

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata



Tesis Doctoral

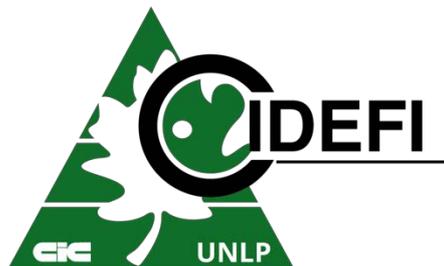
**“Mancha Gris de la Hoja del Tomate:
Identificación, Biología y Genómica del Agente Etiológico”**

Doctorando: Lic. Mario Emilio Ernesto Franco

Director: Ph. D. Pedro Alberto Balatti

Director: Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat

2019



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

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y al Instituto San Patricio, por la formación.

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

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

A mis amigos, porque siempre están.

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

ÍNDICE

Resumen.....	7
Abstract.....	9
Capítulo I: Introducción General.....	11
I. I. Tomate	12
I. I. I. Origen y Distribución.....	12
I. I. II. Sistemática	12
I. I. II. I. Revisión Sistemática	12
I. I. III. Características Morfológicas	13
I. I. IV. Propiedades Nutricionales y Organolépticas.....	14
I. I. V. Cultivo	16
I. I. VI. Producción.....	17
I. I. VII. Enfermedades.....	21
I. I. VII. I. Enfermedades de Origen Abiótico.....	22
I. I. VII. II. Enfermedades de Origen Biótico.....	23
I. I. VII. II. III. Enfermedades de Tomate Causadas por Hongos y Oomicetes	24
I. II. Mancha Gris de la Hoja del Tomate	25
I. II. I. Distribución y Alcance del Daño.....	25
I. II. II. Agentes Causales	25
I. II. III. Sintomatología	25
I. II. III. Ciclo de la Enfermedad y Epidemiología	27
I. II. IV. Condiciones Predisponentes.....	28
I. II. V. Manejo de la Enfermedad.....	28
I. II. V. I. Prácticas de Cultivo	28
I. II. V. II. Cultivares Resistentes.....	29
I. II. V. III. Control Químico	29
I. II. V. IV. Control Biológico	30
I. III. El Género <i>Stemphylium</i>.....	31
I. III. I. Sistemática.....	31
I. III. I. II. Revisión Sistemática	31
I. III. II. Características Morfológicas.....	32
I. III. III. Hábitos y Rango de Hospedadores.....	35
I. IV. Interacción Planta-Hongo Fitopatógeno.....	36
I. IV. I. Infección y Colonización	36
I. IV. II. Interacción Molecular.....	39
I. V. Hipótesis y Objetivos.....	41
I. V. I. Hipótesis General.....	41
I. V. II. Objetivos	41

I. V. II. I. Objetivo General.....	41
I. V. II. II. Objetivos Específicos	41
Capítulo II: Identificación y Caracterización de Aislados de <i>Stemphylium</i> Causantes de la Mancha Gris de la Hoja del Tomate en Argentina.....	42
II. I. Introducción.....	43
II. I. I. Hipótesis del Capítulo.....	47
II. I. II. Objetivos del Capítulo	47
II. II. Materiales y Métodos.....	48
II. II. I. Material Fúngico.....	48
II. II. I. I. Material Fúngico de Partida	48
II. II. I. II. Material Fúngico Complementario	48
II. II. II. Caracterización Morfológica.....	50
II. II. III. Análisis Molecular.....	51
II. II. III. I. Extracción de ADN Genómico	51
II. II. III. II. Amplificación y Secuenciación del ITS y <i>Gpd</i>	51
II. II. III. III. Análisis Taxonómico.....	53
II. II. III. IV. Análisis de Diversidad Genética	54
II. II. IV. Evaluación de la Agresividad.....	56
II. II. V. Aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235	56
II. II. VI. Inoculación Cruzada de Aislados Provenientes de Pimiento en Tomate	57
II. III. Resultados	58
II. III. I. Caracterización Morfológica.....	58
II. III. II. Identificación Molecular.....	68
II. III. III. Análisis de Diversidad Genética	73
II. III. IV. Agresividad	74
II. III. V. Material Fúngico Adicional.....	77
II. III. VII. Aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235.....	79
II. III. VI. Aislados Provenientes de Pimiento.....	83
II. IV. Discusión	88
Capítulo III: Genoma Borrador de <i>Stemphylium lycopersici</i> CIDEFI-216	93
III. I. Introducción	94
III. I. I. Hipótesis del Capítulo	100
III. I. II. Objetivos del Capítulo.....	100
III. II. Materiales y Métodos	101
III. II. I. Material Fúngico	101
III. II. II. Extracción de ADN Genómico	101
III. II. III. Secuenciación y Ensamblaje <i>De Novo</i> del Genoma	101
III. II. IV. Anotación Génica Estructural y Funcional.....	103

III. II. V. Evaluación de la Completitud del Espacio Génico	104
III. III. IV. Disponibilidad de Datos	104
III. III. Resultados	106
III. III. I. Secuenciación y Ensamblaje	106
III. III. II. Anotación	109
III. III. III. Completitud del Genoma Borrador	112
III. IV. Discusión	113
 Capítulo IV: Genoma Mitocondrial de <i>Stemphylium lycopersici</i> CIDEFI 216: Caracterización, Taxonomía y Evolución.....	
IV. I. Introducción.....	119
IV. I. I. Hipótesis del Capítulo	122
IV. I. II. Objetivos del Capítulo.....	122
IV. II. Materiales y Métodos.....	123
IV. II. I. Ensamblaje <i>De Novo</i>	123
IV. II. II. Anotación Estructural y Funcional de Genes	123
IV. II. III. Secuencias Repetitivas	123
IV. II. IV. Mitogenómica Comparativa	124
IV. II. V. Filogenia.....	124
IV. II. VI. Disponibilidad de Datos	128
IV. III. Resultados	129
IV. III. I. Características Generales	129
IV. III. II. Genes Codificantes de Proteínas.....	133
IV. III. III. <i>Atp8</i> y <i>Atp9</i>	135
IV. III. IV. <i>Cox1</i> y <i>Cox2</i>	137
III. II. V. <i>Rps3</i>	138
IV. III. VI. Intrones y Endonucleasas Homing	139
IV. III. VII. ARNs y Uso de Codones	139
IV. III. VIII. Elementos Repetitivos	143
IV. III. IX. Mitogenómica Comparativa.....	145
IV. III. X. Análisis Filogenético de Pezizomycotina	146
IV. IV. Discusión	150
 Capítulo V: Análisis <i>In Silico</i> del Secretoma y Metaboloma Secundario de <i>Stemphylium lycopersici</i> CIDEFI-216.....	
V. I. Introducción	159
V. I. I. Hipótesis del Capítulo.....	164
V. I. II. Objetivos del Capítulo	164
V. II. Materiales y Métodos	166

V. II. I. Secretoma <i>In Silico</i>	166
V. II. II. Identificación de <i>Clusters</i> de Genes de Metabolitos Secundarios.....	166
V. II. Resultados	168
V. II. I. Secretoma <i>In Silico</i>	168
V. II. II. <i>Clusters</i> de Genes de Metabolitos Secundarios	184
V. III. Discusión	193
Capítulo VI: Conclusiones y Perspectivas	201
VI. I. Conclusiones	202
VI. II. Perspectivas	204
VI. II. I. Genoma de Referencia de Alta Calidad de <i>Stemphylium lycopersici</i>	204
VI. II. II. Fuentes de Diversidad	205
VI. II. III. Secretoma <i>in vivo</i>	207
VI. II. IV. Melaninas	207
Bibliografía	208

Resumen

Resumen

La mancha gris de la hoja del tomate es una enfermedad causada por tres especies del género *Stemphylium*: *S. botryosum*, *S. solani* y *S. lycopersici*. De amplia distribución mundial, fue reportada por primera vez en Argentina en 1990. Desde entonces, no solo ha aumentado en las áreas endémicas, sino que también se ha diseminado a nuevas regiones de cultivo. En base a la premisa que la patogenicidad de *Stemphylium* en plantas de tomate se debe a la expresión de efectores que vulneran los mecanismos de defensa del hospedador, en la presente tesis se indagó sobre la biología y genómica del agente etiológico con particular énfasis en el repertorio de efectores. Como primer paso, se comprobó que *S. lycopersici* es el principal agente causal de la mancha gris de la hoja del tomate en Argentina. Los aislados exhibieron una gran diversidad según lo evaluado mediante su morfología, genética y agresividad en tomate. Luego, se seleccionó un representante a partir del cual se generó el primer genoma borrador de *S. lycopersici* mediante secuenciación de segunda generación. Se utilizó al genoma mitocondrial para inferir la historia evolutiva de este fitopatógeno. El mitogenoma reveló una estructura dinámica, rica en secuencias repetitivas y elementos móviles, con algunas particularidades como la ausencia de los genes *atp8* y *atp9* y la fusión de los genes *cox1* y *cox2*. Finalmente, el genoma borrador fue utilizado como insumo en la identificación y caracterización del secretoma *in silico* y de los *clusters* de genes de metabolitos secundarios. De esta manera, se determinó que el secretoma de *S. lycopersici* está compuesto por 1005 proteínas (11,12 % del proteoma), 363 de las cuales presentan características de efectores. En general, se encontró un repertorio de proteínas típico al de un hongo necrótrofo; variedad y cantidad de enzimas que degradan la pared celular, efectores LysM y enzimas que intervienen en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno. Por otra parte, se identificaron 36 *clusters* de genes de metabolitos secundarios, con predominio de *clusters* de genes biosintéticos de policétidos. Se encontró que el genoma de *S. lycopersici* contiene genes claves para la biosíntesis de melanina vía 1,8-dihidroxi-naftaleno y L-dihidroxi-fenilalanina. Asimismo, posee el gen codificante de la 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenasa, enzima clave en la biosíntesis de piomelanina. Estos datos sientan bases sólidas para el desarrollo de estudios funcionales dirigidos a caracterizar tanto el metabolismo secundario como así también el

Resumen

secretoma *in vivo* de *S. lycopersici* bajo cualquier condición fisiológica, siendo de particular interés durante su interacción con el tomate. El conocimiento de las moléculas intervinientes en esta interacción será clave para el diseño racional de estrategias para el manejo de la mancha gris de la hoja del tomate.

Abstract

Abstract

Tomato gray leaf spot is a disease caused by three species of the genus *Stemphylium*: *S. botryosum*, *S. solani* and *S. lycopersici*. Widely distributed throughout the world, it was first reported in Argentina in 1990. Since then, it has not only increased in endemic areas, but has also spread to new growing regions. Based on the premise that the pathogenicity of *Stemphylium* in tomato plants is due to the expression of effectors that subvert the defense mechanisms of the host, the present thesis studied the biology and genomics of the etiological agent with particular emphasis on the effector repertoire. As a first step, it was proved that *S. lycopersici* is the main causal agent of tomato gray leaf spot in Argentina. The isolates exhibited a remarkable diversity as assessed by their morphology, genetics and aggressiveness on tomato. Then, a representative isolate was selected from which the first draft genome of *S. lycopersici* was generated by second generation sequencing. The mitochondrial genome was used to infer the evolutionary history of this phytopathogen. The mitogenome revealed a dynamic structure, rich in repetitive sequences and mobile elements, with some particularities such as the absence of the *atp8* and *atp9* genes and the fusion of the *cox1* and *cox2* genes. Finally, the draft genome was used as an input in the identification and characterization of the *in silico* secretome and the secondary metabolite gene clusters. In this way, it was determined that the secretome of *S. lycopersici* is composed of 1005 proteins (11,12 % of the proteome), 363 of which have characteristics of effectors. Overall, a protein repertoire typical of a necrotrophic fungus was found; variety and quantity of cell wall-degrading enzymes, LysM effectors and enzymes involved in the elimination of reactive oxygen species. On the other hand, 36 secondary metabolite genes clusters were identified, with a predominance of biosynthetic gene clusters for polyketides. It was found that the genome of *S. lycopersici* CIDEFI-216 contains key genes for the biosynthesis of melanin via 1,8-dihydroxynaphthalene and L-dihydroxyphenylalanine. Additionally, it possesses the gene coding for 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, an important enzyme in the biosynthesis of pyomelanin. These data provide a solid basis for the development of functional studies aimed at characterizing both the secondary metabolism as well as the *in vivo* secretome of *S. lycopersici* under any physiological condition, being of particular interest during its

Abstract

interaction with the tomato. The knowledge of the molecules involved in this interaction will be key to the rational design of strategies for the management of the tomato gray leaf spot disease.

Capítulo I: Introducción General

Capítulo I

I. I. Tomate

I. I. I. Origen y Distribución

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea originaria de la región andina comprendida entre el Sur de Colombia y Norte de Chile. Si bien la evidencia arqueológica que concierne a su domesticación es escasa, la evidencia lingüística e histórica señala que el punto más probable de su domesticación fue México. Su nombre proviene del náhuatl “tomatl”, palabra acuñada por los aztecas para denominar al tomatillo y a otras especies de *Physalis*; el tomate (*S. lycopersicum*) en sí, era conocido como “xitomatl”^{1 3}.

A mediados del siglo XVI, el tomate fue introducido en España e Italia y, posteriormente, distribuido a otros países del Viejo Mundo². El primer registro del tomate en la literatura data de 1544, cuando el botánico italiano Pietro Andrea Mattioli describe a una fruta aplastada y acanalada, que iba del color verde al amarillo dorado a la que llamó “Pomi d’oro”, con su equivalente latino de “Mala aurea”, que significa “Manzana dorada”¹⁴. Nótese que esta denominación, que actualmente perdura en Italia como “pomodoro”, sugiere que las primeras plantas de tomate introducidas en Italia producían frutos de color amarillo. De hecho, no fue hasta una década más tarde que Mattioli dio cuenta de la existencia de tomates rojos¹⁵.

Actualmente, el tomate presenta una amplia distribución mundial producto de sus apreciadas cualidades sensoriales y nutricionales y, consecuentemente, importancia económica^{2,3}.

I. I. II. Sistemática

El tomate, *S. lycopersicum*, es miembro de la pequeña sección *Lycopersicon*, clado monofilético dentro del género *Solanum*, familia Solanaceae^{6 9}.

I. I. II. I. Revisión Sistemática

La nomenclatura y clasificación del tomate han sufrido reiteradas modificaciones a lo largo del tiempo. Así, en 1753, Carl Linneaus clasificó al tomate dentro del género *Solanum* bajo el nombre de *Solanum lycopersicum*¹⁰. En desacuerdo con Linneaus, en 1768, Philip Miller reubicó al tomate dentro del género *Lycopersicon* como *Lycopersicon esculentum*¹¹. Más de

Capítulo I

un siglo después, Gustav Karsten cambió su nombre por *Lycopersicum lycopersicum*, devolviéndole el epíteto original de Linnaeus ¹². Sin embargo, como este último violaba el Código Internacional de Nomenclatura, en 1974, Dan Henry Nicolson sugirió cambiarlo por *Lycopersicon lycopersicum* ¹³. Frente a la necesidad que había de estabilizar el nombre del tomate, en 1988 se reconoció oficialmente a *Lycopersicon esculentum* como *nomen conservandum* (Melbourne ICN Art. 14,4 & App. IV). No obstante, el advenimiento de la biología molecular trajo aparejados avances en las herramientas de taxonomía que permitieron comprobar que la clasificación original de Linnaeus era correcta ^{6 9}.

I. I. III. Características Morfológicas

La planta de tomate posee un sistema radicular amplio, compuesto por una raíz principal que puede llegar al metro de profundidad, provista de una gran cantidad de ramificaciones secundarias que son además acompañadas por un número considerable de raíces adventicias surgidas de la base de su tallo ¹⁴.

El tallo es anguloso y pubescente, es decir, recubierto con finos pelos cortos. Muchos de estos pelos son de naturaleza glandular, confiriéndole su olor característico. Al principio, la rigidez del tallo dota a la planta de un porte erguido, sin embargo, llegado a un punto el crecimiento es tal que su peso la obliga a rastrear sobre el suelo. El desarrollo del tallo es variable según el tipo de cultivar, existiendo dos tipos de patrones de crecimiento: el crecimiento determinado, o definido, y el crecimiento indeterminado, o indefinido. En los primeros, una vez producidos varios pisos laterales de inflorescencia, el crecimiento del tallo principal se detiene producto de la formación de una inflorescencia terminal. Los cultivares de crecimiento indeterminado, en cambio, siempre poseen en su ápice un meristema que resulta en un crecimiento continuo del tallo principal, originando así florescencias solamente en su posición lateral ^{2,14}.

Las hojas, también pubescentes, son compuestas e imparipinnadas, constituidas por 7 a 9 folíolos lobulados o dentados. También pueden observarse pequeños foliolillos en el raquis de la hoja ^{2,14}

Capítulo I

Las flores de las variedades cultivadas se agrupan en inflorescencias simples o ramificadas. Su número es variable, yendo de 5 a 12. Las flores son hermafroditas, regulares y péndulas, de polinización autógama ^{2,14}.

Los frutos del tomate son bayas compuestas por una pared exterior, el pericarpio, que rodea los lóculos y formadas por semillas y tejidos placentarios separados por paredes internas, los tabiques. Los frutos de las especies salvajes son generalmente pequeños, con menos de 2 cm de diámetro, y biloculares, mientras que los de las especies cultivadas son más grandes y multiloculares. Su color, verde cuando es inmaduro, evoluciona durante la madurez para alcanzar diversos tonos según los cultivares, como pueden ser el crema, amarillo, naranja, rosa, rojo o marrón ^{2,3,14}

I. I. IV. Propiedades Nutricionales y Organolépticas

El fruto del tomate está compuesto principalmente por agua (90-95 %), azúcares, ácidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos. Los valores nutricionales del tomate promedio rojo, maduro y crudo se detallan en la tabla I. 1 ¹⁵.

El sabor del fruto viene dado, en gran parte, por el balance entre los azúcares solubles (principalmente glucosa y fructosa) y los ácidos orgánicos (cítrico y málico). Sin embargo, el sabor del tomate también resulta de la percepción de sus compuestos volátiles. Por otra parte, su color es consecuencia de la composición y distribución de carotenoides, clorofila y antocianinas (Tabla I. 2) ^{3,16}.

Capítulo I

Tabla I. 1. Propiedades nutricionales del tomate promedio rojo, maduro y crudo.

	Nutriente	Valor por 100 g
Proximales	Agua	94,52 g
	Energía	18 kcal
	Proteína	0,88 g
	Lípidos	0,20 g
	Carbohidratos	3,89 g
	Fibra	1,2 g
	Azúcares totales	2,63 g
	Minerales	Calcio
Hierro		0,27 mg
Magnesio		11 mg
Fósforo		24 mg
Potasio		237 mg
Sodio		5 mg
Zinc		0,17 mg
Vitaminas	Ácido Ascórbico	13,7 mg
	Tiamina	37 mg
	Riboflavina	19 mg
	Niacina	594 mg
	Vitamina B-6	80 mg
	Folato	15 µg
	Vitamina B-12	0,00 µg
	Vitamina A, RAE	42 µg
	Vitamina A, IU	833 IU
	Vitamina E	0,54 mg
	Vitamina D (D ₂ + D ₃)	0,0 µg
	Vitamin D	0 IU
	Vitamin K	7,9 µg
Lípidos	Ácidos grasos, saturados totales	28 g
	Ácidos grasos, monoinsaturados totales	31 g
	Ácidos grasos, poliinsaturados totales	83 g
	Ácidos grasos, trans totales	0 g

Fuente: US Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory (2016).

Capítulo I

Tabla I. 2. Principales compuestos volátiles del tomate.

Volátil	Concentración (ppb)	Características odoríferas
<i>cis</i> -3-Hexanal	12000	tomate/verde
β -Ionona	4	frutal/floral
Hexanal	3100	verde/herboso
β -Damascenona	1	frutal
1-Penten-3-ona	520	frutal/floral/verde
2+3-Metilbutanal	27	rancio
<i>trans</i> -2-Hexenal	270	verde
2-Isobutiltiazol	36	vid de tomate
1-Nitro-2-feniletano	17	rancio/terroso
<i>trans</i> -2-Heptenal	60	verde
Fenilacetaldehído	15	floral/alcohol
6-Metil-5-hepten-2-ona	130	frutal/floral
<i>cis</i> -3-Hexenol	150	verde
2-Feniletanol	1900	frutal/a nuez
3-Metilbutanol	380	rancio/terroso
Metilsalicilato	48	gaulteria

Fuente: Wang & Seymour, 2017.

I. I. V. Cultivo

Si bien la planta de tomate es cultivada como anual, es perenne. Las condiciones de cultivo óptimas son temperaturas cálidas, con una máxima de aproximadamente 25-35 °C, suelo bien drenado y luz solar plena. Su patrón de crecimiento es indeterminado, pero muchos cultivares modernos son determinados, por ejemplo, los cultivares para cosecha mecánica ^{3,14}.

Existe una gran diversidad de técnicas de cultivo del tomate, que se implementan en condiciones ambientales muy diferentes y con tipos de varietales en constante cambio. Esto responde a los objetivos específicos que se persigan en cada caso: aumentar el rendimiento, ampliar el cronograma de producción, mecanizar las operaciones de cultivo y mejorar la calidad de la fruta tanto para el mercado de productos frescos como para el tomate para el proceso industrial. A continuación, se hace una breve descripción de las distintas formas de cultivo:

Capítulo I

Cultivo estacado en campo abierto. Las plantas crecen en un solo tallo y son detenidas a varias alturas después de cuatro a seis coronas de flores. Alternativamente, las plantas crecen en dos o tres tallos, generalmente sujetadas en alambres horizontales que sostienen el tallo de manera vertical o con una ligera inclinación, alcanzando una altura máxima de 1,5 m ².

Cultivo sobre rejilla en campo abierto. Se utiliza una red de malla ancha que forma un túnel, de aproximadamente 0,4 m de alto y 0,6 m de ancho, sobre el cual crece la planta. Los tallos sin cortar crecen a través de la red, descansando sobre ella; los frutos se mantienen por encima del suelo, lo que limita las pudriciones ².

Cultivo para procesamiento industrial en campo abierto. Se cultivan grandes áreas de tomates sin ningún tipo de soporte ni protección. Se hacen 2 a 4 cosechas manuales o una sola mecánica ².

Cultivos protegidos sin control de temperatura. Los tomates son plantados y cultivados en el suelo en túneles de plástico sin calefacción. Se cultivan en hileras simples o dobles, con un tallo por planta sostenido verticalmente por una cuerda ².

Cultivos protegidos con control de temperatura. La protección generalmente es provista por estructuras de vidrio cerradas y calefaccionadas, y el cultivo es principalmente sin suelo, utilizándose sustratos de diversos tipos, por ejemplo: bolsas que contengan puzolana, turba o fibra de coco; rollos de lana mineral o lana de vidrio; canales con solución nutritiva circulante ²

En cuanto al riego, la estrategia implementada depende del tipo de cultivo. Así, el riego por aspersión es el elegido en los cultivos a campo abierto, mientras que el riego por goteo es el utilizado en los cultivos protegidos ².

I. I. VI. Producción

La producción de tomate reviste gran importancia tanto a nivel mundial, como nacional y regional. El tomate es el quinto cultivo hortícola de importancia mundial considerando el área cultivada; el tercero con relación al volumen de producción; y el segundo con relación al rendimiento (hg/ha) y a la producción bruta (USD) (Tabla I. 3). La importancia de este producto hortícola también se refleja en el crecimiento constante de su producción a nivel

Capítulo I

mundial; en lo que va del siglo, esta pasó de 109,2 millones de toneladas (3,8 millones de ha) en el 2000 a 177 millones de toneladas (4,7 millones de ha) en el 2016 (Figura I. 1). Durante este último año, los principales países productores de tomate fueron China, India, Estados Unidos y Turquía, con el primero triplicando la producción del segundo y aportando casi el 30 % de la producción mundial total (Tabla I. 4) ¹⁷.

Argentina es el tercer productor de tomate de Sudamérica, ubicándose tras Brasil y Chile ¹⁷. En el año 2014, el cultivo de tomates en Argentina cubrió un área aproximada de 15989 ha, produciendo alrededor de 668041 t de producto fresco y dejando una ganancia bruta estimada de 213 millones de dólares ¹⁸. Las principales regiones productivas del país son: la provincia de Corrientes, en el Noreste; las provincias de Salta y Jujuy, en el Noroeste; la provincia de Mendoza, en Cuyo; el Cinturón Hortícola Platense y el Cinturón Verde de Mar del Plata, en la provincia de Buenos Aires; y el Alto Valle de Río Negro. Estas regiones, bajo distintos sistemas de producción y en diferentes épocas del año, son las fuentes que abastecen la demanda nacional (Tabla I. 5). El tomate para consumo en fresco deriva principalmente de las provincias de Corrientes y de Buenos Aires, donde es cultivado predominantemente en invernadero. Por otra parte, el tomate con destino industrial es cultivado principalmente a campo en la provincia de Mendoza ¹⁴.

Tabla I. 3. Diez principales hortalizas de acuerdo a su producción bruta en USD.

Hortaliza	Producción (t)	Área cultivada (ha)	Rendimiento (hg/ha)	Producción bruta (USD)
Papa	376826967	19246462	195790	11056,982131
Tomate	177042359	4782753	370168	95618,15721
Cebolla	93168548	4955432	188013	51251,115794
Ajo	26573001	1468811	180915	42050,320936
Pepino y pepinillo	80616692	2144672	375893	40639,9418
Mandioca	277102564	23482052	118006	39012,192943
Chiles y pimiento	34497462	1938788	177933	32437,348443
Batata	105190501	8623973	121975	26459,331998
Zanahora y nabo	42711830	1168729	365455	24869,453838
Berenjena	51288169	1793978	285891	21929,914994

Fuente: Food and Agriculture Organization, 2016.

Capítulo I

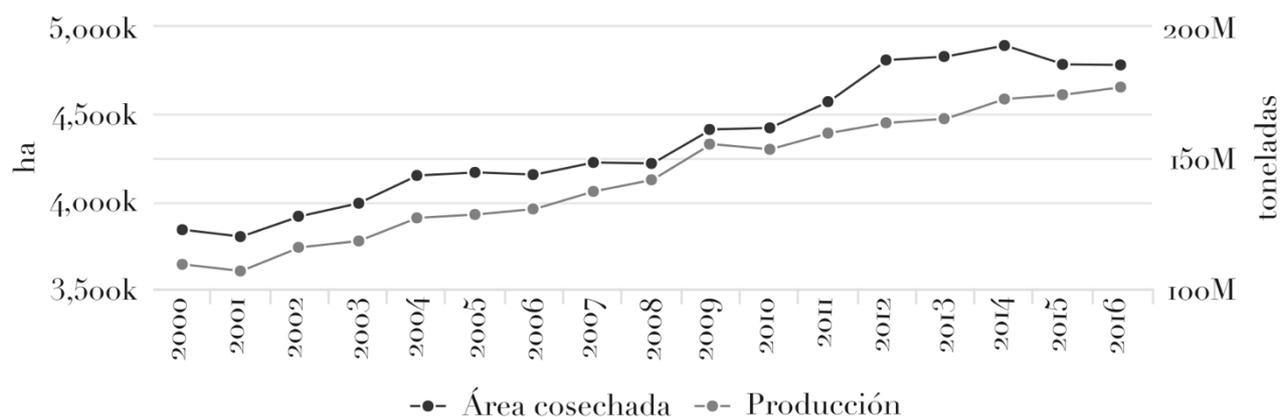


Figura I. 1. Producción y rendimiento de tomates en el mundo desde el 2000. Fuente: Food and Agriculture Organization, 2016 ¹⁹.

Tabla I. 4. Principales productores de tomate.

