la presencia de flaviolina cuando las reductasas fúngicas fueron inhibidas por el tricyclazol, demuestran que este hongo sintetiza melanina-DHN. El gen *pks1* de *F. fulva* está implicado en la vía de síntesis de pigmentos oscuros, puesto que codifica para un dominio KS ya asociado a otras PKS de otros hongos, incluyendo unos pertenecientes a Mycosphaerellaceae, que también están involucradas en la síntesis de melanina-DHN.

CAPITULO IV: *Metabolitos secundarios sintetizados por Fulvia fulva*

IV.1 Introducción

Dothideomycetes es una clase de hongos del *phylum Ascomycota* que incluye más de 25 órdenes de organismos adaptados a una amplia gama de ambientes (Videira, 2017). *Fulvia fulva* (sin. *Cladosporium fulvum*) es también un hongo dematiáceo, pero en el orden Capnodiales, que además se ha considerado como un modelo para el estudio de las interacciones planta-patógeno ya que se comporta de acuerdo con la hipótesis gen a gen (Flor, 1971; De Wit, 2016). Entre ellos, los representantes del género *Stemphylium*, del orden Pleosporales, pueden establecer relaciones patógenas, saprotróficas o endofitíticas con una amplia gama de especies vegetales (Jones, et al, 2014; Franco, et al, 2017).

F. fulva es el agente causal del moho de hoja, una enfermedad que afecta principalmente a los tomates cultivados en invernadero (Thomma, et al; 2005). *Stemphylium lycopersici* es el agente causal de la mancha gris de la hoja, que es una enfermedad del tomate que provoca serias pérdidas de producción en la Argentina (Franco, et al, 2017). Ambas son enfermedades foliares que provocan reducciones en las áreas fotosintéticas de las plantas y, por lo tanto, en el rendimiento final. Mientras que *S. lycopersici* es un patógeno necrotrófico (Gilbert & Parker, 2010), *F. fulva* es un hemibiótrofo (Jashni et al; 2015), por lo tanto son organismos ideales para comparar aspectos funcionales que podrían estar relacionados con su estrategia de interacción con la planta.

F. fulva secreta en el apoplasto un conjunto de efectores de avirulencia (Collemare, et al., 2014), como AVR2 (Van Esse, et al., 2008), AVR4 (Van Esse, et al., 2006, 2007), AVR4E, AVR9 (Westerink, et al., 2004), y AVR5 (Mesarich, et al, 2014), y

proteínas extracelulares ECP1, ECP2, ECP4 y ECP5 (Luderer, et al., 2002a). El otro hongo, *S. lycopersici* provoca la muerte de células vegetales probablemente a través de la síntesis y liberación de metabolitos secundarios fitotóxicos (Jashni, et al., 2015; Lo Presti, et al., 2015). Curiosamente, la estructura química, así como los efectos biológicos de estas moléculas se han aclarado sólo en el caso de algunas especies fúngicas (Zheng, 2010 a y b; Li, et al., 2017).

Los metabolitos secundarios fúngicos (MS) son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que proporcionan ventajas adaptativas a los diversos ambientes que se generan en los diversos ecosistemas. Los MS en determinadas patologías actúan como factores de virulencia, pero además es probable que desempeñen actividades biológicas relevantes, pero además estos podrían afectar la inocuidad de los alimentos, las aflatoxinas y/o tricótesenos son también metabolitos secundarios por otro lado otros podrían ser útiles de la industria farmacéutica, (Collemare, et al., 2014). Por otro lado aparece como un tema de estudio interesante conocer si su síntesis o secreción son parte de la respuesta de compatibilidad o incompatible. En general los genes que codifican para la síntesis de MSs se organizan en *clusters* (Keller, et al., 2018) y sobre la base de la vía de biosíntesis se clasifican en polipéptidos, péptidos no ribosomales, híbridos peptídicos de la poliketida sintetasa, terpenos o alcaloides (Keller, et al., 2005). En función de la naturaleza fisicoquímica los MSs, pueden ser compuestos volátiles, solubles o compuestos insolubles en agua. Los compuestos orgánicos volátiles se cree desempeñan un papel clave como mensajeros a distancia en las interacciones biológicas Tyc, et al., (2017). Se ha encontrado que muchas plantas responden a un conjunto específico de compuestos orgánicos volátiles sintetizados por los patógenos (COVs (VOCs en inglés), que desencadenan respuestas de defensa directas y/o indirectas (Holopainen, et al., 2010; Maffei, et al., 2010).

Además, se ha descrito que estas respuestas pueden ser diferenciales, ya que también depende de la naturaleza del estrés de la planta. Por ejemplo, cuando el patógeno fúngico que ataca la planta es necrotrófico, esta interacción podría activar a la resistencia sistémica inducida (SIR), mientras que si el agente de estrés es un hongo biotrófico o el ambiente se estaría activando la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Arimura, et al., 2005; Cellini, et al., 2018). En cualquier caso y más allá de los estreses que activan los mecanismos de defensa de la planta es escasa la información sobre la síntesis de COV por parte de *F. fulva*, por otro lado es importante considerar esta información comparándola directamente con otro patógeno que difiera en su actividad biológica, de manera de inferir si el comportamiento se puede asociar a los compuestos sintetizados por *Fulvia fulva*.

IV.1.1 Hipótesis del capítulo:

IV.1.1.1 *Fulvia fulva* si bien es un hongo hemibiotrófico produce metabolitos secundarios en una cantidad y diversidad similar al de otros patógenos foliares y estos alteran la sanidad y fisiología vegetal de las hojas de tomate.

IV.1.2 Objetivos del capítulo

IV.1.2.1 Conocer el perfil de los MS sintetizados y liberados por un hongo hemibiotrófico y contrastarlo con el perfil de metabolitos de un patógeno necrótico de tomate como *Stemphylium lycopersici* que provocan la mancha gris de la hoja del tomate.

IV.1.2.2 Determinar se los metabolitos secundarios volátiles afectan la sanidad de las hojas desprendidas de tomate.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1 Material fúngico

Los aislados de *Fulvia fulva* raza-2 (CIDEFI 300) y *Stemphylium lycopersici* (CIDEFI 213 y CIDEFI 216) utilizados en este trabajo pertenecen a la colección de cultivos del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y fueron caracterizados cultural y molecularmente (Medina, et al., 2015; Franco, et al, 2017; y Medina & Lucentini, et al., 2018).

IV.2.2 Condiciones de crecimiento

Se sembraron y cultivaron los aislados, CIDEFI 300 de *F. fulva* y de *S. lycopersici* los aislados CIDEFI 213 y CIDEFI 216 (Franco, et al., 2017) en agar dextrosa de patata (PDA) medio a 24°C en la oscuridad durante 14 y 7 días respectivamente (Rollan, et al., 2015). Dos discos de agar de un diámetro de 5 mm se extrajeron de los cultivos con una pipeta de vidrio estéril y se colocaron en un vial de vidrio (10 ml) conteniendo 3,5 ml de caldo de dextrosa de patata (PDB) medio (Sigma-Aldrich, Australia), luego de lo cual se sellaron con una tapa de silicona. Los viales se incubaron con agitación orbital a 150 rev. min⁻¹ a 24°C en la oscuridad durante 7 días en el caso del aislado de *S. lycopersici* y 14 días en el caso de *F. fulva*. Estas diferencias en los días de incubación están relacionadas con la velocidad de crecimiento de los dos hongos que es distinta.

IV.2.3 Compuestos orgánicos volátiles (COVs (VOCs en inglés)): Extracción, identificación y cuantificación

Los perfiles de COVs producidos por los hongos en estudio se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un cromatógrafo de gas HP CGC 6890/MS Agilent 5975C VL –equipado con una columna capilar de sílice fundida ZB-5HT Inferno (30 m, 0.25 mm id., 0.25 μm , Phenomenex, Inc) el que además tenía acoplado a la salida de la columna un espectrómetro de masas. Para extraer COV de la línea fija del soporte de los viales, que se incubaron durante una hora a 30 °C se utilizó una fibra de micro extracción en fase sólida recubierta con 65 m de polidimetilsiloxano/divinilbenceno. Después de la inyección, los compuestos fueron desorbidos durante 5 minutos en un inyector sin divisiones a 250 °C. La temperatura del horno se mantuvo a 40°C durante 2 min, luego se elevó a 200°C por 10 °C min^{-1} y 250 °C por 15 min^{-1} , luego de lo cual la temperatura se llevó nuevamente a 40°C. Como gas de arrastre se utilizó helio a un flujo de 1 ml min^{-1} . La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masa de las muestras con patrones disponibles en internet utilizando el Programa de Búsqueda de Espectros Masivos del NIST con librerías NIST05 y Adams (*Identification of Essential Oil components by Gas chromatography/ Mass spectrometry, 4th Edition*) y el uso del índice Kovalts (KI) en referencia a n-alcanos. Los antecedentes de los medios de PDB no inoculados se analizaron como control.

IV.2.4 Espectro fluorométrico de sobrenadantes de cultivos fúngicos

Una alícuota de los sobrenadantes de los cultivos de ellos hongos en PDB se filtró a través de una membrana de 0,45 micrones y se procedió a analizar el espectro fluorométrico (Shimadzu UV-1800). Los espectros de absorción se midieron a temperatura ambiente en celdas de cuarzo con una longitud de 1,0 cm con trayecto óptico entre 200 y 800 nm. Las matrices de fluorescencia-excitación-emisión (FEEMs) se determinaron utilizando un equipo de conteo de un solo fotón FL3 TCSPC-SP (Horiba Jobin Yvon). Los FEEMs se generaron mediante la recopilación de los datos de espectros de emisiones sucesivas de 260 a 650 nm a longitudes de onda de excitación que oscilaban entre 240 y 580 nm, con pasos incrementales de 5 nm en concordancia a lo descrito por Lucentini & Medina et al., (2018).

IV.2.5 Ensayo de virulencia

Una alícuota de los sobrenadantes de cultivos de los hongos PDB fueron esterilizados pasando el sobrenadante de cultivo a través de una Membrana estéril de 0.22 μm . Los ensayos de virulencia en las hojas desprendidas de tomate del cultivar Elpida de un mes de edad, que se colocaron con el lado adaxial hacia abajo, en un papel filtrante humedecido con agua estéril dentro de una placa Petri, se colocaron 3 foliolos por caja de Petri y se repitió por triplicado para cada tratamiento, se llevaron a cabo utilizando el sobrenadante de cultivo de hongos sin filtrar y filtrados (Franco et al., 2017). Como controles negativos los foliolos fueron tratados con una alícuota de agua esterilizada y PDB no inoculado. El control positivo consistió en foliolos inoculados con sobrenadante de cultivos de hongos cultivados en PDB durante 7 y 14 días (según la

especie de hongos) sin filtrar. Las placas de Petri (9cm) fueron selladas con Parafilm con el fin de reducir la pérdida de humedad y fueron incubados a 25°C. El promedio del tamaño de las lesiones se determinó a los 7 días de la inoculación y se determinó mediante el software de análisis de imágenes Assess 2.0 (Lamari, 2002). El experimento se llevó a cabo con nueve réplicas (foliolos) por cepa inoculada. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un diseño de las cepa en contraste a los controles agua y el medio de cultivo PBD, después de la prueba de Tuckey ($p < 0.05$), con InfoStat versión 2015 I (Di Rienzo, et al., 2015).

IV.3 Resultados

IV.3.1 COVs liberados por *Fulvia fulva* y *Stemphylium lycopersici*

El tomate es afectado por patógenos fúngicos necrotróficos y biotróficos que sintetizan metabolitos secundarios solubles y volátiles que alteran la fisiología vegetal. Los COVs sintetizados por *F. fulva* CIDEFI 300 y por los aislados del patógeno necrotrófico *S. lycopersici* CIDEFI 213, CIDEFI 216, se presentan en las figuras 1, 2 y 3 respectivamente. El área bajo la curva de las funciones o área de integración de la producción de COVs por los aislados nos indica la cantidad de metabolitos secundarios volátiles que produjeron los aislados. Las áreas de integración fueron 1.13×10^8 y 6.18×10^7 para las cepas *S. lycopersici* CIDEFI 213 y CIDEFI 216, respectivamente y 1.72×10^7 para *F. fulva* CIDEFI 300. Estos resultados mostraron que *F. fulva*, un patógeno hemibiotrófico sintetiza una menor cantidad de COVs que el patógeno necrotrófico *S. lycopersici* (Franco, et al., 2017; Collemare, et al., 2014).

