



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Licenciatura en Biotecnología y Biología molecular

“Caracterización morfológica y molecular de
aislamientos de *Cladosporium*.”

Trabajo Final de Grado

Alumna: Rocío Medina

Director: Ph.D. Pedro Balatti.

2011

El presente Trabajo Final de Grado de la Carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) y en el Instituto de Fitopatología Vegetal (INFIVE), de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, bajo la dirección del Dr. Pedro A. Balatti.



Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas por la formación brindada.

A mi papá por haber confiado en mí incondicionalmente. A mi mamá y a Rochi, por haberme apoyado y “bancado” todos estos años. Los quiero!!

A mi tío, Anto, Belu y Pani; gracias por estar siempre conmigo.

A Ange, gracias, sos una segunda mamá para mí!

A mis amigas incondicionales, que en todas las etapas de mi vida me apoyaron y acompañaron, gracias Bren, Chulis, Luli, Verito, Pao y Vick.

Al Dr. Pedro Balatti por su paciencia, atención, predisposición, por intentar enseñarme algo de todo lo que sabe, y por su confianza en mí.

A Silvina y Ale, gracias por TODO.

A Mario por transmitirme su pasión por los hongos.

A los chicos del INFIVE, Ismael, Darío, Pepe, Grace; Emi, Ernest y Car, quienes me apoyaron y ayudaron siempre.

A mis compañeros y amigos de la facu, Dami, Cami C, Cami L, Clarita, Cin; Euge, Iva, Ceci, gracias por la buena onda!!!

Índice general.

Capítulo 1. Introducción.

A. Cultivo de tomate.	
I. Generalidades.	9
II. Enfermedades.	
B. <i>Passalora fulva</i> y hongos dematiáceos del género <i>Cladosporium</i> .	14
I. Generalidades del Reino Fungi.	14
II. Taxonomía.	15
III. Filogenia.	17
C. Cladosporiosis.	19
I. Interacción compatible.	19
II. Interacción incompatible.	21
III. Patogenicidad y virulencia.	22
D. Técnicas moleculares.	23
I. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.	23
II. Marcadores moleculares: ISSRs.	26
III. Relojes moleculares: genes conservados.	27

Capítulo 2. Hipótesis y objetivos.

I. Hipótesis de trabajo.	30
II. Objetivo general.	30
III. Objetivos específicos.	30

Capítulo 3. Materiales y métodos.

A. Material biológico.	33
I. Origen de los aislamientos.	33

II. Cultivo <i>in vitro</i> .	34
B. Caracterización morfológica.	35
C. Patogenicidad.	36
I. Suspensión de conidios.	36
II. Inoculación de las plantas.	36
III. Reaislamiento e identificación del patógeno.	37
D. Extracción, purificación y cuantificación del ADN.	38
I. Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega.	38
II. Extracción de ADN mediante el protocolo CTAB.	38
III. Visualización y cuantificación del ADN extraído.	39
E. Caracterización molecular.	39
I. Amplificación de genes conservados.	39
• ITS.	39
• β Tubulina y Actina.	40
II. Amplificación de ISSRs.	42
III. Marcadores Raza Específicos. Genes <i>Avr</i> .	43
Capítulo 4. Resultados.	
A. Caracterización morfológica.	45
B. Patogenicidad.	48
C. Extracción de ADN.	50
D. Caracterización molecular.	51
Capítulo 5. Discusión.	64
Capítulo 6. Conclusiones.	71
Anexo.	74
Bibliografía.	79

Capítulo 1

Introducción

A. Cultivo de tomate.

I. Generalidades.

El tomate (*Solanum lycopersium* Miller) es una de las hortalizas que se encuentra más ampliamente distribuida en el mundo y además la de mayor valor económico. Debido a que la demanda del mismo está en constante aumento, la superficie sembrada con tomate está en permanente aumento y con ello su producción y comercialización. El incremento de la producción en las últimas décadas se debe principalmente a aumentos en el rendimiento y en menor proporción, a un aumento de la superficie cultivada (FAO, 2002). El principal productor mundial de tomate es China, que produce unas 33,8 millones de toneladas anuales. En segundo lugar Estados Unidos con 12,5 millones de toneladas, le siguen Turquía, India, Italia, Irán, y Egipto. La Argentina se sitúa en el lugar número 30 con una producción de 680.000 toneladas anuales (FAOSTAT, 2010).

En Argentina el cultivo de tomate es dentro de la producción hortícola indudablemente la actividad de mayor importancia económica. Si bien el cultivo se desarrolló en casi todo el país, existe una fuerte concentración de la actividad, dado que un 87,7% de la superficie nacional dedicada al cultivo se encuentran ubicadas en las Provincias de Corrientes y Buenos Aires (Corvo Dolcet, . 2005).

La provincia de Buenos Aires tiene dos grandes zonas dedicadas a esta producción, una en el cinturón verde que rodea a la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y La Plata, donde se destacan los municipios de La Plata y Florencio Varela y la otra en el cinturón verde de Mar del Plata que se

encuentra en el municipio de General Pueyrredón (Censo Nacional Agropecuario SAGPyA, 2008).

Según el censo hortícola del año 2005 de la provincia de Buenos Aires (Ministerio de Asuntos Agrarios, 2005) la región de La Plata produce 29.971 toneladas de tomate, de las cuales el 83 % se obtiene en cultivo bajo cubierta y aporta el 62 % del total de tomate que se produce en la provincia. En el caso del cinturón hortícola platense, la producción se caracteriza por ser bajo cubierta, tecnología que empezó a adoptarse a mediados de los 80's y que se consolidó durante los 90's, lo que fue acompañado por el desarrollo tecnológico del cultivo, (Gomez *et al.*, 2000, **Figura 1.I**). En esta zona, cuya principal ventaja comparativa es la cercanía a los centros de consumo más importantes del país, se cultivan alrededor de 280 has de tomate en invernáculo (Censo Hortícola de la Provincia de Buenos Aires, 2005).



Figura 1.I. Cultivo de Tomate bajo cubierta; La Plata.

II. Enfermedades del cultivo.

De la misma manera que el resto de los cultivos, la producción de tomate es afectada por un conjunto de enfermedades y plagas. Las enfermedades se definen como el conjunto de respuestas visibles (síntomas) e invisibles de las células y tejidos vegetales, al patógeno o a factores del medio ambiente que inducen alteraciones en la forma, función o integridad de la planta. Todo esto se traduce en un deterioro parcial del tejido y/o la muerte, que se reflejan en una pérdida de calidad y productividad de la planta (Wit *et al.*, 2002; Agrios, 2005). Las patologías resultan de la interacción de tres factores a través del tiempo (triángulo de la enfermedad, **Figura 1.II.**).

- Hospedante: planta.
- Patógeno: agente causal de la enfermedad.
- Ambiente: entorno físico químico.

Si bien el cultivo bajo cubierta significó implementar avances tecnológicos que tuvieron impactos productivos, esto también llevó a la aparición de nuevas patologías a veces más

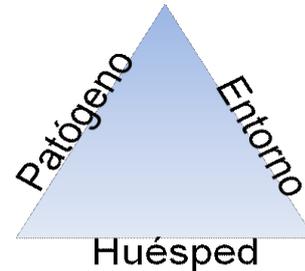


Figura 1.II. Triángulo de la enfermedad.

severas, que en el cultivo tradicional a campo. Esto último está relacionado principalmente por las diferencias en el manejo del cultivo, período de siembra, las variaciones climáticas, nutricionales y fisiológicas, entre otros factores que predisponen las plantas a la infección de los agentes patógenos (Marrero, 2003; Vida *et al.*, 2004).

Entre los agentes que causan enfermedades en las plantas se incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos así como las condiciones

ambientales desfavorables, tales como la falta o exceso de nutrientes, humedad y luz y la presencia de productos químicos. La importancia de los agentes patógenos en el país cambia según las zonas de cultivo y esto se debe a que las patologías surgen de la interacción del genotipo del patógeno, de la planta y del ambiente en el que ocurre la interacción. Esto quiere decir que los patógenos y las plantas hospedantes conviven, pero solo cuando se dan las condiciones ambientales apropiadas se desarrolla la enfermedad (Agrios, 2005).

En términos generales, los virus, hongos y las bacterias suelen tener una alta incidencia en el cultivo de tomate (**Tabla 1**; Ronco *et al.*, 2008, Jones *et al.*, 2001). En la actualidad una de las enfermedades que afecta con frecuencia los cultivos de tomate bajo cubierta es la cladosporiosis (Elad, 2003). Esta es conocida como Moho de la hoja del tomate, que tiene como agente etiológico a *Passalora fulva* (sin. *Cladosporium fulvum*. Cooke, 1883; sin *Fulvia fulva*. Braun *et al.*, 2003). Esta es una enfermedad que ataca a los cultivares comerciales de tomate cultivados bajo cubierta, si bien puede ocurrir en los cultivos a campo, cuando se dan condiciones de alta humedad. Esta patología puede comprometer seriamente la producción (Gabor & Wiebe, 1997).

	Agente Causal	Enfermedad
Virus	TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus)	Peste negra del tomate
Bacterias	<i>Clavibacter michiganense</i>	Chancro bacteriano
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Necrosis de la médula
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Peca bacteriana
	<i>Erwinia carotovora</i>	Podredumbre blanda del tallo
Hongos	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	Oidio
	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris
	<i>Passalora fulva</i>	Moho gris de la hoja
	<i>Geotrichum candidum</i>	Podredumbre agria
	<i>Phytophthora infestans</i>	Tizón tardío
	<i>Alternaria solani</i>	Tizón temprano
	<i>Septoria lycopersici</i>	Viruela
	<i>Verticillium dahliae</i>	Marchitamiento

Tabla 1. Enfermedades de alta incidencia del cultivo de tomate y sus agentes causales.

Los síntomas de la enfermedad aparecen en las hojas en las que se detectan manchas amarillas en el haz; observándose en el envés la presencia de conidios pardo oliváceos del hongo (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.*, 1997; Ho *et al.*, 1999). El primer síntoma es la aparición de una mancha clorótica en el haz de las hojas (**Figura 1.III**). En etapas más avanzadas de la enfermedad, los conidióforos emergen por los estomas. Esto último ocluye el estoma y genera alteraciones en el intercambio gaseoso y con ello en la respiración de la planta (Butler & Jones, 1949; Chupp & Sherf, 1960). En ataques severos, gran parte de la superficie foliar se ve afectada, reduciéndose así la capacidad fotosintética de la planta que se refleja en una reducción del rendimiento y en la calidad del fruto. En ataques severos se produce el marchitamiento de las hojas, lo que genera una defoliación parcial de la planta, pudiendo ocurrir la muerte de esta (Jones, 1997; Wit *et al.*, 2002).

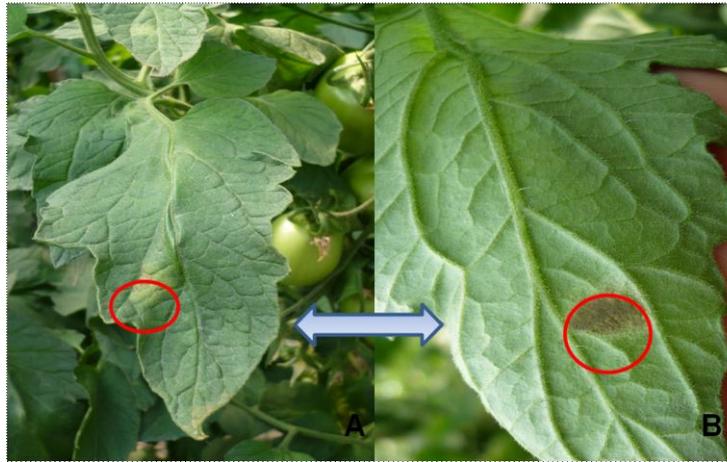


Figura 1.iii. Síntomas de cladosporiosis. A. Haz. B. envés correspondiente.

B. *Passalora fulva* y hongos dematiáceos del género *Cladosporium*.

I. Generalidades del Reino Fungi.

Los hongos pertenecen al grupo monofilético que conforman el Reino Fungi. Son organismos eucariotas, unicelulares o filamentosos. Su pared celular es rica en quitina y α -glucanos (Aleuxopoulus, C. & Mims, C 1985). Este Reino incluye cinco grandes entidades o phylas: phylum *Chytridiomycota*, phylum *Zygomycota*, phylum *Glomeromycota*, phylum *Ascomycota* y phylum *Basidiomycota*.

Los hongos son organismos heterótrofos que se nutren por absorción, en ellos se distinguen tres estrategias de obtención de materia orgánica: 1. A través de interacciones simbióticas, 2. A través de interacciones parásitas y 3. A través de interacciones saprótrofas. Estas últimas son las correspondientes a los

hongos que viven sobre materia orgánica muerta en descomposición que habitualmente se desarrollan en medios ácidos (pH entre 5,5 y 6).

Los hongos se caracterizan por tener un cuerpo vegetativo microscópico no diferenciado en tejidos y/u órganos, llamado talo, con formas unicelulares y/o filamentosas (hifas). Las hifas crecen por alargamiento de su ápice (crecimiento polarizado) y también se ramifican, denominándose al conjunto de las mismas micelio. El micelio se organiza y puede hasta formar pseudotejidos que constituyen estructuras somáticas macroscópicas y/o portadoras de esporas (cuerpos fructíferos). Las hifas pueden ser continuas, en ellas no se observan septos regulares y por lo tanto son multinucleadas; alternativamente las hifas pueden estar divididas por tabiques o septos simples o complejos, como en algunos hongos (*Ascomycota*, *Basidiomycota*).

Los hongos, son los únicos organismos que suelen tener dos nombres, uno correspondiente a su forma sexual (teleomorfo) y el otro nombre que corresponde a la forma asexual (anamorfo) del hongo.

Passalora fulva y las especies descritas dentro del género *Cladosporium sensu lato* pertenecen al phylum *Ascomycota*. En el caso de estos hongos, no diferencian estructuras producto de la reproducción sexual, pero sí diferencian estructuras asexuales, que son de gran utilidad en su identificación.

II. Taxonomía.

En el caso de hongos anamórficos la identificación se realiza a través de la conidiogénesis y de las estructuras diferenciadas. La clasificación de *Passalora fulva* es compleja y aún se encuentra en discusión (Cooke, 1883; Ciferri, 1952;

Arx, 1983; Aptroot, 2006). La introducción de un enfoque filogenético ha resultado en una simplificación de la ubicación taxonómica (Crous *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2001). *Passalora fulva* pertenece al género *Mycosphaerella* (Crous *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 2001, Crous *et al.*, 2007). Actualmente las especies de este género han sido diferenciadas de acuerdo a su morfología y análisis filogenéticos.

El género *Cladosporium* abarca hifomicetos dematiáceos (Ellis, 1971) que presentan ramoconidios y conidios con cicatriz de tipo coronar (David, 1997). Son anamorfos de *Davidiella*, clado hermano de *Mycosphaerella* (Schubert *et al.*, 2009). Es uno de los géneros más heterogéneos de los hifomicetes (Dugan *et al.*, 2008) e incluye entre otros a hongos endófitos, patógenos de humanos y fitopatógenos. El asco de las especies de *Davidiella* tienen inclusiones celulares irregulares (luces), que están ausentes en las especies de *Mycosphaerella* (Aproot 2006, Braun *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2007.; Crous *et al.*, 2009).

Los miembros de *Cladosporium* habitualmente se desarrollan en las plantas como saprótrofos en hojas senescentes, tallos muertos de especies herbáceas y leñosas. Sin embargo, también se los encuentra en lesiones necróticas de las hojas provocadas por otros hongos (Bensch *et al.*, 2010).

En la **Figura 1.IV** se muestra en términos generales la ubicación taxonómica de ambos géneros.

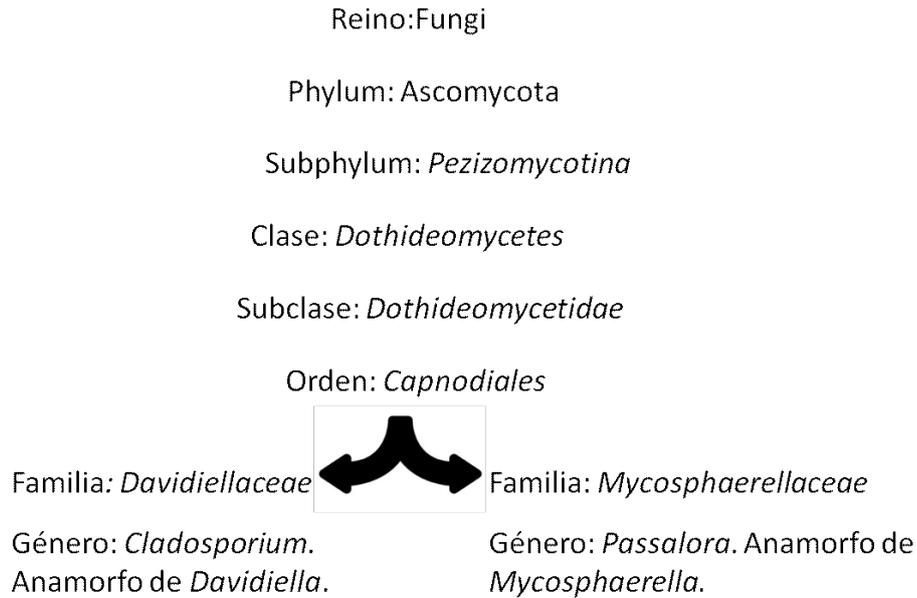


Figura 1.IV. Ubicación taxonómica.

III. Filogenia.

Un árbol filogenético describe las relaciones de parentesco, ancestría y descendencia, entre un conjunto de genes, organismos, especies o de taxa superiores. Un árbol consiste en nodos conectados por ramas. Los nodos terminales (OTUs: Unidad Taxonómica Operativa) representan secuencias u organismos de los que tenemos datos. Los nodos internos representan ancestros hipotéticos y el ancestro de todas las secuencias comprendidas en el árbol es la raíz del árbol (León Martínez Castilla, 2007).