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

Fuente: Food and Agriculture Organization, 2016.

Argentina es el tercer productor de tomate de Sudamérica, ubicándose tras Brasil y Chile ¹⁷. En el año 2014, el cultivo de tomates en Argentina cubrió un área aproximada de 15989 ha, produciendo alrededor de 668041 t de producto fresco y dejando una ganancia bruta estimada de 213 millones de dólares ¹⁸. Las principales regiones productivas del país son: la provincia de Corrientes, en el Noreste; las provincias de Salta y Jujuy, en el Noroeste; la provincia de Mendoza, en Cuyo; el Cinturón Hortícola Platense y el Cinturón Verde de Mar del Plata, en la provincia de Buenos Aires; y el Alto Valle de Río Negro. Estas regiones, bajo distintos sistemas de producción y en diferentes épocas del año, son

Capítulo I

las fuentes que abastecen la demanda nacional (Tabla I. 5). El tomate para consumo en fresco deriva principalmente de las provincias de Corrientes y de Buenos Aires, donde es cultivado predominantemente en invernadero. Por otra parte, el tomate con destino industrial es cultivado principalmente a campo en la provincia de Mendoza ¹⁴.

Tabla I. 5. Calendario de ingreso de tomate al Mercado Central.

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

Fuente: Argerich & Troilo, 2011.

I. I. VII. Enfermedades

Se define como enfermedad a la serie de respuestas invisibles y visibles de las células y tejidos vegetales a un organismo patógeno o factor ambiental, que resulta en cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta y que puede llevar a un deterioro parcial o muerte total de partes de la planta o de toda la planta ²⁰.

Las enfermedades resultan de la interacción de tres factores a través del tiempo: el hospedador (planta), el ambiente (entorno fisicoquímico) y el agente etiológico. Así, las plantas hospedadoras pueden convivir con un agente etiológico (de alguna enfermedad), pero solo cuando se dan las condiciones ambientales apropiadas se desarrolla la enfermedad. Esta interacción se representa esquemáticamente mediante el “triángulo de la enfermedad” (Figura I. 2) ²⁰.

Capítulo I

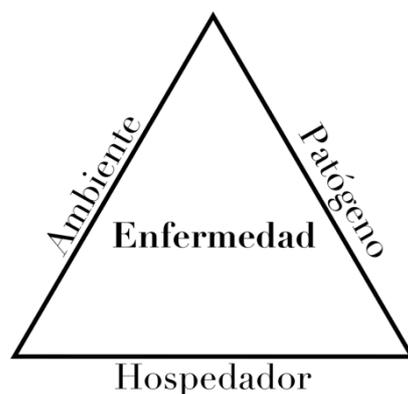


Figura I. 2. Triángulo de la enfermedad.

Las enfermedades de las plantas suelen agruparse según los síntomas que causan (podredumbre de la raíz, marchitez, manchas foliares, etc.), los órganos que afectan (enfermedades de las raíces, vástagos, follaje, etc.) o el tipo de plantas afectadas (enfermedades de cultivos a campo, enfermedades vegetales, enfermedades del césped, etc.). Sin embargo, un criterio útil para agrupar enfermedades es según el agente etiológico que causa la enfermedad puesto que, al indicar la causa de la enfermedad, se sugiere el probable desarrollo y propagación de la misma y, a su vez, también las posibles medidas de control ²⁰. Así, de acuerdo con su etiología, las enfermedades de plantas se pueden dividir en: enfermedades parasitarias, de origen biótico; y enfermedades no parasitarias, también llamadas fisiogénicas, de origen abiótico ^{14,20}.

I. I. VII. I. Enfermedades de Origen Abiótico

Las enfermedades de origen abiótico resultan de la influencia negativa de factores ambientales sobre procesos fisiológicos normales de las plantas; las enfermedades fisiogénicas se producen cuando estos factores se manifiestan en niveles superiores o inferiores a un cierto rango tolerado por la planta. Si bien es casi ilimitada la cantidad de factores ambientales que pueden causar enfermedades en plantas, se destacan el exceso de una sustancia tóxica en el suelo o en el aire, el desbalance de una sustancia esencial (agua, oxígeno o nutrientes minerales) o el resultado de algún extremo en las condiciones que sostienen la vida vegetal (temperatura, humedad, oxígeno, CO₂ o luz) ^{14,20}.

Capítulo I

Algunos de los desórdenes nutricionales que suelen afectar al tomate son: la deficiencia de nitrógeno, manifestada por una reducción del crecimiento vegetativo y clorosis en las hojas más jóvenes; la deficiencia de calcio, responsable de la podredumbre apical del fruto; y la carencia del fósforo, traducida en una clorosis internerval en las hojas más viejas, entre otros. En cuanto a la temperatura, periodos sostenidos de baja o elevada temperatura provocan lesiones foliares por quemado, aborto de flores y deformaciones en el fruto. Respecto al estrés hídrico, la falta de agua puede causar marchitamiento de los órganos más jóvenes, aborto de flores y podredumbre apical del fruto, mientras que su exceso puede producir síntomas de marchitamiento por asfixia radical y podredumbre de raíces. Finalmente, la planta de tomate es muy sensible a la fitotoxicidad, por lo que el uso abusivo de pesticidas trae aparejado la manifestación de diversos síntomas de intoxicación ^{2,3,14,20}.

I. I. VII. II. Enfermedades de Origen Biótico

Las enfermedades de origen biótico son aquellas que resultan de la acción de parásitos, es decir, de organismos que se asocian íntimamente con las plantas, nutriéndose y multiplicándose o creciendo a expensas de estas. Notablemente, en la mayoría de las enfermedades parasitarias, la cantidad de daño causado a la planta es mucho mayor de lo que se esperaría de la mera eliminación de nutrientes por el parásito. En efecto, este daño adicional es el resultado de sustancias secretadas por el parásito o producidas por el hospedador en respuesta a estímulos originados por el parásito. En estos casos, los tejidos afectados pueden presentar un aumento de la respiración celular, desintegración o colapso celular, división o agrandamiento celular anormal y degeneración de componentes específicos como la clorofila, causando síntomas como marchitamiento, clorosis, necrosis y abscisión ²⁰.

Las enfermedades parasitarias son causadas por diversos grupos de organismos, a saber: virus y viroides, bacterias, hongos y oomicetes, protozoos, nemátodos y plantas superiores parasitarias ²⁰.

Capítulo I

I. I. VII. II. III. Enfermedades de Tomate Causadas por Hongos y Oomicetes

Los hongos (reino Fungi) son organismos heterótrofos de organización unicelular o pluricelular y reproducción sexual o asexual, cuyos caracteres distintivos principales son su tipo de nutrición por absorción y su pared celular compuesta por quitina²⁰. Los oomicetes (reino Straminipila) se encuentran en estrecha relación con los hongos, pero diferenciándose de estos en características tales como tener pared celular compuesta por celulosa, diferentes vías para la biosíntesis de lisina, mitocondria con crestas tubulares vesiculares, talos vegetativos en gran parte diploides y, a menudo, β -1-3 glucanos (laminarinas) como su principal hidrato de almacenamiento²¹⁻²⁴. Desde el punto de vista fitopatológico, las especies más importantes son miceliales y puede crecer vegetativamente sobre el sustrato en el que se desarrolla, nutriéndose del mismo; bajo ciertas condiciones diferencian esporas, pero cuando las condiciones ambientales son desfavorables pueden formar estructuras de resistencia, como los esclerocios, las clamidosporas o las oosporas, entre otras. En contraste con los virus, las bacterias e incluso ciertos hongos oportunistas, que a menudo dependen de aberturas naturales o heridas para la invasión, los hongos y oomicetes fitopatógenos disponen de diversas estrategias especiales para poder atravesar activamente las barreras externas de las plantas y, posteriormente, invadir los tejidos vegetales. La principal fuente de inóculo de estos fitopatógenos son sus estructuras de resistencia y reproducción, las cuales pueden diseminarse a través del viento, agua o por la acción de animales. Entre las micosis de mayor importancia podemos mencionar al mal de los almácigos causado por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium* spp. Y por los oomicetes *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.; al moho gris causado por *Botrytis cinerea*; al oidio causado por *Leveillula taurica*, *Oidium neolycopersici* y *O. lycopersici*; al moho de la hoja causado por *Fulvia fulva*; a la fusariosis causado por *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*; al cancro de tallo causado por *Alternaria alternata*; al tizón tardío causado por el oomicete *Phytophthora infestans*; al tizón causado por *Phytophthora capsici*; a la podredumbre del tallo y de la raíz causada por *Phytophthora parasitica*; a la raíz corchosa causada por *Pyrenochaeta lycopersici*; a la podredumbre húmeda del tallo causada por *Sclerotinia sclerotiorum*; a la verticiliosis causada por *Verticilium dahliae* y *V. albo-atrum*; a la antracnosis causada por varias especies del género *Colletotrichum*, como *C. coccodes*, *C.*

Capítulo I

gloeosporioides y *C. dematium*; a la viruela causada por *Septoria lycopersici*; a la mancha anillada causada por *Corynespora cassiicola*; y a mancha gris de la hoja causada por *Stemphylium solani*, *S. lycopersici* y *S. botryosum*^{2,3,14}.

I. II. Mancha Gris de la Hoja del Tomate

I. II. I. Distribución y Alcance del Daño

La mancha gris de la hoja del tomate es una enfermedad de amplia distribución mundial, siendo considerada una de las enfermedades más destructivas del tomate dondequiera que se cultiven variedades susceptibles bajo condiciones cálidas y elevada humedad relativa^{2,3,25}. Las pérdidas causadas por esta patología son tales que, en algunos casos, cultivos enteros han sido destruidos en un corto periodo de tiempo²⁶. En América del Sur, los países afectados por esta patología son Argentina, Brasil, Colombia, Perú y Venezuela²⁵.

I. II. II. Agentes Causales

La mancha gris de la hoja del tomate es causada por tres especies del género *Stemphylium*, a saber: *Stemphylium botryosum*, *S. lycopersici* y *S. solani*^{2,3}.

I. II. III. Sintomatología

La mancha gris de la hoja del tomate es una enfermedad que afecta principalmente a los foliolos, aunque, en condiciones muy favorables, también se pueden desarrollar lesiones en los pecíolos y en las partes tiernas del tallo. Nunca se han observado síntomas en el fruto^{2,3}.

Los primeros síntomas de la enfermedad son pequeñas manchas circulares a oblongas, de color pardo a negro que aparecen distribuidas de manera aleatoria en las hojas más bajas. Luego, estas manchas se expanden y forman lesiones necróticas de centro gris, borde marrón oscuro y halo clorótico. Ocasionalmente, las lesiones coalescen necrosando grandes áreas foliares. A medida que la enfermedad progresa, el tejido necrótico de la mancha se desprende (autotomía). En estado avanzado, las hojas afectadas presentan una marcada clorosis y la autotomía es tal que se produce el secado y desprendimiento de la hoja entera. Las infecciones graves en los semilleros e invernáculos

Capítulo I

de producción pueden producir una marcada defoliación sin que las plantas muestren necesariamente síntomas de clorosis (Figura I. 3) ^{2,3,14}.

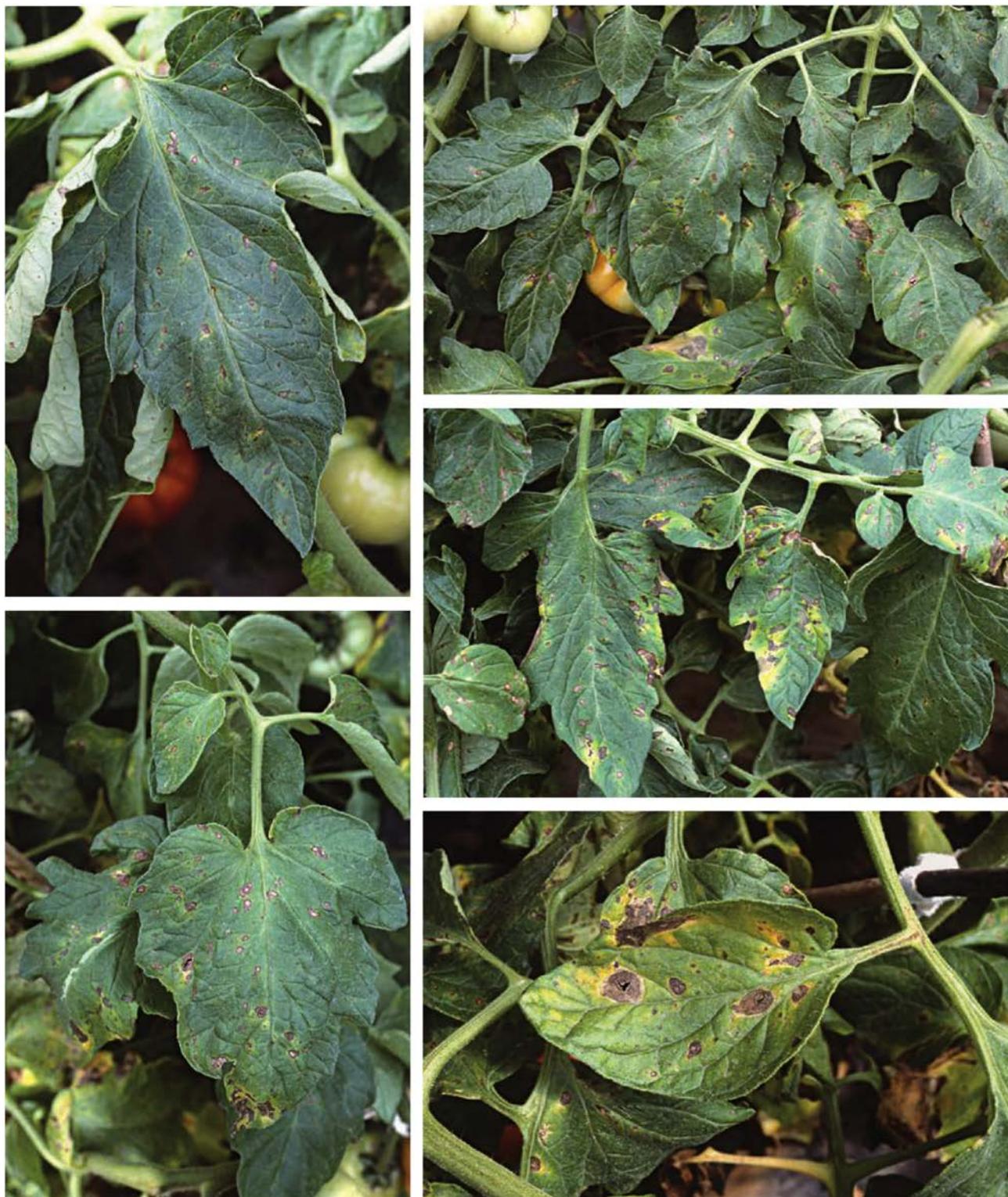


Figura I. 3. Síntomas típicos de la mancha gris de la hoja del tomate. Fuente: Blancard (2012)².

Capítulo I

I. II. III. Ciclo de la Enfermedad y Epidemiología

Stemphylium botryosum, *S. lycopersici* y *S. solani* son saprófitos, cualidad que les permite sobrevivir entre temporadas de cultivo tanto en el suelo como en el rastrojo^{2,3,14}. Además, estas especies son polífagas, es decir que son capaces de enfermar hospedadores alternativos, incluyendo a otras solanáceas cultivadas comúnmente en proximidades a cultivos de tomate como, por ejemplo, el morrón (*Capsicum annuum*) y la berenjena (*Solanum melongena*)^{2,3,14,27}³⁰. Además, *S. botryosum* es homotático, por lo que puede diferenciar peritecios, cuerpos fructíferos que contienen ascosporas, desempeñando un papel esencial en la perpetuación del patógeno fuera de los períodos de crecimiento dentro del hospedador^{2,31}. Cabe recalcar que, si bien no se han reportado los teleomorfos de *S. lycopersici* y *S. solani*, los cuales son heterotáticos, esto no significa que estos hongos sean estrictamente asexuales, pues su estado sexual podría estar ocurriendo en la naturaleza, aunque en muy baja frecuencia. En consecuencia, la tierra, el rastrojo y otras plantas hospedadoras son la principal fuente de inóculo.

Las esporas son transportadas por diversos medios hasta la superficie los folíolos; la germinación se da generalmente 6 horas después post-infección (hpi). La penetración de los tubos germinativos ocurre principalmente a través de los estomas (12 hpi), aunque, eventualmente, se da la penetración directa a través de las paredes periclinales de las células epidérmicas. Luego de la penetración, la hifa se expande originando una vesícula globosa e irregular en la cavidad subestomática, que se ramifica, originando hifas secundarias que colonizan el mesófilo del hospedador a las 24 hpi. Una vez dentro del tejido, el hongo invade rápidamente el mesófilo, diferenciándose los primeros síntomas típicos de la enfermedad entre las 48 y 72 hpi en condiciones controladas y alrededor de 5 días a campo^{2,3,32}.

En cuanto a la diseminación del patógeno, una vez establecido el micelio se forman conidióforos y conidios en la cara abaxial del folíolo. Además, en condiciones especiales, *S. botryosum* diferencia peritecios. Tanto los conidios como las ascosporas son dispersados principalmente por el viento, pero también por las salpicaduras de agua resultantes de la lluvia o del riego por aspersión^{2,3,14}.

Capítulo I

I. II. IV. Condiciones Predisponentes

Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la mancha gris de la hoja del tomate son el clima húmedo, particularmente la presencia de agua en las plantas, y un rango de temperaturas comprendido entre los 23 °C y 27 °C.

I. II. V. Manejo de la Enfermedad

El control tradicional de las enfermedades es llevado a cabo por estrategias de un solo componente que buscan la erradicación total del patógeno. Sin embargo, este tipo de sistema tiene limitaciones. Una de ellas reside en el objetivo que persigue, puesto que la eliminación total del patógeno es prácticamente imposible y, además, innecesaria, ya que solo es suficiente con mantenerlo por debajo del umbral de daño. Por otro lado, una estrategia de un solo componente se limita a resolver un aspecto puntual de la problemática, al mismo tiempo que descuida otros aspectos no menos importantes. El resultado es un sistema que no logra optimizar los recursos disponibles, lo que trae consigo un aumento en los costos de producción³³. A fin de superar esta limitante, surge el manejo integrado de enfermedades; un sistema que hace uso de un conjunto de técnicas compatibles para mantener a las plagas y enfermedades por debajo de los niveles que produzcan daño económico al cultivo. Las principales estrategias de control se basan en el uso de cultivares resistentes, control químico basado en el umbral de daño económico, control biológico y prácticas culturales; y su uso holístico ha demostrado ser eficaz y sustentable^{33 36}.

I. II. V. I. Prácticas de Cultivo

Como oportunamente se ha señalado, *S. botryosum*, *S. lycopersici* y *S. solani* son saprófitos y, por lo tanto, pueden nutrirse a expensas de material orgánico muerto. En consecuencia, debe eliminarse el rastrojo durante y después del cultivo^{2,14,36}.

Por otra parte, dado que estos son polífagos, debe evitarse la proximidad, tanto espacial como temporal, de los hospedadores alternativos. Esto significa que deben eliminarse a los hospedadores alternativos, silvestres y cultivados, que puedan crecer en las

Capítulo I

proximidades del área de cultivo. Asimismo, es preferible la secuencia y rotación de cultivos con especies de otra familia botánica diferente a Solanáceas ^{2,14,36}.

En cuanto a las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad, el manejo debe estar dirigido a reducir la temperatura y humedad relativa en el cultivo. En este sentido, resulta ventajoso utilizar plantaciones de menor densidad y realizar deshojes para favorecer la circulación de aire. Además, es preferible el riego por goteo, en lugar del riego por aspersión ^{2,14,36}.

Finalmente, es preciso realizar monitorios periódicos y aplicar control químico desde la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad ^{2,3,14,36}.

I. II. V. II. Cultivares Resistentes

El uso de resistencia genética es el modo más económico, factible y sustentable para el manejo de las enfermedades ^{34,35}. Existen cultivares resistentes a la mancha gris de la hoja del tomate disponibles en el mercado, los que deberían usarse siempre que sea posible, sobre todo en áreas en donde la patología es más frecuente ³. Esta resistencia es particularmente estable y, hasta ahora, no ha sido quebrada ^{2,37}. La resistencia es conferida por el gen dominante *Sm*, que proviene de la especie de tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* ^{38,39}. Inicialmente, se creía que el gen *Sm* en el genoma del tomate (*S. lycopersicum*) estaba ligado al brazo largo del cromosoma II, entre los marcadores TG110 y T10 ⁴⁰. Sin embargo, un estudio reciente presentó evidencia que el mismo se encuentra restringido al brazo corto del cromosoma II, sugiriéndose, además, a los genes Solyc11g01870.1.1 y Solyc11g01880.1.1 como posibles candidatos ³⁷. La identificación del gen *Sm* proporcionará la base para el desarrollo eficiente de nuevos cultivares resistentes mediante ingeniería genética.

I. II. V. III. Control Químico

Durante muchas décadas, los fungicidas desempeñaron un papel importante, y casi exclusivo, en el control de las enfermedades. Sin embargo, la experiencia acumulada en las últimas décadas mostró claramente que la aplicación de fungicidas tuvo un mejor resultado cuando estos fueron usados dentro de una estrategia de manejo integrado de

Capítulo I

enfermedades. Sumado a esto, la opinión pública ha influenciado en la industria de fungicidas para el desarrollo de nuevos productos efectivos con bajo impacto ambiental, compatibles con programas de manejo integrado de enfermedades ³⁵.

De acuerdo con el manejo integrado de enfermedades, la aplicación de fungicidas debe evitarse siempre que sea posible. Las aplicaciones preventivas están restringidas solo a aquellas plagas de umbrales de daño muy bajo y también a mantener bajo el nivel de inóculo de enfermedades de difícil control una vez instaladas en los invernaderos ³⁶. Es aconsejable realizar monitoreos semanales y, una vez que se observan los primeros síntomas, recurrir a la aplicación del control químico ^{2,14,36}. Los fungicidas recomendados para el manejo de *Stemphylium* como agente causal de la mancha gris de la hoja del tomate son: el Zineb, el Maneb y el Mancozeb, del grupo químico de los ditiocarbamatos; la Azoxistrobina, de las estrobilurinas; el Clorotalonil, de los cloronitrilos; la Iprodiona, de las dicarboximidias; el Difenconazol, de los triazoles; el Tiofanato Metílico, de los benzimidazoles; y la Anilazina, de las triazinas ^{2,36,41}.

I. II. V. IV. Control Biológico

La contaminación ambiental causada por el uso excesivo e indebido de agroquímicos ha llevado a cambios considerables en las actitudes de las personas hacia el uso de pesticidas en la agricultura. En consecuencia, algunos investigadores están centrando sus estudios a fin de desarrollar insumos alternativos a los productos químicos sintéticos; entre estas alternativas, se encuentra el control biológico ⁴².

El control biológico puede ser definido como la inhibición o destrucción total o parcial de poblaciones de patógenos por otros organismos. Experimentalmente, se puede obtener control biológico contra muchos patógenos de plantas, pero las aplicaciones a campo siguen siendo en su mayoría ineficaces. Por tal motivo, el control biológico de enfermedades de plantas con microorganismos antagónicos se practica en un grado bastante limitado y como complemento de otras estrategias de control ²⁰.

En la actualidad, no se registra ningún producto comercial de control biológico para tratar la mancha gris de la hoja del tomate. Sin embargo, un estudio al respecto afirma que *Trichoderma asperellum* tiene el potencial para reducir la severidad de la mancha gris

Capítulo I

de la hoja del tomate causada por *S. solani* cuando este agente biocontrolador es aplicado en tierra ⁴³. Por otra parte, existen reportes que dan cuenta del potencial de especies de *Trichoderma* para controlar otras patologías causadas por especies de *Stemphylium* ^{44 46}. Es importante seguir avanzando en esta dirección, puesto que este tipo de conocimiento podría conducir a la elaboración de un formulado a base de microorganismos antagónicos que sean eficaces para el manejo integrado de esta y otras enfermedades causadas por *Stemphylium*.

I. III. El Género *Stemphylium*

I. III. I. Sistemática

El género *Stemphylium* pertenece al Reino Fungi, Subreino Dykarya, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Orden Pleosporales y Familia Pleosporaceae.

I. III. I. II. Revisión Sistemática

En 1833, Wallroth establece el género *Stemphylium* en base a la especie tipo *Stemphylium botryosum* Wallr ⁴⁷. Un siglo después, Wiltshire, en sus estudios pioneros sobre los géneros *Alternaria*, *Stemphylium* y *Macrosporium*, propone que este último debía ser descartado como *nomen ambiguum* en favor de *Alternaria*, y que el género *Stemphylium* debía ser dividido en los géneros *Eustemphylium* y *Pseudostemphylium*; el primero incluyendo a las especies semejantes a *S. botryosum*, y el segundo a las especies semejantes a *S. lanuginosum* ⁴⁸. Más tarde, Wiltshire asocia el estado sexual de *S. botryosum* Wallr con *Pleospora herbarum* Rabenh ⁴⁹. Las definiciones propuestas por Wiltshire fueron adoptadas en estudios subsiguientes que, sin embargo, encontraron dificultades al momento de incluir especies dentro de estos géneros ^{50 52}. En 1967, Simmons llevó a cabo la redefinición de los géneros *Alternaria*, *Stemphylium* y *Ulocladium* en base a las descripciones del estado sexual y/o asexual de sus especies tipo. Este enfoque le permitió, por ejemplo, constatar que *P. lanuginosum* debía ser incluido dentro del género *Ulocladium* ⁵³. Más tarde, en 1985, Simmons hace otro aporte significativo al comprobar que el estado sexual asociado a *S. botryosum* Wall es *P. tarda* Simmons, y no *P. herbarum* Rabenh, como originalmente se

Capítulo I

había pensado⁵⁴. Este sistema de nomenclatura dual de hongos pleomórficos, que permitía la asignación de distintos nombres para las diferentes formas de un mismo hongo, fue puesto en desuso el 3o de julio de 2011 en el Congreso Botánico celebrado en Melbourne. Así, bajo el principio “un hongo, un nombre” del Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas, el Grupo de Trabajo de Dothideomycetes del Comité Internacional sobre Taxonomía de Hongos recomendó el uso del nombre de *Stemphylium* por sobre el de *Pleospora*^{55,56}.

I. III. II. Características Morfológicas

El género *Stemphylium* se caracteriza por la producción de dictioconidios pigmentados originados a partir de conidióforos de proliferación percurrente y por sus células conidiógenas en forma de cáliz. Estas son las principales características morfológicas que diferencian a *Stemphylium* de otros géneros relacionados de morfología similar, tales como *Alternaria* y *Ulocladium*⁵³.