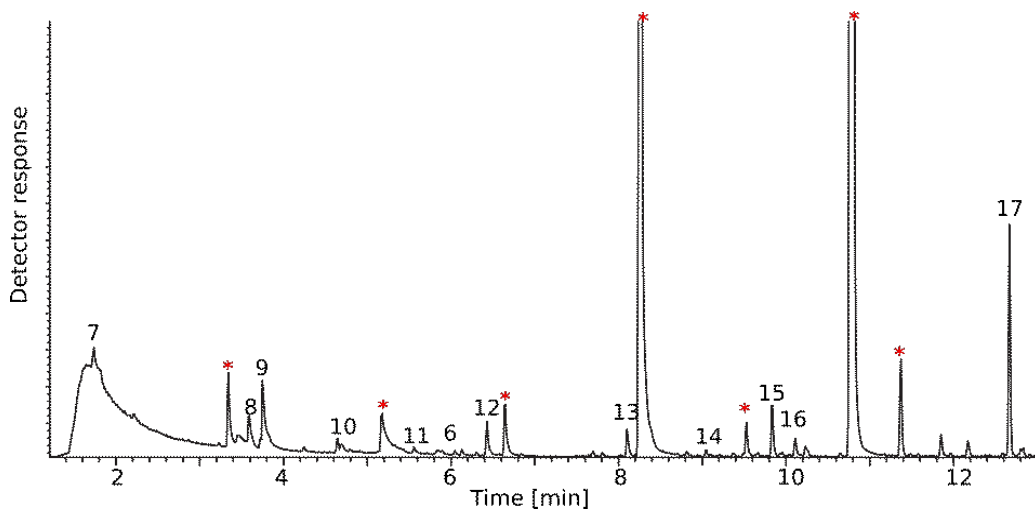


Figura IV.1 Perfiles de compuestos orgánicos volátiles (COVs (VOCs en inglés)) identificados mediante un análisis GC-MS en cultivos de cepa *F. fulva* CIDEFI 300 cultivada en medios PDB. Los compuestos detectados en PDB no inoculado se marcan con asterisco rojo. Los compuestos con abundancia relativa >1 % se numeran en cada cromatograma. 6) Alcohol furfuril. 7) Acetona. 8) Trimetilacetato de metilo. 9) Alcohol isoamil. 10) 1-Octano. 11) 3-Hexanona, 4-metil-. 12) Estireno. 13) 3-Octanone. 14) Ácido hexanoico, 2-etil, éster metílico. 15) 2-Nonanone. 16) Alcohol fenética. 17) No identificado Nist05.

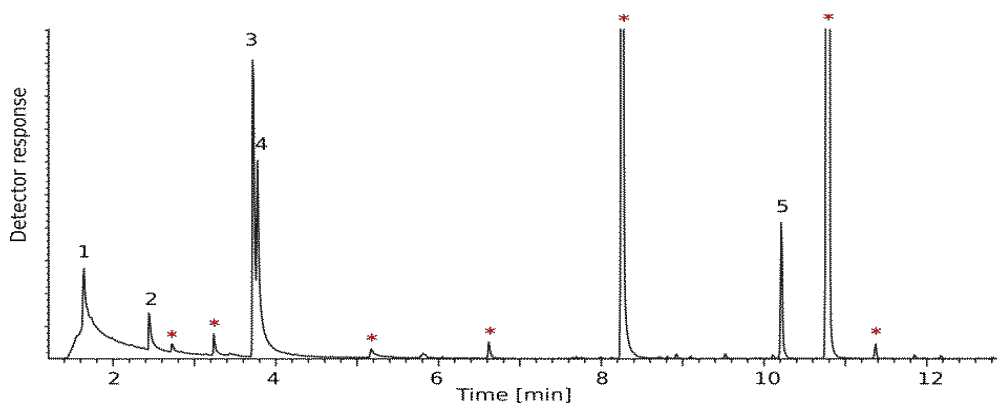


Figura IV. 2. Perfiles de compuestos orgánicos volátiles (COVs) identificados mediante un análisis GC-MS en cultivos de cepa *S. lycopersici* CIDEFI 213 cultivada en medios PDB. Los compuestos detectados en PDB no inoculado se marcan con asterisco rojo. Los compuestos con abundancia relativa >1 % se numeran en cada cromatograma. 1) Alcohol etílico. 2) 2-Metil-1-propanol. 3) Alcohol isoamilo. 4) 2-metil-1-butanol. 5) Alcohol fenético.

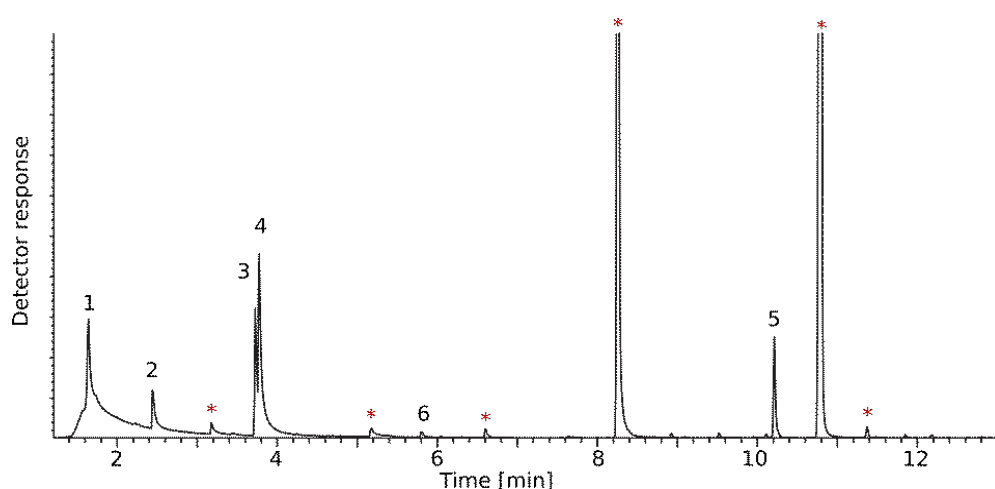


Figura IV. 3. Perfiles de compuestos orgánicos volátiles (COVs) identificados mediante un análisis GC-MS en cultivos de cepa *S. lycopersici* CIDEFI 216 cultivada en medios PDB. Los compuestos detectados en PDB no inoculado se marcan con asterisco rojo. Los compuestos con abundancia relativa >1 % se numeran en cada cromatograma. 1) Alcohol etílico. 2) 2-Metil-1-propanol. 3) Alcohol isoamilo. 4) 2-metil-1-butanol. 5) Alcohol fenétic. 6) Alcohol furfuril.

El análisis cromatográfico de las muestras de análisis *F. fulva* CIDEFI 300 demostró que el hongo sintetizó 18 metabolitos secundarios, lo que se desconocía (Tabla IV 1). En los controles positivos que fueron los aislados de *S. lycopersici* se detectaron 11 compuestos orgánicos volátiles. Los alcoholes isoamílico, fenético y furfurílico fueron sintetizados por *F. fulva* pero también por los hongos necrotróficos. Entre los compuestos que fueron sintetizados por *F. fulva* y *S. lycopersici* el alcohol isoamílico fue el más importante en cantidad representando el 14,6% y por otro lado ambas especies de patógenos sintetizaron acetona.

Tabla IV 1. Abundancia relativa [%] de compuestos orgánicos volátiles (COVs) identificado mediante un análisis GC-MS en cultivos de las cepas control CIDEFI 300 y los controles CIDEFI 213 y CIDEFI 216 de *S. lycopersici* cultivadas en medios PDB.

RT (min)	KI	Compuesto	CIDEFI 300	CIDEFI 213	CIDEFI 216
1.64	624.27	Alcohol etílico	-	14.12	21.08
1.74	629.54	Acetona	3.86	0.34	-
2.45	669.56	2-Metil-1-propanol	-	4.94	6.81
3.59	733.18	Metil trimetilacetato	8.52	-	-

3.73	741.09	Isoprenol	0.62	-	-
3.72	740.64	Alcohol isoamílico	20.13	40.08	14.64
3.78	743.89	2-Metil-1-butanol	-	25.45	41.46
4.25	770.12	Tolueno	0.65	-	-
4.64	792.43	1-octeno	2.04	-	-
5.56	843.83	3-Hexanona, 4-metil-	1.28	-	-
5.80	857.12	Alcohol furfurílico	1.37	0.91	1.09
5.90	862.78	Etilbenzeno	0.73	-	-
6.05	871.19	p-Xileno	0.78	-	-
6.13	875.73	4-Heptanona	0.87	-	-
6.31	885.65	Bromoformo	0.52	-	-
6.43	892.60	Estireno	6.77	-	-
8.10	988.05	3-Octanona	5.36	-	-
8.13	989.59	6-Metil-5-hepten-2-ona	-	0.14	-
8.72	642.25	No identificada Nist05	-	0.18	-
8.81	701.95	2-Etil-1-hexanol	-	0.20	-
8.92	711.54	alcohol Bencílico	-	0.46	0.61
9.05	720.15	Ácido Hexanóico, 2-etil-, éster Metil	1.03	-	-
9.83	719.66	2-Nonanona	9.34	-	-
10.21	696.60	alcohol Fenetílico	1.58	13.19	14.31
12.67	694.13	No identificado Nist05	34.54	-	-

RT: tiempo de retención. KI: índice de Kovalts.

Curiosamente, entre los cultivos de *F. fulva* el único MS identificado hasta el momento había sido la cladofulvina (Griffiths, et al., 2015).

F. fulva sintetizó acetona, compuesto que también fue detectado en los cultivos de los dos patógenos fúngicos necrotróficos, aunque una cepa de *S. lycopersici* produjo este compuesto (tabla IV. 1) en una baja proporción (0,34 %) comparado con al nivel que *F. fulva* (3,86 %) (Figura IV.4).

La abundancia relativa de COVs sintetizados por *Fulvia fulva* y los controles de hongo necrotrófico *S. lycopersici* CIDEFI213 y 216 se presentan y contrastan en la figura IV.4.

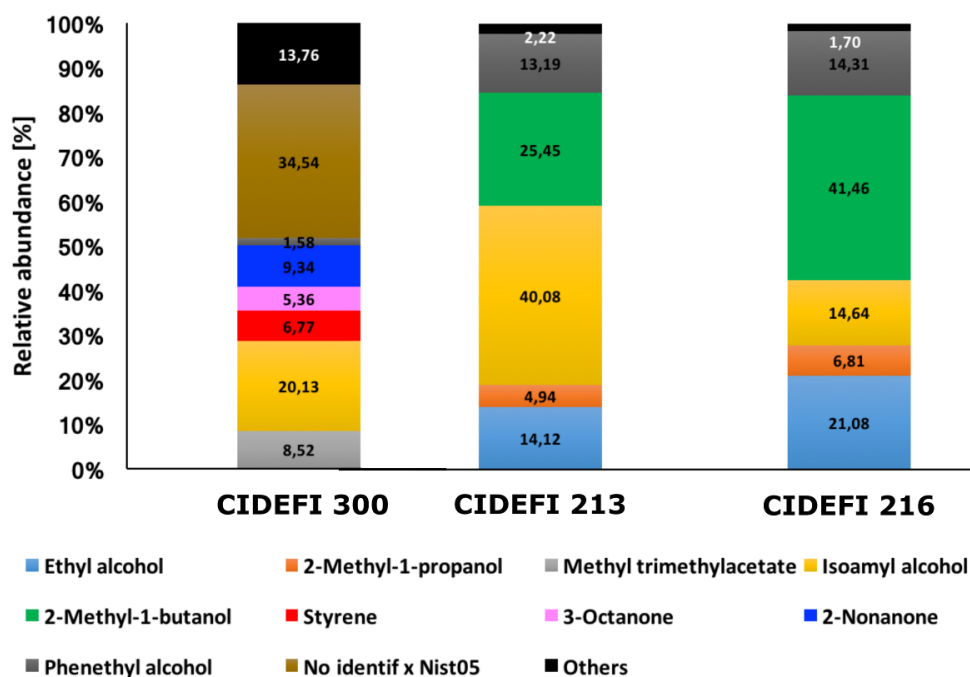


Figura IV. 4: Abundancia relativa [%] compuestos orgánicos volátiles (COV) identificados mediante un análisis GC-MS en cultivos de cepas *S. lycopersici* CIDEFI 213 y CIDEFI 216 y en cultivos de cepa *F. fulva* CIDEFI 300 cultivada en medios PDB. Los compuestos con abundancia relativa <5 % se agruparon en "Otros".

Fulvia fulva sintetizó y liberó COVs, el compuesto más importante en lo que hace a la cantidad (34,5 %) tiene un tiempo de retención de 12,67 min, un índice de Kovalts (KI) 694.13 y una masa de aproximadamente 198,2 unidad de masa atómica (Figura IV. 5), sin embargo, no se encontraron compuestos con características similares en las librerías NIST05 ni en Adams.