El Método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) es un algoritmo de agrupamiento que une ramas en un árbol basándose en el criterio de maximizar la similitud entre pares y entre promedios de pares ya unidos. En sentido estricto, no es un método de distancia evolutiva (Li, 1997). UPGMA puede generar una topología acertada con las longitudes de

ramas verdaderas solo si la divergencia entre secuencias se apega a un reloj molecular (Swofford *et al.*, 1996), condición que raramente se cumple en la práctica.

Se parte del supuesto que cada especie es un grupo por sí solo. Luego se ingresan nuevos grupos y se calcula la distancia del conjunto tomando el promedio. Este proceso se repite hasta que todas las especies están conectadas en un solo grupo.

El método de la Máxima parsimonia es el que menor explicación de los resultados requiere ya que es el procedimiento que utiliza menos supuestos. Según este criterio, el árbol de máxima parsimonia es el que tiene menor número de sustituciones o cambios evolutivos en todas las secuencias que se derivan de un ancestro común (León Martínez Castilla, 2007).

Para cada sitio en la alineación, todos los árboles posibles son evaluados y se les asigna una puntuación, en función del número de cambios evolutivos necesarios para producir la secuencia de los cambios observados. El mejor árbol es el que minimiza el número total de mutaciones en todo el sitio.

Una vez que se obtiene una estimación de la filogenia que mejor describe las relaciones entre nuestros datos, es necesario evaluar la confiabilidad de dicha inferencia (Holder & Lewis, 2003). Una de las formas más comunes de evaluar la confiabilidad de una inferencia filogenética es el análisis de *bootstrap* (Efron, 1979; Felsenstein, 1985). El primer paso en un análisis de *bootstrap* es remuestrear con reemplazo, las columnas del alineamiento de secuencias. Es decir, en el alineamiento remuestreado (“de *bootstrap*”) determinada columna

de la alineación original puede aparecer dos o más veces, mientras que otras columnas pueden no estar representadas para nada.

Si se reconstruye un nuevo árbol con la alineación remuestreada y se obtiene un árbol similar al árbol obtenido con los datos originales, eso incrementa nuestra confianza en la construcción inicial. Alternativamente si el nuevo árbol se ve muy diferente del árbol original, es una indicación de poca confiabilidad o más exactamente, de que la información evolutiva está distribuida en forma muy heterogénea en los datos del alineamiento.

Al remuestrear numerosas veces, mil veces, se generan mil alineamientos de bootstrap y es posible asignar intervalos de confianza a cada rama interna del árbol. En general, el bootstrap se considera una medida conservadora de la confiabilidad (Hillis & Bull, 1993; Holder & Lewis, 2003; Felsenstein & Kishino, 1993; Efron *et al.*, 1996)

C. Cladosporiosis. Modelo de patosistema. Interacción gen a gen.

I. Interacción compatible.

La inoculación de las plantas de tomate susceptibles a la enfermedad, con cepas virulentas de *Passalora fulva*, resulta en la infección y el desarrollo de la enfermedad en la planta. A esta relación se la conoce como interacción compatible, es decir cuando la planta se enferma (Joosten & de Wit, 1999; Lauge *et al.*, 2000).

El ciclo del moho de la hoja del tomate comienza con la germinación de los conidios que sobreviven de un año a otro en los desechos vegetales, las semillas y el suelo (Yan *et al.*, 2007). Los conidios se adhieren principalmente

al envés de las hojas inferiores, donde germinan generando hifas que penetran a través de los estomas. El hongo prolifera en el apoplasto, es decir los espacios intercelulares, sin formar estructuras especializadas como apresorios o haustorios (Honee *et al.*, 1994). Una vez en el interior de la hoja, la hifa aumenta de tamaño, engrosa su diámetro y genera hifas secundarias que colonizan los espacios intercelulares del parénquima esponjoso (Lazarovits & Higgins, 1976 a, b; Wit, 1977). La pared de la célula vegetal, que se encuentra en contacto con la hifa, presenta una depresión que podría ser el resultado de la actividad de enzimas secretadas por el hongo. Cuando las condiciones de humedad son superiores al 85% y la temperatura oscila entre 24 y 26°C; en un período de 7-10 días, se produce la infección de las hojas y aparecen los primeros síntomas de la enfermedad. Estos son pequeñas manchas difusas de color verde pálido-amarillento, que luego se tornan amarillas en el haz (Blancard, 1992; Thomma *et al.*, 2005). En este momento a través de los estomas emergen los conidióforos (**Figura 1.V**; Perez García, 1999).

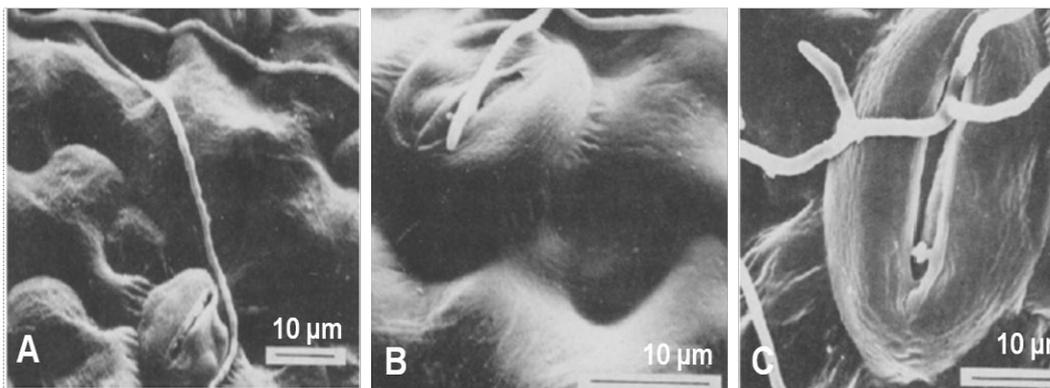


Figura 1.V Etapas de la interacción compatible. (de Wit 1977). A. 5 días post inoculación. B. 7 días post inoculación. C. Conidióforo emergiendo del estoma.

La mayor biomasa fúngica se concentra alrededor del tejido vascular, probablemente debido a la alta concentración de sacarosa que existe en el floema. *Passalora fulva* posee en su pared celular una Invertasa que hidroliza

la sacarosa del líquido apoplástico, generando así glucosa y fructosa; que son absorbidos y convertidos en manitol por la Manitol Deshidrogenasa fúngica, carbohidrato que no es metabolizado por la planta.

El control de la enfermedad es complejo ya que si bien se conocen genes de resistencia, la mayoría de los cultivares son susceptibles al hongo. Las variedades resistentes son de uso limitado debido a que el hongo muta fácilmente generando en un período de tiempo corto nuevas razas. El método de control consiste en la aplicación semanal de fungicidas de contacto y sistémicos (MINIAGRI, 2006).

II. Interacción incompatible.

Cuando las plantas de tomate resistentes al patógeno se inoculan con conidios de *Passalora fulva* se produce una interacción incompatible; como resultado de la cual la planta no se enferma (Joosten & Wit, 1999). Durante las etapas tempranas de la infección, las interacciones compatibles e incompatibles son muy similares (Lazarovits & Higgins, 1976 b; Wit, 1977). Sin embargo en el caso de las interacciones incompatibles, mas tarde las hifas que están en contacto con las células del mesófilo del huésped a menudo colapsan, se forman deposiciones de calosa y suelen detectarse acumulación de fitoalexinas y "PR"-proteínas relacionadas con la patogénesis (Wit & Flach, 1979; Wit & Kodde, 1981; Wit & Meer, 1986; Joosten *et al.*, 1997; Joosten & Wit, 1989; Joosten *et al.*, 1995).

La característica más notoria de la interacción incompatible es la respuesta de hipersensibilidad (HR), en la que las células del mesófilo adyacentes a la hifa colapsan. El hongo queda contenido en un área limitada que son los sitios de

infección y expuesto a componentes que son liberados por las células hospedantes (Van der Burg *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2007), de esta manera la planta hace que la infección no sea exitosa (Joosten & Wit, 1999).

III. Patogenicidad y virulencia.

La patogenicidad se define como la capacidad de un organismo de provocar enfermedad.

Passalora fulva durante la infección secreta al espacio apoplástico numerosas proteínas que actuarían como inductores de resistencia en las plantas de tomate portadoras del correspondiente gen de resistencia (*Cf*, Lauge *et al.*, 2000). Estos inductores se caracterizan por tener un alto número de residuos de cisteína, las cuales contribuirían a la actividad y estabilidad de las mismas (Joosten & Wit, 1999).

Passalora fulva posee un conjunto de factores de patogenicidad esenciales. La pérdida de uno de estos factores conduce a la pérdida de la patogenicidad. Dentro de estas proteínas se han aislado y caracterizado cuatro proteínas extracelulares, ECP1, ECP2, ECP4 y ECP5 (Honee *et al.*, 1994; Esse *et al.*, 2007; Joosten *et al.*, 1994; Ackerveken *et al.*, 1993; Ackerveken *et al.*, 1992, Bolton *et al.*, 2008) que son producidas por todas las cepas del hongo. Además, se han encontrado y caracterizado cuatro péptidos (proteínas de avirulencia) a los que se llamo AVR. Estos péptidos son raza específicos.

Los genes *ecp1*, *ecp2*, *ecp4*, *ecp5*, *avr2*, *avr4*, *avr4E* y *avr9* han sido clonados, al igual que los correspondientes genes de resistencia *Cf* (Jones *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997; Takken *et al.*, 1998). Se han generado

líneas isogénicas de tomate a las que se les ha incorporado los genes de resistencia (*Cf*) correspondientes a los genes *avr* (Stergiopoulos *et al.*, 2007a; Stergiopoulos *et al.*, 2007b; Wit *et al.*, 2002).

Las razas de un hongo son variantes del mismo, que difieren entre otras cosas en la capacidad de provocar enfermedad en un conjunto de hospedantes (Agrios, 2005). La interacción entre las razas y los cultivares se ajustan al modelo planteado por la hipótesis gen a gen (Flor, 1942; Flor, 1971).

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares de la interacción *Passalora fulva*-tomate se han incorporado al cultivar de tomate Money Maker (MM) los genes de resistencia *Cf2*, *Cf4*, *Cf5* y *Cf9* (Boukema, 1981). El disponer de estas líneas isogénicas, que resultan de retrocruzamientos sucesivos, ha permitido el estudio de mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de reconocimiento específico del hongo patógeno por su hospedante basado en la presencia de simples pares gen a gen (Joosten & Wit, 1999).

D. Técnicas moleculares.

I. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.

En 1975 Sanger, en base al conocimiento del proceso natural de replicación del ADN, desarrolló un método para generar *in vitro* secuencias de ADN, utilizando secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos), que cumplen el rol de iniciadores o primers, generalmente homólogos a secuencias conocidas. Una alternativa es que estos primers pueden ser diseñados al azar, sin embargo en todos los casos uno encuentra una región homóloga en el extremo 5' de la cadena de ADN y el otro primer es antiparalelo y homólogo al extremo 3' de la cadena complementaria. Estos conocimientos fueron tomados por Mullis (1986)

que hipotetizó y luego comprobó que adicionando un exceso de oligonucleótidos arrancadores y de nucleótidos, en presencia de la enzima ADN polimerasa y repitiendo condiciones para la apertura de hebras, annealing del primer al ADN molde y luego un período de síntesis de ADN, era posible no solo sintetizar un fragmento de ADN sino además hacerlo crecer de manera exponencial. Esto significó el desarrollo de una tecnología que impactó de una manera insospechada en la ciencia y es la Reacción en Cadena de la Polimerasa conocida comúnmente como PCR. A esto se le sumó, el descubrimiento de ADN polimerasas termoestables, como la de *Thermus aquaticus* Polimerasa (*Taq Polimerasa*), que revolucionaron las técnicas moleculares y como tal llevaron al desarrollo de nuevas tecnologías.

La síntesis de ADN *in vitro* se puede resumir en tres etapas:

- Desnaturalización. En esta etapa, la alta temperatura rompe los puentes hidrógeno que unen las cadenas de ADN y éstas se separan. La doble cadena se desnaturaliza al elevar la temperatura a 92-95°C, porque está por encima del TM (melting temperature) del ADN. El TM es la temperatura en la que se rompen las uniones entre las bases y se separan las hebras de ADN, en dos cadenas simples.
- Fase de apareamiento o annealing entre los oligonucleótidos o "primers" con las hebras de ADN. En la etapa de apareamiento, la temperatura se reduce rápidamente permitiendo la hibridación de cada "primer" con las secuencias complementarias que flanquean la región blanco. La temperatura de apareamiento depende del tamaño y secuencia del "primer" utilizado.

- Síntesis de las nuevas hebras (**Figura 1.VI.A**). La temperatura se eleva a 72°C (Temperatura óptima de la ADN polimerasa) para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión a partir de cada extremo 3' de los "primers" adicionando en sentido 5'-3' los nucleótidos y tomando como molde la secuencia de ADN blanco. Se obtiene así una copia de ADN molde.

Si estos ciclos se repiten en presencia de primers, nucleótidos y enzima en exceso, se produce un aumento exponencial de la cantidad de ADN (**Figura 1.VI.B-C**).

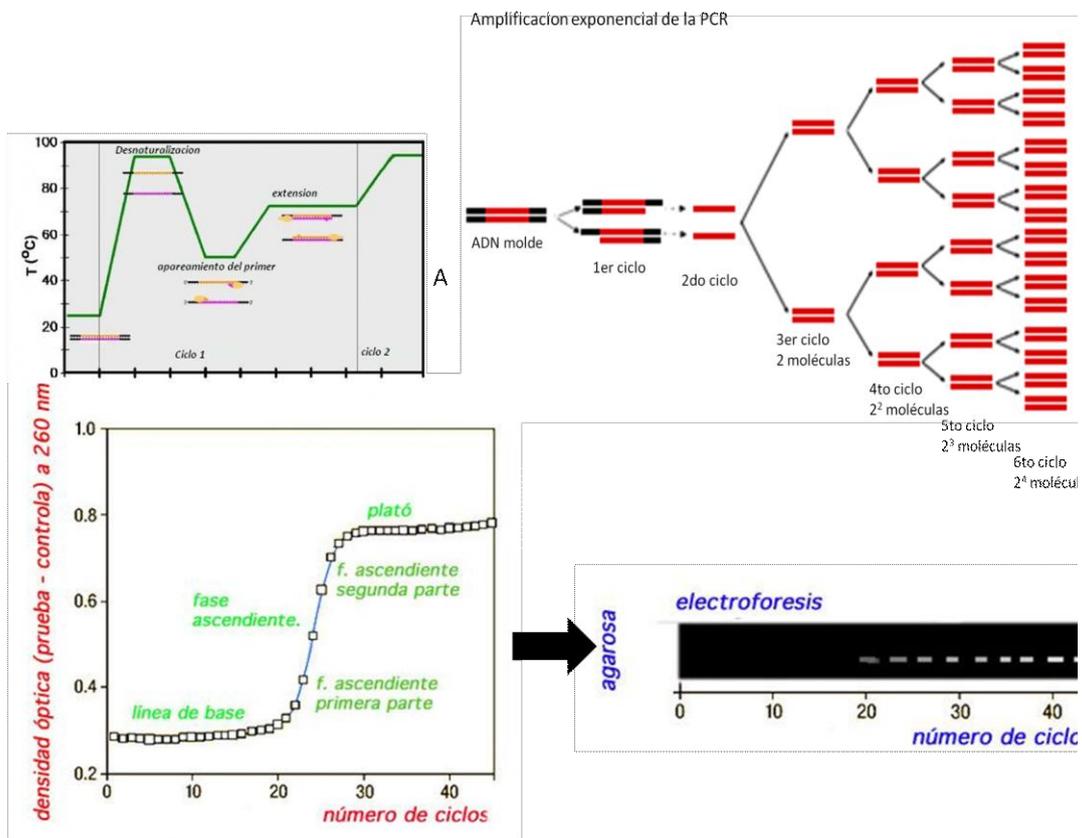


Figura 1.VI. A. Etapas de la replicación in vitro del ADN. **B-C** Amplificación exponencial de la PCR

II. Marcadores moleculares: ISSRs.

Los marcadores moleculares son herramientas potentes para el análisis de biodiversidad, como es realizar estudios de variaciones inter e intrapoblacionales, así como también para la identificación de individuos. Permiten realizar el estudio de flujo génico y variabilidad en poblaciones naturales, el análisis de entradas en los bancos de germoplasma, la selección asistida por marcadores, el mapeo de genes y la identificación de genotipos (Galván *et al.*, 2003). En este contexto, estos marcadores moleculares constituyen una herramienta clave para analizar la variabilidad existente en las poblaciones (Stenglein *et al.*, 2006).

Los marcadores ISSRs, cuya traducción literal sería “secuencias intersatelitales repetitivas”, son dominantes, se generan a partir de primers homólogos a las regiones satelitales que además pueden estar ancladas en el extremo 3' o 5' (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Estos primers amplifican las regiones que se encuentran entre satélites relativamente próximos

La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella digital genética” de cada uno de los individuos analizados.

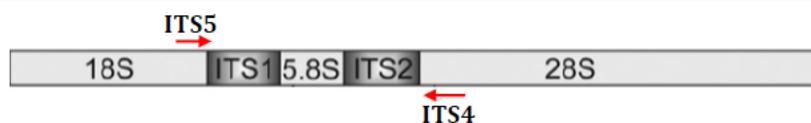
Estos marcadores nucleares hipervariables, se analizan como marcadores dominantes, lo que significa que son dialélicos con bandas presentes o ausentes, las cuales se registran como los dos alelos de un locus (Wolfe & Liston, 1998).

III. Relojes moleculares: genes conservados.

La diversidad genética es, sin lugar a dudas, la materia prima para la evolución, ya que de ella dependen tanto la adaptación como la especiación. La teoría de la evolución celular, por ejemplo, considera que el primer ácido nucleico que “adquirieron” los seres vivos fue el ARN y posteriormente el ADN, los cuales fueron utilizados como moldes para la síntesis de proteínas (Darnell & Doolittle 1986; Orgel 1992; Orgel 1994). Si todas las formas de vida tuvieron un antepasado común, que contenía macromoléculas básicas para la vida, puede suponerse que los organismos con secuencias de macromoléculas muy similares están estrechamente relacionados (Atlas & Bartha 1998).