Las descripciones reportadas a continuación derivan de observaciones realizadas *in planta* o a partir del cultivo del hongo en medios de cultivo convencionales, a saber: agar papa dextrosa, agar zanahoria dextrosa y/o agar V8. En cultivos en medio agarizado, las especies de *Stemphylium* forman colonias efusas, de textura aterciopeladas o algodonosas, y de color blanco, gris, marrón, marrón-oliva y/o negro^{52,57}. En ciertas ocasiones, estas pueden presentar el fenómeno de zonación^{58,59}. Asimismo, puede darse la difusión de pigmentos que tiñen el medio en tonos que van del amarillo al rojo oscuro^{60 62}. El micelio de *Stemphylium* está constituido por hifas ramificadas y septadas, que pueden estar inmersas en el agar. Su forma sexual está caracterizada por la producción de ocho ascosporas muriformes y pigmentadas de distintos tonos subhialinos al marrón oscuro en cada uno de sus ascos bitunicados, los cuales se encuentran separados por pseudoparáfisis dentro de un ascostroma (pseudotecio) negro y levemente achatado (Figura I. 4. a-c)^{31,54,63,64}. En cuanto a su forma asexual, los conidióforos son macronematosos, mononematosos, dispersos o cespitosos, simples o en ocasiones levemente ramificados, rectos o flexos, generalmente nodosos, lisos o en parte rugosos y percurrentes. Las células conidiógenas son monoblásticas, integradas, terminales, al principio claviformes o subsféricas, y más

Capítulo I

tarde caliciformes por invaginación. Los conidios son solitarios, secos, acrógenos, oblongos, redondeados en los extremos, elipsoidales, oblicuos o subesféricos, cicatrizados en la base, con un ápice cónico puntiagudo en algunas especies, de aspecto muriforme y de superficie lisa, verrugosa o equinulada. En cuanto la pigmentación, esta varía de distintos tonos subhialinos al marrón oscuro (Figura I. 4. d) ^{31,53,57,64}. En la tabla I. 6 se presenta una sinopsis de la morfometría del conidio y del conidióforo de algunas especies de *Stemphylium* ^{31,53,65 71}.

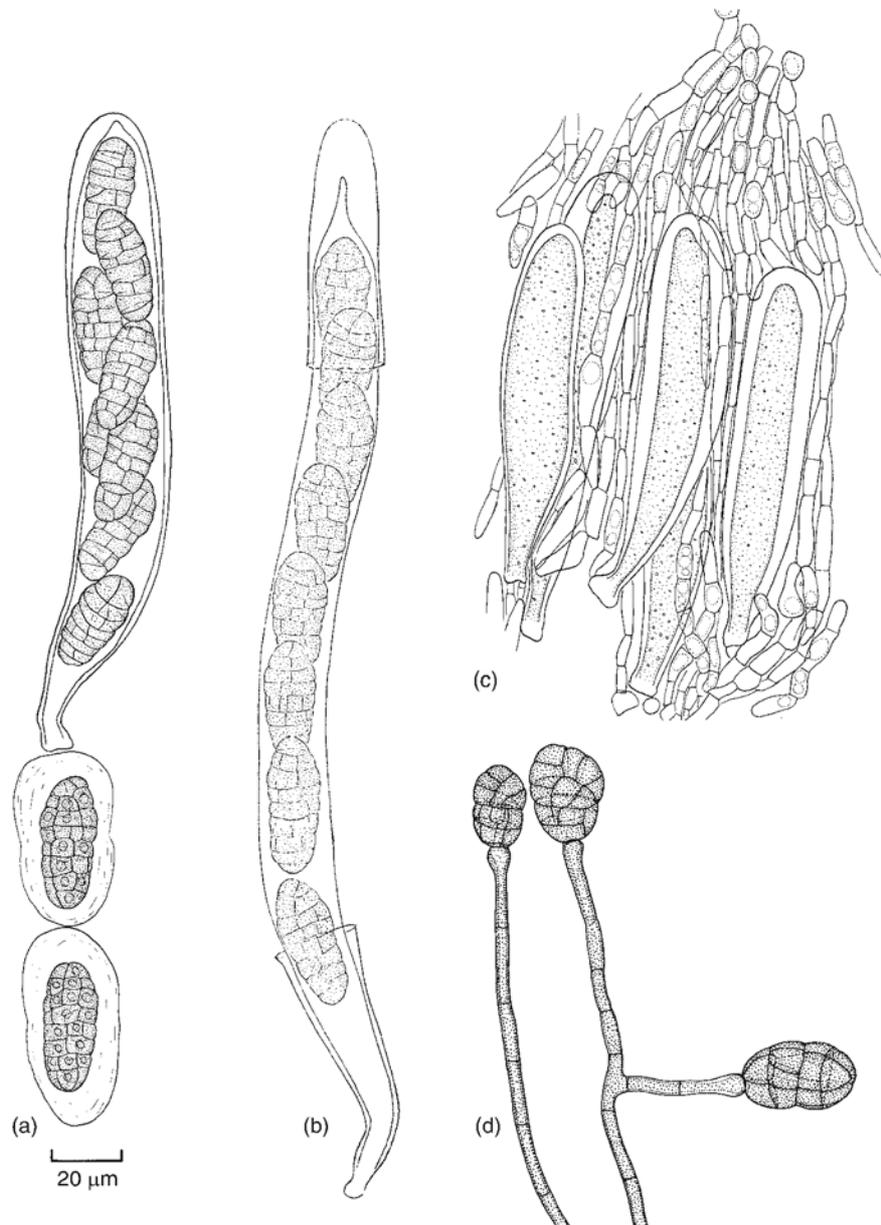


Figura I. 4. Morfología de *Stemphylium*. Ascos y ascosporas que muestran episporas mucilaginosas. (b) Ascos bitunicados estirados que muestra ruptura de la pared exterior. (c) Desarrollo de ascos y pseudoparásitismo. (d) Conidióforo, célula conidiógena y conidios. Fuente: Webster & Weber (2007)⁶⁴.

Tabla I. 6. Medidas de morfología del conidio y conidióforo de algunas especies de *Stemphylium*.

Especie	Conidio						
	Forma	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo/Ancho	Septos transversales	Septos longitudinales	Ápice
<i>S. amaranthi</i>	Ampliamente ovoide o elipsoide	22-35	10-19	2,1	1-3(-4)	0-3	Redondeado
<i>S. beticola</i>	Elipsoide a cilíndrico	22-26	14-16	1,6	2-4	1-3	Redondeado
<i>S. botryosum</i>	Oblongo o ampliamente ovoide	24-33	15-24	1,5	1-3(-4)	1-3(-4)	Redondeado
<i>S. canadense</i>	Ovoide	43,5-59	15-18	3,1	5-8	1-2(-3)	Puntiagudo
<i>S. chrysanthemicola</i>	Elipsoide a cilíndrico	26-29	13,5-15,5	1,9	2-3	1(-2)	Redondeado
<i>S. drummondii</i>	Ovoide a oblongo	33,8	22,6	1,5	1-5	1-4	Redondeado
<i>S. eturmiunum</i>	Ampliamente ovoide o elipsoide	25-27	12	NI	3	1	Redondeado
<i>S. gracilariae</i>	Ampliamente ovoide u oblongo	27-32	17-24	NI	3(-4)	1-2	Redondeado
<i>S. lancipes</i>	Lanceolado	75-80	20-25	NI	1-9	2	Puntiagudo
<i>S. lucomagnoense</i>	Ampliamente ovoide o elipsoide	20-27	11-16	1,8	(2-)3	1-2	Redondeado
<i>S. lycopersici</i>	Ampliamente elipsoide u oblongo	35,6-67,1	12,2-22,9	2,6-3,9	1-6	Varios	Puntiagudo
<i>S. novae-zelandiae</i>	Cilíndrico	34-40,5	11-13	3,1	3-5(-7)	1-2	Redondeado
<i>S. simmonsii</i>	Elipsoidal a ampliamente ovoide	20,5-24,5	13-16	1,6	(2-)3	(1-)2(-3)	Redondeado
<i>S. solani</i>	Oblongo	45-50	20-23	2,1	Varios	Varios	Redondeado
<i>S. vesicarium</i>	Oblongo o ampliamente ovoide	25-42	12-22	1,9	1-5(-6)	1-2(-3)	Redondeado

ND: No informa.

Todas las especies presentan ornamentación verrugosa, en diferentes grados. En *S. botryosum*, además, se describe pared lisa. Referencias: Kurose (2015); Nirenberg & Plate (1983); Pei (2009, 2011); Simmons (1967, 1969, 2001); Weber (1930); Woudenberg (2017).

Capítulo I

I. III. III. Hábitos y Rango de Hospedadores

Los hongos son organismos heterótrofos y, como tales, obtienen sus nutrientes a partir de la materia orgánica del entorno. Los mismos han desarrollado una notable capacidad para adaptarse y explotar de manera óptima diversos nichos ecológicos. Entre estos nichos ecológicos, las plantas no son la excepción, ya que la mayoría, si no todas, están en sus ecosistemas naturales infestadas por hongos. Sin embargo, no todos estos hongos son causantes de enfermedad; por el contrario, la enfermedad suele ser la excepción.

Los hongos poseen diversos hábitos, o estilos de vida, que se diferencian en base al tipo de interacción que estos mantienen con sus hospedadores. En el hábito endofítico, el hongo reside en el interior de la planta hospedadora sin causarle ningún síntoma; el hongo puede, o no, conferirle algún beneficio. En el hábito biótrofo, el hongo coloniza el tejido vegetal vivo y se alimenta a partir del mismo. En el otro extremo, en el hábito necrótrofo, el hongo primero mata a las células de la planta hospedadora y luego se alimentan del tejido muerto. En el hábito hemibiótrofo, el hongo establece con su hospedador una fase inicial biotrófica seguida de otra fase necrotrofica. Finalmente, en el hábito saprótrofo, el hongo deriva su energía a partir de la degradación de materia orgánica muerta; el hongo no mata ni coloniza a un hospedador vivo. Anteriormente, se creía que cada hongo estaba restringidos a un hábito en particular. De hecho, esta cualidad fue utilizada para clasificarlos en “hongos biótrofos”, “hongos necrótrofos”, “hongos hemibiótrofos”, etc. Sin embargo, los hongos son capaces de cambiar entre diferentes estilos de vida de acuerdo a los cambios que le presente el ambiente ^{72 74}. Más aun, la concepción actual es que todos los fitopatógenos muestran transiciones de hábito de biótrofo a necrótrofo, pero la duración de las diferentes fases de crecimiento varía según el caso; la fase biotrófica es relativamente prolongada para biótrofos, intermedia para hemibiótrofos y corta para necrótrofos ⁷⁵.

El rango de hospedadores de *Stemphylium* es muy amplio, tanto es así que este género ha sido asociado a alrededor de 426 especies de plantas en todo del mundo ²⁵. La mayoría de las especies de *Stemphylium* son fitopatógenas de hábito necrótrofo y/o saprótrofo ^{31,57,76}. Sin embargo, también se han descrito especies de *Stemphylium* de hábitos endofíticos ^{60,77 80}. Una especie de *Stemphylium* puede ser patógena necrotrofa en

Capítulo I

un hospedador, pero endófito en otro hospedador, además de saprótrofa en tejido vegetal muerto. Ilustrando esto con las especies que causan la mancha gris de la hoja del tomate: *S. botryosum* ha sido asociado a alrededor de 168 especies vegetales ²⁵, describiéndose como patógeno de, por ejemplo, espárrago ⁸¹, alfalfa ⁸² y espinaca ⁸³, y como endófito de *Chenopodium album* ⁸⁴; *S. lycopersici* ha sido asociado a alrededor de 47 especies vegetales ²⁵, describiéndose como patógeno de, por ejemplo, papa ⁸⁵, kalanchoe ⁸⁶ y crisantemo ⁸⁷, y como endófito de *Humiria balsamífera* ⁷⁹ y *Cynanchum auriculatum* ⁶⁰; y *S. solani* ha sido asociado a alrededor de 34 especies vegetales ²⁵, describiéndose como patógeno de, por ejemplo, pimiento ²⁷, algodón ⁸⁸ y batata ⁸⁹, y como endófito de *Morinda citrifolia* ⁹⁰. Finalmente, en un caso excepcional, una especie de *Stemphylium* fue aislada de una queratitis polimicrobiana en humano; sin embargo, cabe mencionar que el paciente presentaba el tejido ocular inmunocomprometido ⁹¹.

I. IV. Interacción Planta-Hongo Fitopatógeno

I. IV. I. Infección y Colonización

El fenómeno de infección se inicia con la adhesión del patógeno fúngico a la cutícula, la cual es favorecida por la presencia de sustancias mucilaginosas que contienen los propágulos del patógeno. Luego, se produce la germinación de la espora como consecuencia de su estimulación mediante señales topográficas de la planta, como estomas; señales químicas de la planta, tales como ceras epicuticulares; o señales físicas, como hidrofobicidad. Durante la germinación, la espora empeña sus reservas de alimentos para la formación del tubo germinativo. Este es una estructura especializada, distinta del micelio fúngico, que a menudo crece durante una distancia muy corta antes de diferenciarse en otra estructura especializada, infectiva en este caso, denominada apresorio. Los hongos patógenos con diferentes estilos de vida desarrollan distintos tipos de apresorios. Algunos hemibiótrofos forman un apresorio melanizado en forma de cúpula que acumula presión de turgencia para permitir la entrada mecánica de la hifa de infección en el hospedador. Por otro lado, la mayoría de los necrótrofos forman apresorios discretos y penetran en la cutícula de la planta al secretar un arsenal de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de la planta. En cuanto a los patógenos biótrofos, estos

Capítulo I

usan una combinación de presión de turgencia y enzimas hidrolíticas para romper la pared celular sin afectar la viabilidad de la célula hospedador ^{20,92,93}.

La penetración exitosa del hongo fitopatógeno es seguida por la colonización del tejido de la planta hospedadora mediante la diferenciación de estructuras fúngicas que pueden diferir incluso en hongos con el mismo hábito. Por ejemplo, algunos hongos necrótrofos crecen subcuticularmente y, a medida que matan las células epidérmicas para nutrirse, van ocupando grandes partes del tejido. Por otro lado, los biótrosos y hemibiótrosos, pueden crecer dentro del huésped como hifas intracelulares o intercelulares; en este último caso, algunas veces se diferencian estructuras específicas de absorción denominadas haustorios (Figura I. 5) ^{20,92}.

Capítulo I

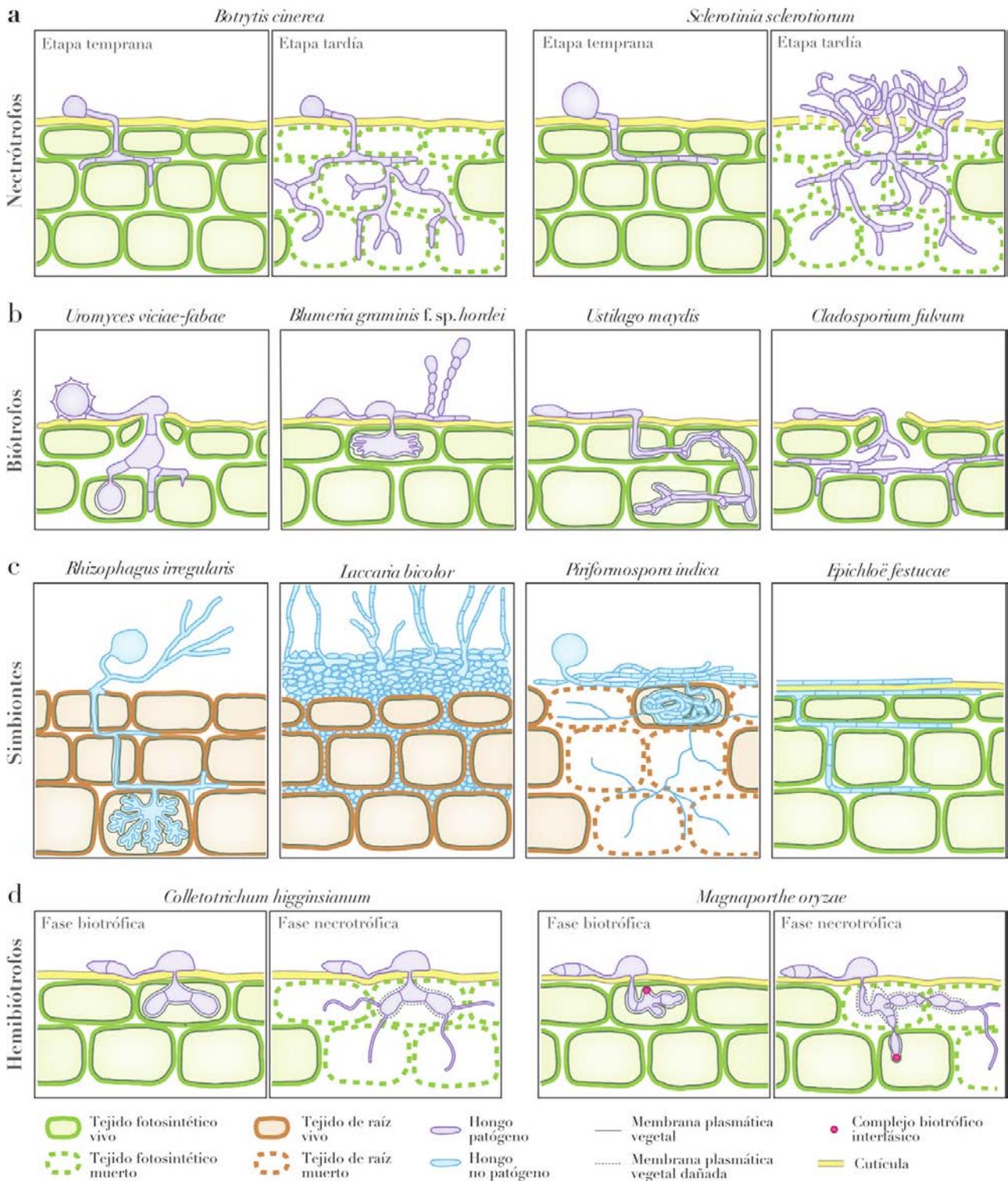


Figura I. 5. Colonización de hongos con diferentes estilos de vida. a) Los necrótrofos generalmente crecen de forma subcutánea y destruyen las células epidérmicas al secretar metabolitos tóxicos y proteínas. b) Los biotrofos obligados pasan a través de una serie de pasos que eventualmente derivan en la formación del haustorio. c) El hongo formador de micorrizas *Rhizophagus irregularis* desarrolla estructuras de alimentación altamente ramificadas llamadas arbuscúlos. El hongo formador de ectomicorrizas *Laccaria bicolor* crece exclusivamente intercelularmente y genera la llamada red de Hartig. Los endófitos colonian el tejido vegetal intracelular o intercelularmente. d) Los hemibiotrofos inicialmente desarrollan hifas invasoras biotróficas abultadas que luego se transforman en hifas necrotroficas. Fuente: Lo Presti et al., 2015⁹².

I. IV. II. Interacción Molecular

Se han desarrollado varios modelos conceptuales para describir las bases moleculares de la interacción entre las plantas y los microorganismos y el eventual establecimiento de la enfermedad. El primero modelo en alcanzar amplia aceptación fue el propuesto por Harold Henry Flor en 1942; en su hipótesis “gen a gen”, Flor propuso que un gen de resistencia dominante del hospedador (*R*) incita un fenotipo de resistencia a la enfermedad en respuesta a un patógeno portador de un gen de avirulencia dominante (*Avr*). Luego, la interacción entre sus productos génicos activa respuestas de defensa en el hospedador, tal como la respuesta de hipersensibilidad, efectiva contra los patógenos biótrosos^{94,95}.

Actualmente, uno de los modelos más utilizados para explicar las interacciones patógeno-hospedador es el modelo zigzag propuesto por Jones y Dangl en el año 2006. El modelo zigzag distingue cuatro fases durante la interacción planta-patógeno. En la primera fase, las plantas reconocen moléculas conservadas del patógeno, denominadas patrones moleculares asociados al microbio (MAMPs, *microbial-associated molecular patterns*) mediante sus receptores denominados receptores de reconocimiento del patrón (PRRs, *pattern recognition receptors*), lo que conduce a una resistencia de amplio espectro, denominada inmunidad activada por MAMP (MTI, *MAMP-triggered immunity*). A continuación, los patógenos que prosperan producen moléculas denominadas efectores que les permiten superar la MTI, lo que resulta en la susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS, *effector-triggered susceptibility*). Posteriormente, estos efectores pueden ser reconocidos de manera específica por receptores intracelulares (proteínas R), disparando la inmunidad activada por efector (ETI, *effector-triggered immunity*). En la última fase, la selección natural impulsa a los patógenos a evitar la ETI ya sea mediante la eliminación o diversificación del gen efector reconocido, o mediante la adquisición de efectores adicionales que suprimen la ETI (Figura I. 6)⁹⁶. Ha de tenerse en cuenta, sin embargo, que las interacciones entre los efectores necrótrosos, por ejemplo, las toxinas provenientes del metabolismo secundario, con sus respectivos receptores en la planta conducen a la susceptibilidad (dominante), en lugar de la resistencia. Esta paradoja fue denominada relación de gen a gen inversa, por su analogía antagónica con la hipótesis fundacional de Flor⁹⁷⁻⁹⁹.

Capítulo I

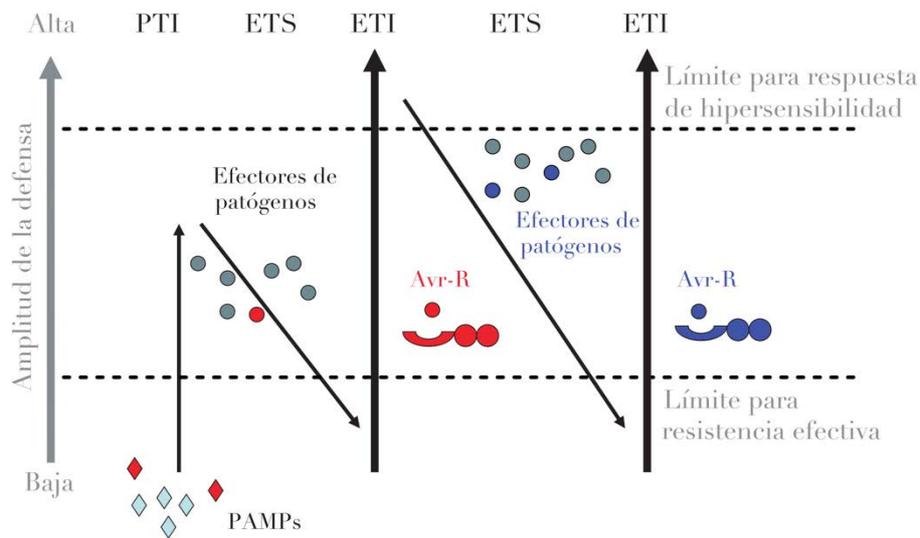


Figura I. 6. Esquema del modelo zigzag. Fuente: Jones & Dangl, 2006 ⁹⁶.

La postulación de la hipótesis de gen a gen, en 1942, disparó la búsqueda de los productos génicos responsables de la enfermedad y resistencia en diversos patosistemas ^{75,100}. Desde entonces, la genética clásica, en algunos sistemas modelo, y el desarrollo de la biología molecular han permitido grandes avances en la investigación de las interacciones entre los hongos fitopatógenos y sus hospedadores. Sin embargo, el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de segunda generación marcó un punto de inflexión metodológico al facilitar la disección de la fitopatogenicidad a través de la biología de sistemas ¹⁰¹. La disponibilidad de secuencias de genomas ha permitido, por ejemplo, el análisis de alto rendimiento de proteomas y metabolomas. En efecto, el complemento de estas disciplinas, con la genómica como pivote, es capaz de proporcionar una visión detallada de la bioquímica del sistema de estudio (patógeno, hospedador o patosistema) y asistir con la identificación de las moléculas claves en esta guerra molecular liberada entre la planta y el patógeno ^{101 103}.

Capítulo I

I. V. Hipótesis y Objetivos

I. V. I. Hipótesis General

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

I. V. II. Objetivos

I. V. II. I. Objetivo General

Establecer bases para el manejo de la mancha gris de la hoja del tomate a partir del conocimiento de la biología molecular de su agente causal.

I. V. II. II. Objetivos Específicos

- I. Identificar molecularmente y caracterizar morfológicamente aislados de *Stemphylium* causales de la mancha gris de la hoja del tomate en Argentina.
- II. Determinar la diversidad genética entre los aislados de *Stemphylium* mediante el uso de marcadores ISSR.
- III. Evaluar la agresividad de los aislados de *Stemphylium* en tomate.
- IV. Obtener el genoma borrador de un aislado representativo de *Stemphylium*.
- V. Realizar estudios taxonómicos y evolutivos en base al genoma mitocondrial.
- VI. Analizar el secretoma y metaboloma secundario del hongo fitopatógeno.

**Capítulo II: Identificación y Caracterización de Aislados de
Stemphylium Causantes de la Mancha Gris de la Hoja del
Tomate en Argentina**

Capítulo II

II. I. Introducción

El tomate (*S. lycopersicum*) es un cultivo importante en todo el mundo. Aproximadamente 4,6 millones de hectáreas se cultivan anualmente y producen alrededor de 163 millones de toneladas ¹⁷. Al igual que otros cultivos, el cultivo de tomate se ve afectado negativamente por diversas plagas y enfermedades. Actualmente, el número estimado de enfermedades del tomate es de aproximadamente 200 ³. Entre las enfermedades infecciosas, se ha descrito que más de 76 especies de hongos son patógenas para el tomate ²⁵.

La mancha gris de la hoja del tomate es una enfermedad causada por tres especies del género *Stemphylium* (teleomorfo: *Pleospora*): *S. solani*, *S. lycopersici* y *S. botryosum* ³. Esta enfermedad está presente en la mayoría de las áreas productoras de tomate del mundo con temperaturas cálidas y alta humedad relativa. Bajo estas condiciones, los conidios del hongo en la superficie de la hoja desarrollan un tubo de germinación que penetra la hoja principalmente a través de los estomas, pero también a través de las paredes celulares periclinales de la epidermis. Luego, se desarrolla una vesícula dentro de la cavidad subestomal, desde donde surgen las hifas secundarias y colonizan todo el mesófilo. Las primeras lesiones macroscópicas se pueden observar después de 36 h de infección ³². Los síntomas consisten en pequeñas manchas pardas, que más tarde se tornan grises y rodeadas por un halo clorótico. A medida que las lesiones maduran, el centro de las lesiones en desarrollo se seca y se vuelve quebradizo. En los ataques severos, se presenta coloración amarillenta a lo largo de toda la hoja, que presenta una gran cantidad de manchas que pueden fusionarse en grandes áreas foliares necróticas ².

Tradicionalmente, la identificación de las especies de *Stemphylium* era llevada a cabo en base a caracteres morfológicos, que incluyeron la forma, tamaño, relación largo/ancho, color, septación y ornamentación del conidio; largo del conidióforo; y diámetro de la célula apical del conidióforo ^{31,49,52 54,57,69,104}. Entonces, sus especies eran delimitadas mediante sistemas de llave como el ejemplificado en la tabla II. 1 ⁵⁷. Si bien los caracteres morfológicos de las ascosporas también han sido utilizados para este fin, las esporas sexuales no son buenos elementos de diagnóstico rápido, debido al tiempo que demora la formación de los cuerpos fructíferos fértiles ^{54,105,106}. Además, el alcance de este tipo de identificación es limitado, puesto que muchas de estas características a menudo se

Capítulo II

superponen entre las especies ¹⁰⁷. Más aún, las características de los conidios de algunas especies varían en función de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, la forma y dimensión del conidio de *S. lycopersici* varía marcadamente con la temperatura (Figura II. 1) ¹⁰⁸. Todo esto hace que la identificación de especies basada únicamente en caracteres morfológicos sea difícil y, en muchos casos, incorrecta ¹⁰⁹. A fin de superar estas limitaciones, otro tipo de técnicas fueron aplicadas como complemento a la identificación morfológica. Por ejemplo, mediante un enfoque quimiotaxonómico, distintas especies de *Stemphylium* de morfología similar pudieron ser diferenciadas entre sí mediante la caracterización de sus micotoxinas y metabolitos ^{61,110,111}. Sin embargo, el gran salto cualitativo en la identificación y taxonomía fue alcanzado a partir de los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN (ácido desoxirribonucleico). El análisis de las secuencias de ADN es un enfoque mucho más confiable para la identificación y clasificación de especies porque, a diferencia de los caracteres morfológicos, las secuencias de ADN no son alteradas por el ambiente. En particular, la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS, *internal transcribed spacer*) ha sido seleccionada como código de barras de ADN fúngico ¹¹². Se estimó que este marcador tiene un 73 % de probabilidad de identificar correctamente una especie de hongo ¹¹³. En caso del género *Stemphylium*, el uso exclusivo de la secuencia del ITS no es suficiente para distinguir de modo fehaciente entre especies, por lo que este marcador ha de ser complementado con otros. Luego, la estrategia consistió en realizar análisis filogenéticos moleculares utilizando múltiples marcadores moleculares de manera simultánea. De este modo, el uso de una región del gen codificante de la gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) en conjunto con el ITS ha servido para distinguir entre algunas especies de *Stemphylium*. Asimismo, se encontró que el poder de resolución alcanzado es aún mayor cuando estos dos marcadores se complementaron con una región del gen codificante del factor de elongación 1- α (*ef-1 α* , *elongation factor 1- α*) y con la región intergénica comprendida entre el gen codificante de la subunidad catalítica A de la ATPasa de membrana vacuolar (*vmaA*, *vacuolar membrane ATPase catalytic subunit A*) y el gen aledaño, involucrado en la biogénesis de vacuola (*vpsA*, *vacuolar protein sorting A*) ¹¹⁴. Por lo tanto, la identificación de las especies de *Stemphylium* debe comprender tanto el análisis

Capítulo II

de caracteres morfológicos, como el análisis filogenético utilizando múltiples marcadores moleculares.