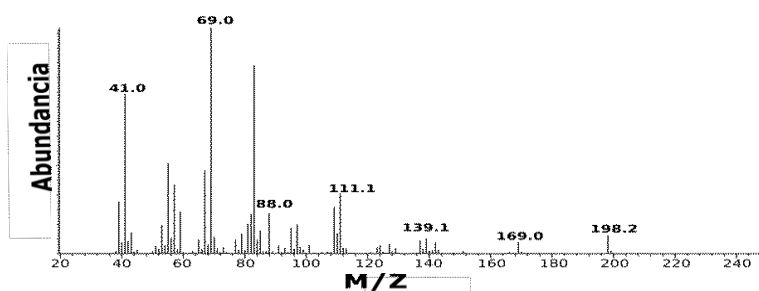


Figura IV. 5 Espectros de masa del compuesto más abundante detectado por GC-MS de cultivos de cepa *F. fulva* CIDEFI 300 cultivado en medios PDB durante 14 días.

Además, *F. fulva* produjo 2- nonanona (9,4 %), Metil trimetilacetato (8.5 %, Metil 2,2- dimetilpropionato) y estireno (6.8 %). *F. fulva* también sintetizó y liberó 3- octanona (5,4 %), compuesto relacionado principalmente con sabores mohosos, terrosos y de setas (Schueuermann, et al., 2019). Además, el análisis de los cultivos de *F. fulva* mostró que el hongo sintetizó otros compuestos menores como 1- octeno (2,0 %), 3- hexanona, 4 Metil- 3- hexanona (1,3 %), ácido hexanoico, 2 etil, éster metilo (1,0 %), 4- heptanona (0,9 %), p- xileno (0,8 %), etilbenceno (0,7 %), tolueno (0,6 %), 3 metil-3- buten-1-ol (0,6 %) y bromoformo (0,5 %). *S. lycopersici* libero seis compuestos que no son producidos por el hongo hemibiotrófico *F. fulva* CIDEFI 300. Las cepas CIDEFI 213 y CIDEFI 216 produjeron COVs, Alcohol Etilico (14% y 21%, respectivamente), 2-metil-1- propanol (4.94% y 6.81%, respectivamente), 2-metil-1- butanol (25.45% y 41.46% respectivamente), y alcohol bencílico (0.46% y 0.61%, respectivamente). Sin embargo la cepa CIDEFI 213 produjo otros COVs que no produjo la otra cepa de *S. lycopersici* como tampoco *F. fulva*, 6-metil-5-hepten-2-ona (14%), 2-etil-1-hexano (0,20%)

IV.3.2 Estudio de la característica biológica y química del sobrenadante de los cultivos fúngicos

La solubilidad y la presión de vapor a 20 °C de COVs detectados se enumeran en la Tabla IV. 3. Los compuestos con alta solubilidad en agua pueden ser detectados por técnicas fotoquímicas, el rol biológico de estos compuesto en las plantas de tomate se estudió realizando un ensayo *in vitro* utilizando foliolos desprendidos.

Tabla IV.3. Solubilidad en agua -expresada como g.L⁻¹ y presión de vapor -expresada como mmHg- para COVs detectados, los que produce *Fulvia fulva* se presentan en negrita y los otros los produce el hongo necrotrófico. Los valores estándar se presentaron a 20°C; con excepción de la presión de vapor de 3-Hexanona, 4-metil-; ácido hexanóico, éster metílico y alcohol fenetílico, que las temperaturas se muestran entre paréntesis.

Compuesto	Solubilidad en agua (20°C)[g.L-1]	presión vapor (20°C) [mmHg]
Alcohol etílico	<i>Miscible</i>	43.0
Acetona	<i>Miscible</i>	184.0
2-Metil-1-propanol	85	9.0
Metil-trimetil-acetato	15	49.0
Alcohol isoamílico	28	28.0
3-Metil-3-buten-1-ol	90	3.6
Tolueno	<i>Insoluble</i>	22.0
1-octeno	<i>Insoluble</i>	15.0
3-Hexanona	<i>Ligeramente</i>	8.0 (25°C)
Alcohol furfurílico	<i>Miscible</i>	0.4
Etilbenceno	<i>Insoluble</i>	10.0
p-Xileno	<i>Insoluble</i>	9.0
4-Heptanona	4.6	5.2
Bromoformo	<i>Ligeramente</i>	5.0
Estireno	0.3	5.0
3-Octanona	<i>Insoluble</i>	2.0
6-Metil-5-hepten-2-ona	3.02	0.8
2-Etil-1-hexanol	<i>Insoluble</i>	0.2
Alcohol bencílico	33	0.1
Ácido hexanóico	<i>Insoluble</i>	1,09 (25°C)
2-Nonanona	<i>Insoluble</i>	0.6
Alcohol fenetílico	20	1 (58 °C)

En cuanto al ensayo de hojas desprendidas, los sobrenadantes sin filtrar de los cultivos de *F. fulva* desarrollaron síntomas típicos del moho de hoja de tomate en las hojas después de 7 días de inoculación. Además, el análisis UV-Vis mostró que el sobrenadante de la cepa CIDEFI 300 tiene un espectro de absorción diferencial en comparación con PDB entre λ 240-280 nm (Figura IV.6.A). Este cambio fue acompañado de cambios en la emisión de fluorescencia (Figure IV. 7). El pico con un máximo de fluorescencia en $\lambda_{excitación}$ 325- $\lambda_{emisión}$ 420 fue el más intenso de la cepa CIDEFI 300. Los filtrados de *F. fulva* no generaron alteraciones mientras que si lo hicieron los extractos no filtrados que generaron en los folíolos la sintomatología típica del moho de la hoja de tomate. A diferencia de esto los sobrenadantes filtrados y no

filtrados del patógeno necrotrófico *S. lycopersici* provocaron el desarrollo de un área necrótica bastante similar en apariencia a los síntomas de la mancha de la hoja gris.

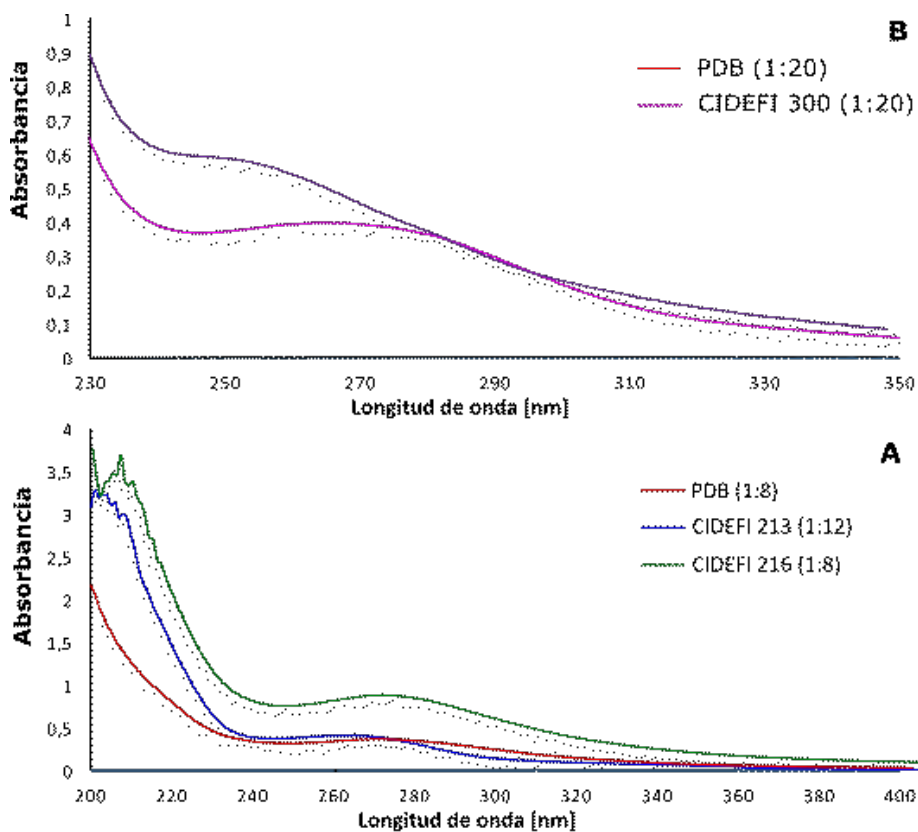


Figura IV.6. Análisis UV-Vis de los sobrenadantes filtrados de los cultivos. **A.** los provenientes de *F. fulva* de la cepa CIDEFI 300 **B.** y los provenientes de *Stemphylium lycopersici* de las cepas CIDEFI 213 y CIDEFI 216.

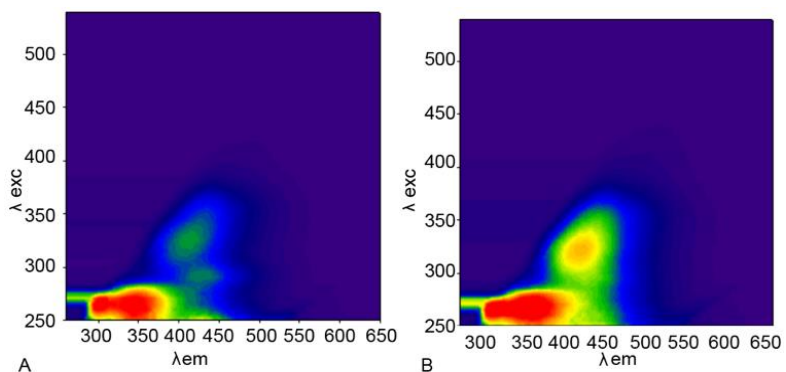


Figura IV.7. Matriz de fluorescencia-excitación-emisión (FEEM). **A.** Medios PDB no inoculados (1:20). **B.** *F. fulva* CIDEFI 300 cepa (1:20). Los gráficos se hicieron con la misma escala de intensidad de color. Fluorescence–excitation-emission matrix (FEEMs).

IV.4 Discusión

IV.4.1 COVs liberados por *Fulvia fulva* y *Stemphylium lycopersici*

Collemare, et al., (2014) informó que el genoma de *F. fulva cepa raza OWU* alberga 23 grupos genéticos que codifican para MS putativos y destacó que podrían ser demasiados, teniendo en cuenta la naturaleza biotrófica del hongo. Estos resultados se oponen a la hipótesis de que los hongos biotróficos evolucionaron y desarrollaron una estrategia de interacción con las plantas mediante la pérdida de genes que codifican metabolitos secundarios.

Las especies de *Stemphylium* sintetizan una amplia gama de MS que podrían desempeñar, ya sea solos o en masa, un papel clave durante la infección de la planta hospedadora y también podría explicar su comportamiento necrotrófico (Trigos, et al., 2011). La producción de alcohol se ha estudiado principalmente en *Saccharomyces cerevisiae* que sintetiza una amplia gama de alcoholes, entre ellos los alcoholes fusel que resultan de la fermentación de aminoácidos (Lorenz, et al., 2000). Varios autores describieron que la producción de alcohol acetona-butanol-etílico en microorganismos se producía a través de un proceso metabólico de fermentación presente en especies solventogénicas como *Clostridium* (Jones & Woods, 1986; Xin, et al., 2018). Hazelwood, et al., (2008) encontró que cuando los hongos se cultivan en condiciones limitantes de nitrógeno, sintetizan con frecuencia compuestos aromáticos como alcoholes isoamílico e isobutílico, que se han asociado con la activación de procesos

relacionados con la virulencia (Pusztahelyi, et al., 2015). Los aminoácidos como la valina, leucina, isoleucina, metionina y fenilalanina se asimilan a través de la vía Ehrlich. Curiosamente, los compuestos sintetizados a través de esta vía podrían desencadenar el *quorum-sensing*, que conduce a la inducción de la diferenciación y probablemente la adaptación de las células de levadura al medio ambiente (Lorenz, et al., 2000; Hazelwood, et al., 2008). La leucina, en condiciones limitantes de nitrógeno, es el precursor del alcohol isoamílico (Jones & Pierce, 1964), un compuesto que provoca alargamiento celular, crecimiento pseudohifal y síntesis de quitina (Hazelwood, et al., 2008). En línea con esto, también la germinación de esporas fúngicas es estimulada por el alcohol isoamílico (French, 1985). El alcohol fenético también es sintetizado y liberado tanto por *F. fulva* (1.58 %) como por *S. lycopersici* (13.19 %) y podría funcionar como un compuesto de control de crecimiento como en *Candida albicans* (Lingappa, et al., 1969). El alcohol furfúrico, es otro compuesto sintetizado y liberado por ambas especies de hongos, en concentraciones inferiores al 1 % es un derivado menos reactivo y reducido del furfural (Almeida, et al., 2009). En condiciones microaerofílicas, la producción del furfural desencadena la producción de especies reactiva de oxígeno (ERO), mientras que, el alcohol furfúrico, que provoca una reducción de ERO y por lo tanto no se dañan las células (Gorsich, et al., 2006), lo que sugiere que este tipo de compuestos podrían desempeñar un papel en el desarrollo de síntomas en las hojas de tomate.