El gen utilizado universalmente con fines taxonómicos y filogenéticos es el rDNA que codifica el ARN de la subunidad 18 S ribosomal, que tiene un alto grado de conservación. Es un marcador apropiado en estudios donde la distancia evolutiva es apreciable, dado que en organismos estrechamente relacionados, el grado de conservación es muy elevado.

Una alternativa ampliamente utilizada en estudios filogenéticos de hongos es usar secuencias como la que se muestra en la **Figura 1.VII**, donde en una única secuencia amplificada con primers universales, encontramos regiones conservadas (rDNA 18s, rDNA 5.8s y rDNA 28s) y regiones hipervariables (ITS1-ITS2; ITS: Internal Transcribed Spacer) tal como se indica (Goodwin *et al* 2001, Lacap *et al* 2003).



1.VII Fragmento de ADN con regiones conservadas e hipervariables.

Cuando es necesario identificar especies del mismo género, se recurre a hacer un análisis donde se incluyan también secuencias de ADN que codifiquen proteínas conservadas, como por ejemplo Actina, β Tubulina, Histonas, Calmodulina, Factor de Transcripción $\alpha 1$, entre otros (Dugan *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2009; Tigano *et al.*, 2006; Boucias *et al.*, 2006; Tartal *et al.*, 2002; Crous *et al.*, 2007).

En síntesis el cultivo de tomate es afectado por la enfermedad moho de la hoja del tomate y en la Argentina poco es lo que se conoce sobre este patógeno y la cladosporiosis. Para esto se dispone de herramientas moleculares que son clave para los estudios taxonómicos y de diagnóstico. Una identificación clara y precisa de la diversidad y razas del patógeno, son convenientes e indispensables para desarrollar estrategias de control de la enfermedad.

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos

I. Hipótesis de trabajo.

En base a todo lo expuesto, se plantea la hipótesis de trabajo: Los síntomas de cladosporiosis del tomate cultivado en el cinturón hortícola platense están asociados a la presencia de cepas patogénicas y no patogénicas de *Cladosporium*.

II. Objetivos generales.

Los objetivos generales de este trabajo son caracterizar morfológica y molecularmente hongos aislados de plantas de tomate con síntomas típicos del moho de la hoja mediante el uso de herramientas tradicionales y de biología molecular.

III. Objetivos específicos.

- Caracterizar en base a diferencias morfológicas los distintos aislamientos tanto macro como microscópicamente.
- Establecer similitudes y diferencias genotípicas entre los aislamientos mediante la amplificación de secuencias utilizando marcadores moleculares (ISSRs).
- Establecer relaciones filogenéticas de los aislamientos en base al análisis de las secuencias de los Espacios Transcritos Internos del ADN ribosomal (ITS: Internal Transcribed Spacer).
- Analizar divergencias en la secuencia codificante del gen de una proteína conservada como es el caso de la β Tubulina.

- Diseñar primers que permitan amplificar la secuencia de ADN que codifica la Actina en ambos grupos de hongos.
- Evaluar la patogenicidad de los aislamientos mediante la inoculación de plantas de tomate variedad Money Maker.
- Identificar razas de *Passalora fulva* de cultivos monospóricos mediante la amplificación de los genes que codifican las proteínas Avr.
- Diseñar una metodología que permita detectar diversas razas de un modo simple, eficaz, confiable y rápido.

Capítulo 3

Materiales y métodos

A. Material biológico.

I. Origen de los aislamientos.

El trabajo se realizó con once aislamientos monospóricos del género *Cladosporium*, que se obtuvieron a partir de lesiones típicas de moho de la hoja, en plantas de tomate de diversos híbridos cultivados en sitios del cinturón hortícola platense.

Sintéticamente los aislamientos se realizaron cortando secciones de unos 5-10 mm de material conteniendo tejido enfermo y sano (Agrios 2005), que se desinfectaron superficialmente, sumergiendo los mismos en una solución de hipoclorito de sodio (10 %) durante 15-30 segundos. Estos se lavaron tres veces en agua estéril y se secaron en papel absorbente estéril, luego de lo cual se sembraron en APG (agar-papa-glucosado) suplementado con cloranfenicol (300 mg L⁻¹) y se incubaron a 25°C en oscuridad (Reissinger *et al.*, 2001). Las colonias desarrolladas se subcultivaron con el fin de obtener un cultivo monospórico, (**Figura 3.I**) para lo cual se sembró por agotamiento en APG (agar-papa-glucosa, pH 5,6) una ansada de esporas provenientes de los aislamientos puros. (Bernal *et al.*, 2009).

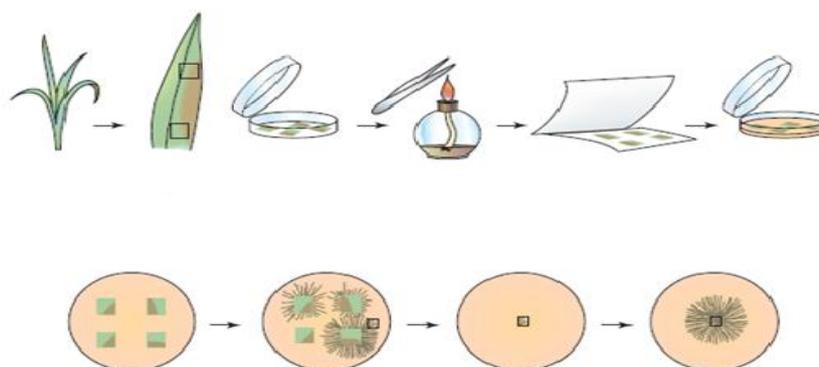


Figura 3.I. Esquema del procedimiento para obtener un aislamiento monospórico a partir de hojas enfermas.

De esta manera se obtuvieron los 11 aislamientos que se mencionan en la

Tabla 2.

Aislamiento	Origen	Identificación
CFOT7	Olmos	Cepa 1
AAS17	Arana	Cepa 2
AAS2	Arana	Cepa 3
HD8	Los Hornos	Cepa 4
HD10	Los Hornos	Cepa 5
CFOPC	Olmos	Cepa 6
CFP14	Abasto	Cepa 7
AAS16	Arana	Cepa 8
EMP	Los Hornos	Cepa 9
ALH	Los Hornos	Cepa 10
ELH	Los Hornos	Cepa 11

Tabla 2. Origen de los aislamientos

II. Cultivo *in-vitro*.

El medio de cultivo utilizado fue APG.

Ingrediente	Concentración (g/l)
Infusión de papa	4
Agar	15
Glucosa	20
Agua destilada	c.n.p

B. Caracterización morfológica.

Se realizó la observación microscópica de los aislamientos mediante la técnica de microcultivos, con el propósito de observar la estructura completa del micelio. Para ello, se colocaron en cajas de petri portaobjetos con áreas cóncavas, cubreobjetos, (**Figura 3.II.A**), y dos trozos de algodón y esterilizándose el conjunto en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Luego, en una campana de flujo laminar se depositó una gota de APG sobre cada portaobjeto, que fue inoculada por punción en el borde, con cada uno de los aislamientos en estudio, (**Figura 3.II.B**). El medio sembrado se cubrió con cubreobjetos y se humedecieron los algodones con agua bidestilada estéril. El sistema se incubó a 25°C en oscuridad y a los 7 días de la inoculación, (Gams *et al.*, 2007), se observaron en un microscopio óptico con fluorescencia (NIKON modelo EFD-3), equipado con una cámara digital (modelo Nikon D40) documentando la observación con fotografías.

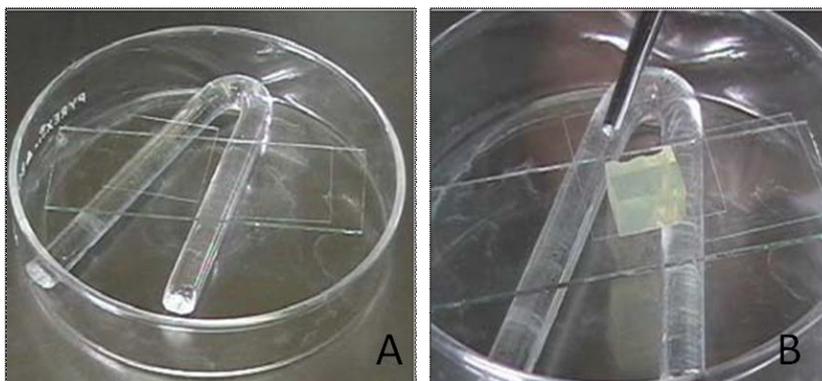


Figura 3.II. Microcultivos. A. Material para microcultivo. B. Inoculación del agar.

C. Patogenicidad.

I. Suspensión de conidios.

Con el fin de disponer de inóculo para los ensayos de patogenicidad se realizó una suspensión de conidios utilizando como fuente los cultivos monospóricos de cada aislamiento. Con este objetivo se colocó una alícuota de agua bidestilada estéril sobre la placa conteniendo el cultivo del hongo y con el fin de desprender los conidios se raspó la superficie con un tip estéril. La suspensión de conidios se recogió en un recipiente estéril, se ajustó la concentración a 10^5 conidios. mL^{-1} (Bernal *et al.*, 2009) haciendo el recuento en la cámara de Neubauer (**Figura 3.III**).

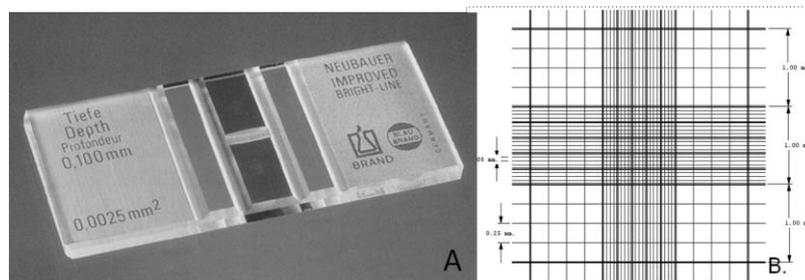


Figura 3.III. A. Cámara de Neubauer. B. Cuadrícula de dimensiones conocidas.

II. Inoculación de las plantas.

Plantas de tomate del cultivar Money Maker línea *Cf0* (sin genes de resistencia), de 2 meses de edad se inocularon asperjando 10 mL de la suspensión de conidios (**Figura 3.IV**). Luego, las plantas se mantuvieron en un ambiente con 100 % de humedad relativa, 25°C y un fotoperíodo de 16 horas de luz. Estas condiciones favorecen la germinación de conidios, el crecimiento del tubo germinativo y el desarrollo y la penetración de las hifas, es decir la infección de las plantas.



Figura 3.IV. Plantines Cf0 a los 10 días de germinados. **B.** Plantines Cf0 antes de ser inoculados.

El diseño del experimento fue enteramente al azar con tres repeticiones por plantas, incluyéndose como control negativo 3 plantas no inoculadas. A los 21 días de la inoculación se digitalizaron las imágenes de las hojas enfermas y se procedió a su evaluación.

III. Reaislamiento e identificación del patógeno.

Con el fin de cumplir con los postulados de Koch se procedió a reaislar el patógeno de las plantas inoculadas, a partir de hojas con síntomas típicos de la enfermedad.

La identidad de los aislamientos se confirmó en base a los fingerprints generados con primers homólogos a SSR de manera de amplificar las regiones intersatelitales ISSR.

D. Extracción, purificación y cuantificación de ADN.

I. Protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega.

Se congelaron 100 mg de micelio en Nitrógeno líquido, y se molieron en un mortero estéril hasta obtener un polvo homogéneo. Se pasaron 40 mg del mismo a un tubo eppendorf estéril, se le adicionó la solución de lisis nuclear, y se mezcló en vortex durante 1-3 segundos que luego se incubó 15 minutos a 65°C. Posteriormente se adicionó 3 µl RNasa ($10\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Después, se adicionó 200 µl de Solución de Precipitación Proteínas y se mezcló 20 segundos en vortex. Luego de centrifugar 3 minutos a 13.000 g, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. Con el fin de precipitar el ADN se adicionó isopropanol al 10%; se mezcló y luego se centrifugó a 13.000 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 600 µl de etanol 70% y se secó durante 15 minutos. El ADN se disolvió en un volumen de 100 µl de Solución de Rehidratación a 65°C durante 1 hora.

II. Protocolo de extracción de ADN vegetal CTAB de Doyle & Doyle (1990) modificado por Bornet & Branchard (2001) :

Se congelaron en nitrógeno líquido 300 mg de tejido y se molieron en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. A este se le adicionaron 800 µl de buffer CTAB suplementado con 200 µl de CTAB 10X, 1 µl de β-mercaptoetanol y 1% PVPP, se homogeneizó la mezcla y se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml que se incubó a 60°C durante 30 minutos. Luego, se lavó con un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (12:1), se mezcló y se centrifugó 5 min a 10.000 g. El sobrenadante se pasó a un eppendorf de 2 ml en donde se procedió a

precipitar el ADN. Para esto se agregó un volumen de isopropanol y 10% del volumen de acetato de sodio 3M. La mezcla se mantuvo a -18°C durante 12 horas. La suspensión se centrifugó a 10.000 g para generar un pellet de ADN que se lavó tres veces con etanol 70%, y se secó. El ADN se resuspendió en 150 µl de TE y se le agregó 1-2 µl de RNasa (10 µg.µl⁻¹), luego de lo cual se incubó a 37°C por espacio de 2 horas. El ADN nuevamente se trató con fenol cloroformo y se precipitó como se describió anteriormente. La solución de ADN final se mantuvo en freezer a -20°C.

III. Visualización y cuantificación del ADN extraído.

El ADN se cuantificó en base a la comparación de la intensidad de la banda del ADN genómico con las del marcador molecular control (Genoma del fago Lamba digerido con *Hind* III - Promega Biotech). Las mismas se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 0.7% P/V suplementado con bromuro de etidio, y fueron visualizadas en un transiluminador de UV (Sambrook *et al.*, 1989). Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes SYNGENE y el software GENETOOLS.

E. Caracterización molecular.

I. Amplificación de genes conservados.

- ITS

La amplificación se realizó utilizando los primers ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990; **Tabla I** Anexo) y en base a un programa que consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; 33 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 45 segundos a 56°C y 1 minuto a 72°C y por último una elongación de 5 minutos a 72 °C (Curtis *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 2001).

La mezcla de reacción consistió en buffer de reacción 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25°C; 1% Triton X-100 (sin magnesio)); 1,5 mM cloruro de magnesio; 0,2 mM de cada dNTP; 0,3 µM de cada primer; 1 unidad de T-*Plus* DNA polimerasa (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN) y 50 ng de ADN molde por reacción, en un volumen final de 15 µl.

- β *tubulina* y *actina*.

La secuencia correspondiente a la *tubulina* se amplificó utilizando un set de primers degenerados (**Tabla I** Anexo) diseñados en base a secuencias consenso de hongos, algas y protozoos. (Tartar *et al.*, 2002). La reacción se realizó utilizando las siguientes condiciones finales: buffer 1X; 1,5mM de cloruro de magnesio; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada primer y 1 U de T-*plus* ADN polimerasa. En el caso de esta reacción se tuvieron que ajustar distintas variables debido a la inespecificidad que se encontró al usar las condiciones sugeridas por los autores que reportaron la metodología (Tigano *et al.*; 2006).

También se procedió a amplificar el gen que codifica la *actina*. Esto se hizo en base al diseño de un par de primers (**Tabla I** Anexo) cuyas secuencias se generaron a partir de las secuencias inscriptas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) correspondientes a *Cladosporium* y *Passalora fulva*. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C, y 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 35 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C y un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C. Luego de la puesta a punto de la reacción, las condiciones finales en un volumen de 15 µL fueron: Buffer de reacción 1X; 1,5

mM de cloruro de magnesio; 0,2 mM de cada dNTP; 0,3 μ M de cada primer; 20-40 ng de ADN y 1 U de *T-plus* ADN polimerasa.

Todos los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis a 90 V, en geles de agarosa del 1% P/V suplementados con bromuro de etidio 10 % (10 μ g.ml⁻¹). Las bandas de la amplificación se observaron en un analizador de imágenes Syngene con el software Genetools que permitió con a una cámara digital fotodocumentar los resultados.

Los fragmentos amplificados se purificaron de acuerdo al protocolo de precipitación de productos de PCR utilizando PEG (Polietilenglicol) propuesto por Glenn. El mismo consiste en adicionar 50 μ l de una solución de PEG al 20% - NaCl 4 M a la mezcla de reacción conteniendo el producto a secuenciar, e incubar a 37°C durante 15 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron a 15.000g durante 15 minutos. El ADN queda adherido a las paredes del tubo y se lava con etanol 70%, posteriormente se seca y disuelve en TE o agua bidestilada estéril. Las dos hebras del fragmento de ADN amplificado por PCR fueron secuenciadas en Macrogen Inc. Seúl, Korea de acuerdo al método descrito por Sanger (1977). El secuenciador automático BigDye™ se basa en la detección de la fluorescencia, permitiendo la lectura de hasta 1000 bases en una única reacción.

Las secuencias de ITS, β *tubulina* y *actina* se analizaron con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales de secuencias nucleotídicas (*nucleotide basic local alignment tool*, BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov). Con esta herramienta se realizó una alineación y comparación con las secuencias homólogas depositadas en la base de datos Nucleotide collection (nr/nt). En la

construcción del árbol filogenético se incluyeron las secuencias de los organismos en estudio y aquellas secuencias que mostraron alta homología en el análisis de blast mediante el uso del BioEdit y Mega5 luego de un alineamiento ClustalW de las mismas.

II. Amplificación de ISSRs.

Se utilizaron los primers AN, AA5, GA5, IA5, LA5 y FA5, cuya secuencia se detalla en la **Tabla I**, Anexo. La reacción se llevo a cabo utilizando 12 ng de ADN molde; 2,5 mM de cloruro de magnesio; 1 μ M de primer; 0,2 mM de cada dNTP; 1X de Buffer; 1,25 unidades de T-*plus* ADN 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, annealing de 75 seg a 48°C (primers AA5-AN-GA5-IA5) 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 visualizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5 % conteniendo 10% de Bromuro de Etidio (10 μ g.ml⁻¹). La visualización de las bandas de ADN se realizó por irradiación con luz UV. Posteriormente se analizaron las imágenes en el SYNGENE y con el software GENETOOLS para la evaluación del polimorfismo entre las cepas. Para calcular los valores de similitud y las distancias genéticas utilizando los patrones de bandas ISSR se uso 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 está presente.