Tabla II. 1. Llave propuesta por Ellis (1971) para distinguir especies de *Stemphylium*.

Esporas con ápice redondeado:	1
Conidios con ápice cónico:	3
1. Conidios lisos:	<i>S. sarciniforme</i>
Conidios verrugosos:	2
2. Conidios constrictos en el septo medio:	<i>S. botryosum</i>
Conidios constrictos en los 3 septos transversos mayores:	<i>S. vesicarium</i>
3. Conidios constrictos en el septo medio y $L/A \leq 2$:	<i>S. solani</i>
Conidios constrictos en los 3 septos transversos mayores y $L/A \geq 3$:	<i>S. lycopersici</i>

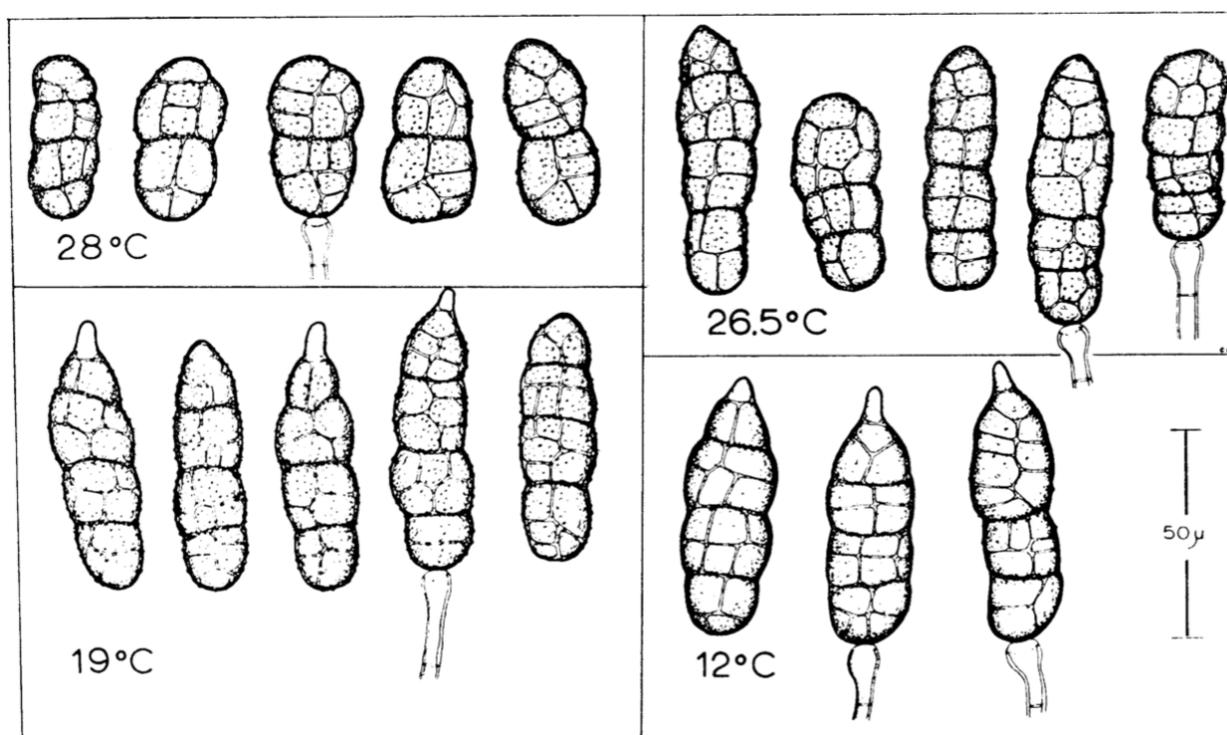


Figura II. 1. Comparación de los conidios producidos por *S. lycopersici* a diferentes temperaturas. Fuente: Leach & Aragaki, 1970¹⁰⁸.

Capítulo II

Los métodos moleculares también se han utilizado ampliamente para estudiar y analizar la diversidad genética entre las poblaciones de patógenos. Con respecto a las especies de *Stemphylium*, se ha estudiado la variabilidad genética utilizando técnicas de marcadores dominantes como ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*), regiones consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), palíndromos repetitivos extragénicos (REP, *Repetitive Extragenic Palindromes*) y secuencias simples internas repetidas (ISSR, *Inter Simple Sequence Repeat*)^{29,30,115} ¹¹⁷. El conocimiento de la estructura y la dinámica de las poblaciones de patógenos es esencial para desarrollar una estrategia para manejar la enfermedad ¹¹⁸.

En Argentina, la mancha gris de la hoja del tomate se reportó por primera vez en la provincia de Corrientes en 1990 y, desde entonces, la enfermedad también se ha encontrado en el resto de las principales regiones productoras de tomate del país. Hasta ahora, la enfermedad se ha asociado con *S. solani* y *S. lycopersici*, aunque tales identificaciones se basaron únicamente en características morfológicas ^{119,120}. Asimismo, no se han realizado estudios con respecto a la variabilidad genética y la estructura poblacional de las especies de *Stemphylium* que causan la mancha gris de la hoja del tomate en Argentina.

Capítulo II

II. I. I. Hipótesis del Capítulo

- I. Los aislados de *Stemphylium* obtenidos de material vegetal con síntomas típicos de la mancha gris de la hoja del tomate de importantes regiones productoras de tomate de Argentina corresponden a *S. botryosum*, *S. lycopersici* y/o *S. solani*.
- II. Los aislados de *Stemphylium* difieren en su fenotipo y genotipo.

II. I. II. Objetivos del Capítulo

- I. Identificar molecularmente aislados de *Stemphylium* causales de la mancha gris de la hoja del tomate en Argentina mediante la amplificación, secuenciación y análisis de la región ITS y de una secuencia parcial del gen *gpd*.
- II. Caracterizar morfológicamente a los aislados de *Stemphylium*.
- III. Determinar la diversidad genética entre los aislados de *Stemphylium* mediante el uso de marcadores dominantes ISSR.
- IV. Evaluar la agresividad de los aislados de *Stemphylium* en tomate.

Capítulo II

II. II. Materiales y Métodos

II. II. I. Material Fúngico

II. II. I. I. Material Fúngico de Partida

El material de partida consistió en veintisiete aislados de *Stemphylium* depositados en la colección de cultivos del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Los aislados fúngicos se obtuvieron de plantas de tomate recolectadas de las principales áreas de cultivo de tomate en Argentina en 2010, 2011 y 2013 que presentaron síntomas típicos de mancha gris de la hoja del tomate (Tabla II. 2). Estos aislados fueron los utilizados para llevar a cabo todos los objetivos del capítulo en cuestión.

II. II. I. II. Material Fúngico Complementario

A lo largo del desarrollo del trabajo de tesis doctoral se incorporaron 39 aislados fúngicos adicionales. Los mismos fueron obtenidos a partir de plantas de tomate o pimiento con síntomas típicos de la mancha gris de la hoja provenientes de Corrientes, La Plata, Salta y Mendoza. Para el aislamiento, secciones de tejido foliar sano y necrótico se lavaron con agua, se desinfectaron con NaOCl al 1 % durante 1 minuto y se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego, las secciones foliares desinfectadas se sembraron en agar papa glucosa (APG) suplementado con cloranfenicol (250 mg/l) e incubaron a 25 °C por 3 días. Pasado este tiempo, se observaron las características macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas sobre las piezas de tejido vegetal, se repicaron las mismas a placas con APG suplementado con cloranfenicol (250 mg/l) e incubaron las mismas a 25 °C por una semana. Para obtener aislados monospóricos, se prepararon suspensiones de conidios, las cuales fueron sembraron en APG suplementado con cloranfenicol (250 mg/l) e incubadas a 25 °C durante 72 h. Luego, una colonia de cada cultivo se transfirió a una nueva placa de APG suplementado con cloranfenicol (250 mg/l) y se incubó a 25 °C durante una semana. Los hongos aislados fueron usados para enfermar folíolos de tomate/pimiento tal como se detalla en la sección II. II. V, “Evaluación de Agresividad”, y se volvieron a aislar para cumplir así con los postulados de Koch. Los cultivos monospóricos de cada aislado se depositaron en la colección del CIDEFI de la FCAyF de la UNLP. Estos aislados

Capítulo II

fueron identificados molecularmente, mas no fueron parte de todos los objetivos del presente capítulo.

Tabla II. 2. Origen de los aislados de *Stemphylium*.

Aislado	Orígen Geográfico	Cultivar	Año
CIDEFI-200	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-201	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-202	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-203	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-204	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-205	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-206	Lavalle (CR)	Torry	2011
CIDEFI-207	Bella Vista (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-208	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-210	Bella Vista (CR)	Elpida	2010
CIDEFI-211	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-212	La Plata (BA)	Elpida	2010
CIDEFI-213	Bella Vista (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-214	Lavalle (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-215	Bella Vista (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-216	Bella Vista (CR)	Elpida	2010
CIDEFI-217	Lavalle (CR)	Torry	2011
CIDEFI-218	Bella Vista (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-219	Lavalle (CR)	Torry	2011
CIDEFI-220	Bella Vista (CR)	Elpida	2011
CIDEFI-225	La Plata (BA)	Tomate Platense	2013
CIDEFI-226	La Plata (BA)	Tomate Platense	2013
CIDEFI-227	Lavalle (CR)	Elpida	2013
CIDEFI-228	Lavalle (CR)	Elpida	2013
CIDEFI-229	Lavalle (CR)	Elpida	2013
CIDEFI-230	La Plata (BA)	Elpida	2013
CIDEFI-231	La Plata (BA)	Elpida	2013

Estos aislados representaron al material de partida.

Capítulo II

II. II. II. Caracterización Morfológica

Las características morfológicas de los aislados se analizaron tanto en cultivos en APG casero y comercial. El APG casero se preparó hirviendo 200 g de papas cv. Spunta en agua destilada (1 l) por 1 h. Luego, el extracto filtrado se mezcló con 20 g de agar y 20 g de dextrosa y finalmente se hirvió durante un tiempo adicional de 20 min. El APG comercial Britania S.A. (Argentina) fue preparado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Cada aislado se inoculó colocando un disco de 7 mm tomado de un cultivo de 7 días en el centro de una placa de Petri, que se incubaron a 25 °C en oscuridad continua durante 7 días. El experimento fue completamente al azar y el número de réplicas fue de tres por aislado por medio de cultivo. Se examinaron características tales como la tasa de crecimiento, el color de la colonia, la elevación, el margen, la zonificación, la pigmentación del medio de cultivo y la esporulación. El diámetro de la colonia se registró como la media de dos medidas de diámetros de colonia en ángulos rectos para cada colonia. Los colores se designaron de acuerdo con el sistema de orden por colores de Munsell, implementado en la aplicación web Virtual Color Atlas v. 2.0.0720 (Virtual Color Systems LTD 2013). La capacidad de esporulación se estimó mediante la adición de 5 ml de Tween 20 al 0,01 % al cultivo, que luego se raspó con la ayuda de una espátula. La suspensión obtenida se homogeneizó pipeteando y agitando en vórtex y, luego, se cargó una alícuota de 100 µl en una cámara Neubauer modificada, donde se contaron las esporas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se promediaron los valores. Se estimó el número de conidios por centímetro cuadrado de la colonia fúngica en comparación con el diámetro de la colonia correspondiente. La morfología de los conidios se examinó en mediante microscopía óptica. Cincuenta conidios maduros (\pm DE) se midieron usando un micrómetro ocular calibrado. Ambas observaciones macroscópicas y microscópicas fueron foto-documentadas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA, analysis of variance) y las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD, *least significant difference*) ($P = 0,05$) utilizando InfoStat versión 2015 1^{2a}. Para examinar si el crecimiento fúngico fue determinado por el tipo de medio de cultivo, se realizó un ANOVA anidado bidireccional usando las variables independientes: medio de cultivo y aislado.

Capítulo II

II. II. III. Análisis Molecular

II. II. III. I. Extracción de ADN Genómico

El ADN genómico total se extrajo de cultivos axénicos utilizando el método Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, *cetyl trimethyl ammonium bromide*) de Borneo y Branchard ¹²². Se tomaron 300 mg de micelio (peso húmedo). El tejido se congeló en Nitrógeno líquido y se homogeneizó en mortero hasta obtener un polvo homogéneo, al que luego se le adicionaron 1000 µl de buffer CTAB (100 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % p/v β-mercaptoetanol, 2 % p/v CTAB). La suspensión de micelio y buffer se pasó a un tubo Eppendorf de 2 ml y se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Luego, se adicionó un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (12:1) pH 8, se mezcló y se centrifugó 5 min a 10000 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 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M. La mezcla se mantuvo a -18 °C durante 12 horas. La suspensión se centrifugó a 10000 g para generar un pellet de ADN, que se lavó tres veces con etanol 70 % y luego se secó a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 150 µl de buffer TE. Para eliminar el ácido ribonucleico (ARN) se adicionó 1 µl de ARNasa (10 µg.µl⁻¹) y se incubó a 37 °C por 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. La calidad y cantidad de ADN genómico se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 % que se tiñó con bromuro de etidio. Los geles se visualizaron mediante luz UV y las imágenes se capturaron con el software GeneSnap. El ADN genómico se cuantificó comparando la intensidad de la banda resultante de la extracción con las de un marcador molecular de concentración conocida mediante el analizador de imágenes GeneTools (SynGene, Cambridge, Reino Unido). El ADN extraído se almacenó a -70 °C hasta el análisis.

II. II. III. II. Amplificación y Secuenciación del ITS y *Gpd*

Para amplificar el ITS se utilizaron los cebadores ITS4 e ITS5 ¹²³. Por otra parte, para amplificar una región del gen *gpd* se utilizaron los cebadores GPDF y GPDR (Tabla II. 3). Estos últimos fueron diseñados en base a secuencias *gpd* de *Stemphylium* spp. disponibles

Capítulo II

en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), buscando la secuencia de menor tamaño que contenga el mayor número de polimorfismo. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase Chain Reaction*), tanto del ITS como *gpd*, se realizaron en una mezcla de reacción de 15 µl que contenía 50 ng de ADN molde, 0,3 µM de cada cebador directo e inverso, 1,5 µl de buffer de reacción 10X (KCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 a 25 °C; 1 % de Tween 20), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP y 1 unidad de Taq polimerasa (todo Inbio Highway®, Buenos Aires, Argentina). Para amplificar el fragmento ITS, el termociclador se programó de la siguiente manera: 5 minutos a 94°C, seguidos de 33 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 56°C y 1 minuto a 72°C, seguido de un paso de extensión final de 72°C durante 5 minutos. Por otro lado, la secuencia parcial del *gpd* se amplificó mediante los siguientes parámetros: 5 minutos a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 30 segundos a 72 ° de extensión, y la extensión final de 5 minutos a 72 °C. Ambas reacciones de amplificación se realizaron usando un MiniCycler PTC-0150 (MJ. Research, Watertown, MA, EE. UU.). Los productos de PCR se resolvieron en electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñida con bromuro de etidio. Los geles se visualizaron mediante iluminación UV, las imágenes se capturaron con GeneSnap y el ADN se cuantificó con el analizador de imágenes GeneTools (SynGene). Los productos de PCR se purificaron por precipitación con isopropanol y se secuenciaron en Macrogen (Seúl, Corea).

Tabla II. 3. Cebadores utilizados para la identificación molecular.

Primer	Sequence (5'-3')
ITS4	AAGCTTTCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GAATTCGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
GPDF	GACATTGTCGCCGTGAAC
GPDR	ACTCGACGACGTAGTAGG

II. II. III. III. Análisis Taxonómico

La posición taxonómica de los aislados se evaluó mediante la realización de un análisis filogenético molecular multilocus. El análisis incluyó a siete representantes de cinco géneros del orden Pleosporales (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Cochliobolus*, *Pyrenophora* y *Setosphaeria*) que se eligieron como grupo externo y se incluyeron 23 representantes del género *Stemphylium* como grupo interno. Todas sus secuencias (ITS y *gpd*) fueron obtenidas del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov; Tabla II. 4). Las secuencias se alinearon con MEGA 5.10 utilizando los parámetros por defecto del algoritmo ClustalW, esto es, una penalización de apertura de hueco 15 y penalización de extensión de hueco 6,66 ¹²⁴. Las alineaciones se verificaron visualmente y se optimizaron manualmente. El análisis filogenético se realizó bajo los criterios de máxima parsimonia (MP, *maximum parsimony*) y Máxima probabilidad (ML, *maximum likelihood*). Previamente, la prueba de homogeneidad de partición (PHT, *partition homogeneity test*) se realizó para determinar si los dos loci podían concatenarse en un solo conjunto de datos. PHT se ejecutó en el software PAUP * 4.0 utilizando los mismos parámetros que se describen a continuación para el análisis de MP ^{125,126}. El análisis filogenético basado en MP se realizó usando PAUP * con la opción de búsqueda heurística con intercambio de ramas de bisección de árbol y 1000 adiciones de secuencia al azar. Los caracteres se trataron como no ponderados y los vacíos se trataron como datos faltantes ¹²⁶. Debido al excesivo tiempo computacional requerido para llevar a cabo una búsqueda heurística de MP, el número de árboles guardados se limitó a 100 con puntajes de 1 o más por cada repetición de secuencia de adición aleatoria. La estabilidad del clado se evaluó mediante 1000 repeticiones de *bootstrap* usando las opciones de búsqueda heurística descritas anteriormente. En cuanto al análisis de ML, los mejores modelos de sustitución el software jModelTest 2 utilizando criterio de información de Akaike (AIC, *Akaike information criterion*) ^{127,128}. Los parámetros del mejor modelo se usaron en el software PhyML 3.1 para el árbol de ML, cuyo soporte se estimó a través de 1000 réplicas de *bootstrap* ¹²⁹.

Capítulo II

Tabla II. 4. Especies adicionales usadas en el análisis filogenético.

Especie	Cepa/Aislado	ITS ^a	<i>gpd</i> ^b
<i>Alternaria alternata</i>	EGS 34-016	AF071346	AF081400
<i>Bipolaris australis</i>	Turgeon 77139	AF081448	AF081409
<i>Cochliobolus sativus</i>	Tinline A20	AF071329	AF081385
<i>Pyrenophora japonica</i>	DAOM 169286	AF071347	AF081369
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	DAOM 208990	AF071348	AF081370
<i>Setosphaeria minor</i>	ATCC 62323	AF071341	AF081396
<i>Setosphaeria rostrata</i>	ATCC 32197	AF071342	AF081379
<i>Stemphylium alfalfae</i>	EGS 36-088	AY329171	AY316971
<i>S. astragali</i>	EGS 27-194.1	AF442777	AF443876
<i>S. astragali</i>	EGS 27-194.2	AF442779	AF443878
<i>Pleospora tarda</i>	EGS 04-118c	AF442782	AF443881
<i>P. tarda</i>	ATCC 26881	AF442781	AF443880
<i>S. callistephi</i>	NO 536	AF442783	AF443882
<i>P. eturmiunum</i>	EGS 29-099	AY329230	AY317034
<i>P. gracilariae</i>	EGS 37-073	AY329217	AY317021
<i>S. gracilariae</i>	EGS 37-073 extype	AF442784	AF443883
<i>P. herbarum</i>	EGS 30-181.1	AF442786	AF443885
<i>S. lancipes</i>	EGS 46-182	AF442787	AF443886
<i>S. lycopersici</i>	EGS 46-001	AF442790	AF443889
<i>S. lycopersici</i>	NO 425	AF442791	AF443890
<i>P. paludiscirpi</i>	EGS 31-016	AY329231	AY317035
<i>P. sedicola</i>	EGS 48-095	AY329232	AY317036
<i>S. solani</i>	EGS 42-027	AF442797	AF443896
<i>S. solani</i>	NO 545	AF442794	AF443893
<i>P. tomatonis</i>	EGS 29-089	AY329229	AY317033
<i>S. trifolii</i>	NO 615	AF442801	AF443900
<i>S. trifolii</i>	NO 553	AF442798	AF443897
<i>P. triglochinicola</i>	EGS 36-118	AF442802	AF443901
<i>S. vesicarium</i>	EGS 37-067	AF442803	AF443902
<i>S. xanthosomatis</i>	EGS 17-137	AF442804	AF443903

^a Número de acceso al GenBank.

II. II. III. IV. Análisis de Diversidad Genética

La diversidad entre todos los aislados se analizó mediante el procedimiento ISSR-PCR¹²². Seis cebadores microsatélites se seleccionaron basándose en el número de bandas polimórficas amplificadas y la reproducibilidad de sus reacciones (Tabla II. 5). Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en un volumen de 25 µl que contenía 12 ng de ADN molde,

Capítulo II

1 μM de cebador, 2,5 μl de buffer de reacción 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 a 25 °C, Tween 20 al 1 %), MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,2 mM y 1,25 unidades de polimerasa Taq (todas Inbio Highway®, Buenos Aires, Argentina). Las amplificaciones se realizaron usando un termociclador PTC-0150 MiniCycler (MJ. Research, Watertown, MA, EUA) programado de la siguiente manera: un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 7 min, seguido de 33 ciclos de 94 °C durante 1 min, 48 °C (cebadores AA5, AN y BA3 y GA5) o 53 °C (cebadores FA5 y LA5) durante 75 segundos y 72 °C durante 4 min, al final todas las reacciones tuvieron una extensión final de 72 °C durante 7 min. Los productos de ISSR-PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 70 V, hasta que el frente de corrida se acercó al final de estos. Los geles se expusieron a la iluminación UV y las imágenes se capturaron con el software GeneSnap (SynGene).

Los patrones de bandas de ISSR-PCR obtenidos a partir de bandas amplificadas estables se organizaron en una matriz de datos binarios, con una puntuación de 0 para la ausencia y de 1 para la presencia de banda. Se realizó un análisis multivariado utilizando el software Past3 (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>). El índice de similitud de Dice se usó para crear una matriz a partir de la cual se obtuvo un dendrograma usando el algoritmo del método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA, *unweighed pair group method with arithmetic mean*). Para medir la variación genética dentro y entre las distintas poblaciones geográficas de *Stemphylium*, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA, *analysis of molecular variance*) en el software Arlequin 3.5.2.2¹³⁰.

Tabla II. 5. Cebadores utilizados para el análisis de diversidad genética.

Primer	Secuencia (5'-3')
AA ₅	GAG(AAG) ₅
AN	(CAA) ₅
BA ₃	(AC)8CT
GA ₅	TCA(GT) ₈
FA ₅	TAC(GA) ₅
LA ₅	CAG(AAC) ₅

Capítulo II

II. II. IV. Evaluación de la Agresividad

La agresividad de los aislados de *Stemphylium* se evaluó *in vitro* en tomate cv. Elpida mediante un ensayo de hoja desprendida. Para ello, se colocaron folíolos desprendidos de plantas de tomate de 45 días con el lado adaxial hacia abajo sobre papel de filtro empapado en agua dentro de una placa de Petri de plástico. Luego, se lesionaron con una punta estéril en el lado abaxial en tres puntos equidistantes donde fueron inoculados con 30 µl de una suspensión de 1000 conidios por ml. La suspensión de esporas se preparó como se describió anteriormente y se filtró con una gasa esterilizada. En los aislados que no esporularon se usó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) como una estimación de la concentración real de inóculo. Para estos aislados no esporulantes, alícuotas de 100 µl de diluciones seriadas de suspensiones de micelio, preparadas como se describió anteriormente, se plaquearon en APG y se incubaron durante 48 ha 25 °C. Después de ese tiempo, se determinó el número de UFC. Los controles consistieron en folíolos tratados con una solución estéril de Tween al 0,01 %. Las placas de Petri se sellaron con Parafilm (Bemis, Neenah, WI, EUA) para evitar la pérdida de agua y se incubaron durante una semana a 25 °C. Los síntomas se examinaron 7 días post-inoculación (dpi) y la lesión promedio se determinó a partir de infecciones puntuales utilizando el software de análisis de imágenes para la cuantificación de la enfermedad de las plantas Assess 2.0¹³¹. El experimento consistió en nueve repeticiones de un foliolo por réplica inoculado con cada aislado; el experimento se repitió dos veces. Los hongos inoculados se volvieron a aislar para cumplir los postulados de Koch. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de un factor y las diferencias entre los medios de tratamiento se contrastaron con la prueba de LSD (P = 0,05) mediante el software InfoStat versión 2015 1¹³¹.

II. II. V. Aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235

Los aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235, que fueron obtenidos durante el transcurso del trabajo de tesis, fueron recuperados de la misma porción de tejido necrótico de plantas con síntomas típicos de la mancha gris de la hoja del tomate, procediendo de acuerdo con lo descrito en la sección II. II. I. II. Sin embargo, mientras que el asilado CIDEFI-234

Capítulo II

compartió características morfológicas con el resto de los aislados, el aislado CIDEFI-235 presentó características morfológicas notablemente distintas. Dada esta particularidad, se decidió avanzar con la identificación y caracterización de ambos, siguiendo la metodología descrita anteriormente. En cuanto a la identificación molecular del aislado CIDEFI-235, la evidencia morfológica y molecular (ITS) indicó al género *Corynespora*, por lo que tuvieron en cuenta a secuencias de otras especies de este género para la elaboración del árbol filogenético (Tabla II. 6).

Tabla II. 6. Especies adicionales usadas en el análisis filogenético del aislado CIDEFI-235.

Espece	Cepa/Aislado	ITS ^a
<i>Alternaria alternata</i>	EGS 34 016	AF071346
<i>Corynespora cassicola</i>	AS54	FJ852576
<i>C. citricola</i>	CBS 169.77	FJ852594
<i>C. endiandrae</i>	CBS 138902	KP004450
<i>C. leucadendri</i>	CBS 135133	KF251150
<i>C. olivacea</i>	CBS 484.77	JQ044429
<i>C. proliferata</i>	CBS 112393	FJ852596
<i>C. smithii</i>	CABI5649b	FJ852594
<i>C. torulosa</i>	CPC 15989	KF777154

^a Número de acceso al GenBank.