Fulvia fulva produjo 2- nonanona (9,4 %), un compuesto con actividad antifúngica (French, 1985; Vaughn, et al., 1993; Song, et al., 1996), que también es sintetizado por bacterias (Andersen, et al., 1994; Groenhagen, et al., 2013). También sintetizó Metil trimetilacetato (8.5 %, Metil 2,2- dimetilpropionato) y estireno (6.8 %). El compuesto anterior podría ser el precursor de otros metabolitos como el

dimetilpropionato, que protege a las plantas de patógenos induciendo la resistencia sistémica (Huang et al., 2012). Por otro lado, tanto, Furia & Bellanca (1975), como Li et al., (2016, 2017, 2018) y Wen et al., (2014) encontraron que el estireno podría utilizarse como un indicador de la presencia de patógenos en las frutas. El estireno secretado por *Penicillium expansum* redujo significativamente la atracción ejercida por trozos de ramas de pino sobre el gorgojo del pino (*Hylobius abietis*) (Azeem, et al., 2013). *F. fulva* también produjo, 3-octanona, que en baja concentración repele *Megaselia halterata*, el cual es un insecto díptero patógeno de hongos (Pfeil, et al., 1993) e inhibe el crecimiento de hongos en alta concentración (Cardoza, et al., 2002). La 3-octanone de *Cladosporium* spp, redujo los síntomas de la enfermedad en *A. thaliana* infectado con *P. syringae* pv. *Tomate*, porque indujo la resistencia sistémica de las plantas (Naznin, et al., 2013, 2014). Además, 3 octanona resultó ser fitotóxica en *A. thaliana*, donde desencadenó una explosión oxidativa (Splivallo, et al., 2007; Jones & Pierce, 1964). Aunque *Cladosporium cladosporioides* produjo concentraciones relativamente altas de 1-octeno su papel biológico es desconocido (Prenafeta-boldú, et al., 2019). *F. fulva* sintetiza además otros compuestos menores al 2% de la abundancia relativa (figura IV.4) como 1- octeno, 3- hexanona, 4 metil- 3- hexanona, ácido hexanóico, 2 etil, éster metilo, 4- heptanona, p- xileno, etilbenceno, tolueno, 3 metil-3-buten-1-ol y bromoformo. La 3-hexanona tuvo un efecto inductor del crecimiento de *A. thaliana* (Groenhagen, et al., 2013), mientras que la 4-metil-3-hexanona se encontró que actuó como un repelente de insectos (Norris, 2018). Es bien sabido que los mecanismos de defensa de las plantas, como SIR y/o SAR contribuyen a la sanidad de las plantas ya que conforman su “sistema inmunológico” (Kanchiswamy, et al., 2015). COVs fúngicos, como cariofileno, m-cresol, benzoato de metilo, 3-octanone, 1-octen-3-ol, 6-pentilo-a-pirone, activan la resistencia sistémica inducida en plantas (Li, et al., 2016). *F. fulva*

sintetiza 3-octanano que basado en los hallazgos de Martínez-Medina, et al., (2017) podría funcionar como un activador de cualquiera de los mecanismos que forman el sistema inmunológico de la planta.

Estos COVs podrían estar activando las vías de señalización de transducción que, por cierto, llevaron a la auto estimulación del crecimiento micelial y/o a la inhibición de otro competidor putativo en un entorno en particular (Snoeiijers, et al., 2000; Li, et al., 2016, Martínez-Medina, et al., 2017). Todas estas consideraciones sugieren que el oxígeno y el nitrógeno podrían desempeñar un papel regulador clave en la síntesis de compuestos volátiles tanto en *F. fulva* como en *S. lycopersici*.

Fulvia fulva y el fitopatógeno necrotrófico control sintetizan metabolitos secundarios (MS) algunos de los cuales son volátiles y por ello se conocen como Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) entre los que se incluyen alcoholes, cetonas y aldehídos (Pusztahelyi, et al., 2015) que, no solo es probable sean esenciales para el crecimiento de hongos, sino que además es probable le otorguen a los hongos ventajas adaptativas en la naturaleza (Perez-Nadales, et al., 2014; Scharf et al., 2014). *F. fulva*, un hongo hemibiotrófico (Thomma, et al., 2005), se cree que está bajo un proceso evolutivo de una pérdida convergente de genes que codifican para estas enzimas metabólicas secundarias, que podría ocurrir a través de la reducción de genes que codifican transportadores específicos de toxinas. Esto podría reducir además la capacidad de *F. fulva* para secretar enzimas y toxinas en comparación con los hongos necrotróficos, lo cual es de esperarse ya que está en línea con su comportamiento ecológico cuando interactúa con el tomate (Pusztahelyi, et al., 2015). *S. lycopersici* también tiene el potencial de secretar una amplia gama de enzimas y toxinas degradantes de la pared celular, que probablemente está relacionada con su capacidad necrotrófica (Franco, 2019).

IV.4.2 Estudio de la característica biológica y química del sobrenadante de los cultivos fúngicos

En base a estos resultados, se puede inferir que la característica fotoquímica del sobrenadante CIDEFI 300 se debe a una amplia gama de compuestos secretados. Además, la ausencia de síntomas de moho de hoja en las hojas desprendidas sugiere que estos compuestos, incluidos los COVs identificados y no identificados, no tienen la capacidad de provocar alteraciones fisiológicas que devengan en síntomas, al menos en la concentración ensayada.

Estos resultados muestran que *F. fulva* sintetiza y secreta compuestos antimicrobianos que repelen insectos, por lo que podrían otorgarle al hongo ventajas adaptativas y de crecimiento. De acuerdo con su comportamiento biotrófico parece que el patógeno, secreta compuestos que no sólo estimulan el crecimiento de las plantas y su sanidad, sino que también actúan sobre los competidores, así como los insectos.

IV.5 Conclusiones

En resumen, *F. fulva*, sintetiza y libera cuantitativamente menos COVs que *S. lycopersici*, hongo necrotrofico, probablemente debido al diferente tipo de interacción que cada hongo establece con Tomate; sin embargo, *F. fulva* sintetizó un espectro específico y más diverso de COVs, que contrasta con la cantidad de COVs liberada por *S. lycopersici* que son hongos necrotrofos.

La producción de alcoholes furfurilo y compuestos derivados por *F. fulva* y *S. lycopersici* está asociado al desarrollo de síntomas en las hojas de tomate.

F. fulva produce compuestos que contribuyen a la colonización de los tejidos. Estudios futuros deberían dilucidar las funciones de los diversos COVs sintetizados por *F. fulva*.

Este es el primer trabajo en describir en detalle el perfil de COV sintetizados por los hongos *Fulvia fulva* y el control *S. lycopersici*.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

V.1 Conclusiones.

El aislamiento de *Fulvia fulva*, agente causal del *moho de la hoja de tomate*, a través de la inoculación de esporas del hongo recuperadas a partir de hojas de tomate con síntomas típicos de la enfermedad e inoculándolas en agar agua permitió recuperar el hongo, lo que se confirmó por la coloración violácea típica que generan estos cultivos, característicos de la especie y distintivo de otros *Cladosporium s.p.*

El crecimiento lento de *Fulvia fulva* es una característica intrínseca de la especie.

La amplificación y secuenciación de la región Intergénica del ARN (ITS) y de los genes de avirulencia y de las secuencias de las proteínas Ecp fueron los elementos que confirmaron la identidad de los aislados como *Fulvia fulva*.

La amplificación y secuenciación de los genes *avr* de *Fulvia fulva* permitió identificar las razas del hongo en un corto tiempo evitando así el test en planta que consume más tiempo y espacio.

Los nuevos aislados de *Fulvia fulva* pertenecen a las razas 2 y 0, cuya presencia ya habían sido reportadas en cultivos de tomate en la Argentina.

Los marcadores moleculares ISSR mostraron la variabilidad genética de los aislados de *Fulvia fulva*, que no estuvo relacionada con el cultivar de donde se obtuvo el aislado, ni con el sitio de muestreo, ni con la raza.

El nivel de polimorfismo encontrado en los genes de avirulencia es importante y similar a lo encontrado en los genes que codifican las proteínas extracelulares que secreta *Fulvia fulva* y que cumplen un rol de virulencia.

Se obtuvieron y compararon las secuencias de las proteínas Ecp sintetizadas por el *Fulvia fulva*.

Fulvia fulva sintetiza pigmentos oscuros de la familia de las melaninas tipo DHN, cuyas características fotoquímicas son similares a una melanina-DOPA comercial.

Fulvia fulva sintetiza también otros pigmentos derivados de la vía de los policétidos. La frecuencia de polimorfismos en los genes de avirulencia y en las secuencias de las proteínas Ecp indicó que los aislados de las dos razas están evolucionando a nivel de los genes de virulencia.

Las razas identificadas indican que el moho de la hoja del tomate se puede controlar cultivando híbridos de tomate conteniendo uno o dos genes de resistencia. En los cultivos de tomate las dos razas del hongo están evolucionando probablemente debido a la presión de selección que establece el uso de cultivares resistentes y de fungicidas.

F. fulva sintetizó un espectro específico y más diverso de COVs. Que además contrasta con la cantidad de COVs liberada por representantes de *S. lycopersici* que son hongos necrotróficos.

El perfil de metabolitos secundarios volátiles de *Fulvia fulva* es complejo

V.2 Consideraciones finales

Estudios futuros deberían estar dirigidos a realizar mutaciones puntuales en los genes *avr* y en la secuencia de las proteínas ECP con el fin de identificar el rol de las mismas en la interacción hongo-tomate, es decir en el proteoma de plantas infectadas con *Fulvia fulva*.

CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA

VI.1 Bibliografía

Agosti G., J.H. Birkinshaw, P. Chaplen. (1962) Studies in the biochemistry of micro-organisms. Anthraquinone pigments of strains of *Cladosporium fulvum* Cooke. *Biochem J.*, 85(3) 528.

Agrios, G. N. (2005) *Plant Pathology*. San Diego: Academic Press (Elsevier Academic Press). doi:10.1016/j.plantsci.2005.02.019

Aguilera V.A. -Cogley, M. Berbegal, S. Català, F.C. Brentu, J. Armengol, A. Vicent. (2017) Characterization of Mycosphaerellaceae species associated with citrus greasy spot in Panama and Spain. *PLoS one.*, 12(12) e0189585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189585>.

Almeida J.R., Bertilsson M., Gorwa-Grauslund M.F., Gorsich S., Lidén G., (2009) Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 625. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1875-1>.

Almeida-Paes R., Figueiredo-Carvalho M.H.G., Brito-Santos F., Almeida-Silva F., Oliveira M.M.E., Zancoppe-Oliveira R.M., (2016). Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of Terbinafine, *PLoS One* 11 e0152796.

Almeida-Paes R., Frases S., de Araujo G., de Oliveira M.M., Gerfen G.J., Nosanchuk J.D., Zancoppe-Oliveira R.M., (2012) Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 8623e8630.

Almeida-Paes R., Frases S., Fialho-Monteiro P.C., Gutierrez-Galhardo M.C., Zancoppe-Oliveira R.M., Nosanchuk J.D., (2009) Growth conditions in Fluence

melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates, *Microbes Infect.* 11 554e562.

Andersen R.A., Hamilton-Kemp T.R., Hildebrand D.F., McCracken Jr C.T., Collins R.W., et al., (1994). Structure-antifungal activity relationships among volatile C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones, and alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 42 1563-1568.

Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P. and Mundy, J 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.*, 24(14), , p. 2579-2589.

Argerich, C. & Troilo, L. (2011) *Buenas Prácticas Agrícolas en la Cadena de Tomate*. (FAO).

Arimura G.I., Kost C., Boland W., (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.* 1734 91-111. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.03.001>.

Azeem M., Rajarao G.K., Nordenhem H., Nordlander G., Borg-Karlson A.K., (2013) *Penicillium expansum* volatiles reduce pine weevil attraction to host plants. *J. Chem. Ecol.* 39 120-128. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0232-5>.