III. Marcadores raza específicos. Genes *avr*.

Puesto que se dispone de la secuencia de algunos de los genes de avirulencia de *Cladosporium*, en base a estas Stergiopoulos (2007) diseño primers para la amplificación de los mismos.

Para realizar esta reacción se utilizó como molde ADN genómico de los cultivos monospóricos y ADN genómico extraído de lesiones de hojas de plantas de tomate que fue cuantificado mediante el uso del fluorómetro Qubit de Invitrogen. Se realizaron reacciones de amplificación en las que las condiciones fueron similares a las descritas por Stergiopoulos (2007), si bien se utilizaron primers modificados (**Tabla I** Anexo).

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando las siguientes condiciones: Buffer de reacción 1X; cloruro de magnesio 1,5 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,3 μ M de cada primer; 0,2 U de enzima y 30 ng de ADN molde. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C, 30 segundos de hibridación a 63°C, 65°C, 53.5°C y 62.5°C para *avr2*, *avr4*, *avr4E* y *avr9* respectivamente, 1 minuto a 72°C; y una extensión final a ésta temperatura durante 7 minutos.

Capítulo 4

Resultados

A. Caracterización morfológica.

Se analizaron las características morfológicas de los aislamientos monospóricos CFOT7, AAS17, AAS2, HD8, HD10, CFOPC, CFP14 Y AAS16 cultivados en APG. Estos presentaron colonias planas, aterciopeladas, color verde oliváceo, un poco más claras hacia la periferia, que en el anverso tenían color negro (**Figura 4.I.A**).

Las colonias de los aislamientos monospóricos EMP, ALH y ELH presentaron un aspecto un poco distinto a los anteriores. Las mismas lucieron aterciopeladas de color gris-gris oliváceo, con bordes irregulares (**Figura 4.I.B**); también presentaron color negro en el anverso de la placa. Estos aislamientos, a diferencia de los descritos anteriormente, mostraron un crecimiento lento. Mientras que los primeros desarrollaron un diámetro de colonia de 40 mm en 15 días, en el caso de EMP se obtuvieron valores similares luego de los 30 y 40 días de crecimiento.

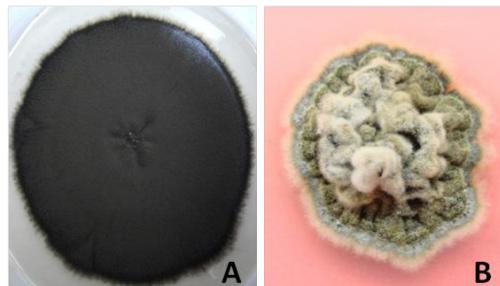


Figura 4.I. Morfología macroscópica de las colonias del género *Cladosporium* (A) y *Passalora fulva* (B)

Se realizaron observaciones microscópicas de los aislamientos utilizando aumento 10X, 40X y 100X. Las observaciones de los aislamientos CFOT7, AAS17, AAS2, HD8, HD10, CFOPC, CFP14 Y AAS16 se realizaron a los 7 días

de la inoculación. En el caso del aislamiento EMP, debido a que su crecimiento fue más lento, se realizaron las mismas observaciones pero a los 20 días de la inoculación. En la **Figura 4.III** se destaca una notable diversidad en la forma de los conidióforos y en la disposición de los conidios. El aislamiento EMP produjo conidios más grandes que el resto y similares a los producidos por los aislamientos ALH y ELH (datos no presentados).

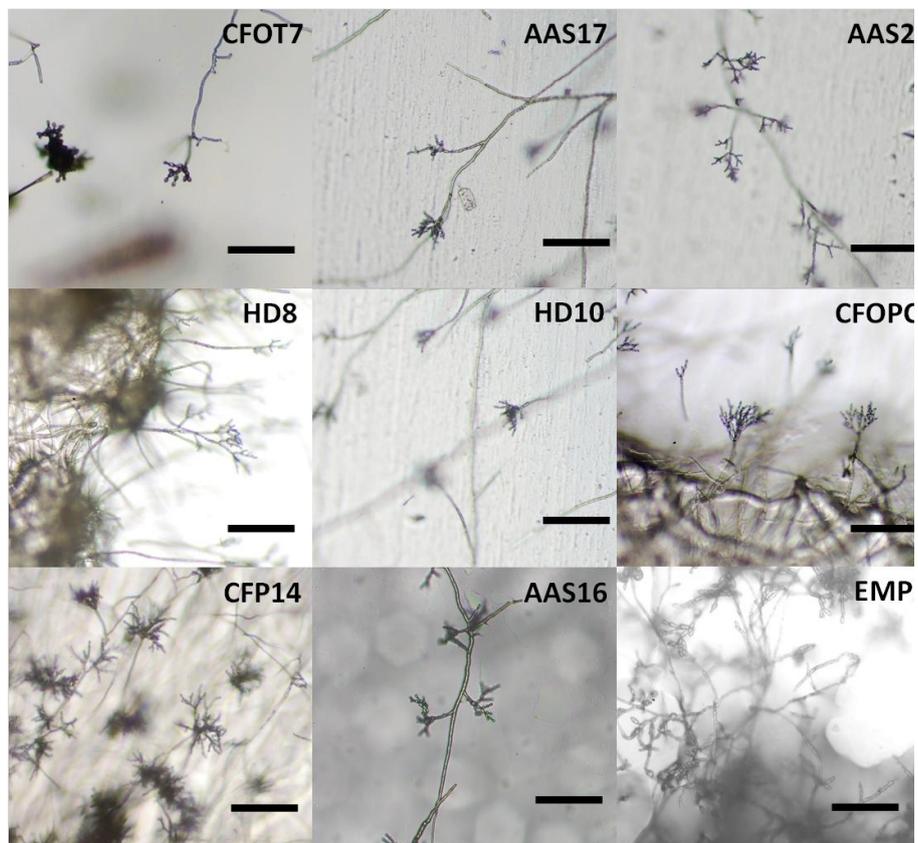


Figura 4.III. Características morfológicas-10 X. La barra indica 100 µm.

En la Figura **4.IV** se observa que los aislamientos presentaron cadenas de conidios de distinta forma y tamaño. Mientras que los aislamientos CFOT7, AAS17, CFOPC, AAS16 y EMP presentaron conidios alargados, el aislamiento HD8 presentó conidios esféricos. Es de destacar que el aislamiento EMP presentó conidios sensiblemente más grandes que los de los restantes.

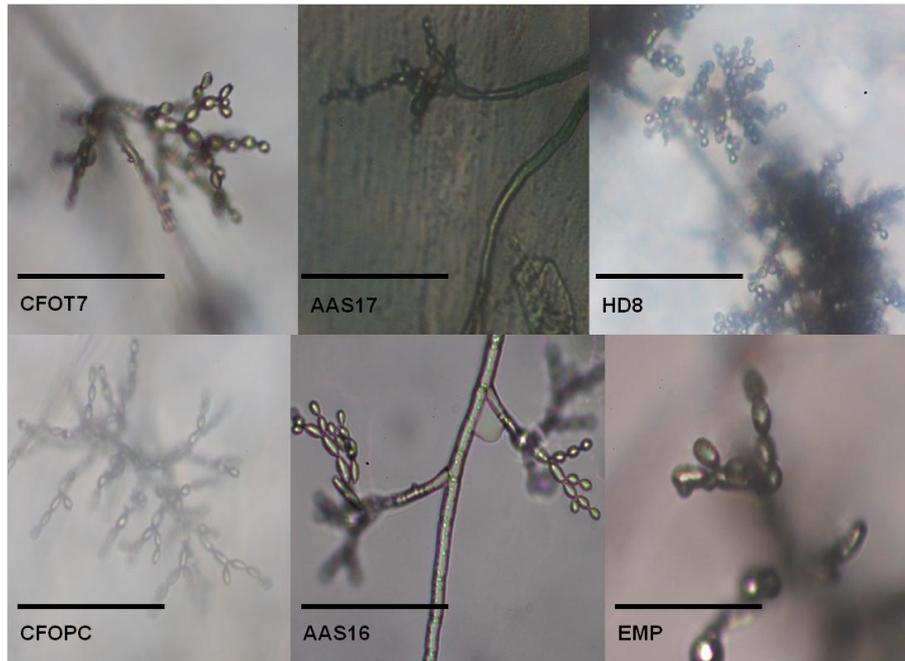


Figura 4.IV. Características morfológicas-40 X. La barra corresponde a 50 μ m.

En la Figura 4.V se presentan observaciones de algunos de los preparados con aumento 100X.

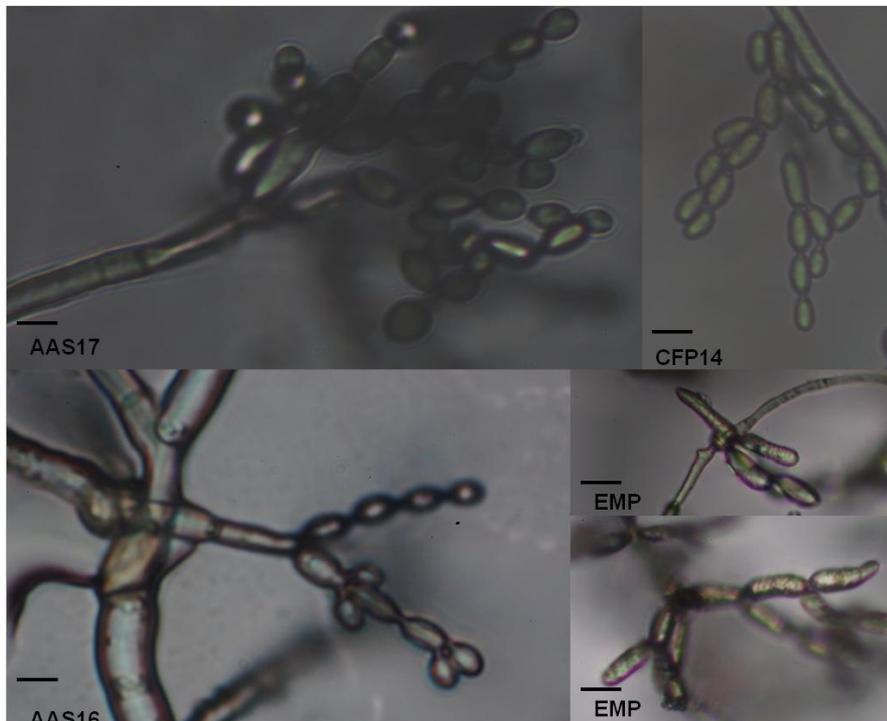


Figura 4.V. Observaciones 100X. La barra indica 5 μ m

B. Patogenicidad.

En ensayos preliminares realizados por personal del CIDEFI se observaron que las plantas de tomate del cultivar Money Maker (MM) sin genes de resistencia a *Passalora fulva* mostraron síntomas típicos de la enfermedad, cuando las mismas se inocularon con una suspensión de esporas del aislamiento CFOT7.

A partir de esas lesiones se reaisló el hongo, con el fin de cumplir con los postulados de Koch. Más aún se procedió a identificar el aislamiento original y el reaislamiento, con marcadores moleculares del tipo de los ISSR, con el fin de comparar los perfiles genéticos. La amplificación realizada con los primers IA5 y GA5, bastó para confirmar que el hongo que se aisló de las hojas no fue el organismo inoculado (**Figura 4.VI.**).

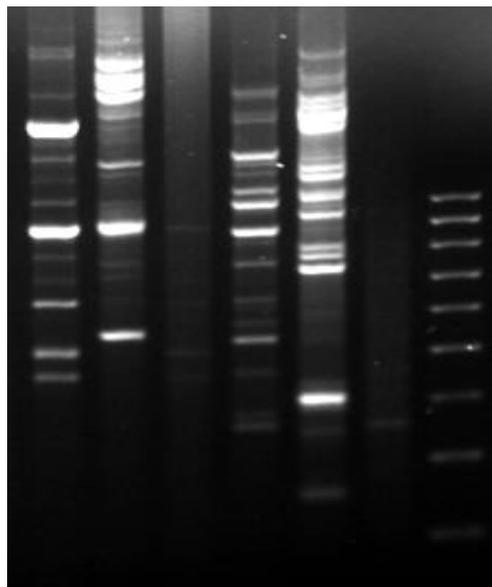


Figura 4.VI. ISSRs reaislamientos. Las calles 1-3 corresponden a el primer IA5 mientras que las calles 4-7 al primer GA5. En la calle 8 se sembró el patrón de peso molecular 100-1000 pb. Calles 1,4:CFOT7. Calles2,5: reaislamiento 1. calles3,6: reaislamiento 2.

Si bien algunas de las plantas inoculadas en este ensayo mostraron manchas necróticas en algunas de sus hojas (**Figura 4.VII**), evidentemente las mismas no estuvieron asociadas a la presencia de *Passalora fulva*, agente causal del moho de la hoja de tomate.



Figura 4.VII. Cultivar MM-C0 inoculado con los distintos aislamientos. Se muestra la evolución del ensayo durante los 21 días

Considerando la velocidad de crecimiento de los hongos aislados de las manchas en las hojas, se desarrollaron estrategias para aislar a partir de las manchas típicas de moho de la hoja preferencialmente hongos de crecimiento lento, que muy probablemente son los agentes causales de las manchas. Así se obtuvieron tres aislamientos a partir de material enfermo de tomate proveniente

de diferentes sitios y a partir de diferentes cultivares de tomate, EMP, ALH y ELH. Nuevamente con el fin de cumplir con los postulados de Koch los mismos se inocularon sobre los cultivares de tomate Money Maker *Cf0*, *Cf2*, *Cf4*, *Cf5* y *Cf9*. En función de los resultados obtenidos se demostró la presencia de dos razas del hongo que se encuentran presentes en los cultivos (**Tabla 3**). En la **Figura 4.VIII** se presenta el envés de una hoja con síntomas típicos de la enfermedad y se puede apreciar el color verde oscuro u oliváceo que es propio del signo del hongo.

Aislamiento/ línea MM	<i>Cf0</i>	<i>Cf2</i>	<i>Cf4</i>	<i>Cf5</i>	<i>Cf9</i>
EMP	+	+	-	-	-
ALH	+	+	-	-	-
ELH	+	-	-	-	-

Tabla 3. Resultados del ensayo biológico realizado con los cultivares EMP, ALH y ELH. +: desarrolla enfermedad. -no desarrolla enfermedad.



Figura 4.VIII. Envés con síntomas típicos de la enfermedad.

C. Extracción de ADN.

En la **Figura 4.IX** se muestran las cantidades de ADN genómico extraído con los dos protocolos descritos oportunamente en materiales y métodos. Se observó que en la extracción de ADN con el Kit de extracción de ácidos nucleicos, se obtuvieron aproximadamente 30 ng.mg⁻¹ de material fresco,

mientras el método convencional de CTAB modificado rindió más, ya que se obtuvieron 100 ng de ADN.mg⁻¹ de tejido fresco.

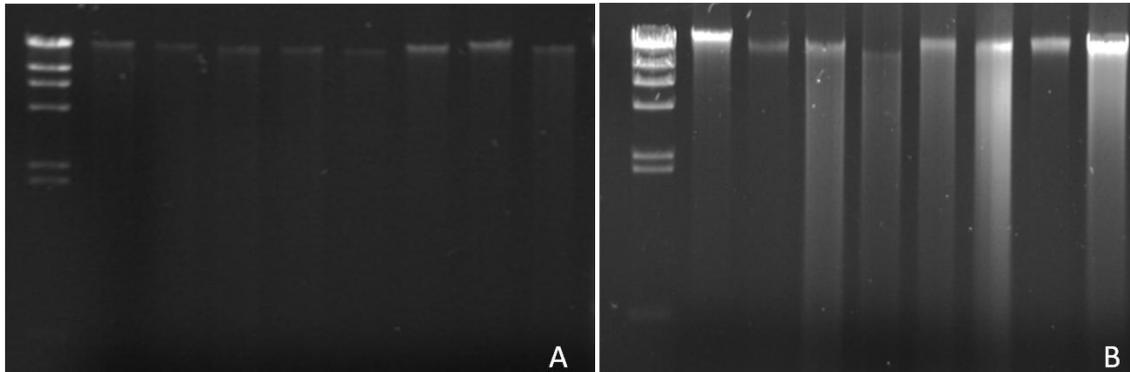


Figura 4.IX. Cuantificación ADN extraído con WizarD Genomic DNA Purification Kit Promega (A) y extraído con Protocolo CTAB modificado (B) .Se sembraron 5 µl de ADN. En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ-HindIII. Se sembraron 5 µl de ADN en el siguiente orden: CFOT7, AAS17, AAS2, HD8, HD10, CFOPC, CFP14 y AAS16; tanto en el gel A como en el B.

D. Caracterización molecular.

En la **Figura 4.X** se muestran las bandas obtenidas en la amplificación del ITS utilizando ADN molde de 9 aislamientos. Se observa que en todos los casos la banda amplificada mostró el mismo tamaño que además fue el esperando considerando una secuencia tipo de ITS. Estas amplificaciones se almacenaron hasta que se procedió al secuenciado de las mismas.

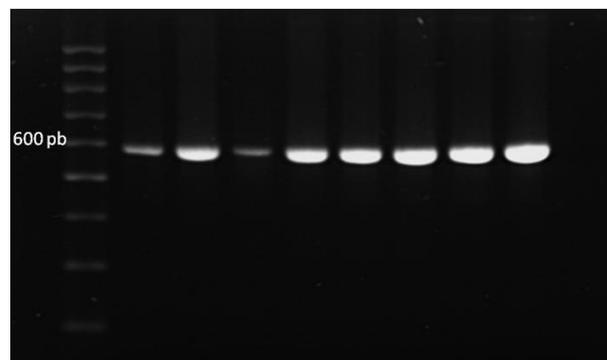


Figura4.X. Amplificación ITS. En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular 100-1000 pb, y luego 5 µl del producto de PCR en el siguiente orden: CFOT7, AAS17, AAS2, HD8, HD10, CFOPC, CFP14 y AAS16. En la última calle se sembró el blanco de reacción (sin ADN).