II. II. VI. Inoculación Cruzada de Asilados Provenientes de Pimiento en Tomate

Se evaluó la patogenicidad en tomate cv. Elpida y pimiento cv. Margarita de los aislados provenientes de material vegetal con síntomas típicos de la mancha gris de la hoja del pimiento mediante el ensayo en foliolo desprendido, descrito en la sección II. II. IV. Adicionalmente, se evaluó la patogenicidad de los aislados en plantines de tomate cv. Elpida y pimiento cv. Margarita. Para ello, se inocularon los plantines mediante la aspersión con una suspensión de 1000 conidios por ml, luego de lo cual los mismos fueron envueltos con bolsas plásticas transparentes, las cuales fueron retiradas a los dos días. Los plantines se mantuvieron a temperatura ambiente, de alrededor de 25 °C, durante 14 días. Como control se utilizaron plantines asperjados con agua estéril. El experimento consistió en cuatro repeticiones de un plantín por réplica inoculado con cada aislado; el experimento se repitió dos veces.

II. III. Resultados

II. III. I. Caracterización Morfológica

Las características morfológicas de los aislados variaron notablemente, ya sea que se cultivaran en APG casero o comercial. La media de diámetro de las colonias osciló entre $25,00 \pm 1,00$ mm (CIDEFI-212) a $79,33 \pm 2,30$ mm (CIDEFI-230) después de 7 días de incubación a 25° C. Los aislados CIDEFI-200, CIDEFI-201, CIDEFI-210, CIDEFI-212 y CIDEFI-231 fueron los que presentaron el crecimiento más lento. Se encontraron variaciones en el diámetro de la colonia dentro del mismo aislado, como fue el caso del aislado CIDEFI-229 que alcanzó un diámetro medio de colonia de 70,33 mm en APG comercial, pero creció solo hasta 25 mm cuando se cultivó en APG casero (Figura II. 2). También se observaron diferencias entre aislados y dentro de otros caracteres de la colonia, como el color, la textura, la elevación, el margen y la existencia de zonificación y sus patrones. Por ejemplo, cuando el aislado CIDEFI-203 se cultivó en APG casero, mostró colonias algodonosas planas que fueron blancas, de color verde oliva moderado y de color verde amarillo brillante y márgenes ondulados que presentaban, además, una zonificación concéntrica. Cuando el mismo aislado fue cultivado en APG comercial, desarrolló colonias algodonosas que fueron de color blanco, amarillo vivo y naranja pálido amarillo, con márgenes regulares y la ausencia de zonificación. Ninguno de los aislados esporuló en APG comercial. Sin embargo, la esporulación en el APG casero varió marcadamente. En un extremo, los aislados CIDEFI-201, CIDEFI-210, CIDEFI-212 y CIDEFI-231 no esporularon. En el otro extremo, el aislado CIDEFI-218 produjo 63,057 esporas por centímetro cuadrado de micelio aéreo. El resto de los aislados mostraron diferencias en su capacidad de esporulación entre estos dos extremos. Es importante mencionar que los aislados no esporulantes CIDEFI-201, CIDEFI-210, CIDEFI-212 y CIDEFI-231 compartieron características de colonia tales como la difusión de un pigmento color vivo amarillo verdoso que cambió a un color rojo oscuro a medida que el cultivo envejecía. Las características de las colonias de todos los aislados se describen en la tabla II. 7 y las imágenes se exhiben en la figura II. 3.

Capítulo II

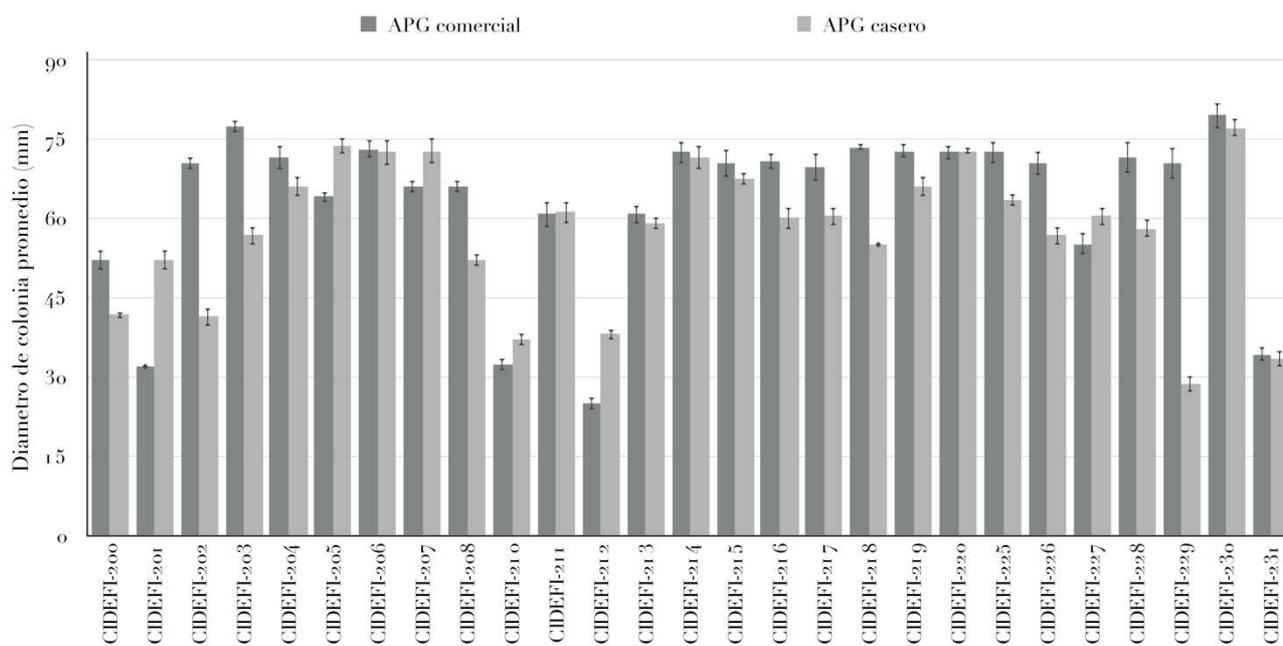


Figura II. 2. Diámetro de las colonias de aislados de *Stemphylium* cultivados 7 días en APG casero o comercial, a 25 ° C y en la oscuridad continua.

Capítulo II

Tabla II. VI. Características morfológicas de las colonias de *Stemphylium* en APG, casero y APG comercial (entre corchetes)

Aislado	Característica Morfológica de la Colonia/Crecimiento/Micelial									
	Dámetro	Color Overso	Color Reverso	Textura	Elevación	Margen	Zonación	Conditos por cm ²	Pigmentación del Medio	
CIDDEF1-200	4,66 ± 0,58 g	W (N 9) - MOC (5,5GY 4/4)	BYG (2,5GY 8/10) - MOC (5GY 3/4)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Concentrica	244 ± 47	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-201	[52,00 ± 1,73] f	[W (N 9) - VY (5Y 8/2)]	[VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[DR (7,5R 3/6) - VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-202	52,00 ± 1,73 g	PY (5Y 9/4) - PYP (7,5YR 9/9) - W (N 9)	VRO (0R 5/4) - DRO (0R 4/2)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Ausente	0	DR (7,5R 3/6) - VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-203	[32,00 ± 0,90] c	[PY (2,5Y 9/4) - PYP (7,5YR 9/9) - W (N 9)]	[VRO (0R 5/4) - DRO (0R 4/2)]	[Atriciopelada]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[DR (7,5R 3/6) - VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-204	4,33 ± 1,53 f	LYG (2,5GY 9/9) - MOC (5GY 4/4) - BGY (0Y 8/8)	LYG (2,5GY 9/6) - MOC (5GY 3/4)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Concentrica	57,6 ± 7,7 e	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-205	[76,33 ± 1,45] op	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/2)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-206	56,67 ± 1,54 hi	BYG (2,5GY 8/8) - MOC (5GY 4/4) - W (N 9)	BYG (2,5GY 8/10) - MOC (5GY 3/4)	Algodonosa	Plana	Ondular	Concentrica	84,4 ± 4,8 fg	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-207	[77,33 ± 1,45] s	[W (N 9) - VY (5Y 8/2) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-208	66,00 ± 1,73 mm	BYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	BGY (0Y 8/10) - MO (7,5Y 4/6)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Ausente	23,27 ± 3,38 c	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-209	[71,33 ± 2,08] opqr	[W (N 9) - LYG (5GY 8/4)]	[LYG (2,5GY 8/4) - MYG (2,5GY 7/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[Ausente]	
CIDDEF1-210	[64,00 ± 1,00] m	[W (N 9) - VY (5Y 8/2)]	[W (N 9) - MOC (7,5GY 4/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[Ausente]	
CIDDEF1-211	72,33 ± 3,31 opqr	W (N 9)	[VGY (0Y 8/2) - LO (0Y 6/8)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-212	[75,00 ± 1,73] pqr	[LYG (5GY 8/4) - PYG (5GY 8/9)]	[LYG (5GY 9/4) - MOC (5,5GY 4/4)]	[Atriciopelada]	[Plana]	[Entero]	[Concentrica]	[0]	[Ausente]	
CIDDEF1-213	72,66 ± 2,24 pqr	BYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - LY (2,5Y 8/6)	BYG (2,5GY 8/10) - MOC (5GY 3/4)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Radial	66,9 ± 1,33 a	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-214	[66,0 ± 1,00] mm	[W (N 9) - VY (5Y 8/2) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[DR (7,5R 3/6) - VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-215	52,00 ± 1,00 g	W (N 9) - BY (5Y 8/8) - BGY (0Y 8/9)	LYG (5GY 9/4) - MOC (2,5GY 4/4)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Concentrica	9,59 ± 3,02 ab	Ausente	
CIDDEF1-216	[66,0 ± 1,00] mm	[W (N 9) - LY (5Y 8/4)]	[BYG (2,5GY 8/8) - LO (5Y 5/8)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-217	37,00 ± 1,00 de	LY (5Y 9/6)	VRO (0R 5/4) - B (N 9)	Algodonosa	Plana	Ondular	Ausente	0	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-218	[32,33 ± 1,45] c	[W (N 9)]	[VRO (0R 5/4) - DRO (0R 4/2)]	[Atriciopelada]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-219	61,00 ± 2,00 M	BYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	BYG (2,5GY 8/10) - MOC (5GY 3/4)	Algodonosa	Elevada - Plana	Ondular	Radial	3,6 ± 2,19 a	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-220	[62,66 ± 2,21] jk	[W (N 9) - POY (7,5YR 8/4)]	[BGY (0Y 8/10) - MO (7,5Y 2/4) - LOB (2,5Y 5/8)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Concentrica]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-221	38,00 ± 1,00 e	LY (5Y 9/6)	VRO (0R 5/4) - B (N 9)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Ausente	0	DR (7,5R 3/6) - VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-222	[35,00 ± 1,00] a	[W (N 9)]	[VRO (0R 5/4) - DRO (0R 4/2)]	[Atriciopelada]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-223	59,00 ± 1,00 jk	GOG (7,5GY 3/2) - W (N 9)	LYG (5GY 9/4) - B (N 9)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Ausente	47,96 ± 6,88 h	Ausente	
CIDDEF1-224	[62,66 ± 1,54] jk	[W (N 9) - VY (5Y 8/2)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada - Plana]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-225	71,33 ± 2,09 opqr	BYG (2,5GY 8/8) - MOC (7,5GY 4/4) - W (N 9)	VGY (7,5Y 8/2) - DYB (0R 3/6)	Algodonosa	Plana	Ondular	Ausente	370 ± 80 a	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-226	[72,33 ± 2,08] opqr	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/2)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-227	67,33 ± 1,44 no	BYG (2,5GY 8/8) - MOC (7,5GY 4/4) - W (N 9)	VGY (7,5Y 8/2) - DYB (0R 3/6)	Algodonosa	Elevada	Entero	Radial	371 ± 91 a	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-228	[70,33 ± 2,26] op	[W (N 9) - VY (2,5Y 8/2) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[DR (7,5R 3/6) - VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-229	62,00 ± 2,00 jk	W (N 9) - LYG (2,5GY 9/9) - POY (7,5YR 8/4) - GO (0Y 3/2)	LYG (5GY 9/4) - MOC (2,5GY 4/4)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Concentrica	19,6 ± 19,6 a	Ausente	
CIDDEF1-230	[72,66 ± 1,52] opqr	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/2) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-231	62,33 ± 1,53 jk	LYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	PYG (2,5GY 9/9) - MYG (2,5GY 5/4)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Ausente	46,7 ± 13,4 d	Ausente	
CIDDEF1-232	[62,66 ± 2,26] no	[W (N 9) - LYG (5GY 8/4)]	[LYG (2,5GY 8/4) - MYG (2,5GY 7/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Ondular]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-233	55,00 ± 0,90 h	MYG (5GY 7/4) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	PYG (2,5GY 9/9) - MYG (2,5GY 5/4)	Algodonosa	Plana	Ondular	Concentrica	63,57 ± 1,68 i	Ausente	
CIDDEF1-234	[73,33 ± 0,58] qr	[LYG (5GY 8/4)]	[LYG (2,5GY 9/9) - MYG (2,5GY 5/4)]	[Algodonosa]	[Plana]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[Ausente]	
CIDDEF1-235	66,00 ± 1,73 mm	BYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	VGY (7,5Y 8/2) - DYB (0R 3/6)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Ausente	65,49 ± 4,68 e	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-236	[72,66 ± 1,45] pqr	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/2)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-237	72,66 ± 0,58 pqr	BYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	VGY (7,5Y 8/2) - DYB (0R 3/6)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Radial	28,57 ± 2,78 c	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-238	[72,33 ± 1,45] opqr	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/2)]	[VY (5Y 8/2) - VRO (0R 5/4)]	[Algodonosa]	[Elevada]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (0Y 8/2)]	
CIDDEF1-239	63,33 ± 1,45 hm	BYG (2,5GY 8/8) - VPG (06GY 8/9) - W (N 9)	BGY (0Y 8/10) - MO (7,5Y 4/6)	Algodonosa	Elevada	Ondular	Radial	29,0 ± 100 a	VGY (0Y 8/2)	
CIDDEF1-240	[72,33 ± 2,08] opqr	[W (N 9) - LYG (5GY 8/4)]	[LYG (2,5GY 8/4) - MYG (2,5GY 7/4)]	[Algodonosa]	[Elevada - Plana]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[Ausente]	

Tabla II. VI. (Continuación)

Aislado	Característica Morfológica de la Colonia/Crecimiento Micelial ^a									
	Díámetro	Color-Olivoso	Color Reverso	Textura	Elevación	Margen	Zonación	Cóndios por cm ²	Pigmentación del Medio ^b	
CIDEFL-256	56,07 ± 1,53 hi	LYG (2,5GY 8/6) - VPG (6GY 8/9) - W (N 9)	LYG (2,5GY 8/6) - VPG (6GY 8/9) - W (N 9)	PYG (2,5GY 9/2) - MYG (2,5GY 5/4)	Elevado	Ondulado	Ausente	8,07 ± 2,51 ab	Ausente	
CIDEFL-277	70,33 ± 2,31 op	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/12) - VRO (6R 5/4)]	[VY (5Y 8/12) - VRO (6R 5/4)]	Elevado	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (6Y 8/12)]	
	60,33 ± 1,53 jk	LYG (2,5GY 8/6) - VPG (6GY 8/9) - W (N 9)	LYG (2,5GY 8/6) - VPG (6GY 8/9) - W (N 9)	PYG (2,5GY 9/2) - MYG (2,5GY 5/4)	Elevado - Plana	Ondulado	Ausente	67,36 ± 5,93 ef	Ausente	
CIDEFL-268	55,00 ± 2,00 h	[W (N 9) - VY (2,5Y 8/12) - LO (6Y 5/4)]	[LYG (2,5GY 8/4) - MO (7,5Y 4/6) - DOY (7,5YR 6/12)]	[LYG (2,5GY 8/4) - MO (7,5Y 4/6) - DOY (7,5YR 6/12)]	[Elevado - Plana]	[Ondulado]	[Ausente]	[0]	[VGY (6Y 8/12)]	
	58,00 ± 1,73 ij	BYG (2,5GY 8/8) - BY (5Y 8/8) - W (N 9)	BYG (2,5GY 8/8) - BY (5Y 8/8) - W (N 9)	VGY (7,5Y 8/12) - DYB (6YR 3/6)	Elevado	Ondulado	Ausente	18,92 ± 2,10 bc	VGY (6Y 8/12)	
CIDEFL-279	71,33 ± 2,89) oppr	[W (N 9) - VY (2,5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[W (N 9) - VY (2,5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[VRO (6R 5/4) - DRO (6R 4/12)]	[Elevado]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[DR (7,5R 3/10) - VGY (6Y 8/12)]	
	98,07 ± 1,54 b	MYG (5GY 7/4) - W (N 9)	MYG (5GY 7/4) - W (N 9)	PYG (2,5GY 9/2) - MYG (2,5GY 5/4)	Elevado	Ondulado	Concentrico	86,97 ± 17,94 g	Ausente	
CIDEFL-230	70,33 ± 2,89) op	[W (N 9)]	[W (N 9)]	[PYG (2,5GY 9/2)]	[Elevado]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[Ausente]	
	77,00 ± 1,73 s	BYG (2,5Y 8/8) - VPG (6GY 8/9) - MOC (2,5GY 4/4) - W (N 9)	BYG (2,5Y 8/8) - VPG (6GY 8/9) - MOC (2,5GY 4/4) - W (N 9)	BCY (6Y 8/10) - MO (7,5Y 4/6) - B (N 2)	Elevado	Ondulado - Entero	Radial	3,97 ± 1,77 a	Ausente	
CIDEFL-253	59,33 ± 2,30) s	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[W (N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/12) - DOY (7,5YR 6/12)]	[Elevado]	[Entero]	[Ausente]	[0]	[VGY (6Y 8/12)]	
	33,33 ± 1,53 c	PYP (7,5YR 9/2) - W (N 9)	PYP (7,5YR 9/2) - W (N 9)	VRO (6R 5/4) - B (N 9)	Elevado	Ondulado	Ausente	0	DR (7,5R 3/10) - VGY (6Y 8/12)	
	34,33 ± 1,45) ed	[W (N 9) - LY (5Y 9/6)]	[W (N 9) - LY (5Y 9/6)]	[VRO (6R 5/4) - DRO (6R 4/12)]	[Elevado]	[Ondulado]	[Ausente]	[0]	[DR (7,5R 3/10) - VGY (6Y 8/12)]	

Valores de tres repeticiones tomados de cultivos de 7 días cultivados en PDA casero / comercial a 25 ° C, en oscuridad continua.

^aMedias.

^bDesviación estándar.

^cLas medias de la misma columna seguidas por una letra en común no difieren significativamente de acuerdo con el test LDS a P ≤ 0,05.

^dColores de acuerdo a la carta de colores de Munsell: B = Black, BGY = Brilliant greenish yellow, BY = Brilliant yellow, BYG = Brilliant yellow green, DOY = Deep orange yellow, DR = Deep red, DRO = Deep reddish orange, DYB = Deep yellowish brown, GO = Grayish olive, GOG = Grayish olive green, LG = Light grey, LO = Light olive, LOB = Light olive brown, LY = Light yellow, LYG = Light yellow green, MO = Moderate olive, MOC = Moderate olive green, MYG = Moderate yellow green, PYP = Pale yellow, PYG = Pale yellowish green, PYP = Pale yellowish pink, SGY = Strong greenish yellow, SYB = Strong yellowish brown, VGY = Vivid greenish yellow, VPG = Very pale green, VRO = Vivid reddish orange, VY = Vivid yellow, W = White.

Capítulo II

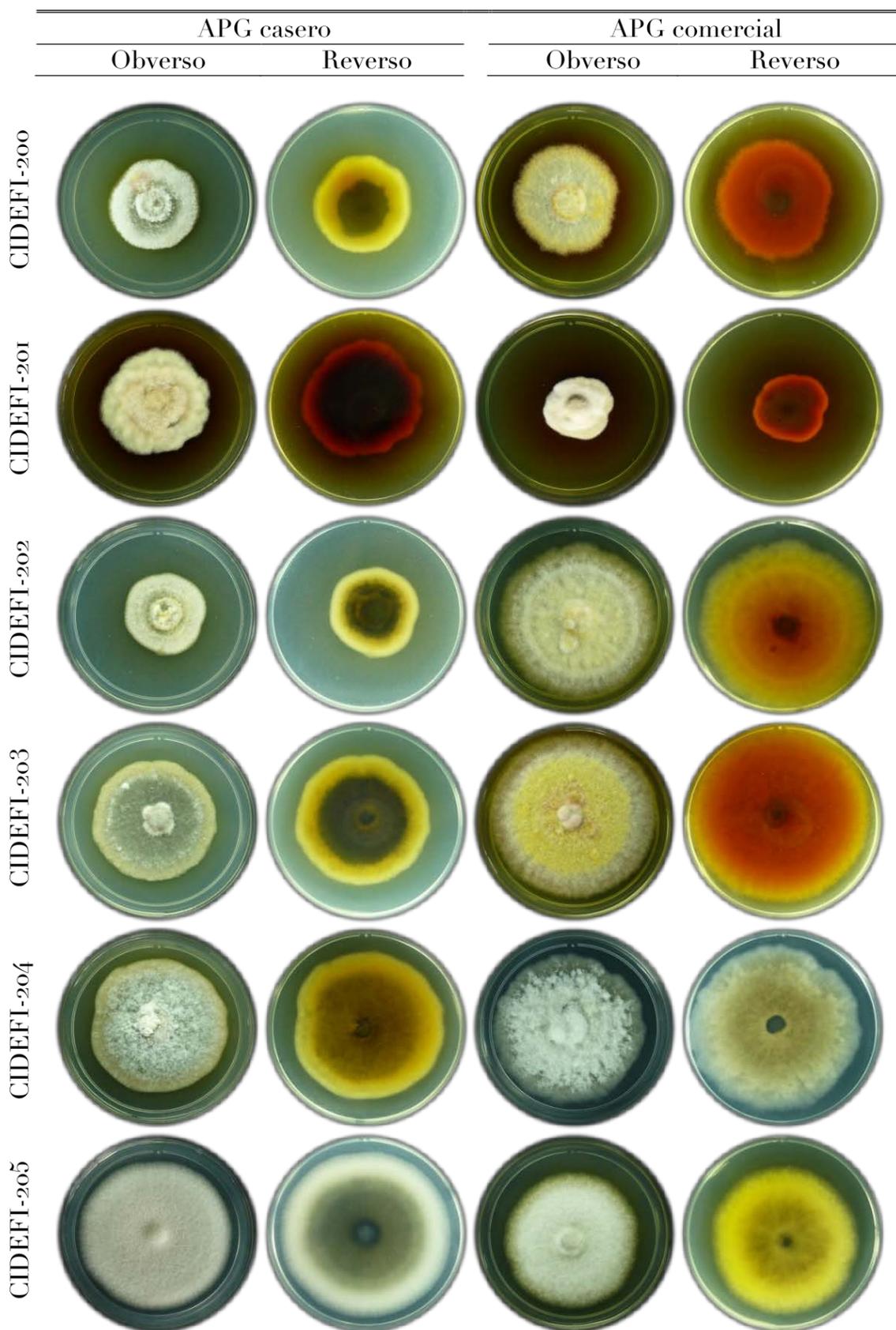


Figura II. 3. Colonias de los aislados de *Stemphylium* cultivados 7 días en APG casero o comercial, a 25 ° C y en oscuridad continua.

Capítulo II

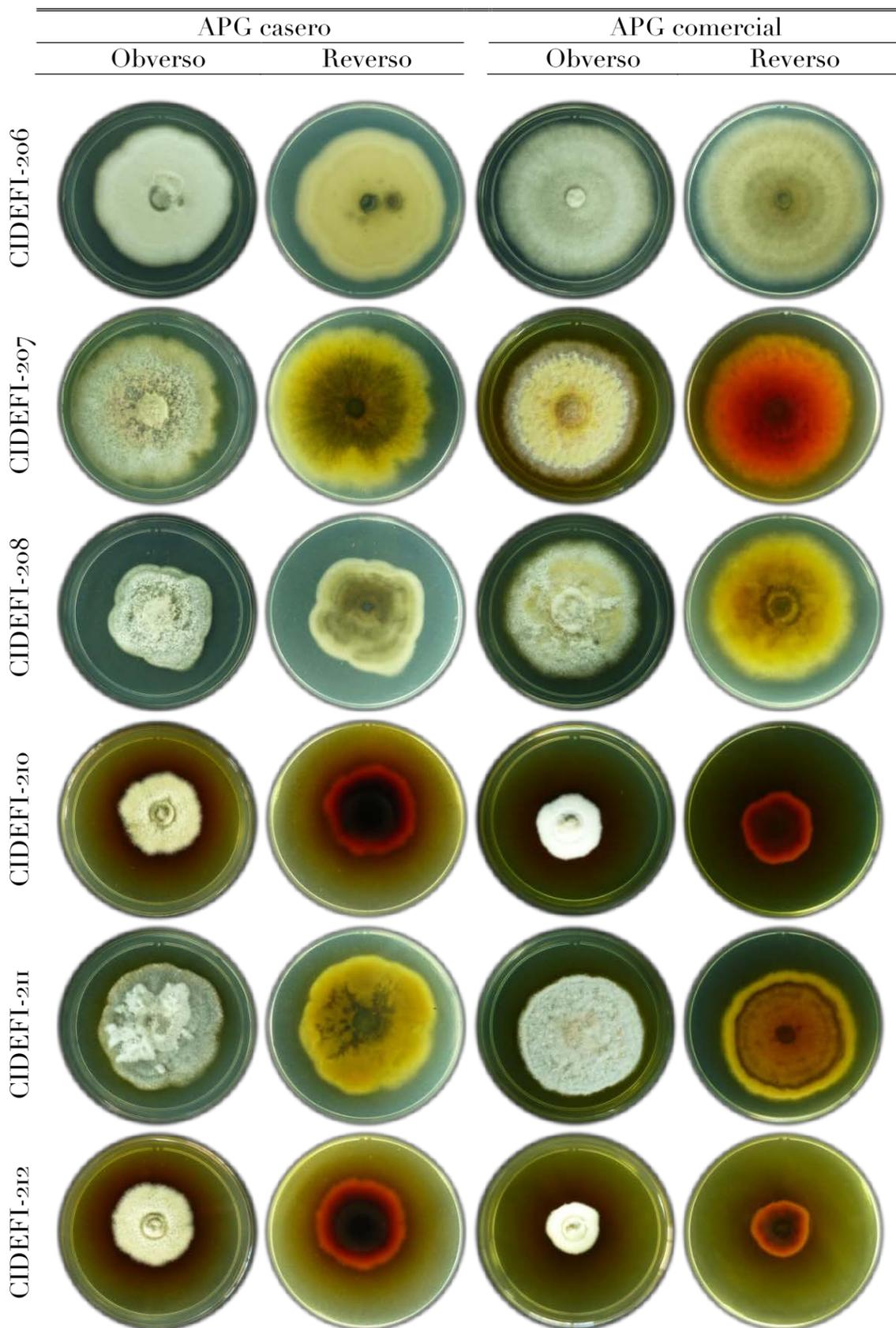


Figura II. 3. (Continuación).