Baires-Varguez L, Cruz-García A, Villa-Tanaka L, Sánchez-García S, Gaitán-Cepeda LA, Sánchez-Vargas LO, et al. (2007) Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol.*;24:148-151.

Ballaré, C.L. (2011) Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends Pl. Sci.*, In Press, Corrected Proof(12).

Bárcena A., M. Bruno, A. Gennaro, M.F. Rozas, M.V. Mirífico, P.A. Balatti, M.C.N. Saparrat. (2018). Melanins from two selected isolates of *Pseudocercospora griseola*

grown in-vitro: Chemical features and redox activity. *J Photochem Photobiol B, Biol.*, 186 207-215. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.07.019.

Barcena A., Petroselli G., Velasquez S.M., Estévez J.M., Erra-Balsells R., Balatti P.A., Saparrat M.C.N., (2015) Response of the fungus *Pseudocercospora griseola f. mesoamericana* to Tricyclazole, *Mycol. Prog.* 14 76.

Bashyal, B. M., Chand, R., Kushwaha, C., Sen, D., Prasad, L. C., & Joshi, A. K. (2010). Association of melanin content with conidiogenesis in *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 309-316.

Bell A.A. & Wheeler M.H.(1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol.*, 24 411–451.

Bergmann S, Funk AN, Scherlach K, Schroeckh V, Shelest E, Horn U, et al. (2010) Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 76:8143–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00683-10> PMID: 20952652

Beveraggi A, Mourichon X, Sallé G (1995) Etude comparée des premières étapes de l'infection chez les bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladie des raies noires. *Can J Bot* 73:1328–1337

Bingle L.E., Simpson T.J., Lazarus C.M.. (1999) Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet Biol.*, 26(3), 209-223.

Blancard, D. 2012 *A Colour Handbook. Tomato Diseases. Identification, Biology and Control*, (Manson Publishing Ltd.).

Bolton, M. D.; Esse, H. P. van, Vossen, J. H.; Jonge, Ronnie de, Stergiopoulos, I, Stulemeijer, I. J. E.; Berg, G. C. M van den, Borrás-Hidalgo, O.; Dekker, H. L.; Koster, C. G. de; Wit, P. J. G. M de; Joosten, M. H. A. J y Thomma, B. P. H. J. 2008: The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* 69(1), 119–136

Bond, T.E.T. (1938) Infection experiments with *Cladosporium fulvum* Cooke and related species. *Ann. Appl. Biol.* **25**, 277–307.

Bornet, B. & Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Report.* **19**, 209–215

Borowsky RL. (2001). Estimating Nucleotide Diversity From Random Amplified Polymorphic DNA and Amplified Fragment Length Polymorphism Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*;18(1):143-148.

Braun, U; Crous, P.W; Dugan, F; Groenewald, J.Z y Hoog, G.S. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. Nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. Strⁿ. *Mycol. Progress* 2: 3-18.

Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H.B. and Mundy, J. (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.*, 47(4), p. 532-546.

Brown D.W., Yu J.H., Kelkar H.S., Fernandes M., Nesbitt T.C., Keller N.P., Adams T.H., Leonard T.J.. (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93(4) 1418-1422. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1418>.

Butler M.J. & Day A.W., (1998) Fungal melanins: a review, *Can. J. Microbiol.* 44 1115e1136. <https://doi.org/10.1139/w98-119>.

Butler, E. J & Jones, S.G. 1949: Tomato leaf mould, *Cladosporium fulvum* Cooke. *Macmillan*, London, pp. 123.

Cai XZ, Xu YP, and Zheng Z. 2002 [Avirulence genes of plant pathogens]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. Jan;18(1):5-9. *Chinese*. PMID: 11977599.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 553-556.

Cardoza Y.J., Alborn H.T., Tumlinson J.H., (2002). In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage *J. Chem. Ecol.* 28:161-174. <https://doi.org/10.1023/A:1013523104853>.

Cellini A., Buriani G., Rocchi L., Rondelli E., Savioli S., et al., (2018) Biological relevance of volatile organic compounds emitted during the pathogenic interactions between apple plants and *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Pathol.* 19 158-168. <https://doi.org/10.1111/mpp.12509>.

Chand R., Kumar M., Kushwaha C., Shah K., Joshi A.K., (2014) Role of melanin in release of extracellular enzymes and selection of aggressive isolates of *Bipolaris sorokiniana* in barley, *Curr. Microbiol.* 69 202e211.

Chiang Y.M., Meyer K.M., Praseuth M., Baker S.E., Bruno K.S et al., 2011. Characterization of a polyketide synthase in a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanine and naphtho- γ -pyrone *Fungal Genet. Biol.* 48: 230-437.

Chung K.R., Ehrenshaft M., Wetzel D.K., Daub M.E.. (2003) Cercosporin-deficient mutants by plasmid tagging in the asexual fungus *Cercospora nicotianae*. *Mol Genet Genomics.*, 270(2) 103-113. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0902-7>.

Chung KR, & Liao HL. 2008. Determination of a transcriptional regulator-like gene involved in biosynthesis of elsinochrome phytotoxin by the citrus scab fungus, *Elsinoe*

fawcettii. *Microbiology*; 154:3556–66. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019414-0>
PMID: 18957608.

Chupp, C & Sherf, A.F. 1960: Vegetable disease and their control. Pp. 541-545.

Collemare J., Griffiths S., Iida Y., Jashni M.K., Battaglia E., et al., 2014. Secondary metabolism and biotrophic lifestyle in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *PLoS One*. 9, e85877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085877>.

Collemare, J., & Lebrun M. H. 2011. "Fungal Secondary Metabolites: Ancient Toxins and Novel Effectors in Plant–Microbe Interactions." *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, 377–400.

Condit, R. & Hubbell, S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome* 34:66-71

Cooke, M.C. (1883) New American fungi. *Grevillea*, **12**, 32.

Cordero R.J., & Casadevall A. (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev.*, 31(2) 99-112. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.003>.

Crous, P. W., Kang, J. C., & Braun, U. (2001). A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia*, 93(6), 1081-1101.

Curtis, M. D; Gore, J & Oliver, R.P. 1994: The phylogeny of the tomato leaf mold fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Current Genetic* 25: 318-322.

Dadachova E., Bryan R.A., Huang X., Moadel T., Schweitzer A.D., Aisen P., Nosanchuk J.D., Casadevall A., (2007) Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi, *PLoS One* e457.

Davies, D. G., & Hodge P. 1974. "Chemistry of Quinones. Par V. Structure of Cladofulvin, a Bianthraquinone from *Cladosporium Fulvum* Cooke." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, no. 1: 2403–5.

De Bary, A., & Garnsey, H. E. F. (1887). *Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria*. Oxford: Clarendon Press

De Jonge, R, H. P van Esse, A Kombrink, T Shinya, Y Desaki, R Bours, S van der Krol, N Shibuya, M. H. A. J Joosten, and B Thomma. 2010. "Immunity in Plants." *Science* 329: 953–55. <https://doi.org/10.1126/science.1190859>

De Jonge, R, H. P van Esse, K Maruthachalam, M. D Bolton, P Santhanam, M. K Saber, Z Zhang, et al. 2012. "Tomato Immune Receptor Ve1 Recognizes Effector of Multiple Fungal Pathogens Uncovered by Genome and RNA Sequencing." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (13): 5110–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119623109>.

De Wit P.J.G.M, (2016) *Cladosporium fulvum* Effectors: Weapons in the Arms Race with Tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-011516-040249>.

De Wit, P. J .G .M. 1977. "A Light and Scanning-Electron Microscopic Study of Infection of Tomato Plants by Virulent and Avirulent Races of *Cladosporium Fulvum*." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83 (3): 109–22. <https://doi.org/10.1007/BF01981556>.

De Wit, P. J .G .M. 1992. "Molecular Characterization of Gene-For-Gene Systems in Plant-Fungus Interactions and the Application of Avirulence Genes in Control of Plant Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* 30 (1): 391–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002135>.

De Wit, P. J. G. M, Mehrabi R, van den Burg H. A, and Stergiopoulos I. 2009. "Fungal Effector Proteins: Past, Present and Future: Review." *Molecular Plant Pathology* 10 (6): 735–47. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00591.x>

De Wit, P. J. G. M. 1982. "Partial Characterization and Specificity of Glycoprotein Elicitors Present in Filtrates of Cultures and Cell Walls of *Cladosporium Fulvum*." *Active Defence Mechanisms in Plants*, 364–65.

De Wit, P.J.G.M., Van Der Burgt A., Ökmen B., Stergiopoulos I., Abd-Elsalam K. A., Aerts A. L., Bahkali A. H., et al. 2012. "The Genomes of the Fungal Plant Pathogens *Cladosporium Fulvum* and *Dothistroma Septosporum* Reveal Adaptation to Different Hosts and Lifestyles But Also Signatures of Common Ancestry." *PLoS Genetics* 8 (11): 23209441. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003088>.

Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., et al. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature.*, 434(7036) 980.

Desveaux, D., Subramaniam, R., Despres, C. and Brisson, N. 2004. A "whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Develop. Cell*, 6(2), p. 229-240.

Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada et al., InfoStat versión 2015l. Córdoba (2015) Universidad Nacional de Córdoba.

Dick, M. W. 2001 *Straminipilous Fungi*. (Springer Netherlands,). doi:10.1007/978-94-015-9733-3.

Dixón R. A. & Harrison M. J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:479-501

Dong C. & Yao Y., (2012) Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau, *J. Biosci. Bioeng.* 113 474e479.

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 185-209.

Edgar, R. C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

Ehrlich K.C., Chang P.K., Yu J., Cotty P.J.. (2004) Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Appl Environ Microbiol.* 70(11) 6518-6524. doi: 10.1128/AEM.70.11.6518-6524.2004.

Eisenman C.H. & Casadevall A., (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 931e940.

Elliott M. L. (1995) Effect of melanin biosynthesis inhibiting compounds on *Gaeumannomyces* species. *Mycologia.* 87(3) 370-374. doi:10.2307/3760835.

Ellis, M. B. 1971: Dematiaceous Hyphomycetes. *Commonwealth Mycological Institute*, Kew, Surrey, England, 608

Engl I., Nowrousian M., Kück U. (2007) Regulation of melanin biosynthesis via the dihydroxynaphthalene pathway is dependent on sexual development in the ascomycete *Sordaria macrospora*. *FEMS microbiol Lett.*, 275(1) 62-70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00867.x>.

Espagne E., Lespinet O., Malagnac F., Da Silva C., Jaillon O., et al.,... and P. Silar (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Genome Biol.*, 9(5) R77.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and windows. *Molecular Ecology Resources.*, 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.

Fermentas. (2006) Catálogo de marcadores de pesos moleculares para electroforesis de DNA: Lambda DNA markers. Disponible en: <http://www.fermentas.com/>

Fernandes B., T. Matamá, D. Guimarães, A. Gomes, A. Cavaco-Paulo. (2016) Fluorescent quantification of melanin. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 29(6) 707-712. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12535>.

Fernandez C.W. & Koide R.T., The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress, *Fungal Ecol.* 6 (2013) 479e486.

Flor H.H., (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9 275-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>.

Flor, H. H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32, 653–669.

Food and Agriculture Organization. (FAOSTAT). *United Nations* (2016). Available at: <http://faostat.fao.org/>.

Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D. and Tong, L 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *PNAS*, 102(5), p. 1773-1778.

Fox, R. T. V.1997: Fungal goes in your garden. Leaf Moulds. *Mycologist* 11:88.

Franco M.E.E. (2019). Mancha gris de la hoja del tomate: identificación, biología y genómica del agente etiológico (*Doctoral dissertation*, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).

Franco, M.E.E, Troncozo M.I, López S.M.Y, Lucentini G, Medina R, Saparrat M.C.N, L.B Ronco, and P.A Balatti. 2017. "A Survey on Tomato Leaf Grey Spot in the Two Main Production Areas of Argentina Led to the Isolation of *Stemphylium Lycopersici* Representatives Which Were Genetically Diverse and Differed in Their

Virulence.” *European Journal of Plant Pathology* 149 (4).
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1248-z>.

Frandsen R.J., Rasmussen S.A., Knudsen P.B., Uhlig S., Petersen D., Lysoe E., Gotfredsen C.H., Giese H., Larsen T.O., (2016) Black perithecial pigmentation in *Fusarium* species is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin, *Sci. Rep.* 6 26206.

French R.C., (1985) The bioregulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23 173–199.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.001133>.

Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S. & Oliver, R. P. (2008). Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.* **10**, 1421–1428.