Además, se amplificó la secuencia correspondiente al extremo 3' del 4to exón del gen que codifica la β Tubulina. Si bien se trabajó sobre una reacción descrita en la bibliografía (Tigano *et al.*, 2006) se modificaron ciertos parámetros tales como la cantidad de ADN molde, temperatura y tiempo de annealing. En la **Figura 4.XI** se presentan los resultados de las reacciones de amplificación y se muestra que la temperatura óptima de reacción fue 58 °C.

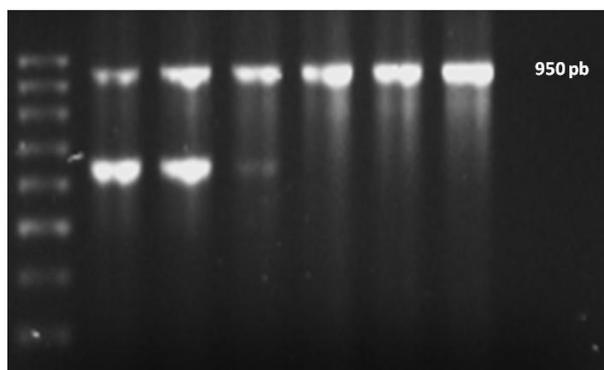


Figura 4.XI. Amplificación β tubulina En primer lugar se sembró el marcador 100-1000 pb. En las calles 2, 4 y 6 se sembraron las reacciones cuyo molde fue el ADN de HD8, mientras que en las calles 3, 5 y 7 el molde fue el material genético de AAS16. La temperatura de annealing vario de la siguiente manera: calles 2-3: 55 °C. calles 4 y 5: 57°C y calles 6 y 7: 58°C. En la calle 8 se sembró el blanco de la reacción, ensayado a 55°C.

En la **Figura 4.XII** se presentan los resultados de las reacciones con distintas cantidades de ADN molde en donde se demostró que la cantidad óptima de ADN molde se encuentra entre 50 y 100 ng.

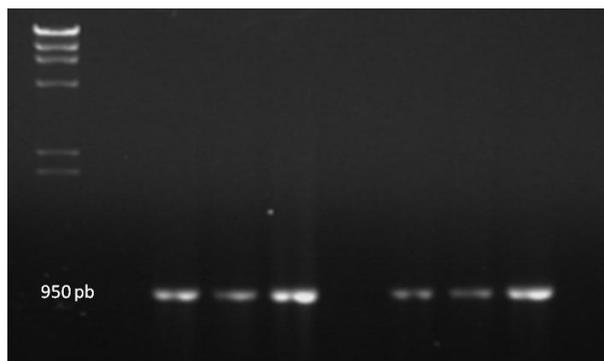


Figura 4.XII. Amplificación β tubulina. En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII. Se utilizaron cantidades crecientes de ADN molde de HD8 (25, 50, 75 y 100 ng) y de AAS16. El producto de reacción fue sembrado en este orden.

Finalmente las condiciones de amplificación utilizada para los 9 aislamientos iniciales fueron en el caso del annealing a 58°C con una cantidad de ADN molde de 75 ng (**Figura 4.XIII**).

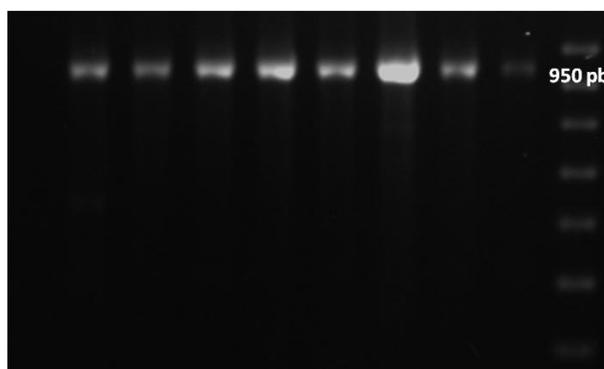


Figura 4.XIII. Amplificación β tubulina. Calle 1: blanco. Calle2: CFOT7. Calle3: AAS17. Calle4: AAS2. Calle 5: HD8. Calle6: HD10. Calle7: CFOPC. Calle8: CFP14. Calle9: AAS16. Calle 10: marcador de peso molecular 100-1000 pb.

La amplificación de la *actina*, se realizó luego de hacer un análisis bioinformático de las secuencias del gen que codifica esta proteína, tanto en el género *Cladosporium* como en *Passalora fulva*. Se alinearon las secuencias utilizando un software bioinformático (BioEdit), se encontraron las secuencias

consenso 5' y 3' y se diseñaron los primers ACTF y ACTR (**Tabla I**, Anexo). Luego, se realizó un primer blast con el fin de corroborar la especificidad de los primers diseñados. Los resultados del análisis se muestran a continuación.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

```
>AJ300329.1 Cladosporium cladosporioides partial act1 gene for actin, exons 1-2, strain CBS 169.54
product length = 534
Forward primer 1 GGGTTTCGCCCTTCCCCACG 20
Template 239 ..... 258
Reverse primer 1 CCTTCATGCTGGACGGGGCC 20
Template 772 ..... 753
>AJ300312.1 Cladosporium sp. A13 partial act1 gene for actin, exons 1-2, isolate A13
product length = 533
Forward primer 1 GGGTTTCGCCCTTCCCCACG 20
Template 228 .....T..... 247
Reverse primer 1 CCTTCATGCTGGACGGGGCC 20
Template 760 .....T..G..A... 741
>AJ300327.1 Cladosporium fulvum partial act1 gene for actin, exons 1-2, strain Dutch Race 4
product length = 528
Forward primer 1 GGGTTTCGCCCTTCCCCACG 20
Template 216 .....T.....A.... 235
Reverse primer 1 CCTTCATGCTGGACGGGGCC 20
Template 743 .....A..T..A... 724
```

Si bien se evaluaron diversas variables de la reacción de amplificación, las condiciones óptimas de reacción fueron las que se describieron en materiales y métodos; siendo 40 ng la cantidad de ADN molde del aislamiento CFOPC. En la **Figura 4.XIV** se puede apreciar el efecto de la temperatura de annealing sobre la reacción y que la temperatura óptima de hibridización fue 60 °C.

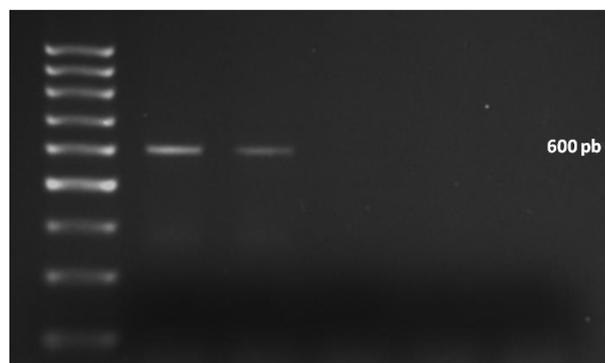


Figura 4.XIV. Amplificación actina. Calle1: marcador de peso molecular 100-1000 pb. Calle2: 60°C. Calle3: 60,5°C. Calle4: 61°C. Calle5: 61,5°C. Calle6: blanco.

En la **Figura 4.XV** se presentan los fingerprints de los aislamientos que se obtuvieron con los primers ISSR en cuatro geles generados con los diversos primers utilizados. En primer lugar se observó que los aislamientos son distintos a nivel genético, es decir que los organismos presentaron patrones de bandas distintos.

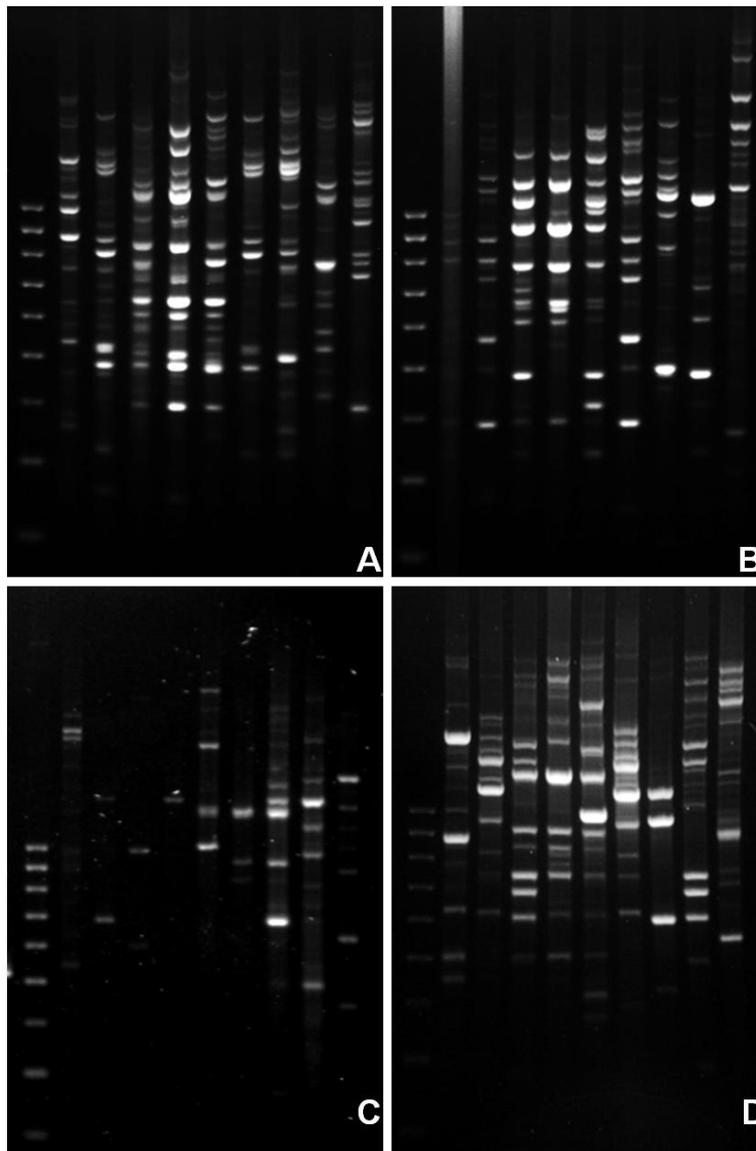


Figura 4.XV. Reacción ISSR. A: primer GA5. B: primer AA5. C: primer AN. D: primer IA5. Calle1: marcador 100-1000 pb. Calle2: CFOT7. Calle3: AAS17. Calle4: AAS2. Calle5: HD8. Calle6: HD10. Calle7: CFOPC. Calle8: CFP14. Calle9: AAS16. Calle10: EMP

Considerando el número promedio de bandas amplificadas con cada primer, y el rango de tamaño de las mismas se estimó que la diversidad evaluada utilizando estos 6 primers, corresponde al 0,41 % del genoma (**Tabla 4**). Para realizar el cálculo se consideró que el tamaño del genoma de un hongo es de aproximadamente 2×10^7 pares de bases.

Reacción	Tamaño de las bandas	Número de bandas promedio	% del genoma
AN	150-2500	10	0,07
AA5	250-1800	15	0,08
IA5	400-2500	14	0,10
GA5	250-1800	20	0,12
LA5	400-2100	2	0,01
FA5	400-1200	5	0,03
% del genoma total evaluado			0,41

Tabla 4. Análisis ISSR. Porcentaje del genoma evaluado.

Utilizando las secuencias de ITS se realizó el análisis Blast (*nucleotide basic local alignment tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov), analizándose además las mismas con dos softwares Bioedit y Mega5, con el objetivo de realizar el correspondiente árbol filogenético, mediante el análisis de Máxima Parsimonia. Este análisis se realizó con las secuencias obtenidas en nuestro trabajo (Anexo, **Tabla II**) y con las de la base de datos que se detallan en la **Tabla III** Anexo que fueron aquellas que surgieron del análisis de BLAST.

En la **Figura 4XVI**, se observa el árbol obtenido en el que se detectan los clusters correspondientes a la división *Davidellacea* y *Micosphaerellacea*. Además, se puede ver que EMP es un hongo que se agrupa con representantes de la familia *Mycosphaerellaceae*; en tanto que los otros 8 aislamientos se agruparon con hongos de la familia *Davidellaceae*.

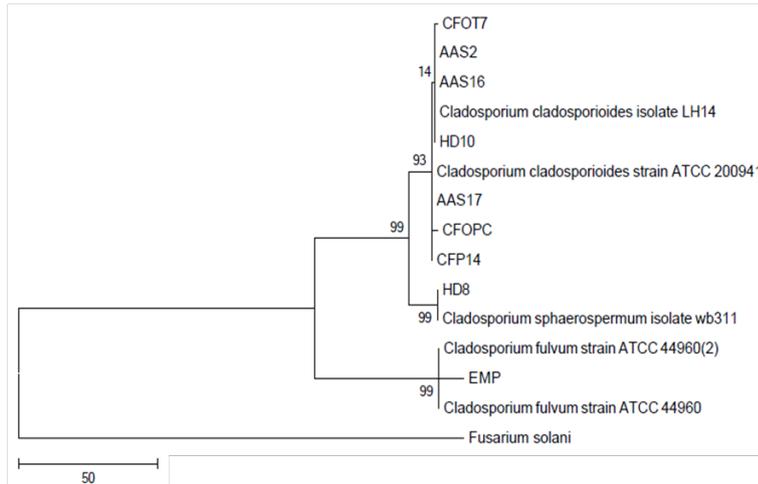


Figura 4.XVI. Árbol ITS.

Las secuencias obtenidas correspondientes al gen de la β *tubulina* (Tabla IV; Anexo) fueron altamente homólogas al fragmento de ADN que codifica el cuarto exón del gen correspondiente a *Passalora fulva* (1183 pb). Considerando que solo se conocen las secuencias parciales de este gen de aislamientos del género *Cladosporium* y que se dispone de la secuencia completa del mismo para *Passalora fulva*, (Tabla V, Anexo), se procedió a identificar la región de mayor homología de las secuencias depositadas (Figura 4.XVII), cuyos números de acceso se detallan en la Tabla V, Anexo. Estas

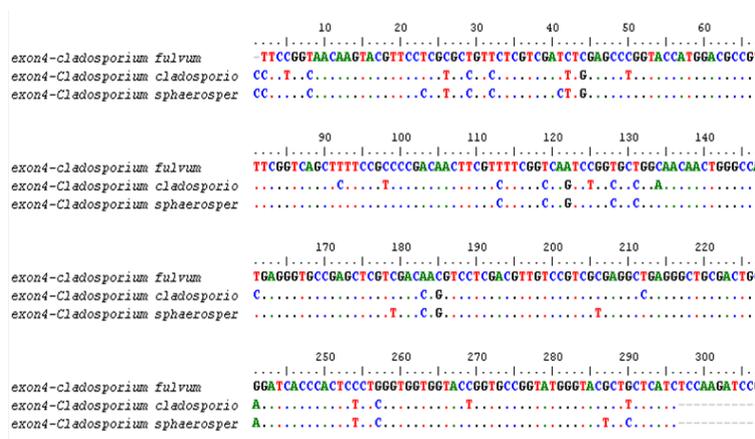


Figura 4.XVII. Alineamiento β *tubulina*.

secuencias tuvieron alta homología en el extremo 5´.

Luego, se procedió a alinear las secuencias obtenidas con la secuencia del cuarto exón de *Passalora fulva* (Figura 4.XVIII), y se encontró que las secuencias amplificadas corresponden al extremo 3´ de este gen.

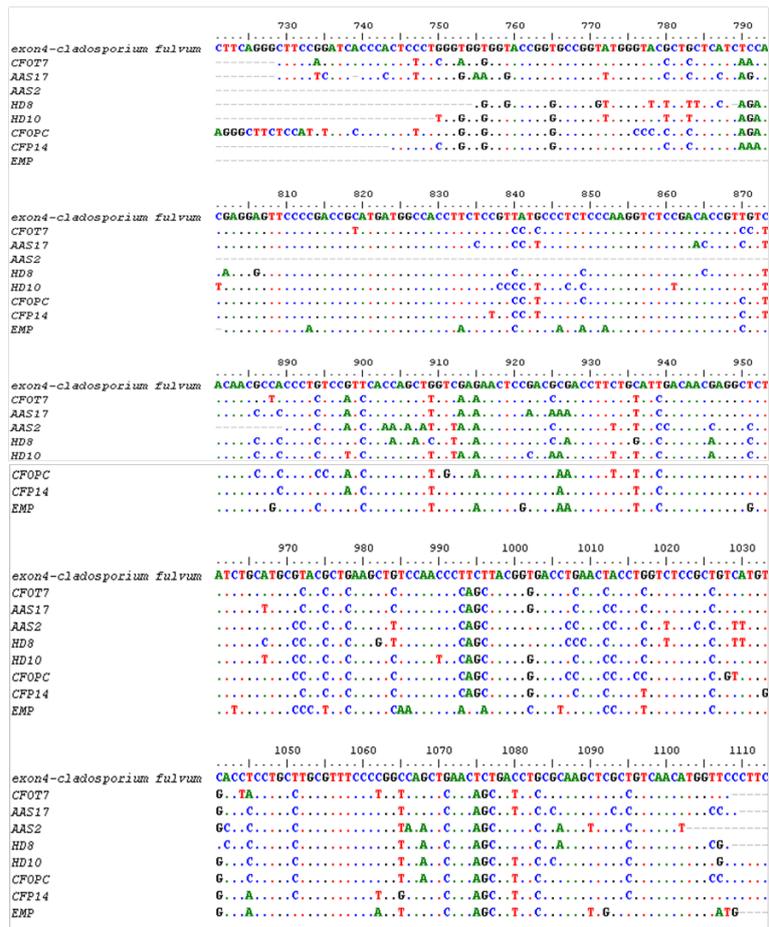


Figura 4.XVIII. Alineamiento β tubulina.