Capítulo II

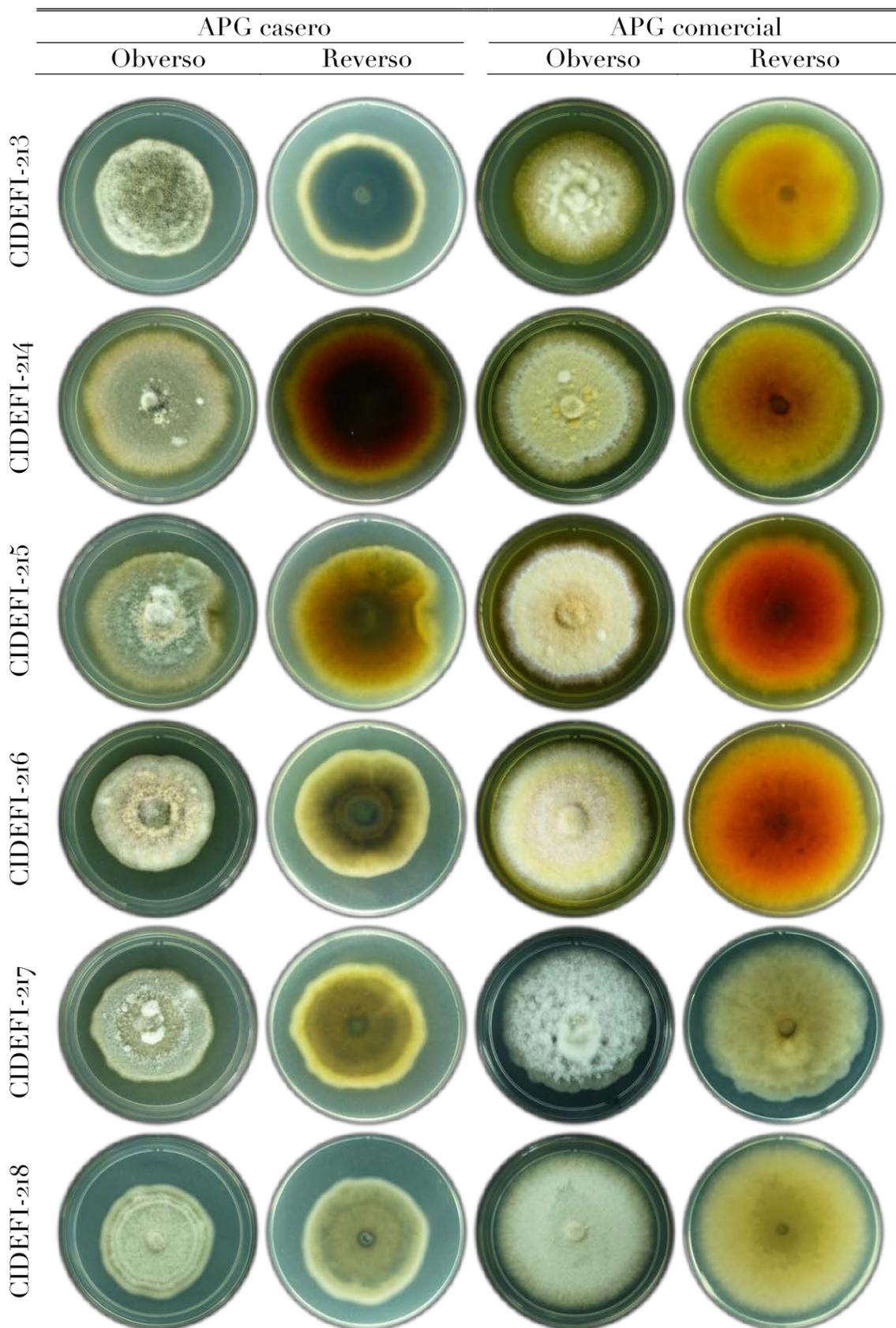


Figura II. 3. (Continuación).

Capítulo II

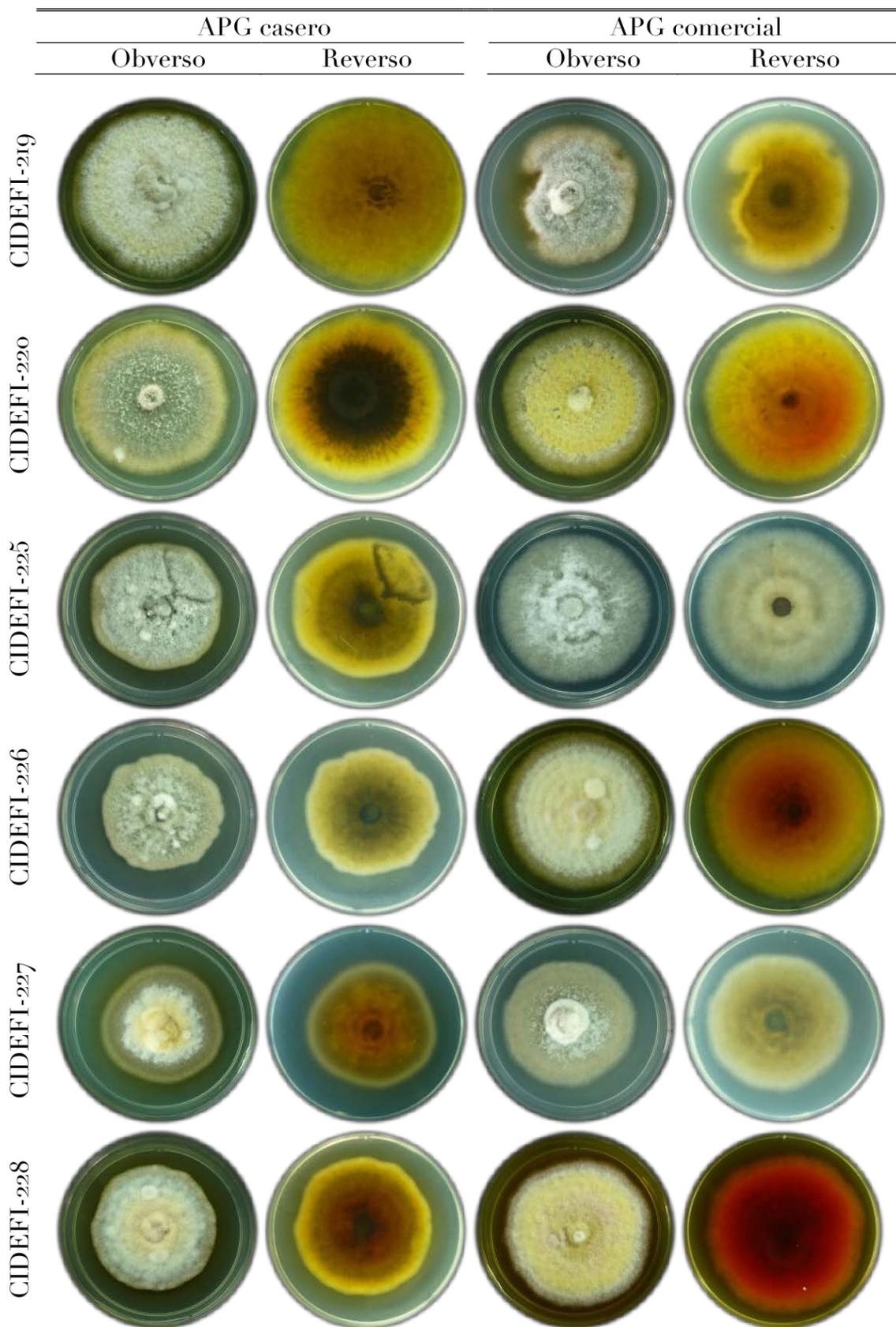


Figura II. 3. (Continuación).

Capítulo II

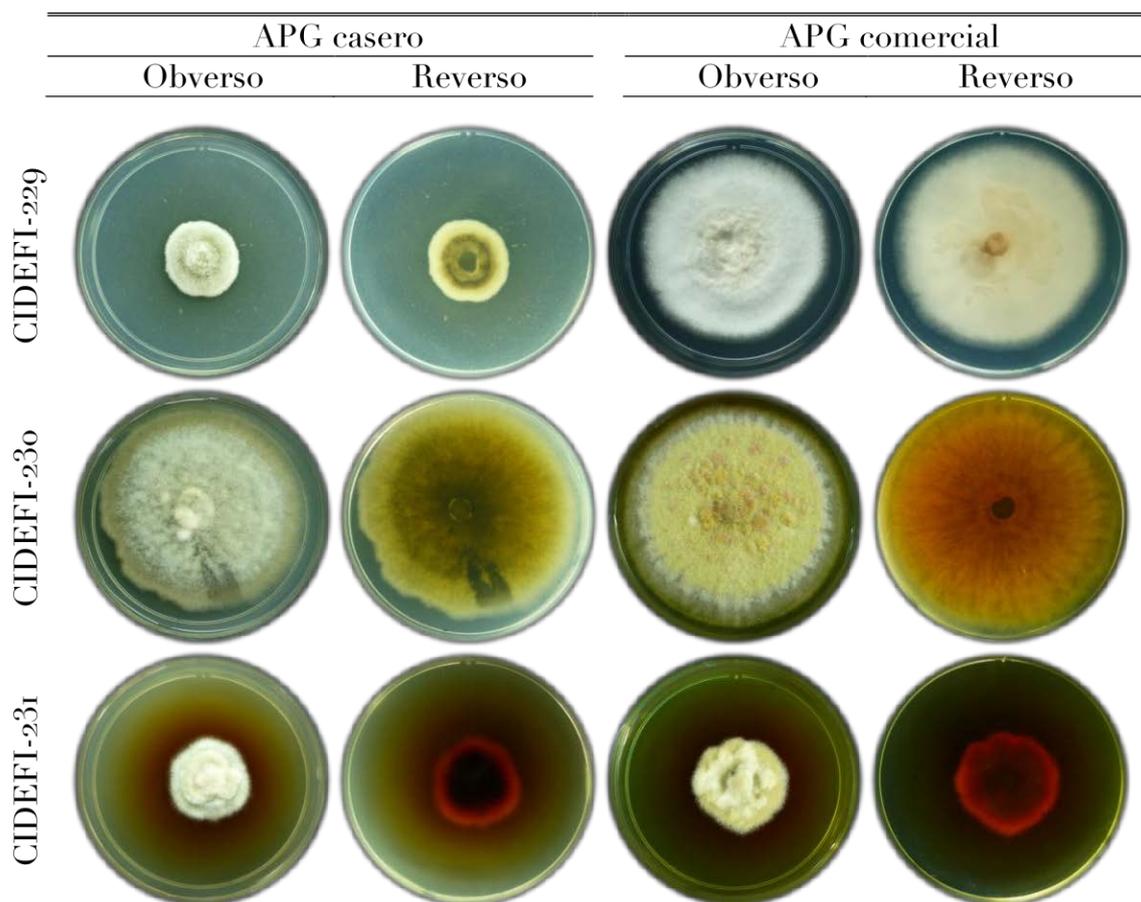


Figura II. 3. (Continuación).

Los conidióforos fueron de color marrón claro, septados y de 3,6 μm de ancho, con células apicales con forma de cáliz de 7,2 μm de ancho. La forma del conidio fue oblonga, redondeada o puntiaguda en el ápice, con una prominente cicatriz de color marrón oscuro en la base redondeada. Estos fueron de color marrón claro y la ornamentación de la pared celular fue verrugosa. También se observaron variaciones marcadas en las dimensiones de los conidios y la relación entre la longitud y el ancho (L/A), que fue de 2,2 (CIDEFI-230) a 3,1 (CIDEFI-206, CIDEFI-219). Las características morfológicas de los conidios de todos los aislados que se esporularon *in vitro* se detallan en la tabla II. 8 y se muestran algunos ejemplos se muestran en la figura II. 4.

Capítulo II

Tabla II. 8. Características morfológicas de aislados de *Stemphylium*.

Aislado	Conidios ^{a, d, e} (µm)			Septos transversos
	Largo (L)	Ancho (A)	L/A promedio	
CIDEFI-200	51,84 ^b ± 3,91 ^c i	17,47 ± 1,37 ij	2,99 ± 0,33 fghi	3(-4)
CIDEFI-201	No esporuló.			
CIDEFI-202	48,14 ± 2,24 fgh	15,79 ± 1,20 bcde	3,06 ± 0,26 ij	(2-)3
CIDEFI-203	48,58 ± 4,66 h	16,90 ± 2,11 h	2,89 ± 0,23 efg	3(-4)
CIDEFI-204	51,22 ± 3,20 i	17,57 ± 1,57 j	2,93 ± 0,24 efgh	3
CIDEFI-205	45,60 ± 2,74 d	15,70 ± 1,30 bcd	2,92 ± 0,22 efg	(2-)3
CIDEFI-206	48,34 ± 4,09 gh	15,46 ± 1,20 ab	3,14 ± 0,34 j	(2-)3
CIDEFI-207	51,36 ± 4,63 i	16,94 ± 1,41 hi	3,05 ± 0,34 hij	3(-4)
CIDEFI-208	46,56 ± 3,32 def	16,03 ± 1,57 cdef	2,92 ± 0,26 efg	3(-4)
CIDEFI-210	No esporuló.			
CIDEFI-211	39,46 ± 2,75 c	15,74 ± 1,30 bcd	2,52 ± 0,26 c	(1-)2(-3)
CIDEFI-212	No esporuló.			
CIDEFI-213	47,23 ± 3,23 efgh	17,95 ± 1,63 jk	2,65 ± 0,32 d	3(-4)
CIDEFI-214	48,10 ± 4,11 fgh	19,25 ± 1,49 l	2,50 ± 0,17 c	3(-4)
CIDEFI-215	39,36 ± 3,03 c	16,32 ± 1,45 efg	2,43 ± 0,31 bc	(1-)2(-3)
CIDEFI-216	37,49 ± 5,98 b	15,46 ± 2,01 ab	2,45 ± 0,40 bc	3
CIDEFI-217	46,75 ± 5,04 defg	16,61 ± 1,52 gh	2,83 ± 0,36 e	3
CIDEFI-218	48,43 ± 5,83 h	16,18 ± 1,52 defg	3,01 ± 0,38 ghi	3
CIDEFI-219	48,67 ± 4,03 h	15,55 ± 1,39 bc	3,15 ± 0,37 j	3
CIDEFI-220	51,22 ± 4,67 i	18,14 ± 1,20 k	2,83 ± 0,28 e	3(-4)
CIDEFI-225	53,47 ± 5,06 j	18,43 ± 1,13 k	2,90 ± 0,25 efg	3(4)
CIDEFI-226	39,02 ± 3,46 bc	16,56 ± 1,00 fgh	2,36 ± 0,25 b	2(-3)
CIDEFI-227	45,98 ± 4,88 de	16,18 ± 1,06 defg	2,87 ± 0,47 ef	(2-)3
CIDEFI-228	39,79 ± 2,06 c	16,03 ± 1,23 cdef	2,50 ± 0,22 c	2(-3)
CIDEFI-229	46,75 ± 4,37 defg	17,47 ± 1,37 ij	2,68 ± 0,26 d	2(-3)
CIDEFI-230	33,02 ± 2,55 a	14,98 ± 1,33 a	2,21 ± 0,15 a	(1-)2
CIDEFI-231	No esporuló.			

^a Valores de 50 repeticiones tomados de cultivos de 7 días cultivados en PDA casero / comercial a 25 ° C y en oscuridad continua.

^b Media

^c Desviación estándar

^d Las medias de la misma columna seguidas por una letra en común no difieren significativamente de acuerdo con el test LDS a P ≤ 0.05.

^e La forma conidial era oblonga, redondeada o puntiaguda en el ápice y con una prominente cicatriz de color marrón oscuro en la base redondeada; el color era marrón claro; y la ornamentación de la pared celular era verrugosa.



Figura II. 4. Conidios de aislados de *Stemphylium* cultivados 7 días en APG casero, a 25 ° C y en oscuridad continua. Barra de escala = 30 µm.

II. III. II. Identificación Molecular

La secuencia del ITS de todos los aislados de *Stemphylium* tenía 579 pares de bases (pb) de longitud, mientras que la secuencia parcial de *gpd* de los mismos fue de 322 pb de longitud. Con respecto a este último, los aislados presentaron secuencias *gpd* que diferían solo en la base número 70, que tenían una G o una A. Esta base se localiza en el tercer intrón de la secuencia del gen *gpd* de longitud completa (Locus tag: TW65_o4473; Número de acceso a proteína KNG48731). Esta diferencia se usó para dividir aislados dentro de dos grupos: Grupo-G y Grupo-A. Todas las secuencias ITS y *gpd* se depositaron en el DDBJ/EMBL/GenBank con los números de acceso presentados en la tabla II. 9.

Capítulo II

Tabla II. 9. Números de acceso al GenBank de las secuencias ITS y *gpd* de aislados de *Stemphylium*.

Aislado	ITS ^a	<i>gpd</i> ^a
CIDEFI-200 ^A	KF709429	KJ624421
CIDEFI-201 ^G	KJ624431	KJ624422
CIDEFI-202 ^A	KP026204	KP026203
CIDEFI-203 ^G	KP026205	KP026202
CIDEFI-204 ^A	KP026206	KP026201
CIDEFI-205 ^A	KP026207	KP026200
CIDEFI-206 ^A	KJ624432	KJ624423
CIDEFI-207 ^A	KJ624433	KJ624424
CIDEFI-208 ^A	KJ624434	KJ624425
CIDEFI-210 ^A	KJ624435	KJ624426
CIDEFI-211 ^A	KJ624436	KJ624428
CIDEFI-212 ^A	KJ624437	KP026199
CIDEFI-213 ^A	KJ624438	KJ624427
CIDEFI-214 ^G	KP026208	KP026198
CIDEFI-215 ^A	KP026209	KP026197
CIDEFI- 216 ^G	KJ624439	KJ624429
CIDEFI- 217 ^A	KP026210	KP026196
CIDEFI-218 ^G	KP026211	KP026195
CIDEFI-219 ^A	KJ624440	KJ624430
CIDEFI-220 ^A	KP026212	KP026194
CIDEFI-225 ^A	KJ624449	KP026189
CIDEFI-226 ^A	KJ624450	KP026188
CIDEFI-227 ^G	KJ624446	KP026183
CIDEFI-228 ^A	KJ624447	KP026186
CIDEFI-229 ^G	KJ624448	KP026187
CIDEFI-230 ^A	KJ624441	KP026185
CIDEFI-231 ^A	KJ624442	KP026184

^a Número de acceso del GenBank.

^G Grupo G: G en el residuo número 70.

^A Grupo A: A en el residuo número 70.

Para hacer el análisis filogenético más simple pero aún igual de informativo, se utilizó un solo aislado representativo de cada uno de los dos grupos separados en base la secuencia *gpd*. CIDEFI-216 fue seleccionado como representante del Grupo-G y CIDEFI-217 fue elegido del Grupo-A. La alineación de las secuencias de las secuencias ITS y *gpd* de los aislados y taxones relacionados resultó en matrices de datos de 521 pb y 294 pb de longitud, respectivamente. El PHT del alineamiento de las secuencias concatenadas

Capítulo II

ITS y *gpd* dio un valor de p de 0,577000, por lo que esta matriz pudo ser usada. La matriz de datos ITS-*gpd* contuvo un total de 815 caracteres, de los cuales 504 fueron constantes, 70 no fueron informativos para parsimonia y 241 fueron informativos para parsimonia.

El árbol más parsimonioso obtenido del análisis ITS-*gpd* tuvo una longitud de árbol de 648 pasos, un índice de consistencia de 0,7577, un índice de retención de 0,7773 y un índice de consistencia reescalado de 0,5890 (Figura II. 5). Con respecto al enfoque ML, jModelTest seleccionó HKY + I + G como el mejor modelo de sustitución de nucleótidos (-ln L = 4055,5102; frecuencia base: A = 0,2333, C = 0,2812, G = 0,2177, T = 0,2678; tasas de transición/transversión = 1,4080; forma gamma = 2,5790). Cuando el modelo de sustitución molecular seleccionado se incorporó al análisis filogenético bajo los criterios de ML en PhyML, se recuperó un solo árbol ITS-*gpd* (-ln L = -4113,82741) (Figura II. 6.). Ambos enfoques, ML y MP, dieron como resultado un clado de *Stemphylium* monofilético bien soportado. Los aislados CIDEFI-216 y CIDEFI-217 aislados se ubicaron en el mismo clado junto con *S. lycopersici* y *S. xanthosomatis* con valores de *bootstrap* de 97 % y 91 % para el enfoque MP y ML, respectivamente. Dentro de estos clados, los aislados CIDEFI-216 estuvieron estrechamente relacionados con *S. xanthosomatis* y CIDEFI-217 con *S. lycopersici*.

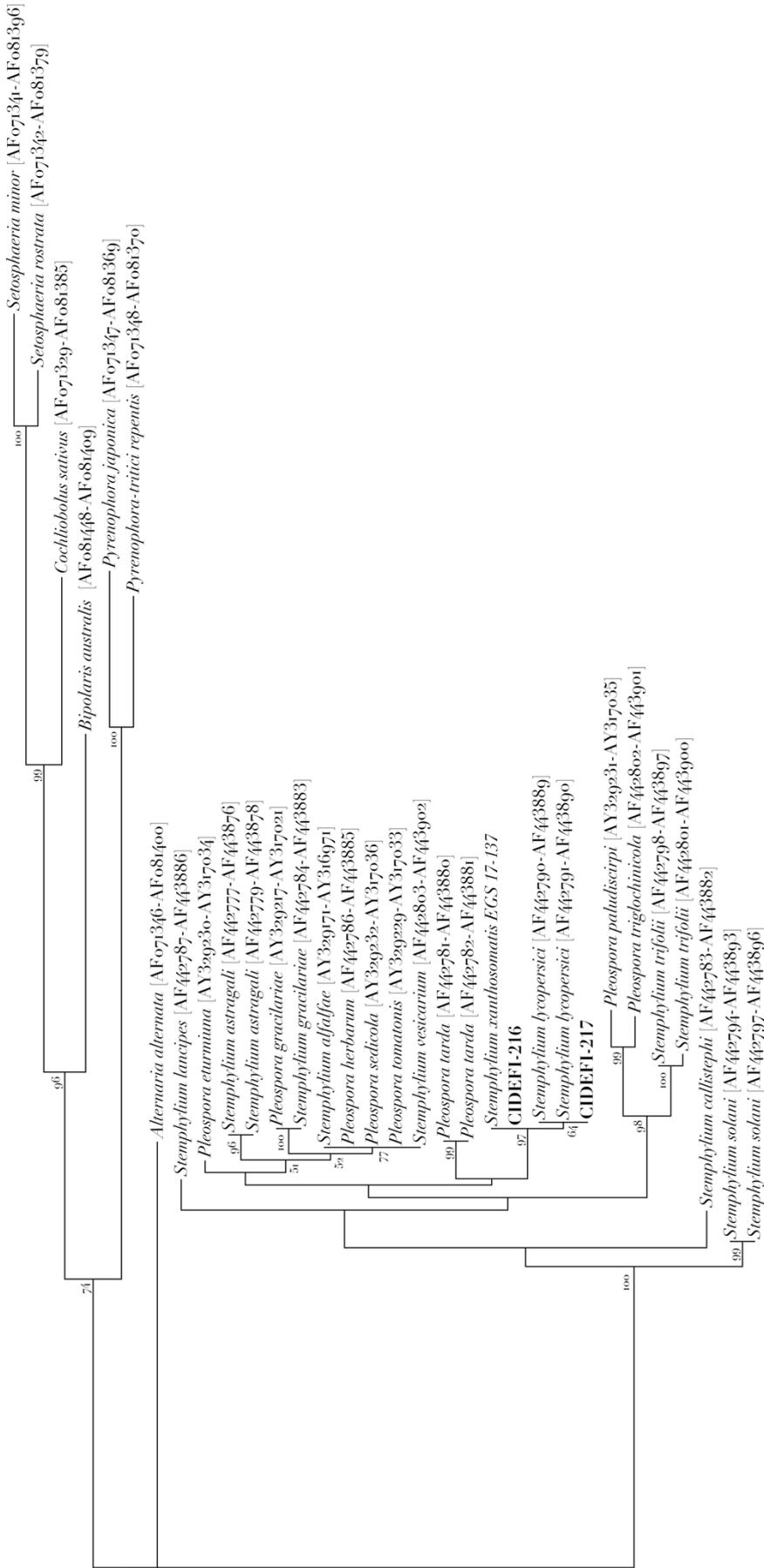


Figura II. 5. Árbol de máxima parsimonia de *Stemphylium* inferido a partir del conjunto de datos ITS-*gpd*. Se seleccionaron las secuencias de siete representantes de cinco géneros del orden Pleosporales (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Cochliobolus*, *Pleospora* y *Stemphaeria*) como grupos externos. Las secuencias generadas en este estudio están en letra negra. Los números en los nodos representan valores de soporte *bootstrap* como un porcentaje de 1000 repeticiones. La barra de escala representa el número promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio.

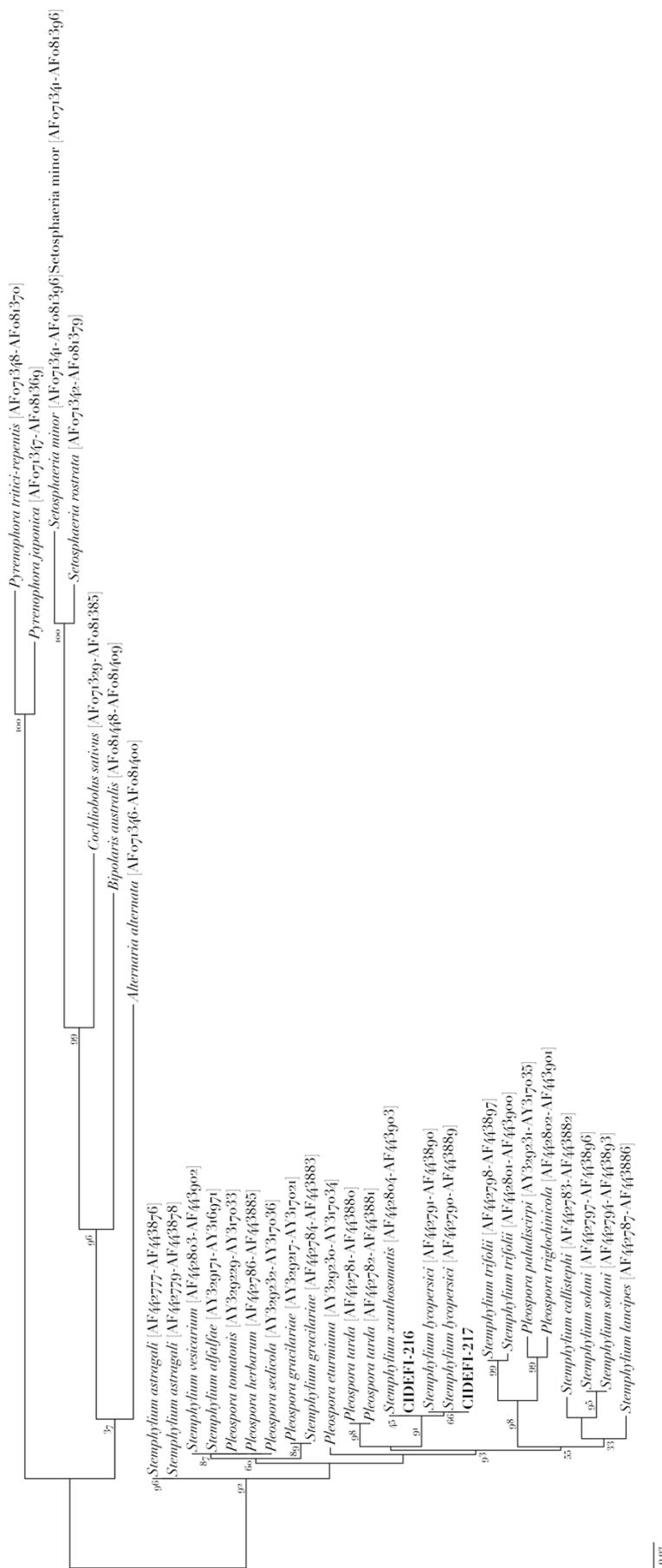


Figura II. 6. Árbol de máxima verosimilitud de *Stephylium* inferido a partir del conjunto de datos ITS-*gpd*. Se seleccionaron las secuencias de siete representantes de cinco géneros del orden Pleosporales (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Cochliobolus*, *Pyrenophora* y *Setosphaeria*) como grupos externos. Las secuencias generadas en este estudio están en letra negra. Los números en los nodos representan valores de soporte *bootstrap* como un porcentaje de 1000 repeticiones. La barra de escala representa el número promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio.