Fulton T.R., N. Ibrahim, M.C. Losada, D. Grzegorski, J.S. Tkacz. A melanin polyketide synthase (PKS) gene from *Nodulisporium* sp. that shows homology to the pks1 gene of *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Gen Genet.*, 262(4-5) (1999) 714-720.
<https://doi.org/10.1007/s004380051133>.

Furia T.E. & Bellanca N., 1975, Fenaroli's Handbook of flavor ingredients, Second ed., Vol. 2, *CRC Press*, Francis & Taylor, Cleveland, OH. ISBN 0-87819-533-5.

Gadd G.M. (1982) Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi*. *Mycol Res* (ISSN 0007-1536), 78(1) 115-122. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(82\)80083-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80083-1).

Galagan J.E., S.E. Calvo, C. Cuomo, L.J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S.I. Lee... and B.W. Birren. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature.*, 438(7071) 1105.

Gallas J.M. & Eisner M.. (1987) Fluorescence of melanin - dependence upon excitation wavelength and concentration. *Photochem Photobiol.*, 45(5) 595-600. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb07385.x>.

Geib E., Gressler M., Viediarnikova I., Hillmann F., Jacobsen I.D., Nietzsche S., Hertweck C., Brock M., (2016) A non-canonical melanin biosynthesis pathway protects *Aspergillus terreus* conidia from environmental stress, *Cell Chem. Biol.* 23 587e597.

Gilbert G.S & Parker I.M., (2010) Rapid evolution in a plant - pathogen interaction and the consequences for introduced host species. *Evol. Appl.* 3 144-156. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00107.x>.

Glazebrook, J. 2005, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann. Rev. Phytopa.*, 43(1), p. 205-227.

Goodwin, S.B.; Dunkle, L.D., Zismann, V.L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648–658.

Gorsich S., Slininger P., McCaffery J., Baltmr M., (2006) The fermentation inhibitor furfural causes cellular damage to *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechno Fuels and Chemicals Symposium Proceedings* 4–16.

Grant, M. & Lamb, C. 2006, Systemic immunity. *Curr. Op. Pl. Bio.*, 9(4), p. 414-420.

Graziani S., Vasnier C., Daboussi M.J.. (2004) Novel polyketide synthase from *Nectria haematococca*. *Appl Environ Microbiol.*, 70(5) 2984-2988. doi: 10.1128/AEM.70.5.2984-2988.2004.

Griffiths S., C.H. Mesarich, B. Saccomanno, A. Vaisberg, P.J.G.M. de Wit, R. Cox, J. Collemare. (2016) Elucidation of cladofulvin biosynthesis reveals a cytochrome P450

monooxygenase required for anthraquinone dimerization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 113(25) 6851-6856. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603528113>.

Griffiths S., C.H. Mesarich, E.J. Overdijk, B. Saccomanno, P.J.G.M. de Wit, J. Collemare. (2018) Down - regulation of cladofulvin biosynthesis is required for biotrophic growth of *Cladosporium fulvum* on tomato. *Mol Plant Pathol.* 19(2) 369-380. <https://doi.org/10.1111/mpp.12527>.

Griffiths S.. The secondary metabolome of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL (2015) ISBN 978-94-6257-581-3.

Groenhagen U., Baumgartner R., Bailly A., Gardiner A., Ebert L., et al., (2013) Production of bioactive volatiles by different Burkholderia ambifaria strains. *J. Chem. Ecol.* 39 892–906. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0315-y>.

Hampson M.C., Amarowicz R., Shahidi F., (1996) The presence of melanin in *Synchytrium endobioticum*, *Mycologia* 4 647e650.

Hane J K, Paxman J, Jones D A B, Oliver R P and de Wit P (2020) “CATASrophy,” a Genome-Informed Trophic Classification of Filamentous Plant Pathogens – How Many Different Types of Filamentous Plant Pathogens Are There? *Front. Microbiol.* 10:3088. doi: 10.3389/fmicb.2019.03088

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. 2010, Effect of exogenous salicylic acid under changing environment. *Environ. Experim. Bota.*, 68(1), p. 14-25.

Hazelwood L.A., Daran J.M., Van Maris A.J.A., Pronk J.T., Dickinson J.R., (2008) The Ehrlich Pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 2259-2266. DOI: 10.1128/AEM.02625-07.

Heath, M. C. 2000. "Hypersensitive Response-Related Death." *Plant Molecular Biology*, no. 44: 321–34.

Henson J.M., M.J. Butler, A.W. Day (1999). The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev of phytopathol.*, 37(1) (1999) 447-471. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.447>.

Hignett & Kirkham. (1967). The role of extracellular melanoproteins of *Venturia inaequalis* in host susceptibility. *Journal of General Microbiology*, 48, 269-275.

Holliday, P & Mulder, J. L. 1976. C.M.I Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 48. *Fulvia fulva*. *Commonwealth Mycological Institute, Kew*.

Holopainen J.K., Gershenzon J., (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* 15 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.006>.

Huang C.J., JTsai. F., Chang S.Y., Yang H.P., Wu W.S, et al., (2012). Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L Pest Manage. *Sci.* 68 1306–1310. <https://doi.org/10.1002/ps.3301>.

Indec 2018 Censo Nacional Agropecuario. <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-8-87>

Iakovidis, M., Soumpourou, E., Anderson, E., Etherington, G., Yourstone, S., & Thomma, C. .2019. "Genes encoding recognition of the *Cladosporium fulvum* effector protein Ecp5 are encoded at several loci in the tomato genome". *bioRxiv*, 759761

Iida, Y, P van 'T Hof, H Beenen, C. H Mesarich, M Kubota, I Stergiopoulos, R Mehrabi, et al. 2015. "Novel Mutations Detected in Avirulence Genes Overcoming Tomato Cf Resistance Genes in Isolates of a Japanese Population of *Cladosporium Fulvum*." *PLoS ONE* 10 (4): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123271>.

James, T. Y., Porter, T. M. & Martin, W. W. 2014 Blastocladiomycota. in *Systematics and Evolution* 177–207 (Springer Berlin Heidelberg,). doi:10.1007/978-3-642-55318-9_7

Jashni M.K., Mehrabi R., Collemare J., Mesarich C.H., De Wit P.J.G.M., (2015) The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* 6 584. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00584>.

Jones D.T. & Woods D.R., (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50 484–524.

Jones D.T., W.R. Taylor, J.M. Thornton. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci.* 8 275-282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>.

Jones J.B., Zitter T.A., Mormal T.M., Miller S.A. 2014., Compendium of tomato diseases and pests, second ed., American Phytopathological Society, Saint Paul, MN, ISBN: 978-0-89054-434-1.

Jones M., Pierce J.S., (1964) Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70 307–315.

Jones, D. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–9

Jones, D. A; Thommas, C. M; Hammond-Kosak, K. E; Balint- Kurti, P. J y Jones, J. D. G. 1994: Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 226: 789-790.

Joosten, M. H. A. J., & De Wit, P. J. G. M. (1999). The Tomato-*Cladosporium fulvum* Interaction: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. *Annual review of phytopathology*, 37(1), 335-367.

Joosten, M. H. A. J.; Cozijnsen, T. J y Wit, P. J. G. M.de.1994: Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367, 384 – 386.

Joosten, M.H.A.J., Hendrickx, L.J.M. and De Wit, P.J.G.M. (1990). Carbohydrate composition of apoplastic fluids isolated from tomato leaves inoculated with virulent or avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn *Fulvia fulva*). *Neth. J. Plant Pathol* **96**, 103 – 112.

Jun-Zhi Q, Zhi-Peng H, Jie-Ru P, Xue-Qin X, Yan-Ping Z, Fang F, et al. 2005 RAPD and large subunit nuclear rDNA sequence analyses of the entomogenous fungus *Aschersonia*. *Chinese J. Agricul Biotechnol.*;2:85-90.

Kanchiswamy C.N., Malnoy M., Maffei M.E, (2015) Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends Plant Sci.* 20 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.004>.

Kayatz P., G. Thumann, T.T. Luther, J.F. Jordan, K.U. Bartz–Schmidt, P.J. Esser, U. (2001) Schraermeyer. Oxidation causes melanin fluorescence. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42 241–246.

Kearse, M, R Moir, A Wilson, S Stones-Havas, M Cheung, S Sturrock, S Buxton, et al. 2012. “Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data.” *Bioinformatics* 28 (12): 1647–49. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

Keller N. P (2018) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 17 167-180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>.

Keller N. P., Turner G., Bennett J.W., (2005) Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>.

Keon J. & Hargreaves J.. (1998) Isolation and heterologous expression of a gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the wheat leaf-spot pathogen, *Mycosphaerella graminicola*. *FEMS Microbiol Lett.*, 161(2) 337-343. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12966.x>.

Kim Y.T, Lee Y.R., Jin J., Han K.H., Kim H., Kim J.C., Lee T., Yun S.H., Lee Y.W., (2005) Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol.*, 58(4) 1102-1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04884.x>.

Kogej T., M.H. Wheeler, R.T. Rižner, N. Gunde-Cimerman. (2004) Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiol Lett.*, 232 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00073-4).

Koide R.T., Fernandez C., Malcolm G., (2014) Determining place and process: functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function, *New Phytol.* 201433e439.

Korolev, N., David, D.R. and Elad, Y. 2008, The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *A. thaliana*. *Biocontrol*, 53(4), p. 667-683.

Kowalski T., K. Nawrot - Chorabik K, B. Grad, K. Leszczyński. (2016) Influence of culture conditions on medium discoloration and mycelial growth of *Dothistroma septosporum*. *For Pathol.*, 46(5) 507-514. <https://doi.org/10.1111/efp.12243>.

Krüger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S.K., Mulder, L. and Jones, J.D.G. (2002) A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science*, **296**, 744–747.

Kruijt, M., De Kock, M.J.D. and De Wit, P.J.G.M. (2005) Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 85–97.

Kumar S., G. Stecher, K. Tamura. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.*, **33** 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

Kuo, M. J., & Alexander, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology*, **94**, 624-629.

Lamari L. (2002) Assess: image analysis software for plant disease quantification. *APS press*.

Langfelder K., Streibel M., Jahn B. Haase G., Brakhage A.A. 2003 Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 143-158.

Laugé, R, M. H. A. J Joosten, G. F. J. M Van den Ackerveken, H. W. J Van den Broek, and P. J .G .M De Wit. 1997. “The in Planta-Produced Extracellular Proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium Fulvum* Are Virulence Factors.” *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **10** (6): 725–34. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.6.725>.

Laugé, R, M. H. A. J Joosten, J. P. W Haanstra, P. H Goodwin, P Lindhout, and P. J. G. M De Wit. 1998. “Successful Search for a Resistance Gene in Tomato Targeted against a Virulence Factor of a Fungal Pathogen.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95** (15): 9014–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9014>.

Laugé, R, P. H Goodwin, P. J .G .M De Wit, and M. H. A. J Joosten. 2000. “Specific HR-Associated Recognition of Secreted Proteins from *Cladosporium Fulvum* Occurs in Both Host and Non-Host Plants.” *Plant Journal* **23** (6): 735–45. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00843.x>.

Lazarovits G. & Stoessl A. (1988). Tricyclazole induces melanin shunt products and inhibits altersolanol A accumulation by *Alternaria solani*. *Pestic Biochem Physiol.*, *31*(1) 36-45. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(88\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0048-3575(88)90026-0).

Lazarovits, G. & Higgins, V.J. (1976b) Ultrastructure of susceptible, resistant, and immune-reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.* **54**, 235–249.

Lewis, D. (1973). Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.* *48*, 261–277. doi: 10.1111/j.1469-185x.1973.tb00982.x.

Li F., Xue F., Yu X., (2017) GC – MS, FTIR and raman analysis of antioxidant components of red pigments from *Stemphylium lycopersici*. *Curr. Microbiol.* *74* 532-539. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1220-3>.

Li N., Alfiky A., Vaughan M.M., Kang S., (2016) Stop and smell the fungi: fungal volatile metabolites are overlooked signals involved in fungal interaction with plants. *Fungal Biol. Rev.* *30* 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.004>.

Li N., Wang W., Bitas V., Subbarao K., Liu X., et al., (2018). Volatile compounds emitted by diverse *Verticillium* species enhance plant growth by manipulating auxin signalling *Mol. Plant-Microbe Interact.* *31* 1021-1031. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0263-R>.

Lindhout, P, W Korta, M Cislik, I Vos, and T Gerlagh. 1989. "Further Identification of Races of *Cladosporium Fulvum* (*Fulvia Fulva*) on Tomato Originating from the Netherlands France and Poland." *Netherlands Journal of Plant Pathology* *95* (3): 143–48. <https://doi.org/10.1007/BF01999969>.