Con la secuencia del fragmento amplificado correspondiente a *actina* (Tabla VI, Anexo), se realizó un blast donde se confirmó la especificidad del par de primers diseñado (Figura 4.XIX ; Tabla VII, Anexo).

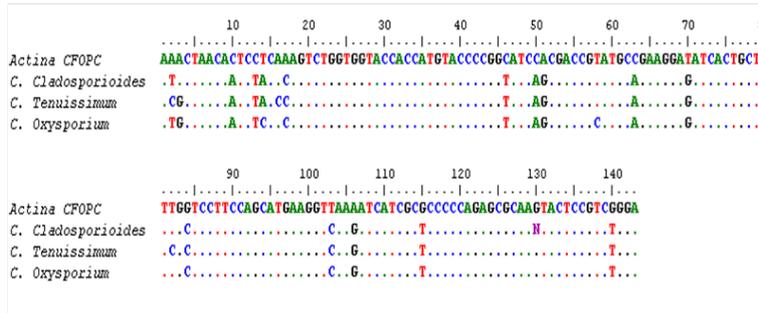


Figura 4.XIX. Alineamiento *actina*.

En lo que hace al análisis de polimorfismos, los fingerprints generados con 6 primers ISSR mostraron que existen polimorfismos entre los aislamientos CFOT7, AAS17, AAS2, HD8, HD10, CFOPC, CFP14 y AAS16, es decir que los mismos son genéticamente distintos. Sin embargo, los aislamientos EMP, ELH y ALH no solo mostraron perfiles conservados entre ellos sino que además estos fueron distintos de los perfiles obtenidos con los otros ocho aislamientos polimórficos. En la **Figura 4.XX** se presenta el dendograma generado con las amplificaciones. Se puede ver que los once aislamientos se agrupan en dos clusters, uno incluye a los aislamientos CFOT7, AAS17, AAS2, HD8, HD10,

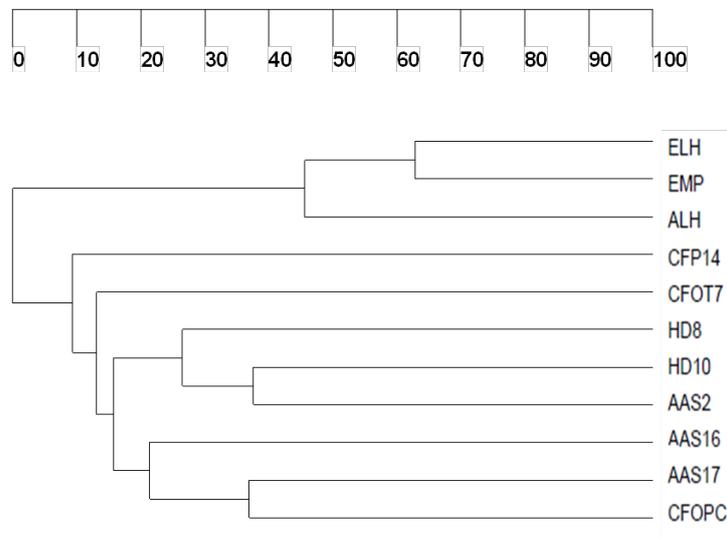


Figura 4.XX. Dendograma ISSRs. Tolerancia: 1%. Método estadístico: UPGMA. Coeficiente de similitud: DICE

CFOPC, CFP14 y AAS16 y el otro a los aislamientos EMP, ELH y ALH.

La amplificación de los genes *avr 2*, *4*, *4E* y *9* es una forma precisa y rápida de determinar la presencia de los genes de avirulencia y con esto establecer las razas de *Passalora fulva* que se encuentran presentes.

La amplificación del gen de avirulencia *avr2*, no fue exitosa con las condiciones de reacción descritas por Stergiopoulos, por ello se trabajó en la puesta a punto de la reacción y más específicamente en la temperatura de annealing, que consistió en la única modificación realizada. En la **Figura 4.XXI** se puede apreciar que la reacción de amplificación más eficiente ocurrió a una temperatura de annealing de 63 °C.

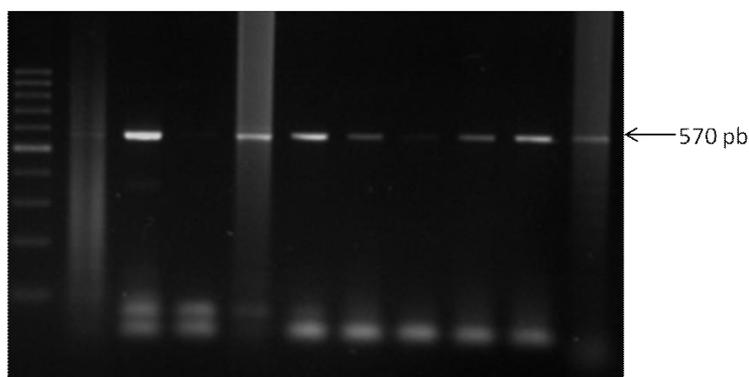


Figura 4.XXI Amplificación Avr2. Calle1: marcador molecular 100-1000 pb.
Calle2: 50,4°C. Calle3:51,3°C. Calle4:52°C. Calle5:54°C. Calle6:56,2°C.
Calle7:58,4°C. Calle8:59,4°C .Calle9:61,3°C. Calle10:63°C. Calle11:64,5°C

Luego, con el fin de dilucidar si los aislamientos eran de *Passalora fulva*, se realizaron amplificaciones de los cuatro genes de avirulencia *avr2*, *avr4*, *avr4E* y *avr9*. Los resultados se presentan en la **Figura 4.XXII**. Por otro lado, en esta reacción también se incluyó ADN extraído de hojas con síntomas típicos de la enfermedad. Se encontró que solo cuando el ADN molde provino de los

aislamientos ELH, ALH y EMP se amplificaron con éxito los genes *avr*. Por otro lado no se obtuvieron las bandas correspondientes a los *avr* cuando la amplificación se realizó con ADN total de la hoja.

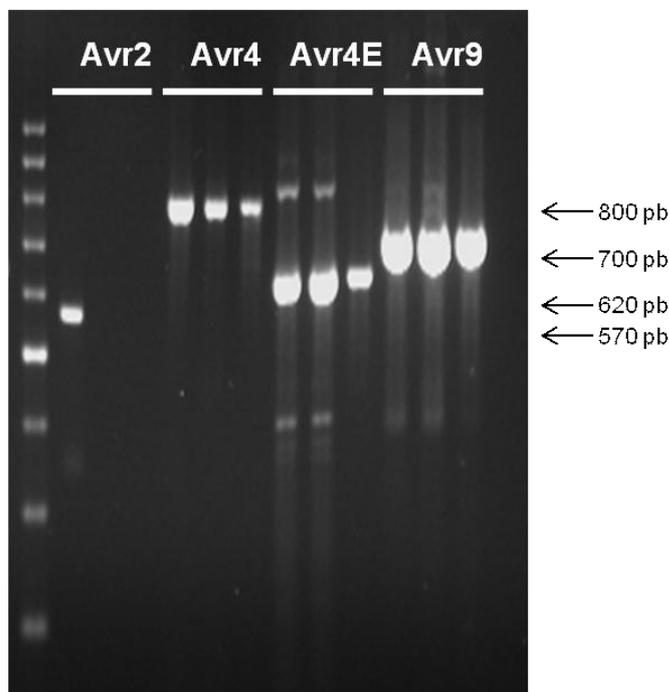


Figura 4.XXII. Amplificación AVR. Las calles 2 ,5 ,8 y 11 corresponden a ELH; 3, 6, 9 y 12 a EMP; y las calles 4, 7, 11 y 13 a ALH.

Los resultados de la reacción anteriormente descrita demostraron que los aislamientos de *P. fulva* contenían, uno cuatro y otros dos aislamientos tres genes de avirulencia. Si bien las reacciones de amplificación de los genes de avirulencia aisladamente permiten identificar las razas, este procedimiento es costoso debido al número de reacciones a realizar y además demanda más tiempo. Por ello, se trabajó en diseñar una reacción de “multiplex” PCR con el fin de amplificar los cuatro genes de avirulencia al mismo tiempo. Este objetivo aparecía como posible considerando que el rango de temperaturas de annealing, para amplificar cada gen *avr*, fue relativamente estrecho. Así se

diseño una reacción de “Multiplex - *avr*”. Con este fin, se trabajó en el ajuste de la concentración de primers, ya que se deben adicionar cuatro pares en una misma reacción y en muchos casos el exceso de los mismos inhiben la reacción. Además, se trabajó en ajustar la cantidad de ADN molde y la temperatura de annealing (**Figura 4.XXIII.A**). El programa de amplificación utilizado se basó en los utilizados en las amplificaciones de los *avr* en forma aislada. Se muestra el gradiente de temperaturas de annealing, donde puede verse que la temperatura óptima de la reacción fue 58,4 °C (**Figura 4.XXIII.B**).

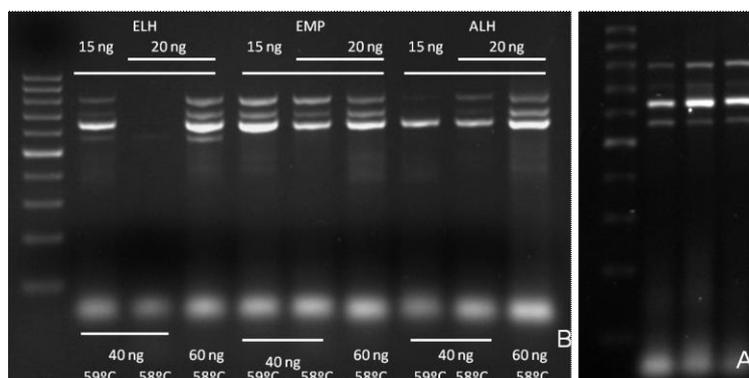


Figura 4.XXIII. Multiplex-*avr*. A. variación de temperaturas de annealing, concentración de molde y cantidad de primer. B. Se usaron 20 ng de cada primer, y se ensayaron las siguientes temperaturas : 54°C, 58.4 y 64,9°C. ADN molde: 40 ng ELH.

La reacción de “Multiplex - *avr*” se realizó en presencia de ADN molde “*avr* positivo” suplementado con cantidades crecientes de ADN de otro aislamiento del género *Cladosporium*. Se demostró que la presencia de ADN no específico, no interfiere la reacción, ya que los cuatro genes de avirulencia se amplificaron aún en presencia de ADN contaminante (**Figura 4.XXIV.A**). Los resultados además demostraron que la reacción es específica ya que se amplificaron los genes *avr* solo cuando el ADN molde fue de *P.fulva* y que las bandas no se

generan por un artefacto producto de la mezcla de primers (**Figura 4.XXIV.B**), ya que no se obtuvo reacción en presencia de ADN molde bacteriano o de otros hongos.

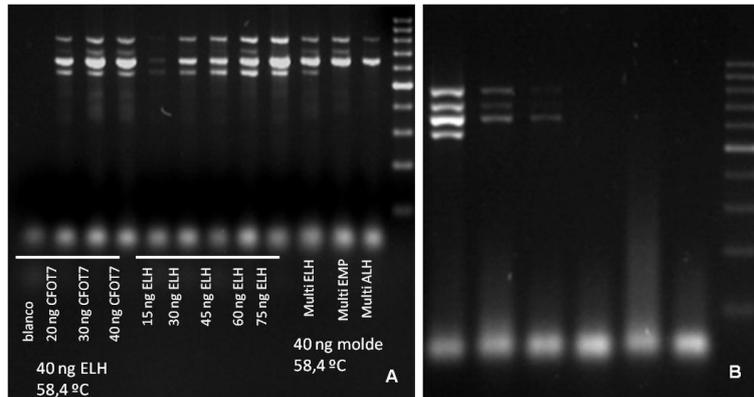


Figura 4.XXIV. Multiplex-avr. A. Calle 1: blanco. Calles 2-3. Ensayo de especificidad. Se mantuvo constante la cantidad de ADN molde de (40 ng) y se agregaron cantidades crecientes de ADN de CFOT7. Calles 6-10. Gradiente de ADN molde. Calles 11-13. Reacción multiplex de los 3 aislamientos detallados. Calle 14: marcador 100-1000 pb. B. Reacción multiplex usando 30 ng de molde de ELH, EMP, ALH, CFOT7, Humicolopsis y Sinorhizobium respectivamente. Calle 7: marcador 100-1000 pb.

Capítulo 5

Discusión

Una de las características que se evaluó fue la velocidad de crecimiento de los aislamientos *in vitro* en medio APG. Se encontró que los aislamientos crecieron con distinta intensidad. Mientras que algunos desarrollaron colonias de 40 mm en un tiempo de aproximadamente 15 días otros lo hicieron en un tiempo considerablemente más largo. Las características morfológicas de los hongos son y han sido elementos importantes de la taxonomía de los hongos (David 1997; Aptroot 2005; Bensch *et al.*, 2010, Braun *et al.*, 2003; Crous 2009; Crous *et al.*, 2006, Crous *et al.*, 2001; Crous *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2007; Dugan *et al.*, 2008; Schoch *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2007). Se ha demostrado que *Cladosporium* suele desarrollar favorablemente en medios más complejos que el APG, como el medio MEA (agar- extracto de malta) y SNA (agar nutritivo sintético) y el desarrollo en esos medios permite identificar más fácilmente las diferencias entre aislamientos de *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum*, (Dugan *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2007), así como también entre las distintas razas fisiológicas de *Passalora fulva* (Crous 2009). Sin embargo el uso de APG fue suficiente para identificar las distintas especies en estudio.

Con el fin de realizar estudios comparativos de los diversos aislamientos se realizaron observaciones en microcultivos de los aislamientos (Dugan *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2009; Crous *et al.*, 2007). Estos cultivos mostraron que los hongos formaron conidios en esas condiciones, pero además, también en los microcultivos se observó que la mayoría de los aislamientos fúngicos mostraron una alta tasa de crecimiento y presentaron conidios pequeños. Esto sugirió que los aislamientos muy probablemente son del

género *Cladosporium*. Sin embargo, tres aislamientos presentaron tasas de crecimiento bajas y además conidios de un tamaño mayor, características similares a las que presentan los representantes de *Passalora fulva* (Crous, 2009). Es decir que, los microcultivos resultaron una técnica sencilla e informativa a nivel de la biología del hongo. Si bien estos resultados se basan en características morfológicas, sugieren que en los síntomas de la enfermedad moho de la hoja del tomate conviven especies de *Cladosporium* probablemente en estrecha relación con el agente patógeno *P. fulva* que presenta crecimiento lento y produce conidios más grandes. Sería importante estudiar el rol de las especies de *Cladosporium* que acompañan al patógeno en la enfermedad y además la dinámica poblacional y la evolución del patógeno en el ambiente.

Otra de las metodologías biológicas que se utilizaron para identificar los aislamientos de *Cladosporium* fue la descrita por De Wit (de Wit *et al.*, 2002). Esta consiste en trabajar con cultivares de tomate conteniendo los genes de resistencia correspondientes a cada gen *avr* de *P. fulva*. La inoculación de las cultivares de tomate sirvió para confirmar que los aislamientos de crecimiento rápido que produjeron conidios más pequeños no enfermaron a las plantas. Sin embargo, cuando el inóculo se hizo en base a alguno de los tres aislamientos identificados como *Passalora fulva* se indujeron en las plantas los síntomas típicos de la enfermedad (Thomma *et al.*, 2005; Ellis, 1971; Holliday & Mulder, 1976; Curtis *et al.*, 1994; Fox, 1997; Jones *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1999; Jones, 1997).

El ensayo de patogenicidad es un análisis clave para determinar si un aislamiento es un agente patógeno. En ese sentido la inoculación de los

cultivares diferenciales de tomate con la suspensión de conidios de los aislamientos del hongo confirmó que en los ambientes estudiados, conviven especies de *Cladosporium* no patogénicas y dos razas de *Passalora fulva*. Si bien las especies de *Cladosporium* en general y *Passalora fulva* en particular contienen pigmentos oscuros como las melaninas (Llorente *et al* en redacción), que suelen ser contaminantes que provocan inconvenientes para el trabajo molecular con ADN genómico, todos los protocolos de extracción de ADN funcionaron con distinta eficiencia. Más aún, si bien un kit de extracción genera un protocolo repetible y trazable, la extracción de ADN con CTAB condujo a la obtención de una mayor cantidad de ADN.

En la actualidad los trabajos de taxonomía orientados a la identificación de individuos demandan disponer de las secuencias universales, que son altamente conservadas como el rDNA. Además se sugiere disponer además de la información de secuencias adicionales, que suelen codificar proteínas estructurales conservadas como por ejemplo la tubulina, actina, histonas o factores de transcripción (Schoch *et al.*, 2006; Dugan *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2009; Bensch *et al.*, 2010). En este sentido se amplificó y secuenció el fragmento de ADN genómico que codifica el ITS de los aislamientos. El análisis blast de las secuencias obtenidas asoció a estas con las correspondientes a *C. cladosporioides* (Crous *et al.*, 2001; Bensch *et al.*, 2010) y *C.sphaerospermum* (Schubert *et al.*, 2009). Estos resultados, de la misma manera que las características morfológicas, sugieren que algunos de los aislamientos obtenidos a partir de lesiones de la hoja del tomate son *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum*. El ITS de uno de los aislamientos que mostraron menor velocidad de crecimiento y producción de conidios

más grandes, mostró en el análisis blast alta homología al ITS de aislamientos de *P. fulva*.

Si bien los genes universales permiten identificar aislamientos, con frecuencia y debido a que están altamente conservados, no permiten analizar la diversidad entre individuos de la misma especie (Schoch *et al.*, 2006). Con este fin se generaron los perfiles usando marcadores moleculares (ISSRs), que permitieron por un lado analizar la diversidad de los aislamientos y por otro agrupar a los mismos aislamientos en dos grandes clusters. Uno de ellos estuvo asociado a la familia *Mycosphaerellaceae* y el otro a la familia *Davidiellaceae* (Crous *et al.*, 2007; Crous *et al.*, 2007 b). Esto demuestra que los marcadores ISSR si bien no se pueden asociar a razas del patógeno y tampoco permiten identificar especies, reflejan con precisión la similitud con grupos o familias de hongos específicas. Como resultado de ello, sugiere que además de tener la característica de mostrar diversidad, poseen poder de discriminación aunque éste es limitado. Probablemente esto se deba, entre otras cosas a la suposición de que una banda es un locus, pero una banda del mismo tamaño no necesariamente es la misma banda y por otro lado una banda puede contener más de un fragmento del mismo tamaño pero que representa distintas secuencias del genoma. Por otro lado, es posible que el potencial de estos marcadores como discriminadores aumente, si se aumenta el número de primers utilizados, de manera de analizar una parte más amplia del genoma.