II. III. III. Análisis de Diversidad Genética

Los 6 cebadores ISSR seleccionados amplificaron 52 bandas claras y reproducibles que variaron entre los 250 pb y los 2500 pb; estos fueron usados para evaluar la diversidad genética. Entre ellos, 27 amplicones fueron polimórficos (52 %). En el dendrograma construido usando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice basado en los datos ISSR, todos los aislados de *Stemphylium* se agruparon en dos grupos con un coeficiente de similitud de 0,83 (Figura II. 7.). En este nivel de similitud, se pudo observar que los aislados CIDEFI-230 y CIDEFI-231, que tenían el mismo origen (Tabla II. 2), se agruparon por separado del resto con un alto nivel de similitud. A un nivel de similitud mayor de 0,88, los aislados restantes se subdividieron en dos grupos. Es importante señalar que no hubo una relación clara entre estos grupos y las características morfológicas o el origen geográfico de los aislados, exceptuando el caso anteriormente dicho de los aislados CIDEFI-230 y CIDEFI-231. De hecho, el AMOVA indicó que el 95,94 % de la variación fue el resultado de diferencias dentro de las poblaciones geográficamente definidas, mientras que solo el 4,96% de la variación se atribuyó a las diferencias entre ellas.

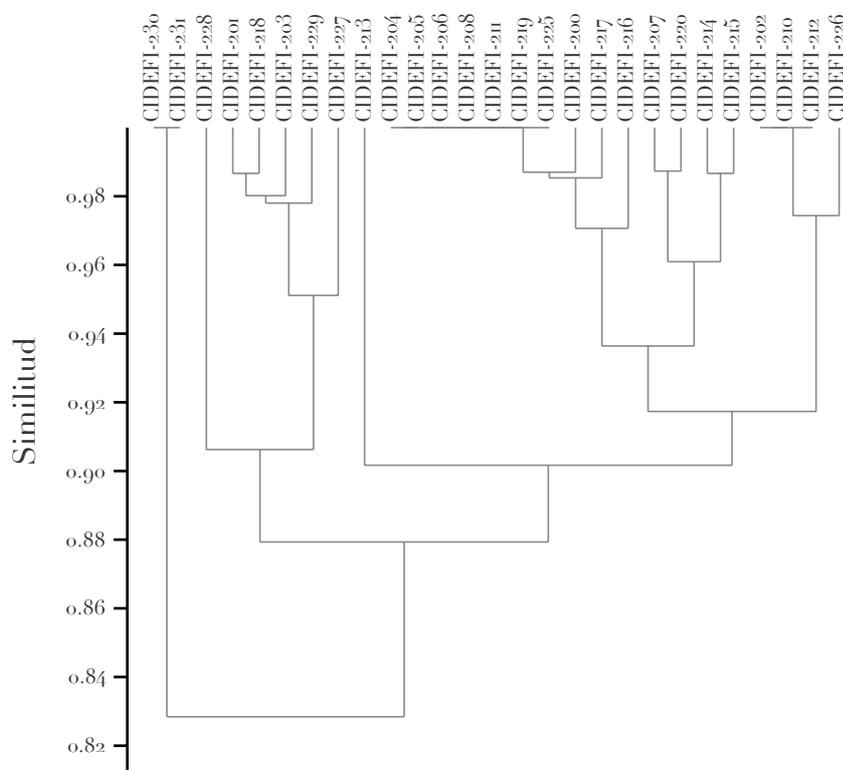


Figura II. 7. Dendrograma generado a partir del análisis UPGMA (Coeficiente de similitud de Dice) utilizando los patrones de banda ISSR de los aislados de *S. lycopersici*.

II. III. IV. Agresividad

Ya sea que se hayan inoculado como suspensiones de esporas o micelios, todos los aislados provocaron síntomas típicos de la mancha gris de la hoja en el tomate cv. Elpida. Los aislados no esporulantes CIDEFI-201, CIDEFI-210, CIDEFI-212 y CIDEFI-231 se inocularon como una suspensión de micelio de 7.10^3 UFC.ml⁻¹, respectivamente. Los ensayos de agresividad confirmaron que todos los aislados enfermaron las hojas de tomate desprendidas. Los primeros síntomas fueron observados a los 2 dpi y, luego, las lesiones se expandieron a través del foliolo. Los folíolos usados como control, tratadas con solución esterilizada de Tween 20 al 0,01 %, se mantuvieron sanas. Todos los aislados fueron reaislados de los folíolos enfermos, cumpliendo así con los postulados de Koch.

Los aislados difirieron en la agresividad, lo que se demostró por el nivel de severidad de los folíolos inoculadas. Basado en esto, los aislados altamente virulentos fueron los aislados CIDEFI-207, CIDEFI-215, CIDEFI-211, CIDEFI-228, CIDEFI-202, CIDEFI-216, CIDEFI-229, CIDEFI-220, CIDEFI- 214, CIDEFI-230 y CIDEFI-226; las áreas de folíolos afectados por estos aislados variaron entre $6,60 \pm 1,05$ cm² y $3,75 \pm 1,11$ cm². Los aislados CIDEFI-208, CIDEFI-225 y CIDEFI-227 presentaron una agresividad media, afectando un área del foliolo de entre $2,31 \pm 1,00$ cm² y $1,77 \pm 0,94$ cm². Finalmente, los aislados menos agresivos fueron los aislados CIDEFI-231, CIDEFI-203, CIDEFI-204, CIDEFI-219, CIDEFI-205, CIDEFI-218, CIDEFI-201, CIDEFI-200, CIDEFI-213, CIDEFI-210, CIDEFI-217, CIDEFI-212 y CIDEFI-206, que afectaron un área menor a $1,07 \pm 0,35$ cm² (Tabla II. 10 y Figuras II. 8 y II. 9).

Capítulo II

Tabla II. 10. Agresividad de los aislados de *S. lycopersici* en tomate cv. Elpida evaluada mediante el ensayo en hoja desprendida.

Tratamiento	Área foliar afectada (cm ²) ^a
Control	0,11 ^b ± 0,02 ^c
CIDEFI-200	0,56 ± 0,27 j
CIDEFI-201	0,64 ± 0,16 j
CIDEFI-202	5,54 ± 1,30 bcd
CIDEFI-203	1,03 ± 0,51 ij
CIDEFI-204	0,96 ± 0,30 j
CIDEFI-205	0,79 ± 0,24 j
CIDEFI-206	0,42 ± 0,13 j
CIDEFI-207	6,60 ± 1,05 a
CIDEFI-208	2,31 ± 1,00 h
CIDEFI-210	0,52 ± 0,17 j
CIDEFI-211	6,07 ± 1,03 ab
CIDEFI-212	0,50 ± 0,08 j
CIDEFI-213	0,55 ± 0,23 j
CIDEFI-214	4,44 ± 1,20 efg
CIDEFI-215	6,58 ± 1,38 a
CIDEFI-216	5,33 ± 1,30 bcd
CIDEFI-217	0,50 ± 0,09 j
CIDEFI-218	0,65 ± 0,21 j
CIDEFI-219	0,89 ± 0,35 j
CIDEFI-220	4,84 ± 0,97 def
CIDEFI-225	2,26 ± 1,06 h
CIDEFI-226	3,75 ± 1,11 g
CIDEFI-227	1,77 ± 0,94 hi
CIDEFI-228	5,71 ± 1,20 bc
CIDEFI-229	5,18 ± 1,56 cde
CIDEFI-230	4,30 ± 0,88 fg
CIDEFI-231	1,07 ± 0,35 ij

^a Valores de 9 replicas 7 dpi

^b Media

^c Desviación estándar

^d Los valores de la misma columna seguidos de una letra en común no son significativamente diferentes según la prueba de LSD a $P \leq 0.05$.

Capítulo II

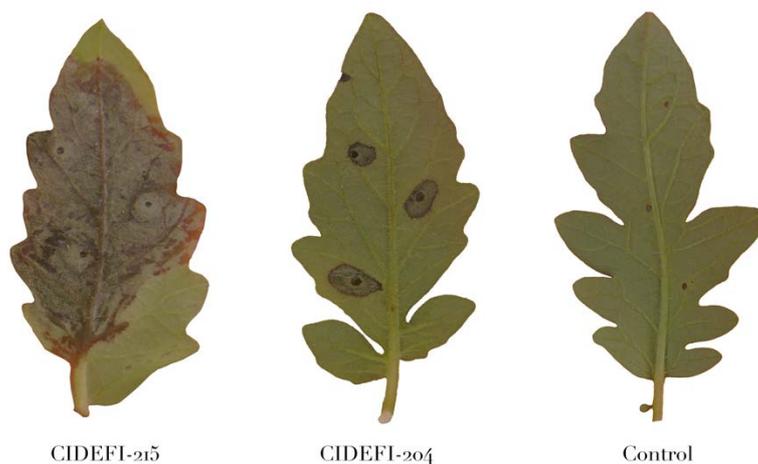


Figura II. 8. Síntomas observados en folíolos desprendidos de tomate cv. Elpida 7 dpi con suspensiones conidiales/miceliales de aislados de *S. lycopersici*. Los folíolos usados como control fueron tratados con una solución estéril de Tween-20 al 0,01 % v/v.

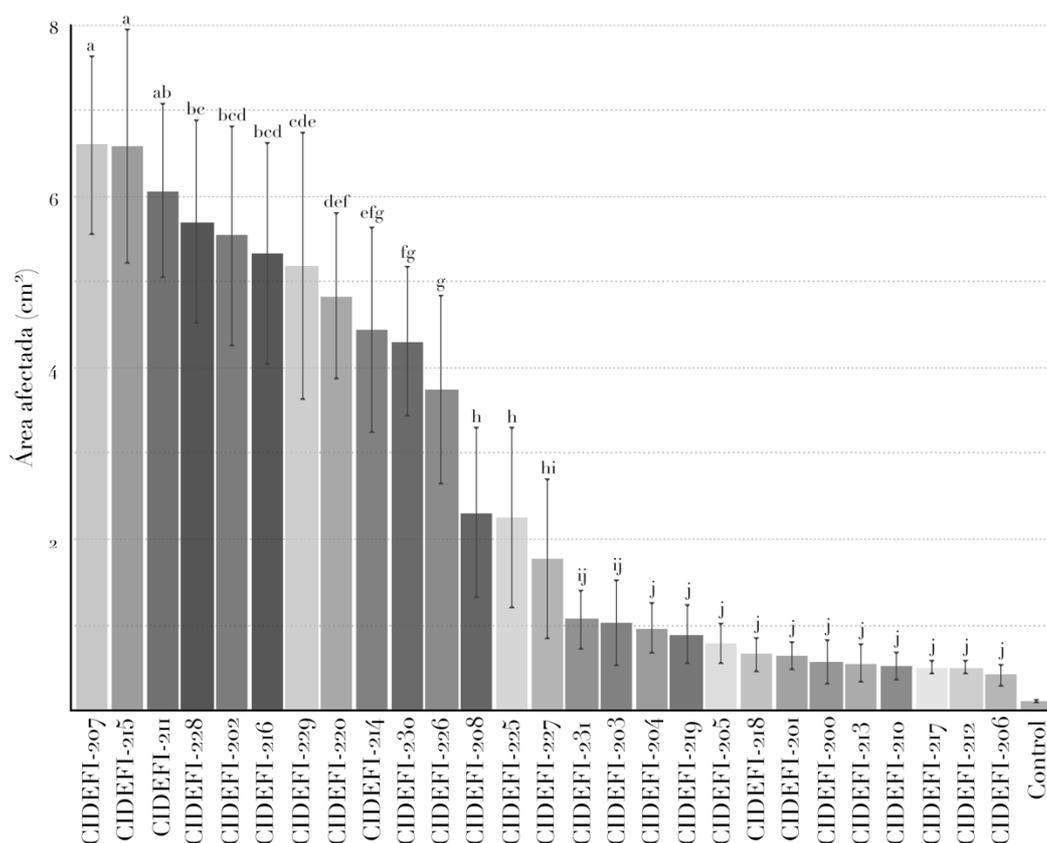


Figura II. 9. Agresividad *in vitro* de aislados de *S. lycopersici* en tomate cv. Elpida evaluada por el ensayo de hojas desprendidas. El área necrótica fue determinada 7 dpi con suspensiones conidiales/miceliales. Los folíolos usados como control fueron tratados con una solución estéril de Tween-20 al 0,01 % v/v. Los valores son corresponden promedios de nueve repeticiones biológicas independientes y las barras de error representan la desviación estándar. Los valores seguidos de una letra en común no son significativamente diferentes según la prueba de LSD a $P \leq 0,05$. El área afectada se determinó utilizando el software de análisis de imágenes para la cuantificación de enfermedad de plantas Assess 2.0¹³¹.

II. III. V. Material Fúngico Adicional

Durante el desarrollo del trabajo de tesis doctoral se incorporaron 39 aislados fúngicos adicionales al cepario del CIDEFI. Los mismos fueron aislados a partir de plantas de tomate o pimiento con síntomas típicos de la mancha gris de la hoja provenientes de Corrientes, La Plata, Salta y Mendoza. Los aislados fueron identificados como *S. lycopersici*, con una excepción; el aislado CIDEFI-235 (Tabla II. 10 y Figura II. 10).

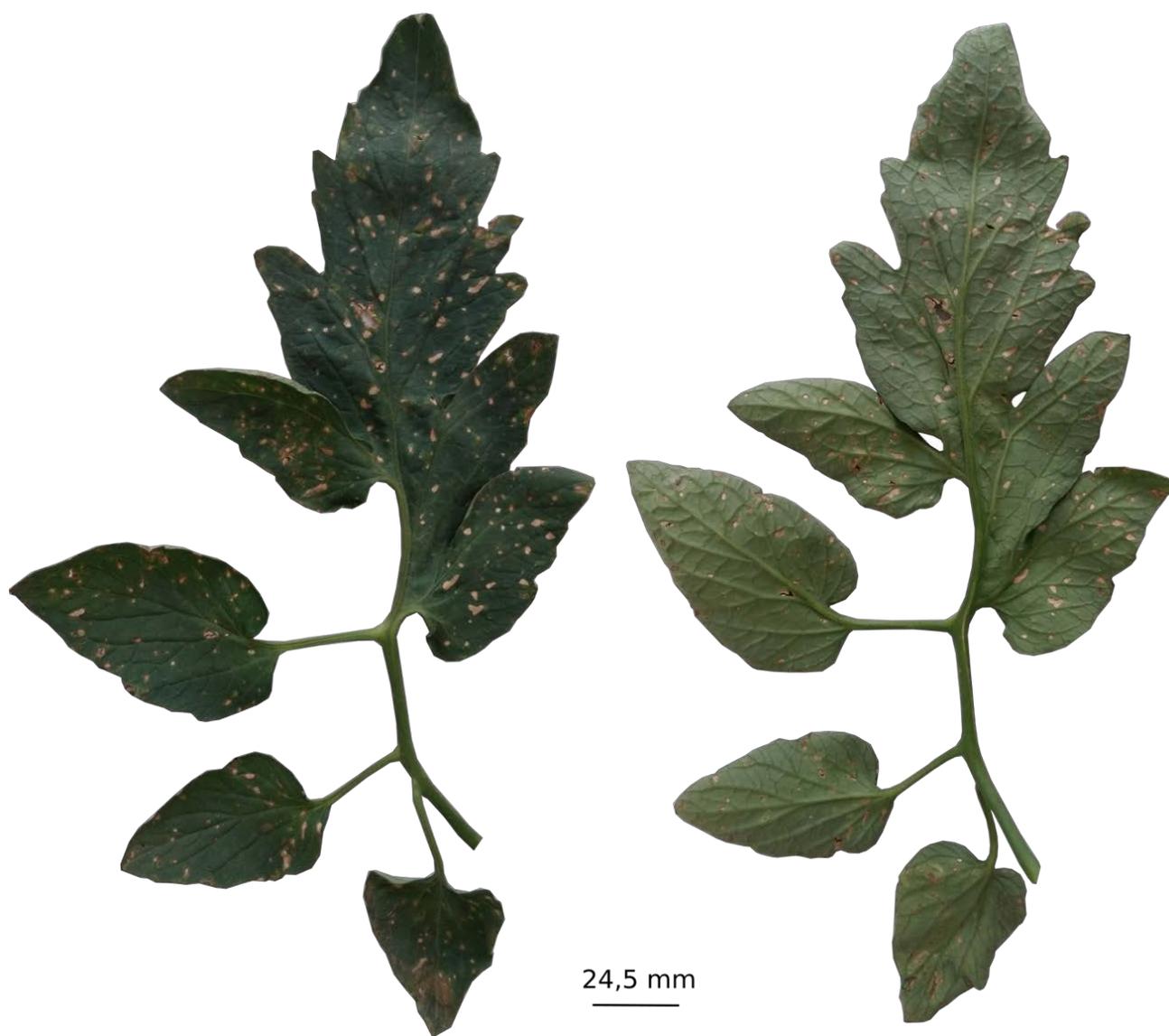


Figura II. 10. Síntoma típico de la mancha gris de la hoja del tomate. La planta en cuestión fue recolectada de La Plata en el año 2016.

Capítulo II

Tabla II. 10. Aislados adicionales.

Aislado	Origen Geográfico	Cultivar	Año	ITS ^a	<i>gpd</i> ^a
CIDEFI-233	Orán (SA)	Elpida	2015	MKo88127	MKo91425
CIDEFI-234	Orán (SA)	Elpida	2015	KX786346	KX786345
CIDEFI-235	Orán (SA)	Elpida	2015	KX786348	-
CIDEFI-236	Quinta Goita (CR)	Hibrido tolerante	2015	MKo88129	MKo91427
CIDEFI-237	Quinta Goita (CR)	Hibrido tolerante	2015	MKo88130	MKo91428
CIDEFI-238	Quinta Goita (CR)	Hibrido tolerante	2015	MKo88131	MKo91429
CIDEFI-239	Quinta Goita (CR)	Hibrido tolerante	2015	MKo88132	MKo91430
CIDEFI-240	Quinta Goita (CR)	Híbrido susceptible	2015	MKo88133	MKo91431
CIDEFI-241	Quinta Goita (CR)	Híbrido susceptible	2015	MKo88134	MKo91432
CIDEFI-242	Quinta Goita (CR)	Híbrido susceptible	2015	MKo88135	MKo91433
CIDEFI-243	Quinta Goita (CR)	Hibrido R8	2015	MKo88136	MKo91434
CIDEFI-244	Quinta Goita (CR)	Hibrido R8	2015	MKo88137	MKo91435
CIDEFI-245	Quinta Goita (CR)	Hibrido R8	2015	MKo88138	MKo91436
CIDEFI-246	Quinta Goita (CR)	Hibrido R8	2015	MKo88139	MKo91437
CIDEFI-247	Quinta Goita (CR)	Hibrido R29	2015	MKo88140	MKo91438
CIDEFI-248	Quinta Goita (CR)	Hibrido R29	2015	MKo88141	MKo91439
CIDEFI-249	Quinta Goita (CR)	Hibrido R9	2015	MKo88142	MKo91440
CIDEFI-250	Quinta Goita (CR)	Hibrido R9	2015	MKo88143	MKo91441
CIDEFI-251	Quinta Goita (CR)	Hibrido R9	2015	MKo88144	MKo91442
CIDEFI-252	Quinta Goita (CR)	Elpida	2015	MKo88145	MKo91443
CIDEFI-253	Quinta Goita (CR)	Elpida	2015	MKo88146	MKo91444
CIDEFI-254	Quinta El Negro (CR)	Elpida	2015	MKo88147	MKo91445
CIDEFI-255	Quinta El Negro (CR)	Elpida	2015	MKo88148	MKo91446
CIDEFI-256	Quinta El Negro (CR)	Elpida	2015	MKo88149	MKo91447
CIDEFI-257	Quinta El Negro (CR)	Elpida	2015	MKo88150	MKo91448
CIDEFI-258	El Algarrobal (MZ)	-	2016	MKo88151	MKo91449
CIDEFI-259	El Algarrobal (MZ)	-	2016	MKo88152	MKo91450
CIDEFI-260	El Algarrobal (MZ)	-	2016	MKo88153	MKo91451
CIDEFI-261	El Algarrobal (MZ)	Yigido	2016	MKo88154	MKo91452
CIDEFI-262	El Algarrobal (MZ)	Yigido	2016	MKo88155	MKo91453
CIDEFI-263	El Algarrobal (MZ)	Yigido	2016	MKo88156	MKo91454
CIDEFI-271	El Algarrobal (MZ)	Dumas	2016	MKo88157	MKo91455
CIDEFI-272	Santa Lucía (CR)	Margarita (Pimiento)	2016	MKo88158	MKo91456
CIDEFI-273	Santa Lucía (CR)	Margarita (Pimiento)	2016	MKo88159	MKo91457
CIDEFI-274	Santa Lucía (CR)	Margarita (Pimiento)	2016	MKo88160	MKo91458

^a Número de acceso del GenBank.

II. III. VII. Aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235

Tanto el aislado CIDEFI-234 como el aislado CIDEFI-235 se obtuvieron de la misma sección de foliolo enfermo. Las características morfológicas del aislado CIDEFI-234 concordó con la del resto de los aislados de *Stemphylium* de la presente tesis (Tablas II. 11 y II. 12 y Figuras II. 11 y II.12). Asimismo, dicho aislado fue identificado como *S. lycopersici*, siguiendo la metodología anteriormente descrita. Sin embargo, en lo que respecta al aislado CIDEFI-235, este desarrolló colonias algodonosas y elevadas, con márgenes enteros y zonificación concéntrica, alternando colores blanco grisáceo y marrón claro. Los conidióforos fueron de color oliva pálido, de 3,6 µm de ancho, sin ramificar o ramificado, de recto a ligeramente curvado, con 1 a 8 septos, de paredes lisas y con células conidiógenas de 3,6-4,80 µm de ancho que eran terminales y de proliferación percurrente. Los conidios fueron alargados, oblicuos a cilíndricos con hasta 4 pseudotabiques y una pared celular gruesa. Estos fueron de color oliva pálido y tenían $128,02 \pm 27,83$ µm de largo y $7,06 \pm 0,58$ µm de ancho (Tablas II. 11 y II. 12 y Figuras II. 11 y II.12). Estas características difirieron notablemente del resto de los aislados y coincidieron con las del género *Corynespora*¹³². En cuanto a la identificación molecular del aislado CIDEFI-235, el software jModelTest seleccionó al modelo GTR+G como el mejor modelo de sustitución de nucleótidos (-ln L = 1773,29796; frecuencia base: A = 0,1216, C = 0,1216, G = 0,1216, T = 0,1216; tasas de transición/transversión = 0,0000; forma gamma = 0,2680). Cuando este modelo de sustitución molecular se incorporó al análisis filogenético bajo los criterios de ML en PhyML, se recuperó el árbol ITS (-ln L = -1419,30121) de la Figura II.13. Así, se identificó molecularmente al aislado CIDEFI-235 como *Corynespora cassicola*.

Tabla II. 11. Características morfológicas de los conidios de los aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235.

Aislado	Característica de la colonia						Pigmentación del medio ^d	
	Diámetro (mm) ^a	Color Obverso ^d	Color Reverso ^d	Textura	Elevación	Margen		Zonación
CIDEFI-234	69,31 b ± 3,66 ^c	W (N 9) - SO (5 YR 7/12) - GR (10R 5/2)	VRO (10R 5/16) - B (N 9)	Algodonosa	Elevada	Ondulado	Ausente	VO (2,5oYR 6/16)
CIDEFI-235	64,97 ± 2,25	LGB (7,5YR 6/2) - W (N 9)	DGRB (2,5YR 2/2) - LYP (2,5YR 8/4)	Algodonosa	Elevada	Entero	Concéntrica	Ausente

^a Valores de 13 repeticiones tomados de conidios de cultivos de 7 días en APG casero a 25 ° C y en oscuridad continua.

^b Media

^c Desviación estándar

^d De acuerdo con el Munsell Colour Order System del Virtual Colour Atlas v. 2.0.0720 (Virtual Colour Systems LTD 2013): B Black, DGRB Dark greyish reddish brown, GR Greyish red, LG Light grey, LGB Light greyish brown, LYP Light yellowish pink, SO Strong orange, VO Vivid orange, VRO Vivid reddish orange, W White.

Capítulo II

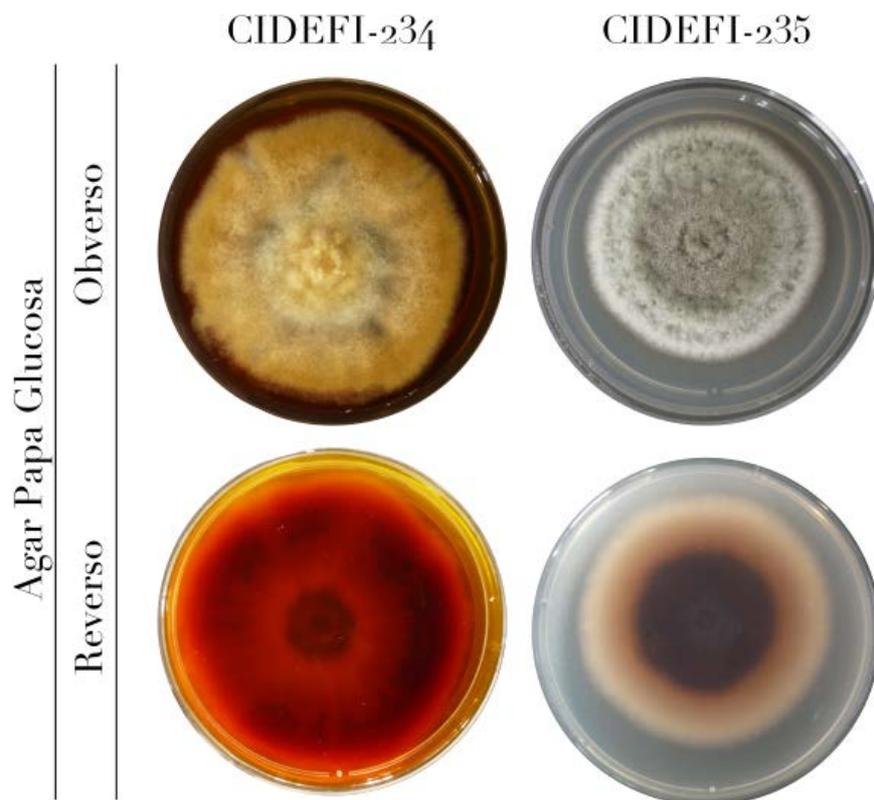


Figura II. 11. Colonias de los aislados CIDEFI-234 y CIDEFI-235 cultivados 7 días en APG comercial, a 25 ° C y en oscuridad continua.

Tabla II. 12. Características morfológicas de los conidios de CIDEFI-234 y CIDEFI-235.

Aislado	Conidios ^{a, b} (µm)			
	Largo (L)	Ancho (A)	L/A promedio	Septos transversos
CIDEFI-234	55,30 ^c ± 3,25 ^d	18,67 ± 1,00	2,97 ± 0,19	(2-)3
CIDEFI-235	128,02 ± 27,83	7,06 ± 0,58	18,26 ± 4,56	1(-2)

^a Valores de 50 repeticiones tomados de cultivos de 7 días cultivados en APG casero a 25 ° C y en oscuridad continua.

^b La forma conidial era oblonga, redondeada o puntiaguda en el ápice y con una prominente cicatriz de color marrón oscuro en la base redondeada; el color era marrón claro; y la ornamentación de la pared celular era verrugosa.