Lingappa B.T., Prasad M., Lingappa Y., Hunt D.F., Biemann K., (1969) Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science.* *163* 192–194. DOI: 10.1126/science.163.3863.192.

Llorente C., A. Bárcena, J.V. Bahima, M.C.N. Saparrat, A.M. Arambarri, M.F. Rozas, M.V. Mirífico, P.A. Balatti. (2012) *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 produces the 1, 8-dihydroxynaphthalene-melanin-like compound and carries a putative pks gene. *Mycopathologia.*, 174(5-6) 397-408. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9558-3>.

Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., ... & Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual review of plant biology*, 66, 513-545.

Lorenz M.C., Cutler N.S., Heitman J., (2000) Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 11 183–199. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.183>.

Lucentini, C. G., Medina, R., Franco, M. E., Saparrat, M. C., & Balatti, P. A. (2021). *Fulvia fulva* [syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic avr and ecp gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 159(3), 525-542.

Luderer R., De Kock M.J.F., Dees R.H.L., De Wit P.J.G.M., Joosten M.H.A.J., Functional analysis of cysteine residues of ecp elicitor proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant Pathol.* 3 (2002a) 91–95. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00095.x>.

Luderer, R, F. L. W Takken, P. J. G. M De Wit, and M. H. A. J Joosten. (2002b) "Cladosporium Fulvum Overcomes Cf-2-Mediated Resistance by Producing Truncated AVR2 Elicitor Proteins." *Molecular Microbiology* 45 (3): 875–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03060.x>.

Maffei M.E., (2010) Sites of synthesis , biochemistry and functional role of plant volatiles. *S. Afr. J. Bot.* 76 612–631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Makemson (1918): The leaf mould of tomatoes caused by *Cladosporium fulvum*.
Michigan Acad Sci. Ann. Rept. 20: 309-348

Mandal P., Roy T.S., Das T.K., Banerjee U., Xess I., Nosanchuk J.D., (2007) Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study, *Braz. J. Microbiol.* 38 662e666.

Martínez-Medina A., Van Wees S.C., Pieterse C.M., (2017) Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Environ.* 40 2691–2705. <https://doi.org/10.1111/pce.13016>.

Mayer, A.M., Staplesb, R.C. and Gil-ad, N.L. 2001, Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, 58(1), p. 33-41.

Mayorga M.E. & Timberlake W.E. (1992) The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Mol Gen Genet.*, 235(2-3) 205-212. <https://doi.org/10.1007/BF00279362>.

Medina, R., López, S. M., Franco, M. E., Rollan, C., Ronco, B. L., Saparrat, M. C., ... & Balatti, P. A. (2015). A survey on occurrence of *Cladosporium fulvum* identifies race 0 and race 2 in tomato-growing areas of Argentina. *Plant disease*, 99(12), 1732-1737.

Medina R., David Gara P.M., Fernández-González A.J., Rosso J.A., Del Panno M.T., Remediation of a soil chronically contaminated with hydrocarbons through persulfate oxidation and bioremediation. *Sci. Total Environ.* 618 (2018) 518-530. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.326>.

Meredith P. & Riesz J.. (2004) Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol.*, 79(2) 211-216. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00012.x>.

Mesarich, C. H, B Ökmen, H Rovenich, S. A Griffiths, C Wang, M Karimi Jashni, Al Mihajlovski, et al. 2017. "Specific Hypersensitive Response–Associated Recognition of New Apoplastic Effectors from *Cladosporium Fulvum* in Wild Tomato." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31 (1): 145–62. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-17-0114-FI>.

Mesarich, C. H, S. A Griffiths, A van der Burgt, B Ökmen, H. G Beenen, D. W Etalo, M. H. A. J Joosten, and P. J. G. M M De Wit. 2014. "Transcriptome Sequencing Uncovers the Avr5 Avirulence Gene of the Tomato Leaf Mold Pathogen *Cladosporium Fulvum*." *Molecular Plant Microbe Interaction* 27 (8): 846–57.

Mitina GV, Mikhailova LA, Mattila TY. 2008 RAPD-PCR, UP-PCR and rDNA sequence analyses of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* and its pathogenicity towards insects and phytopathogenic fungi. *Arch of Phytopathol and Plant Prot.*;41(2):113-128.

Montes-Avila J., M. Ojeda-Ayala, G. López-Angulo G, J.F. Pío-León, S.P. Díaz-Camacho, A. Ochoa-Terán, F. Delgado-Vargas. (2018) Physicochemical properties and biological activities of melanins from the black-edible fruits *Vitex mollis* and *Randia echinocarpa*. *Sens Instrum Food Qual Saf.*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9812-6>.

Mysore, K. & Ryu, C. 2004, Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Pl. Sci.*, 9(2), p. 97-104.

Naznin H.A., Kimura M., Miyazawa M., Hyakumachi M. Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth

promotion effects on tobacco (2013). *Microbes and environment*. 28 42-49.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12085>.

Naznin H.A., Kiyohara D., Kimura M., Miyazawa M., Shimizu M., et al. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana* (2014). *PLoS One*. 9, e86882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086882>.

Nierman W.C., A. Pain, M.J. Anderson, J.R. Wortman, H. Stanley Kim, J. Arroyo, M. Berriman, ... and D.W. Denning. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature.*, 438(7071) 1151.
doi:10.1038/nature04332.

Nighswander-Rempel S.P., J. Riesz, J. Gilmore, J.P. Bothma, P. Meredith. (2005a). Quantitative fluorescence excitation spectra of synthetic eumelanin *J Phys Chem B.*, 109(43) 20629-20635. doi: 10.1021/jp053704.

Nighswander-Rempel S.P., J. Riesz, J.Gilmore, P. Meredith. (2005b).A quantum yield map for synthetic eumelanin *J Chem Phys.*, 123(19) 194901.
<https://doi.org/10.1063/1.2075147>.

Norris D.M. 2018, Insect Attractants and Repellents, in: CRC Press (Taylor & Francis Group), *Handbook of Natural Pesticides*, Boca Raton, FL 33487-2742, pp. 135-149.

Nosanchuk J.D., R.E. Starkand, A. Casadevall, (2015) Fungal melanin: what do we know about structure? *Front. Microbiol.* 6 1463.

Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, 5(4), 203-223.

Ökmen B., J. Collemare, S. Griffiths, A. Burgt, R. Cox, P.J.G.M. de Wit (2014). Functional analysis of the conserved transcriptional regulator CfWor1 in *Cladosporium*

fulvum reveals diverse roles in the virulence of plant pathogenic fungi. *Mol Microbiol.*, 92(1) 10-27. <https://doi.org/10.1111/mmi.12535>.

Ökmen, B., D. W. Etalo, M. H. A. J. Joosten, H. J. Bouwmeester, R. C. H. de Vos, J. Collemare, and P. J. G. M. De Wit. 2013. "Detoxification of α -Tomatine by *Cladosporium Fulvum* Is Required for Full Virulence on Tomato." *New Phytologist* 198 (4): 1203–14. <https://doi.org/10.1111/nph.12208>.

Oliver, R. P. & Solomon, P. S. (2010). New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 415–9.

Orlowski M., (1991) Mucor dimorphism, *Microbiol. Rev.* 55 234e258.

Ozturk I.K., P. Chettri, P.Y. Dupont, I. Barnes, R.L. McDougal, G.G. Moore, A. Sima, R.E. Bradshaw. (2017) Evolution of polyketide synthesis in a Dothideomycete forest pathogen. *Fungal Genet Biol.*, 106 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.07.001>.

Pal A.K., D.U. Gajjar, A.R. Vasavada. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Med Mycol.*, 52(1) (2013) 10-18. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.826879>.

Pal A.K., Gajjar D.U., Vasavada A.R., (2014) DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species, *Med. Mycol.* 52 10e18.

Palmer, C. L., & Skinner, W. (2002). *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology*, 3(2), 63-70.

Peralta, I. E. & Spooner, D. M. (2001) Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum L.* section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am. J. Bot.* **88**, 1888–1902.

Peralta, I. E., Spooner, D. M. & Knapp, S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). in *Systematic Botany Monographs* 186. doi:10.1126/science.113.2935.3

Perez-Nadales E., Nogueira M.F.A., Baldin C., Castanheira S., El Ghalid M., et al., (2014) Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 70 42–67. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>.

Perna G., M.C. Frassanito, G. Palazzo, A. Gallone, A. Mallardi, P.F. Biaji, V. Capozzi (2009). Fluorescence spectroscopy of synthetic melanin in solution. *J Lumin.*, 129(1) 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.07.014>.

Pfeil R.M., Mumma R.O., (1993) Bioassay for evaluating attraction of the phorid fly, *Megaselia halterata* to compost colonized by the commercial mushroom, *Agaricus bisporus* and to 1-octen-3ol and 3-octanone. *Entomol. Exp. Appl.* 69 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01736.x>.

Pieterse, C.M., Van Wees, S.C.M. and Van Loon, L. 2009, Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.*, p. 308- 316.

Pihet M., Vandeputte P., Tronchin G., Renier G., Saulnier P., Georgeault S., Mallet R., Chabasse D., Symoens F., Bouchara J.P., (2009) Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia, *BMC Microbiol.* 9 177.

Prados-Rosales R., Toriola S., Nakouzi A., Chatterjee S., Stark R., Gerfen G., Tumpowsky P., Dadachova E., Casadevall A., (2015) Structural characterization of melanin pigments from commercial preparations of the edible mushroom *Auricularia auricula*, *J. Agric. Food. Chem.* 63 7326e7332.

Prenafeta-boldú F.X., Roca N., Villatoro C., Vera L., G.S. De Hoog, (2019). Prospective application of melanized fungi for the biofiltration of indoor air in closed

bioregenerative systems J. Hazard. Mat. 361 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.059>.

Pusztahelyi T., Holb I.J., Pócsi I. (2015) Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front. Plant Sci.* 6 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>.

Rai, M. & Agarkar, G. (2014) Plant–fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? *Crit. Rev. Microbiol.* 1–11. doi:10.3109/1040841X.2014.958052

Reeves C.D., Hu Z., Reid R., Kealey J.T.. (2008) Genes for the biosynthesis of the fungal polyketides hypothemycin from *Hypomyces subiculosus* and radicicol from *Pochonia chlamydosporia*. *Appl Environ Microbiol.*, 74(16) 5121-5129. doi: 10.1128/AEM.00478-08.

Rivas, S, & C. M Thomma. 2005. “Molecular Interactions Between Tomato and the Leaf Mold Pathogen *Cladosporium Fulvum*.” *Annual Review of Phytopathology* 43 (1): 395–436. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140224>.

Rodrigues M.L., Nakayasu E.S., Almeida I.C., Nimrichter L., The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicle, *J. Proteomics* 97 (2014) 177e186.

Rollán, C.; Medina, R.; López, S.; Protto, V.; Vera Bahima, J.; Saparrat, M.; Ronco, L.; Balatti, P. 2013. Identification of Races 0 and 2 of *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*) on Tomato in the Cinturón Hortícola de La Plata, Argentina. *Plant Disease* 97 (7): 992. *Disease Notes* (<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0987-PDN>).

Rooney, H.C., Van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D., and de Wit, P.J. (2005) *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**: 1783–1786

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sánchez-Vallet, A, R Saleem-Batcha, A Kombrink, G Hansen, D. J Valkenburg, B. P. H. J Thomma, and J. R Mesters. 2013. "Fungal Effector Ecp6 Outcompetes Host Immune Receptor for Chitin Binding through Intrachain LysM Dimerization." *ELife* (2): 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.00790>.

Sansinenea E. & Ortiz A., (2015) Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides, *Biotechnol. Lett.* 37 483e490.

Saparrat M.C., Cabello M.N., Arambarri A.M., (2002) Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*, *Biotechnol. Lett.* 24 1375e1377.

Saparrat M.C.N., G.E. Fermoselle, S.A. Stenglein M.B. Aulicino, P.A. Balatti. (2009) *Pseudocercospora griseola* causing angular leaf spot on *Phaseolus vulgaris* produces 1, 8-dihydroxynaphthalene-melanin. *Mycopathologia*, 168(1) 41-47. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9194-8>.

Scharf D.H., Heinekamp T., Brakhage A.A., (2014) Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS Pathog.* 10 10–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003859>.

Schueuermann C., Steel C.C., Blackman J.W., Clark A.C., Schwarz L.J., et al., (2019). A GC–MS untargeted metabolomics approach for the classification of chemical differences in grape juices based on fungal pathogen *Food Chem.* 270 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.057>.

Selvakumar P., S. Rajasekar, K. Periasamy, N. Raaman. (2008) Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World J Microbiol Biotechnol.*, 24(10) 2125-2131. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9718-2>.