La presencia de genes específicos y el conocimiento de su secuencia con frecuencia permiten disponer de potentes herramientas de identificación

(Pastorino *et al.*, 2003). En este caso estas herramientas son los genes *avr*. Si bien estos genes se pueden identificar en base a la reacción de cultivares de tomate con genes de resistencia, este tipo de ensayo demanda espacio, tiempo y aún así puede ser difícil de resolver, ya que la sintomatología puede variar en función de las condiciones ambientales. En base a reacciones de PCR desarrolladas por Stergiopoulos y colaboradores (2007), que repetimos pero con primers modificados, comprobamos que en el área de cultivo hortícola muestreada conviven dos razas de *Passalora fulva*. Más aún, en base a esta reacción y a la identificación previa se comprobó que en los síntomas de las hojas conviven especies de *Cladosporium* que viven en el ambiente, como *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum*, junto con especies patógenas como *P. fulva*, tal cual se había demostrado con herramientas biológicas.

Confirmado en base a todos los estudios que en el área de cultivo estudiada conviven dos razas del hongo fitopatógeno, *Passalora fulva*, se realizaron análisis adicionales para confirmar la identidad. Con este fin se procedió a analizar las secuencias de *tubulinas*, gen conservado que con frecuencia se utiliza en estudios taxonómicos (Tigano *et al.*, 2006). Otra secuencia que suele utilizarse con el mismo fin es la secuencia de *actina* (Dugan *et al.*, 2008); la secuenciación del fragmento correspondiente a la *tubulina* y el análisis blast de las secuencias confirmaron la identidad del aislamiento EMP como *P. fulva*.

Una de los roles de la fitopatología es aportar soluciones para la producción, en ese contexto si bien es necesario desarrollar estudios en varios sentidos, uno de los aspectos claves es el diagnóstico preciso y

rápido. El disponer de un buen diagnóstico de los patógenos conduce a la toma de decisiones. En este sentido, si bien se demostró que las amplificaciones individuales de los genes *avr* tal cual lo utilizaron Stergiopoulos (2007) y Bernal Cabrera (2009), permiten identificar razas, es evidente que este tipo de análisis es poco viable, porque es costoso y demanda tiempo. Por ello se desarrolló la reacción de "Multiplex - *avr*" que permitió confirmar la presencia de los genes de avirulencia en una sola reacción. Los resultados permiten inferir que la reacción es confiable ya que no es inhibida por la presencia de ADN contaminante, si bien no se tuvo éxito en amplificar los *avr* a partir de tejido foliar. Es probable que se deba trabajar más intensamente en este sentido, en primer lugar en el aislamiento de ADN a partir de las manchas para que sea de mayor calidad. Pero también se deberá trabajar en las condiciones de reacción si se quiere amplificar con éxito los *avr* directamente partir de ADN de tejido foliar. Esta reacción es conveniente por la velocidad de respuesta, si bien la presencia de varios genes de avirulencia no asegure que todos pertenezcan al mismo organismo. En cualquier caso la reacción es confiable porque solo generó producto cuando el ADN molde provino de *P. fulva*. Vale la pena aclarar que si bien la cantidad de ADN molde de las reacción es un poco alto, es posible que se pueda trabajar con una menor cantidad de ADN en una reacción de real time PCR (Yan *et al.*, 2007). En cualquier caso la "Multiplex - *avr*" condujo a la identificación de razas de *Passalora fulva* presentes en la zona hortícola del Gran La Plata.

Capítulo 6

Conclusiones

- Los síntomas que se encontraron en hojas de cultivares comerciales de tomate de la enfermedad moho de la hoja, contuvieron *Cladosporium* spp. de crecimiento rápido y de crecimiento lento.
- Los aislamientos CFOT7, AAS17, AAS2, HD10, CFOPC, CFP14 y AAS16 se identificaron como *Cladosporium cladosporioides* (Crous *et al.*, 2007); el aislamiento HD8 como *Cladosporium sphaerospermum* (Zalar *et al.*, 2007; Dugan *et al.*, 2008) y el aislamiento EMP como un representante del género *Passalora*, perteneciente a la familia de *Mycosphaerellaceae* (Crous *et al.*, 2009).
- Los aislamientos de *C. cladosporioides* CFOT7, AAS17, AAS2, HD10, CFOPC, CFP14 y AAS16 y el aislamiento HD8, *C. sphaerospermum*, no fueron patogénicos en plantas de tomate susceptibles a la enfermedad.
- Los marcadores moleculares ISSRs no solo agruparon a los aislamientos de los hongos en base a su similitud, sino que además los agrupó en hongos patógenos de tomate y hongos saprófitos.
- El aislamiento EMP identificado como *Passalora fulva* y los otros dos aislamientos ALH y ELH, con características fisiológicas y morfológicas similares, indujeron en plantas susceptibles de tomate síntomas típicos del moho de la hoja del tomate.
- La secuencia del fragmento ITS confirmó la identidad de los organismos, que se agruparon en dos clusters, uno correspondiente a la familia *Davidellaceae* y otro a la familia *Mycosphaerellaceae*.
- La secuencia del ITS también confirmó la identidad del aislamiento EMP como *Passalora fulva*.

- La amplificación de los genes *avr* confirmó que el aislamiento EMP tal cual lo sugerido por el ITS es *Passalora fulva*.
- Se identificaron dos razas de *P. fulva*, una contiene cuatro genes de virulencia (ELH) y la otra raza tiene tres, ya que carece del *avr 2* (ALH, EMP).
- Los representantes de *C.cladosporioides* y *C.sphaerospermum*, especies no patógenas, no contienen genes de avirulencia.
- La reacción de “Multiplex-*avr*” identificó los cuatro genes de virulencia.
- La “Multiplex-*avr*” es específica ya que no amplificó genes *avr* a partir de ADN de otros hongos y de bacterias.

Anexo

Tabla I. Primers utilizados en la caracterización molecular.

Primer	Secuencia	Primer	Secuencia
ITS (White <i>et al.</i> , 1990)		IA5	ACA(CAA)5
ITS4	5'-AAGCTTCTCCGCTTATTGATATGC-3'	LA5	CAG(AAC)5
ITS5	5'-GAATTCGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	FA5	TAC(GA)5
Tubulina (Tartar <i>et al.</i> , 2002)		Avr (Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2007, modificados)	
betatubF	5'-TGGGCYAARGGYCACTACACYGA-3'	AVR2F	5'-CAT CAG CAT ATC CTC TTC CAT CC-3'
betatubR	5'-TCAGTGAAGTCCATCTCCTCCAT-3'	AVR2R	5'-CAG TAC GTT CAA AAG CAG ATA AGG-3
Primers actina		AVR4F	5'-ACG GTA GGT CTG TAC ACG CGA C-3'
ACTF	5'-GGGTTTCGCCCTTCCCCACG-3'	AVR4R	5'-AAC GAA CTG GGT CAT GGAATG-3'
ACTR	5'- CCTTCATGCTGGACGGGGCC-3	AVR4EF	5'-GCC CGG TAT ATC GCT GTG C-3'
Primers ISSRs		AVR4ER	5'-CGG AAC CCC TGG CTG AGA-3'
AA5	GAG(AAG)5	AVR9F	5'-AAT ACA ACC TTG AAA CAG CTA GG-3'
AN	(CAA)5	AVR9R	5'-GGA CTC TAC GGG GCT TGG-3'
GA5	TCA(GT)8		

Tabla I. Lista de primers utilizados en la caracterización molecular.

Tabla II. Secuencias de ITS obtenidas.

Aislamiento	Secuencia
CF07	TGAATAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTA ACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGG GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAATTA ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCT GTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAA TCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTA CGCCGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT CAATAAGCGGAGGG
AAS17	GGAATAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCT AACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGC GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCC TGTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAA ATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCT ACGCCGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCAT ATCAATAACGAGAGAA
AAS2	GGGAAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCT AACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGC GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCC TGTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAA ATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCT ACGCCGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCAT TCAATAAGCGGAGAG
HD8	GGGAAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCT CCGCCCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTTTAC GGGGGGGGCCCCGGGTGGACACATCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATA AATTAACACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA TGGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGG CATGCCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGC GCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGCTCGGGAG GGGAGGCCACGCCGAAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTA CTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
HD10	AGGATAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACC ACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGGGG GGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA TTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAAGTAAAGT AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAAATCG ACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCTACCG CGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA TAAGCGAGGGA
CFOPC	GAAATAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTA ACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGG GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCT GTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAA TCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCTA CGCCGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT CAATTATGAAAAA
CFP14	GGTATAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTA ACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGG GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCT GTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAA TCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCTA CGCCGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT CAATANCGAAGAAG
AAS16	GGGATAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCT AACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCGCACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGCCTTCGGGC GGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCC TGTTCCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGCGTCCGCCCGCTGCCTCAA ATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCT ACGCCGTAAAACAACCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCAT ATCAATAAGCGGAGG
EMP	GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCCTGTAGCAGTCTTTGAGCTTAGTATCATTACTGAGTGAGGGCATCA CGCCCGACACTCCAACCCCTGTGAACCAACTCTGTTGCTTCGGGGGGACCCCGCCGTTTCGGCGAC GGCCGCCCGGAGATCATCAACACTGCATCTTTGCGTCCGAGTCTTAAAGTAAATTTAAACAAAACCTTTC AACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCGAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCCTGTTGG AGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTCCGGTTCGGCGGCTTGAAGTCTCCG GCTGAGCAGTCTGCTCTAAGCGTTGTGCATATTTGCTAAAGAGTTCGGGGGGCTTTTGGCCGTTA AATCTTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAG GG

Tabla II. Secuencias ITS obtenidas.

Tabla III.

Aislamiento	Número de acceso
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AF393691.2; HQ832794.1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AF455481.1
<i>Cladosporium fulvum</i>	AF393701.2; AF393700.3

Tabla III. Números de acceso de las secuencias ITS empleadas.

Tabla IV.

Aislamiento	Secuencia
CFOT7	CTTCCAGATCACCCACTCTCTCGGAGGGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACCCTCCTCATCAACAAGATC CGCGAGGAGTTCCCGACCCGATGATGCCACCTTCTCCGTCCTCCCTCCTCCAAAGGCTCCGACACC GTCCCTTGAGCCCTACAACGCTACCTCTCCATCCACCAGCTTGTCAAAAACCTCCGACCCGACCTTGTAT CGACAACGAGGCTCTCTACGACATCTGCATGCCACCCCTCAAGCTCTCCAACCCAGCTACGGGGACCT CAACCCACTCGTCTCCGCGTCTATGTCGGGGTACTACCTGCCCTGCGTTTCCCTGGTCAGCTCAACAG CGATCTCCGCAAGCTCGCCGTCACATGGTTT
AAS17	CTTCTCATCCCCCTCTCTGGGGGAAGGGACCGGTGCCGGTTGGGTACCCTCCTCCTCAGCAAGATC CGCGAGGAGTTCCCGACCCGATGATGCCACCTTCCCGTCTTCCCTCTCCAAAGGCTCCCGAACCC GTGCTTGAGCCCTACAACCCCCCTCTCCATCCACCAGCTTGTCAAAAACCTCCAACAAAACCTTCTGTAT CGACAACGAGGCTCTCTACGACATCTGCTTGGCACCCCTCAAGCTCTCCAACCCAGCTACGGGGACCT CAACCCCTCTGCTCCGCGTCTATGTCGGGGTACCCCTGCCCTGCCCTTCCCGGTCAGCTCAACAG CGATCTCCCAAGCTCCCGTCAACATGGCCCC
AAS2	CCCTCTCCATCCAAAAACATGTTAAAACTCCGACCCGACCTTTTGTATCCACAACCCAGGCCCTACGAC ATCTGCATGCCACCCCTCAAGCTTTCCAACCCAGCTACGGTGACCCCAACCCCTCGTTTCCCGCGTTT TGTCCGGGGTGCCCGCTGCCCTTCCCGGTAACTCAACAGCGACCTCCGAAAGTTCGCGCTCA ACT
HD8	GGGGGACCGGGGCGGTTGGGTTCTCTTTTCTAGAAAAATCCGCAAGGGTTCCCGACCCGATGAT CGCCACCTTCTCCGTCATGCCCTCCCGAAGTCTCCGACCCCGTTGTGAGCCCTACAACCCGCTT CTCCGTCACAAAGATCGTTGAAAACCTCCGACCCAACTTCTGGATCGACAACAAGGCCCTTACAATACT GCCTGCCACCCCTCAAGGTTTCAACCCAGCTACGGTGACCCCAACCTCGTTTCCCGCGTTTGT CCGGGGTCCCGCTGCCCTGCGTTTCCCGGTCAACTCAACAGCGACCTCCGAAAGCTCCCGCTCAACA TGGCGC
HD10	TGGGGGGGTACCGGGGCGGTTGGGTACTTCTCATCAGAAAAATCCGTAAGGATTTCCCGACCC CATGATGGCCACCTTCTCCCGCTTCCCGCCCAAGGCTCTGACACCGTTGTTGAACCCATAACCC CCCTCTCCTTCCACCAGCTTGTAAAACTCCCAACAGCTTTTGTATCGACAACAAGGCCCTTACAGA CATCTGCTTGCCACCCCTCAAGCTCTCCAATCCAGCTACGGGGACCTCAACCCCTCGTCTCCGCGT CATGTCCGGGGTACCCCTGCCCTGCGTTTCCCGGTCAACTCAACAGCGATCTCCCAAGCTCCCGCT CAACATGGTGCCTTCCCGCTCTCCACTTCTCATGATTGGATTCCCTCC
CFOPC	CTGCACTGCCTCCAGGGCTTCTCCATGTATCCCCACTCTCTGGGGGGGGTACCGGGGCGGATGTC CCCCCTCCTCATCAGAAAAATCCGCGAGGAGTTCCCGACCCGATGATGGCCACCTTCTCCGCTTCCC TCCCCAAGGCTCTCCGACCCGCTGTTGAGCCCTACAACCCCGCTCCCATCCACCAGCTTGGCGAA AACTCCGAGAAACCTTTGTATCGACAACGAGGCTCTTACAACATCTGCATGCCACCCCTCAAGCTCTC CAACCCAGCTACGGGGACCCCAACCCCGCTCTCCGCGGTATGTCCGGGGTACCCCGCTGCCCTGC GTTTCCCGGTCAACTCAACAGCGATCTCCGCAAGCTGCCGTCAACATGGCCCCCTTCCCGCGCTCC ATTTTTCAGATTGGATTCCCGCTTCCACTCTCGGGGGGCCACAGCTTCCGCGCGCTCTCCGTGG CGGAGCTTACCCAGCAGATCTTCAACCCGAAGAATGATGGCCGCGCCAACTTCCGCAACGGTCTCTA CCTCACTTGTCTCCCCATCTACCCGCGAAAGGCTCTCCATGAAGGGGGTCCGAGGCCAGATCCCAACA GTCAAAAACAAAAACCTCCGCTTATTTTTTTGAGTGGATCCCAAAAACGTCATGACCGCCCTTCTGTGAA ATCCCTCCCGGGGCTTCAAGATTTTCTTCCACTTCTGTCGGCAACAGCACCTTCAATTAAGGAGCTG TTAAGCGTGTGGTGACCGTCTACTGCCATGTTCAAGGCCAAAGCTTTTTTCTACTGGGACACTGGG GAGGCTGACGAGAT
CFP14	CTCCCTCGGGGGGGTACCGGGGCGGTTGGGTACCCCTCCTCATCAAAAAGATCCGCGAGGAGTTCCC CGACCCGATGATGGCCACCTTCTCTGTCTTCCCTCTCCCAAGGCTCCGACACCGTGTGAGCCCTAC AAGCCCCCTGTCATCCACCAGCTTGTGAGAACTCCGACGAGACTTCTGTATCGACAACGAGGCT CTCTACGACATCTGCATGCCACCCCTCAAGCTCTCCAACCCAGCTACGGGGACCTCAACACCTTGTCT CCGCGCTATGGCCGGGGGACCCCTGCCCTGCGTTTCCCTGGGACGCTCAACAGCGATCTCCCGAAG CTCGCGTCAACATGGTTCCCTTCCCGGCTTCAATTTCTCATGATGCGTTTCCCTCCCTCACC
EMP	GAGGAGTTCCAGACCCGATGATGCCACCTACTCCGTCATGCCATCCAAAGGTTCCGACCCGTC GTCGAGCCATAACCGGACCCCTCCGTCACCAGCTTGTCAAAAACCTGGGACGAAACCTTCTGTATCG ACAACGAGGCGCTGTACGACATTTGCATGCCCTTCTCAAGCTCAACAACCCATCATACGGCGACTTGA CCCCCTTGTCTCCCGCGTCTATGTCGGGGTACCCCTGCTTCCGTTTCCAGGTCAGCTCAACAGCGA TCTCCGCAAGTTGGCTGTCAACATGGTATG

Tabla IV. Secuencias de *β tubulina* obtenidas.

Tabla V.

Aislamiento	Número de acceso
<i>Passalora fulva</i>	EF432762.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EF101453.1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EF101409.1

Tabla V. Números de acceso de *β tubulina* utilizadas.

Tabla VI.

Aislamiento	Secuencia
CFOPC	AAACTAACA CTCTCAAAGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCCGGCATCCACGACCGTATGCCGAA GGATACACTGCTCTTGGTCCTCCAGCATGAAGGTTAAAATCATGCGCCCCAGAGCGCAAGTA CTCCGTCGGGA

Tabla VI. Secuencia de actina obtenida.

Tabla VII.

Aislamiento	Número de acceso
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AJ300328.1
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AJ300324.1
<i>Cladosporium oxysporium</i>	AJ300318.1

Tabla VII. Números de acceso de las secuencias de actinas utilizadas.

Bibliografía

- Ackerveken, G. F. J. M. van de; Kan, J. A. L. van & 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.
- Ackerveken, G. F. J. M. van de; Kan, J. A. L. van; Joosten, M. H. A. J.; Muisers, J. M.; Verbakel, H. M & Wit, P. J. G. M. de. (1993). Characterization of two putative Pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 210-215.
- Agrios, G. N. (2005). "Plant Pathology". 5ta edición.
- Aleuxopoulos, C. & Mims, C. (1985). Introducción a la Micología. Ed. Omega.
- Aptroot, A. (2006). *Mycosphaerella* and its anamorphs 2. Conspectus of *Mycosphaerella*. *CBS Biodiversity Series* 5: 1-231.
- Arx, J. von. (1983). *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*. 86, p. 47-48.
- Atlas, R. M & Bartha, R. (1998). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. *Pearson, Addison Wesley*.
- Bensch, K; Groenewald, J. Z; Dijksterhuis, J; Starink-Willemse, M; Andersen, B; Summerell, B. A; Shin, H. D; Dugan, F.M; Schroers, H-J; Braun, U & Crous, P.W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae, Capnodiales*). *Studies in Mycology* 67: 1-94.
- Bernal Cabrera, A; Martínez Coca, B & Herrera Isla, L. (2009). Caracterización de aislados de *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous provenientes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de cultivo protegido. *Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Facultad de ciencias agropecuarias. Centro de investigaciones agropecuarias*.
- Bernal, A; Martínez, B & Infante, D. 2009: Método para evaluar la respuesta de genotipos de tomate inoculados con *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous en invernadero. *Rev. Protección Veg. Vol. 24 No. 2: 102-105*
- Blancard, D. (1992). Enfermedades del tomate. Observar, identificar y luchar. *INRA. Ed. Mundi-Prensa, 212 p.*
- 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 & 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.
- Bornet, B & Branchard, M. (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: reproducible and specific tools for genomic fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 19: 209-215.
- Boucias, D. G; Scharf, D. W; Breaux, S, E; Purcell, D.H & Mizell, R. E. (2006). Studies on the fungi associated with the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata* with emphasis on a new species *Hirsutiella homalodiscae* nom. prov. *BioControl* (2007) 52:231-258.
- Boukema, I. W. (1981). Races of *Cladosporium fulvum* Cooke (*Fulvia fulva*) and genes for resistance in the tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Proceedings of the meeting of the Eucarpia Tomato Working Group. Avignon, p. 287-292*.
- Braun, U; Crous, P.W; Dugan, F; Groenewald, J.Z & Hoog, G.S. (2003). Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. Nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycol. Progress* 2: 3-18.
- Butler, E. J & Jones, S.G. (1949). *Tomato leaf mould, Cladosporium fulvum* Cooke. *Macmillan, London, pp. 123*.
- Cai, Xin-Zhong; Zhou, X; Xu, You-Ping; Joosten, M. H. A. J & Wit, P. J. G. M. de. (2007). *Cladosporium fulvum* CfHNNI1 induces hypersensitive necrosis, defence gene expression and disease resistance in both host and nonhost plants. *Plant Mol Biol* 64:89-101.
- censo Nacional Agropecuario. Secretaria de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación. 2008.
- Chupp, C & Sherf, A.F. (1960). *Vegetable disease and their control*. Pp. 541-545.
- Ciferri, R. (1952). A few critical Italian fungi. *Atti* 10: 237-247.
- Cooke, M.C. (1883). New American Fungi. *Grevillea* 12:32.

- Corvo Dolcet, S. (2005). Zonas de Producción del Cultivo del Tomate en la Argentina. *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección de Agricultura*. <http://www.seedquest.com/News/releases/2005/pdf/13528.pdf>. Acceso: 23-05-2006.
- Crous, P. W. (2009). Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Fungal Diversity* 38: 1-24.
- Crous, P. W; Braun, U & Groenewald, J. Z. (2007). *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1–32.
- Crous, P. W; Braun, U & Groenewald, J. Z. (2007.b). *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1–32.
- Crous, P. W; Braun, U; Schubert, K & Groenewald, J. Z. (2006). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33–56.
- Crous, P. W; Kang, J.C & Braun, U. (2001). A phylogenetic redefinition of anamorphs genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081-1101.
- Crous, P. W; Schoch, C. L; Hyde, K. D; Wood, A.R; Gueidan, C; Hoog, G. S & Groenewald, J. Z. (2009). Phylogenetic lineages in the *Capnodiales*. *Studies in Mycology* 64: 17–47.
- Crous, P.W; Aptroot, A; Kang, J. C; Braun, U & Wingfield, M.J. 2000: The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Stud. Mycol.* 45: 107-121.
- Crous, P.W; Braun, U; Schubert, S. K & Groenewald, J. Z. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33–56.
- 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.
- Darnell, J. E & Doolittle, W. F. (1986). Speculations on the early course of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 1271-1275.
- David, J.C. (1997) Contribution to the systematics of *Cladosporium* Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycological papers* 172: 1-157.
- Dixon, M. S; Ones, D; Keddie, J; Thomas, C; Harrison, K & Jones, J.D.G. (1996). The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises 2 functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Plant Cell* 84: 451- 459.
- Doyle, J. J & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dugan, F. M, Braun, U; Groenewald, J. Z & Crous, P. W. (2008). Morphological plasticity in *Cladosporium sphaerospermum*. *Persoonia* 21: 9–16.
- Efron, B. (1979). Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann. Statist.* Volume 7, Number 1, 1-26.
- Efron, B; Halloran, E & Holmes S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic tree. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 93, 13429-13434.
- Elad, Y. (2003). Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and applications. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 68(4 Pt A):17-24.
- Ellis, M.B. (1971).: *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 507 p.
- Esse, H. P.van, Thomma, B. P. H. J; Klosostwe, J. W, van't & 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.
- FAO; Foodland Agriculture Organization. (www.fao.org). 2010.
- FAO; Foodland Agriculture Organization. “El Cultivo Protegido en Clima Mediterráneo” (www.fao.org) 2008.
- FAO; Foodland Agriculture Organization. Base de datos on line. (www.faostat.fao.org). 2010.
- Felsenstein, J & Kishino, H. (1993). Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies?. *Syst. Biol.* 42(2):193-200.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, Vol 125. No 1.1-15.
- Flor, H. H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene – for – gene concept. *Annu.Rev.Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fox, R. T. V. (1997). Fungal goes in your garden. 36. Leaf Moulds. *Mycologist* 11:88.
- Gabor, B & Wiebe, W. (1997). Tomato diseases. *A practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. Seminis Vegetable Seeds, Inc. Saticoy, CA.*

- Galvan, M. Z; Bornet, B; Balatti, P. A & Branchard, M. (2003). Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Euphytica* 132: 297–301.
- Gams, W; Verkley, G. J. M & Crous, P. W. (2007). CBS Course in Mycology, 5th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
- Glenn, T. PEG Precipitation of PCR products. Protocolo online. <http://www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/olsen/files/PCR.pdf>.
- Gomez, O; Casanova, A; Laterrot, H & Anais, G. (2000). Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. *IIHLD. La Habana*, 159 p.
- 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.
- Herrera Isla, L & Alonso Díaz, Y. (2006) Efecto de los medios de cultivo y la temperatura en el crecimiento de *Cladosporium fulvum* Cooke (sin. *Passalora fulva*). *Fitosanidad*, vol. 10, núm. 1, pp. 25-28. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Ciudad de La Habana, Cuba.
- Hillis, D. M & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, Vol. 42, No. 2. pp. 182-192.
- Ho, M. H. M; Castañeda, R. F. R; Dugan, F. M & Jong, S. C. (1999). *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and expanded Key. *Mycotaxon* 72: 115-157.
- Holder, M & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature reviews. Genetics*. Volume 4: 275-284.
- Holliday, P & Mulder, J. L. (1976). C.M.I Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 48. *Fulvia fulva*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Honee, G; Van den Ackerveken I, G. F. M; Van den Broek, H. W. J; Cozijnsen, T. J; Joosten, M. H. A. J; Koomangersmann, M; Vercoort, J; Vogelsang, R; Vossen, P; Wubben, J. P & Wit, P. J. G. M de. (1994). Molecular characterization of the interaction between the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and tomato. *Euphytica* 79: 219-225.
- Hughes, S. J. (1976). Sooty molds. *Mycologia* 4: 693-820.
- Hunter, G. C; Wingfield, B. D; Crous, P. W & Wingfield, M. J. (2006). A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus* leaves. *Studies in mycology* 55: 147–161. InfoAgro.com.
- Jones, D. A; Thommas, C. M; Hammond-Kosak, K. E; Balint- Kurti, P. J & Jones, J. D. G. (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 226: 789-790.
- Jones, J. B; Jones, J. P; Stall, R. E & Zitter, T. A. (1997). Compendium of tomato diseases. APS Press, USA, 73p.
- Joosten, M. H. A. J & Wit, P. J. G. M. de. (1989). Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiol.* 89: 945-951.
- Joosten, M. H. A. J & Wit, P. J. G. M. de. (1999). The tomato – *Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 335-367.
- Joosten, M. H. A. J; Cozijnsen, T. J & 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; Verbakel, H. M; Nettekoven, M. E; Leeuwen, J. van; Vosse, R.T. van der & Wit, P. J. G. M. de. (1995). The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 45-59.
- Joosten, M. H. A. J; Vogelsang, R; Cozijnsen, T. J; Verberne, M. C & Wit, P. J. G. M. de. (1997). The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4 mediated resistance by producing unstable Avr4 elicitors. *Plant Cell* 9: 367-379.
- Lacap, D. C; Hyde, K. D & Liew, E. C. Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12: 53-66.
- Laugé, R; Goodwin, P. H; Wit, P. J. G. M. de & Joosten, M. H. A. J. (2000). Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plant. *Plant J.* 23 : 375- 745.
- Lazarovits, G & Higgins, V. J. (1976 a). Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Can. J.Bot.* 54: 224-234.

- Lazarovits, G y Higgins, V. J. (1976 b). Ultrastructure of susceptible resistant and immune reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J.Bot.* 54: 235- 249.
- León Martínez Castilla. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. *Ecología molecular*. Capítulo 4. Año 2007.
- Lii, W-H. (1997). Molecular evolution. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Llorente, C.; Bárcena, A.; Vera Bahima, J; Saparrat M. C. N.; Rozas, M. F.; Mirífico, M. V. & Balatti P.A.DHN-melanin in *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 and identification of a pks gene involved in its synthesis.
- Marrero, T. A. (2003). Principales plagas y enfermedades de las hortalizas en cultivo protegido. Bases del Manejo Integrado de Plagas. *Conferencia del 2^{do} Curso Internacional de Cultivo Protegido*. IIHLD, La Habana, CD-R.
- MINIAGRI 2006: Estrategia fitosanitaria para la campaña de frío 2006-2007. CNSV, La Habana, 3p.
- Ministerio de Asuntos Agrarios. 2005. Censo Hortiflorícola de la Provincia de Buenos Aires. Dirección de Estadística. http://www.maa.gba.gov.ar/agricultura_ganaderia/archivos/resultadofinal.pdf.
- Mullis, K; Faloona, F; Scharf, S; Saiki, R; Horn, G; & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263–273.
- Orgel, L. E. (1992). Molecular replication: Origin of life. *Nature* 358: 203-209.
- Orgel, L. E. (1994). The origin of life on Earth. *Scientific American* 271: 76-83.
- Pastorino, G.N; Martínez Alcántara, V & Balatti, P.A. (2003) Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* [L.] Merr) by a multiplex PCR reaction. *FEMS Microbiology Letters*. Volume 229, Issue 2, pages 153–158.
- Perez García, A. (1999). La interacción tomate-*Cladosporium fulvum*: un modelo experimental para el estudio de la interacción patógeno-planta. *Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga*.
- Reissinger, A, Vilich, V & Sikora, R. A. (2001). Detection of fungi *in planta*: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 105 (5): 563-566.
- Reynolds, D. R. (1998). Capnodiaceous sooty mold phylogeny. *Can. J. Bot.* 76: 2125- 2130.
- Ronco, L; Rollan, C; Larran, S; Mónaco, C & Dal Bó, E. (2008). Manual para el reconocimiento de enfermedades en Tomate y Pimiento. Centro de Investigación de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (CIDEFI).
- Sambrook, J; Fritsch, E. F & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Sanger, F; Nicklen, S & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467.
- Saparrat, M. C. N; Ronco, L & Balatti, P. A. (2008). Hongos y organismos morfológicos afines. Apunte teórico. Facultad de ciencias agrarias y forestales. UNLP.
- Schoch, C. L; Crous, P. W; Groenewald, J. Z; Boehm, E. W. A; Burgess, T. I; de Gruyter, J; de Hoog, G. S; Dixon, L. J; Grube, M; Gueidan, C; Harada, Y; Hatakeyama, S; Hirayama, K; Hosoya, T; Huhndorf, S. M; Hyde, K. D; Jones, E. B. G; Kohlmeyer, J; Kruys, Å; Li, Y. M; Lücking, R; Lumbsch, H. T; Marvanova, L; Mbatchou, J. S; McVay, A. H; Miller, A. N; Mugambi, G. K; Muggia, L; Nelsen, M. P; Nelson, P; Owensby, C. A; Phillips, A. J. L; Phongpaichit, S; Pointing, S. B; Pujade-Renaud, V; Raja, H. A; Rivas Plara, E; Robberts, B; Ruibal, C; Sakayaroj, J; Sano, T; Selbmann, L; Shearer, C.A; Shirouzu, Y; Slippers, B; Suetrong, S; Tanakata, K; Volkmann-Kohlmeyer, B; Wingfield, M. J; Wood, A. R, Woudenberg, J. H. C; Yonezawa, H; Zhang, Y & Spatafor, J. W. (2009). A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes*. *Studies in Mycology*. 64: 1-15.
- Schoch, C; Shoemaker, R. A; Seifert, K. A; Hambleton, S; Spatafora, J. W & Crous, P. W. (2006). A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1043-1054.
- Schubert, K; Greslebin, A; Groenewald, J. Z & Crous, P. W. (2009). New foliicolous species of *Cladosporium* from South America. *Persoonia* 22: 111–122.
- Schubert, K; Groenewald, J. Z; Braun, U; Dijksterhuis, J; Starink, M; Hill, C. F; Zalar, P, de Hoog, G. S & Crous, P. W. (2007). Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Dothidiellaceae*, *Capnodiiales*), with standardization of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* 58: 105–156.

- Stenglein, S. A & Balatti, P.A. (2006). Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 68: 158-167.
- Stergiopoulos, I; Groenewald, M; Staats, M; Lindhout, P; Crous, P. W & 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 & 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.
- Swofford, D. L; Olsen, G. J; Waddell, P. J & Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. *Molecular systematics*.
- Takken, F. L. W; Schipper, D; Nijkamp, H. J. J & Hille, J. (1998). Identification of Ds-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *The plant journal*. 14: 401-411.
- Tartar, A; Boucias, D, G; Adams, B. J & Becnel, J. J. (2002). Phylogenetic analysis identifies the invertebrate pathogen *helicosporidium* sp. As a green alga (chlorophyta). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* . 52, 273–279.
- Thomas, C. M; Jones, D. A; Parniske, M; Harrison, K; Balint-Kurti, P. J; Hatzixanthis, K & 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. H. J; Esse, H. P. van; Crous, P. W & Wit, P. J. G. M. de. (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Molecular plant pathology*. 6 (4) , 379–393.
- Tigano, M. S, Adams, B; Maimala, S & Boucia, D. (2006). Genetic diversity of *hirsutella thompsonii* isolates from thailand based on *afp* analysis and partial *beta tubulin* gene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, 715-721.
- Van den Burg, H. A, Harrison, S. J; Joosten, M. H. A. J, Vervoort, J & Wit, P. J. G. M de. (2006). *Cladosporium fulvum* *Avr4* protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *MPMI* Vol. 19, No. 12, pp. 1420–1430. The American Phytopathological Society.
- Vida, J. B; Zambolim, L; Tessmann, D. J; Brandao Filho, J. U. T; Verzignassi, J. R & Caixeta, J. R. (2004). Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia brasileira* 29: 355-372.
- White, T. J; Bruns, T; Lee, S & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A; Gelfand, D. H; Sninsky, J. J & White, T. J (eds) *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic press, San Diego, p. 315-322.
- Wit, P.J.G.M.de & Flach, W. (1979). Differential accumulation of phytoalexins in tomato leaves but not in fruits after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Plant Pathol.* 15: 257-267.
- Wit, P.J.G.M.de & Kodde, E. (1981). Further characterization and cultivar-specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates and cell-walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.* 18: 297-314.
- Wit, P.J.G.M.de & Meer, F. E, van der. (1986). Accumulation of the pathogenesis-related tomato leaf protein P14 as an early indicator of incompatibility in the interaction between *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 28: 203-214.
- Wit, P.J.G.M.de. (1977). Light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Neth. J. P1. Path.* 83: 109 – 122.
- Wit, P.J.G.M.de; Brandwagt, B. F; Burg, H. A; van den; Cai, X; Hoorn, R. A. L. van der; de Jong, C. F; Klooster, J. van 't; Kock, M. J. D. de; Kruijt, Lindhout, W. H; Luderer, R; Takken. F. L. W; Westerink, N; Vervoot, J. J. M & Joosten, M. H. A. J. (2002). The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Anton. Leeuw. Int. J.G* 81: 409-412.
- Wolfe, A. D & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *Molecular systematics of plants two*, Capítulo 2.
- Yan, L, Zhang, C; Ding, L & Ma, Z. (2007). Development of real-time PCR assay for the detection of *Cladosporium fulvum* in tomato leaves. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Zalar, P; Hoog, G. S.de; Schroers, H-J; Crous, P. W; Groenewald, J. Z & Gunde-Cimerman, N. (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments *Studies in Mycology* 58: 157–183.

Zietkiewicz, E; Rafalski, A & Labuda, D. (1994). Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.