SENASA (2018).

<http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/hortalizas/informacion/informes-y-estadisticas>

Shimizu T, H. Kinoshita, S. Ishihara, K. Sakai, S. Sagai, T. Nihira. (2005) Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl Environ Microbiol.*, 71(7) 3453-3457. doi: 10.1128/AEM.71.7.3453-3457.2005.

Snoeiijers, S. S., Pérez-García, A., Joosten, M. H., & De Wit, P. J. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 493-506.

So KK, Chung YJ, Kim JM, Kim BT, Park SM, Kim DH. 2015. Identification of a polyketide synthase gene in the synthesis of phleochrome of the phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. *Mol. Cells.*;38:1105–10. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0208> PMID: 26612679

Song J., Leepipattanawit R., Deng W., Beaudry R.M., Hexanal vapor is a natural, metabolizable fungicide: inhibition of fungal activity and enhancement of aroma biosynthesis in apple slices (1996). *J. Am. Soc. Horticultural Sci.* 121 937–942.

Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., & Kamoun, S. (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), 1654-1659.

Splivallo R., Novero M., Berteaux C.M., Bossi S., Bonfante P., (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana* *New Phytologist*. 175 417–424. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02141.x>.

Stergiopoulos, I, and P. J .G .M De Wit. 2009. "Fungal Effector Proteins." *Annual Review of Phytopathology* 47 (1): 233–63..

Stergiopoulos, I; Groenewald, M; Staats, M; Lindhout, P; Crous, P. W y Wit, P. J. G. M. de. 2007b: Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection

of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology* 44 415–429.

Stergiopoulos, I; De Kock, M. J. D; Lindhout, P y de Wit, P. J. G. M. de. 2007a.: Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *MPMI* Vol. 20, No. 10, pp. 1271–1283. *The American Phytopathological Society*.

Sticher, L., Mauchmani, B. and Metraux, J.P. 1997, Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopa.*, 35(1), p. 235-270.

Sun S., Zhang X., Sun S., Zhang L., Shan S., Zhu H., (2016) Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure, *Food Chem.* 190 801e807.

Takano Y., Y. Kubo, K. Shimizu, K. Mise, T. Okuno, I. Furusawa. (1995) Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Gen Genet.*, 249(2) 162-167. <https://doi.org/10.1007/BF00290362>.

Thatcher, L.F., Anderson, J.P. and Singh, K.B. 2005, Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Funct. Pl. Bio.* 32(1), p. 1-19.

Thomma, C. M; Jones, D. A; Parniske, M; Harrison, K; Balint-Kurti, P. J; Hatzixanthis, K y Jones, J. D. G. 1997: Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequence that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *The Plant Cell*, Vol. 9, 2209-2224. American Society of Plant Physiologists.

Thomma B.P.H.J., Van Esse H.P., Crous P.W., De Wit P.J.G.M., (2005) *Cladosporium fulvum* (Syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a

model for functional studies on plant pathogenic mycosphaerellaceae. *Mol. Plant Pathol.* 6 379–393. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x>.

Thompson, J. D., D. G Higgins, and T. J Gibson. 1994. "ClustalW: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice." *Nucleic Acids Research* *Acids Res* 22 (22): 4673–80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

Thrower, L. B. (1966). Terminology for plant parasites. *J. Phytopathol.* 56, 258–259. doi: 10.1111/j.1439-0434.1966.tb02261.x

Thywiben A., T. Heinekamp, H.M. Dahse, J. Schmalder-Ripcke, S. Niestzsche, P.F. Zipfel, A.A. Brakhage (2011). Conidial dihydroxynaphthalene melanin of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* interferes with the host endocytosis pathway. *Front Microbiol.*, 2 96. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00096>.

Toledo A.V., M.E.E. Franco, S.M.Y. Lopez, M.I. Troncozo, M.C.N. Saparrat, P.A. Balatti. (2017) Melanins in fungi: types, localization and putative biological roles. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 99 2-6. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004>.

Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V. and Vera, P. 1997, Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *MPMI*, 10(5), p. 624-634.

Trigos Á., Mendoza G., Espinoza C., Salinas A., Fernández J.J., et al., (2011) The role of macrosporin in necrotic spots. *Phytochem. Lett.* 4 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.12.007>.

Tsai H.F, Y.C. Chang, R.G. Washburn, M.H. Wheeler, K.J. Kwon-Chung. (1998) The Developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in

modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol.* 180(12) 3031-3038. doi: 0021-9193/98/\$04.0010.

Tseng M.N., Chung C.L., Tzean S.S. (2014), Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen, *PLoS One* 9 e90473.

Tyc O., Song C., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P., (2017) the ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol.* 25 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>.

US Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. (2016). Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.

Vagstad AL, Hill EA, Labonte JW, Townsend CA. 2012 Characterization of a fungal thioesterase having Claisen cyclase and deacetylase activities in melanin biosynthesis. *Chem. Biol.*; 19:1525–34. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.002> PMID: 23261597.

Vallad, G. E., & Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop science*, 44(6), 1920-1934.

Van de Ackerveken, G. F.; Kan, J. A. L. van; De Wit, P. J. G. M. de (1992): Molecular analysis of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant Journal* 2 (3): 359-366.

Van Den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H., Vervoort, J., & de Wit, P. J. (2006). *Cladosporium fulvum Avr4* protects fungal cell walls against hydrolysis by plant

chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1420-1430.

Van Den Burg, H.A., Spronk, C.A.E.M., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P.C., Vuister, G.W., De Wit, P.J.G.M. and Vervoort, J. (2004) Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein–protein interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 16786–16796

Van Esse H.P., Bolton M.D., Stergiopoulos I., De Wit P.J.G.M., Thomma B.P.H.J., The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20 (2007) 1092–1101. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1092>.

Van Esse, H. P., J. W van't Klooster, M. D Bolton, K. A Yadeta, P van Baarlen, S Boeren, J Vervoort, P. J. G. M De Wit, and B. P. H. J Thomma. 2008. “The *Cladosporium Fulvum* Virulence Protein Avr2 Inhibits Host Proteases Required for Basal Defense.” *The Plant Cell* 20 (7): 1948–63. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059394>.

Van Esse, H. P., Thomma, B. P. H. J; Klosostwe, J. W, van't y Wit, P. J. G. M de. 2006.: Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplasto. *Journal of Experimental Botany* 57 (3): 599-608.

Van Kan, J. A, Van Den Ackerveken, and P. J. G. M De Wit. 1991. “Cloning and Characterization of CDNA of Avirulence Gene Avr9 of the Fungal Pathogen *Cladosporium Fulvum*, Causal Agent of Tomato Leaf Mold.” *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 4, 52-59.

Vasanthakumar A., De Araujo A., Mazurek J., Schilling M., Mitchell R., (2015) Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by L-tyrosine, *Microbiology* 161 1211e1218.

Vaughn S.F., Spencer G.F., Shasha B.S., Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibits postharvest decay fungi (1993). *J. Food Sci.* 58 793–796. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09360.x>.

Videira S.I.R., J.Z. Groenewald, C. Nakashima, U. Braun, R.W. Barretto, P.J.G.M. de Wit, P.W. Crous. (2017) Mycosphaerellaceae—Chaos or clarity? *Stud Mycol.*, 87 257-421. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.003>.

Villarino M., Sandín-España P., Melgarejo P., De Cal A (2011)., High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peaches reduce *Monilinia laxa* infection by interfering with fungal melanin biosynthesis, *J. Agric. Food. Chem.* 59 3205e3213.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A. and Klessig, D.F. 2009, Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann. Rev. Phytopa.*, 47(1), p.177-206.

Vlot, A.C., Klessig, D.F. and Park, S.W. 2008, Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Op. Pl. Bio.*, 11(4), p. 436-442.

Von Dahl, C.C. & Bladwin, I. 2007, Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *J. Pl. Grow. Reg.*, 26(1), p. 201-209.

Walker C.A., Gomez B.L., Mora-Montes H.M., Mackenzie K.S., Munro C.A., Brown A.J.P., Gow N.A.R., Kibbler C.C., Odds F.C., (2010) Melanin externalization in *Candida albicans* depends on cell wall chitin structures, *Eukaryot. Cell* 9 1329e1342.

Wang Y., Feng K., Yang H., Yuan Y., Yue T., (2018) Antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral combination against: *Penicillium expansum* based on FT-IR fingerprint, plasma membrane, oxidative stress and volatile profile. *RSC Advances*. 8 5806–5815. DOI: 10.1039/C7RA12191A.

Wang Y., Aisen P., Casadevall A., (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action, *Infect. Immun.* 63 3131e3136.

Wang, D. & Seymour, G. B. (2017) Tomato Flavor: Lost and Found? *Molecular Plant* **10**, 782–784.

Weijn A., Bastiaan-Net S., Wichers H.J., Mes J.J., (2013) Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms, *Fungal Genet. Biol.* **55** 42e53.

Wen Y.Q., He F., Zhu B.Q., Lan Y.B., Pan Q.H., et al., (2014) Free and glycosidically bound aroma compounds in cherry (*Prunus Avium* L.). *Food Chem.* **152** 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.092>.

Westerink N., Brandwagt B.F., De Wit P.J.G.M., Joosten M.H.A.J., (2004) *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the *Cf-4* Locus (*Hcr9-4E*) by secretion of a stable *Avr4E* isoform. *Mol. Microbiol.* **54** 533–545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04288.x>.

Wheeler M.H. & Klich M.A.. (1995) The effects of tricyclazole, pyroquilon, phthalide, and related fungicides on the production of conidial wall pigments by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *Pestic Biochem Physiol.*, **52**(2) 125-136. <https://doi.org/10.1006/pest.1995.1037>.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18**(1), 315-322.

Wiermer, M., Feys, B.J. and Parker, J.E. 2005, Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Cur. Op. Pl. Bio.*, **8**(4), , p. 383-389.

Wubah D.A., Fuller M.S., and Akin D.E., (1991) Resistant body formation in *Neocallimastix* sp., an anaerobic fungus from the rumen of a cow, *Mycologia* **83** 40e47.

Wulff, B. B. H, A Chakrabarti, and D. A Jones. 2009. "Recognitional Specificity and Evolution in the Tomato– *Cladosporium Fulvum* Pathosystem." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22** (10): 1191–1202. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-10-1191>

Xin F., Dong W., Jiang Y., Ma J., Zhang W., et al., (2018). Recent advances on conversion and co-production of acetone-butanol-ethanol into high value-added bioproducts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 529–540. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1376309>.

Zeng J., R. Decker, J. Zhan. (2012) Biochemical characterization of a type III polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces toxytricini*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 166(4) 1020-1033. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9490-x>.

Zhang A., P. Lu, A.M. Dahl-Roshak, P.S. Paress, S. Kennedy, J.S. Tkacz, Z. An. (2003) Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pks1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics.*, 268(5) 645-655. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0780-4>.

Zheng L., Lv R., Huang J., Jiang D., (2010a) Isolation, purification, and biological activity of a phytotoxin produced by *Stemphylium Solani*. *Plant Dis.* 94 1231–1237. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-10-0183>.

Zheng L., Lv R., Li Q., Liu T., Huang J., et al., (2010b) Effect of SS-Toxin, a metabolite of *Stemphylium Solani*, on H⁺-ATPase activity and standard redox system in plasma membranes from seedlings leaves of garlic (*Allium Sativum*). *Eur. J. Plant Pathol.* 127 419-425.

Zou Y., Hu W., Ma K., Tian M., (2015) Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin and fractions from *Auricularia auricula* fruiting bodies, *Food. Sci. Biotechnol.* 24 15.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Del Capítulo II se produjo “*Fulvia fulva* [syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic *avr* and *ecp* gene sequences. (2021). *Eur J Plant Pathol* **159**, 525–542. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02181-9>. Artículo en el cual poseo la primer autoría (Lucentini et al., 2021).

Del Capítulo III se produjo “Identification of an intermediate for 1,8-dihydroxynaphthalenemelanin synthesis in a race-2 isolate of *Fulvia fulva* (syn. *Cladosporium fulvum*)” en la revista *Heliyon* 4 (2018) e01036. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01036, articulo en el cual comparto la primer autoria con la Dra Rocio Medina. (Lucentini and Medina et al. 2018)

Del Capítulo IV se produjo “Secondary metabolites synthesized by *Stemphylium lycopersici* and *Fulvia fulva*, necrotrophic and biotrophic fungi pathogen of tomato plants”, en la revista *Current Plant Biology* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100122> articulo en el cual poseo la segunda autoria detrás de la Dra Rocio Medina. (Medina, Lucentini, et al., 2019)