^c Media

^d Desviación estándar

Capítulo II

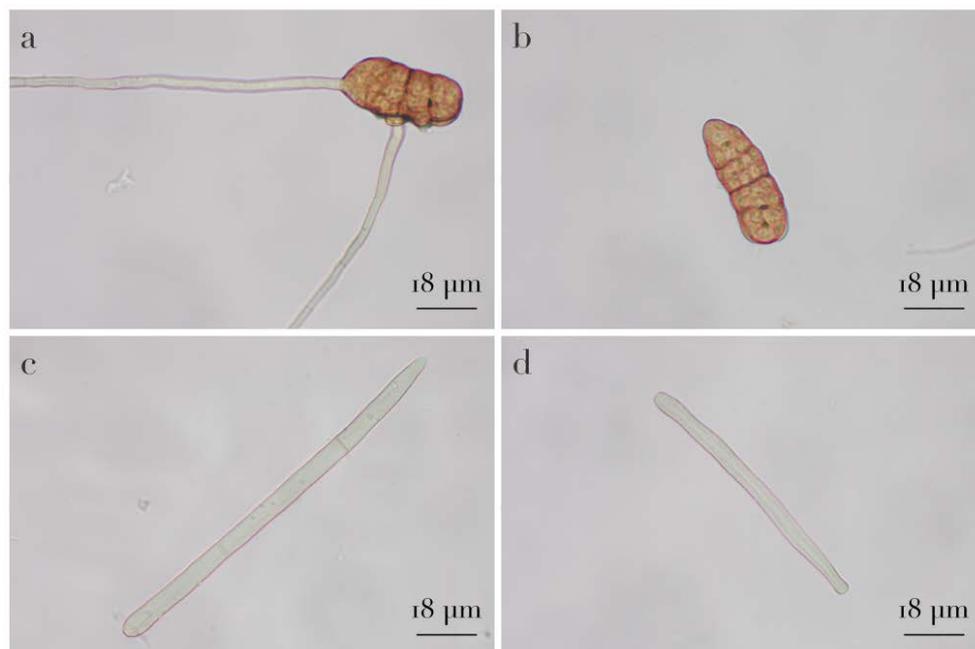


Figura II. 12. Conidios de los aislados CIDEFI-234 (a y b) y CIDEFI-235 (c y d) obtenidos a partir de cultivos de 7 días en APG casero, a 25 ° C y en oscuridad continua.

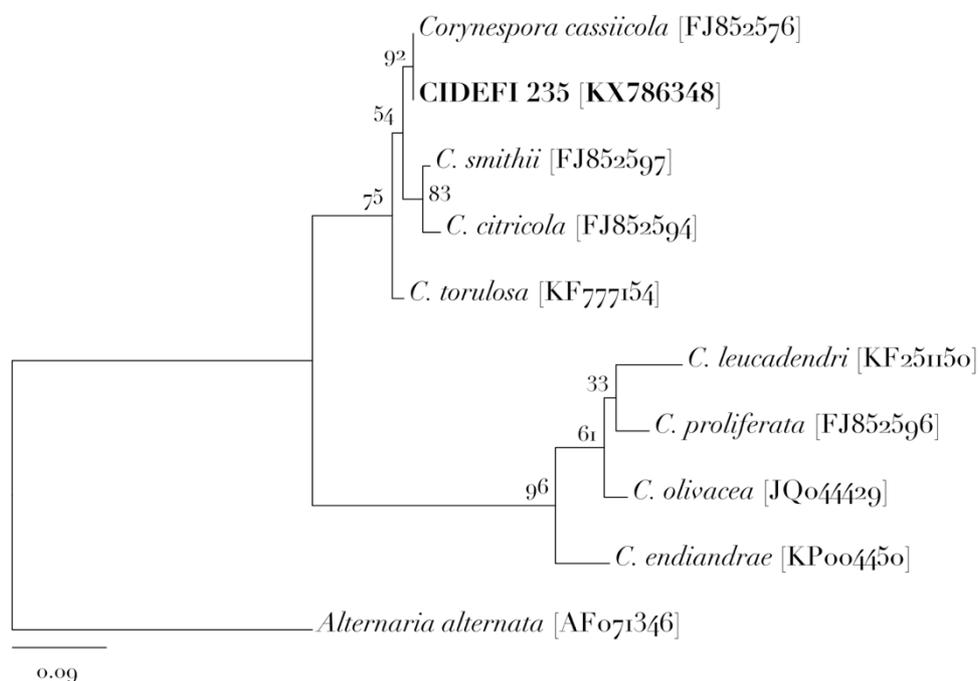


Figura II. 13. Árbol de máxima verosimilitud de *Corynespora* inferido a partir de sus secuencias de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos de *Alternaria alternata* se usó como grupo externo. Las secuencias de nucleótidos generadas en este estudio están en letra de tipo negrita. Los números en los nodos representan valores de soporte *bootstrap* como un porcentaje de 1000 repeticiones. La barra de escala representa el número promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio.

Capítulo II

Finalmente, el ensayo en foliolo desprendido permitió confirmar la patogenicidad de estos aislados en foliolos desprendidos de tomate cv. Elpida. Además, se pudo notar que el aislado de *S. lycopersici* CIDEFI-234 presentó una mayor agresividad que el aislado de *C. cassicola* CIDEFI-235 (Figura II. 14). Tanto el aislado CIDEFI-234 como el aislado CIDEFI-235 fueron reaislados del tejido enfermo, cumpliendo así con los postulados de Koch.

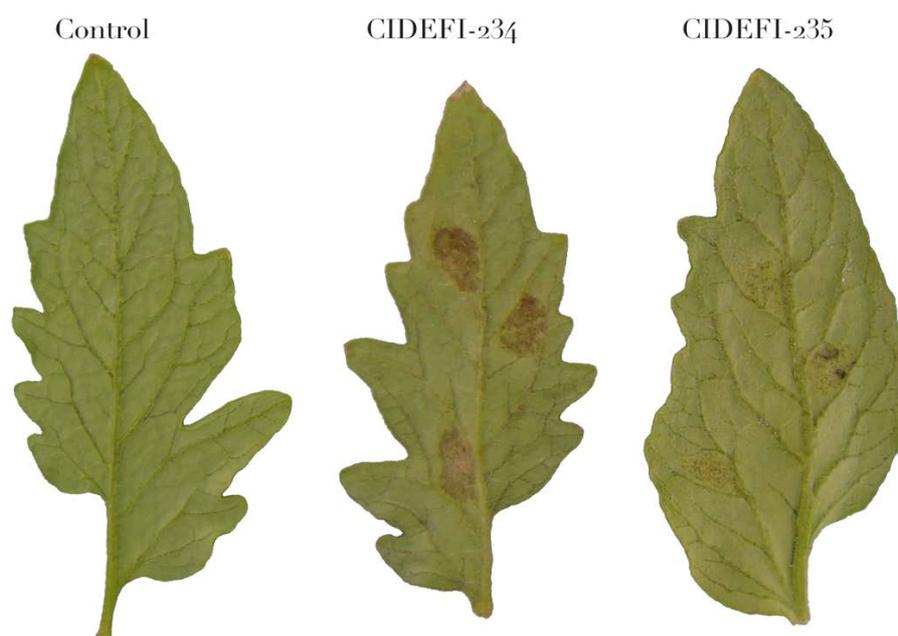


Figura II. 14. Prueba de patogenicidad *in vitro*. Síntomas de la enfermedad de tomate cv. Elpida en foliolos 7 días después de la inoculación con suspensiones conidiales de las cepas CIDEFI-234 (b) y CIDEFI-235 (c). Los foliolos utilizados como control se trataron con una solución estéril de Tween-20 al 0,01 % v/v (a).

II. III. VI. Aislados Provenientes de Pimiento

Los aislados CIDEFI-272, CIDEFI-273 y CIDEFI-274 fueron identificados molecularmente como *S. lycopersici*. Su morfología fue acorde al resto de los aislados de *Stemphylium* de la presente tesis (Tablas II. 13 y II. 14 y Figuras II. 15 y II.16). Estos aislados fueron patogénicos en tomate, además de pimiento, hospedador a partir del cual fueron aislados originalmente (Figuras II. 17 y II. 18).

Tabla II. 13. Características morfológicas de las colonias de los aislados *S. lycopersici* de pimiento.

Aislado	Característica de la colonia							Pigmentación del medio ^d
	Díámetro (mm) ^a	Color Obverso ^d	Color Reverso ^d	Textura	Elevación	Margen	Zonación	
CIDEFI-234	71,33 ^b ± 1,24 ^c	[W(N 9) - VY (5Y 8/12)]	[SGY (7,5Y 7/10)]	Algodonosa	Plana	Entero	Ausente	Ausente
CIDEFI-234	72,66 ± 2,05	[W(N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/12) - VRO (10R 5/14)]	Algodonosa	Plana	Entero	Ausente	Ausente
CIDEFI-235	68,33 ± 1,24	[W(N 9) - BY (5Y 8/8) - VY (2,5Y 8/12) - POY (7,5YR 8/4)]	[VY (5Y 8/12) - VRO (10R 5/14)]	Algodonosa	Plana	Entero	Ausente	Ausente

^a Valores de 13 repeticiones tomados de conidios de cultivos de 7 días en APG casero a 25 ° C, y en oscuridad continua.

^b Media

^c Desviación estándar

^d De acuerdo con el Munsell Colour Order System del Virtual Colour Atlas v. 2.0.0720 (Virtual Colour Systems LTD 2013): BY Brilliant yellow, POY Pale orange yellow, SGY Strong greenish yellow, VRO Vivid reddish orange, VY Vivid yellow, W White

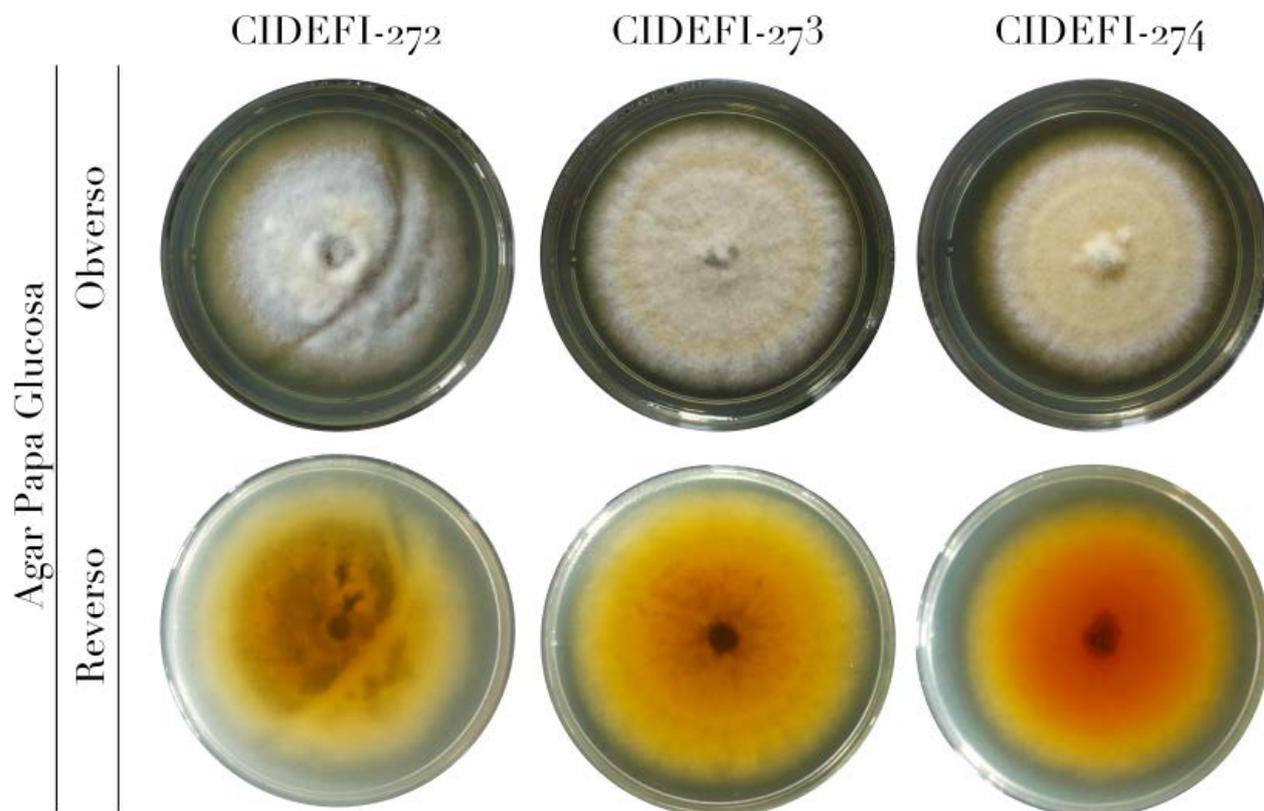


Figura II. 15. Colonias de los aislados de *S. lycopersici* de pimiento cultivados 7 días en APG comercial, a 25 ° C y en oscuridad continua.

Tabla II. 14. Características morfológicas de los conidios de *S. lycopersici* de pimiento.

Aislado	Conidios ^{a, b} (µm)			
	Largo (L)	Ancho (A)	L/A promedio	Septos transversos
CIDEFI-272	60,4 ^c ± 3,2 ^d	17,0 ± 1,3	3,6 ± 0,3	3(-4)
CIDEFI-273	42,9 ± 3,6	15,4 ± 1,4	2,8 ± 0,3	3(-4)
CIDEFI-274	50,0 ± 4,25	17,3 ± 1,2	2,9 ± 0,3	3(-4)

^a Valores de 50 repeticiones tomados de cultivos de 7 días cultivados en APG casero a 25 ° C y en oscuridad continua.

^b La forma conidial era oblonga, redondeada o puntiaguda en el ápice y con una prominente cicatriz de color marrón oscuro en la base redondeada; el color era marrón claro; y la ornamentación de la pared celular era verrugosa.

^c Media

^d Desviación estándar

Capítulo II

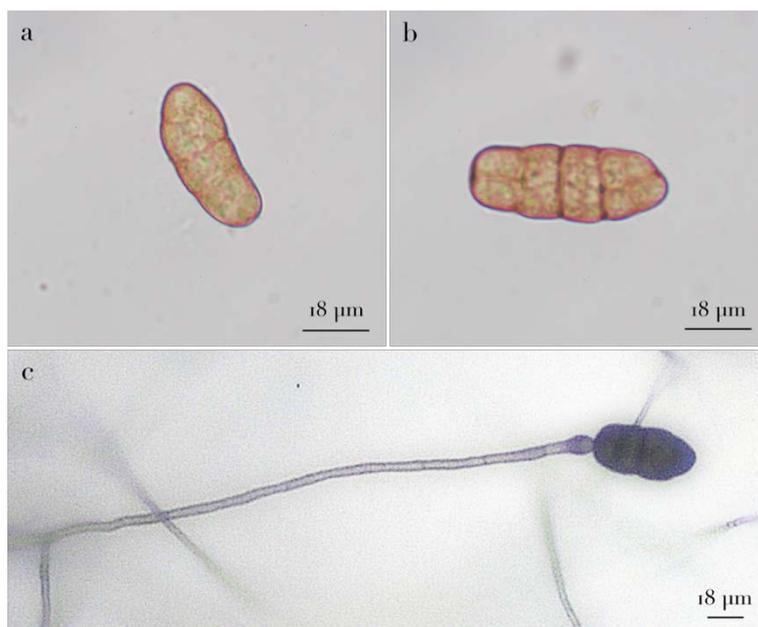


Figura II. 16. Conidios de los aislados *S. lycopersici* de pimiento cultivados 7 días en APG casero, a 25 ° C y en oscuridad continua.

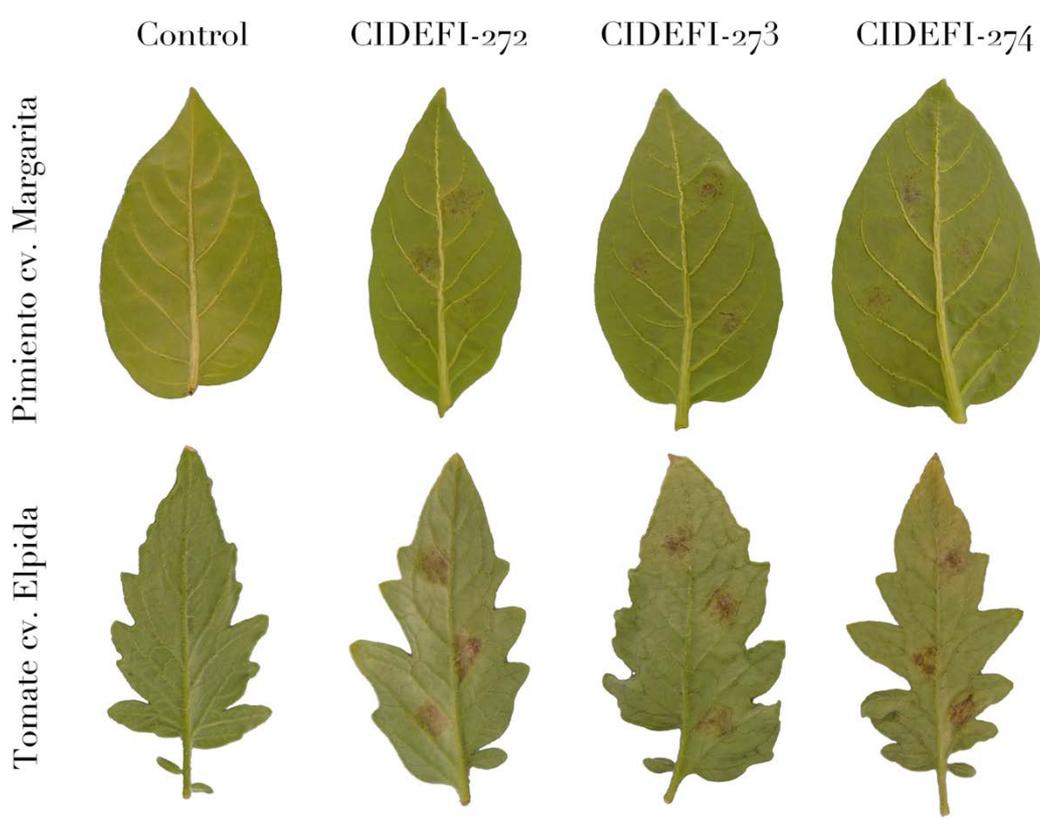


Figura II. 17. Síntomas observados en folíolos desprendidos de pimiento cv. Margarita y tomate cv. Elpida 7 dpi con suspensiones conidiales de *S. lycopersici* aislados originalmente de pimiento cv. Elpida. Los folíolos usados como control fueron tratados con una solución estéril de Tween-20 al 0,01 % v/v.

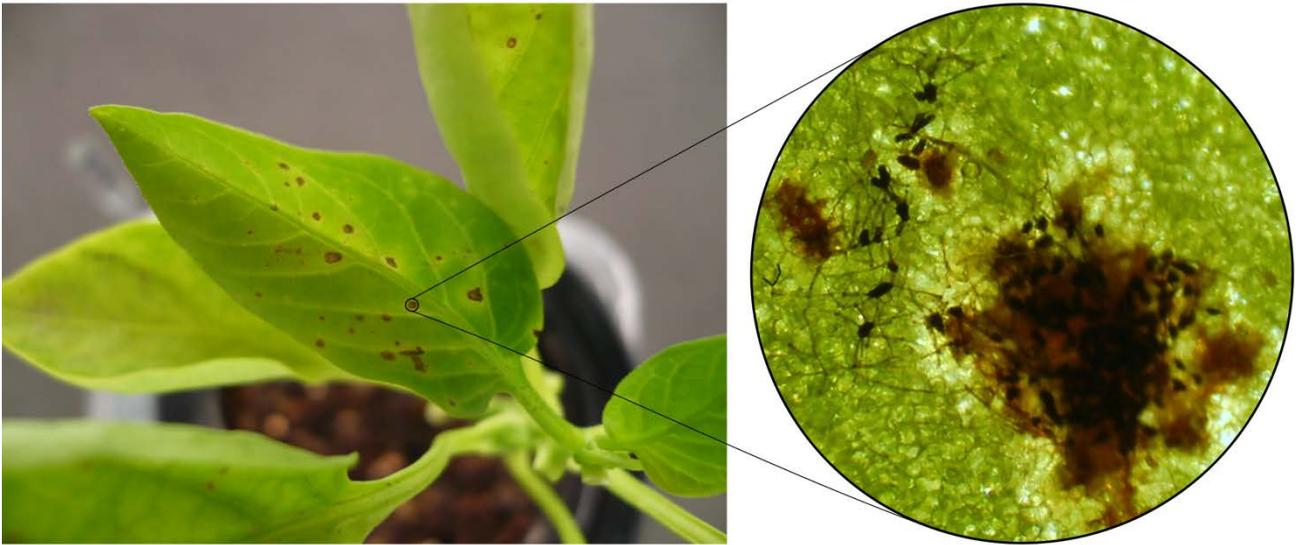


Figura II. 18. Síntomas observados en plantines de pimiento cv. Margarita 14 dpi con una suspensión de conidios de *S. lycopersici* CIDEFI-273. La imagen microscópica corresponde a un aumento de 40 X.

II. IV. Discusión

La incidencia de la enfermedad de la mancha gris del tomate en las principales regiones productoras de tomate de la Argentina ha aumentado considerablemente durante los últimos tres años. Los resultados de esta tesis pusieron en evidencia la importancia de la patología en Corrientes y en el cinturón hortícola platense. Asimismo, se comprobó su aparición en Salta y Mendoza (Tabla II. 10.). Cabe resaltar la importancia de este último hallazgo, puesto que Mendoza se caracteriza por ser una región seca, cuyas condiciones ambientales no serían óptimas para el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, el hecho que la mancha gris del tomate se está extendiendo hacia el sur puede estar relacionado con los cambios en la temperatura y las precipitaciones que muy probablemente estén ocurriendo debido al calentamiento global.

En Argentina, los agentes etiológicos de la mancha gris del tomate se identificaron como dos especies diferentes de *Stemphylium*; mientras que Colombo y sus colaboradores identificaron *S. lycopersici* en tomates enfermos y a *S. solani* en pimientos enfermos que crecían en la provincia de Corrientes, Ramallo y sus colaboradores identificaron *S. solani* en tomates de invernadero enfermos que cultivados en Tucumán. Ambos informes basan su identificación solo en caracteres morfológicos ^{119,120,133}. Aunque el diagnóstico de las especies de *Stemphylium* se ha basado tradicionalmente en los rasgos morfológicos, la variabilidad intrínseca de las características morfológicas dentro del género plantea algunas preguntas con respecto a la identificación del agente causante de la enfermedad.

Las características culturales, así como la morfología de los conidios se han utilizado para definir las especies de hongos. Las características culturales de los aislados fúngicos en APG fueron similares a las descritas para los miembros del género *Stemphylium* ^{31,53,57,64}. Además, se observaron niveles considerables de diversidad. Más aun, también se encontró que ciertos caracteres morfológicos de los aislados variaron en función del medio de cultivo en el que se cultivaron (APG casero o en APG comercial), lo que no solo llevaba a cambios en su tasa de crecimiento y pigmentación, sino también en su capacidad de esporulación. Mientras que los aislados exhibieron una amplia gama de capacidades de esporulación en APG casero, esto no se observó esporulación en cultivos en APG comercial. Por lo tanto, las diferencias observadas entre los dos medios de cultivo

Capítulo II

utilizados podrían deberse a diferencias en su composición química. Parece que la esporulación es un proceso exigente que requiere factores nutricionales que no son proporcionados en el APG comercial. Griffith y sus colaboradores demostraron que el manejo del cultivo de papa utilizado como fuente para elaborar el medio APG juega un papel crítico en la calidad del medio de cultivo resultante. Las papas deficientes en cobre condujeron a una reducción en la pigmentación de varios cultivos fúngicos, y en algunos casos, el número de conidios también se vio afectado¹³⁴. Malca y Ullstrup encontraron que la lactosa era la mejor fuente de carbono para la mejora de la esporulación en el hongo Pleosporales *Bipolaris zeicola* (previamente llamado *Helminthosporium carbonum*) y *Exserohilum turcicum* (anteriormente llamado *Helminthosporium turcicum*)¹³⁵. Más recientemente, Zhu y sus colaboradores encontraron que la esporulación, a diferencia del crecimiento micelial, en *Aschesonia aleyrodinis* se veía afectada por el contenido de lactosa, vitamina B₁, Fe²⁺ y triptona del medio de cultivo¹³⁶. Ambos grupos encontraron que el crecimiento miceliar tuvo diferentes requisitos. Por lo tanto, parece que la esporulación de los aislados de *Stemphylium* es un proceso exigente que es variable entre los aislados, lo que sugiere que, además, difieren en su capacidad metabólica.

Aunque la forma conidial, el color y la ornamentación fueron los mismos para los 27 aislados, se observaron algunas variaciones en sus dimensiones, el número de septos transversales y la relación promedio L/A, que varió de 2,2 a 3,1. En base a las descripciones disponibles de la morfología de conidios de las especies de *Stemphylium* asociadas a la mancha gris de la hoja del tomate, encontramos que mientras algunos de los aislados se ajustaban estrechamente al fenotipo de *S. solani*, debido a la menor longitud, ancho y relación L/A de los conidios, otros presentaron características morfológicas típicas de *S. lycopersici*, ya que produjeron esporas más grandes con una relación L/A igual o superior a 3^{57,70,137 139}. Sin embargo, Hong, Kim, Kurose, Kwon, Nishi y Tomioka, y sus colaboradores, describieron aislados de *S. lycopersici* con conidios con relaciones L/A inferiores a 3^{27,87,140 143}. Aunque la morfología de los conidios se utilizó tradicionalmente como herramienta de diagnóstico para delimitar especies de *Stemphylium*, esta característica está bajo la influencia de factores ambientales. Leach y Aragaki mostraron que las diferencias en la temperatura de incubación del cultivo condujeron a cambios en

Capítulo II

la morfología de los conidios de *S. lycopersici*¹⁰⁸. Además, Tomioka, Tomioka y Sato 2011, y Nasehi, y sus colaboradores, encontraron que la dimensión y la relación L/A de los conidios de *S. lycopersici* en las lesiones foliares fueron diferentes de los cultivados en medio de cultivo^{86,141,142,144}. De hecho, algunos dan cuenta que las características culturales y morfológicas son herramientas poco confiables para ser utilizadas para diferenciar *S. lycopersici* de *S. solani*^{142,144}. Es evidente que los caracteres morfológicos deben ser acompañados de datos moleculares a fin de determinar la identidad del organismo con precisión.

Los marcadores de ADN son herramientas neutrales confiables para evaluar la diversidad genética y las secuencias de genes conservados para confirmar la identidad de los hongos. El análisis filogenético multilocus de las secuencias parciales ITS-*gpd* agrupó todos los aislados en un clado junto con *S. lycopersici* y *S. xanthosomatis* con valores de *bootstrap* significativos tanto en el análisis de MP como de ML, mostrando que son distintos a *S. solani*. Solo se encontraron dos secuencias de *gpd* dentro de los 61 aislados. Por lo tanto, se incluyeron en el análisis filogenético los aislados CIDEFI-216 y CIDEFI-217 como representante de cada grupo de secuencias, los cuales se agruparon dentro de los subclados de *S. xanthosomatis* y *S. lycopersici*, respectivamente. Tanto *S. lycopersici* como *S. xanthosomatis* comparten características morfológicas y tienen secuencias ITS y *gpd* casi idénticas. Aunque se necesitan más estudios taxonómicos, varios autores estuvieron de acuerdo en que *S. xanthosomatis* puede ser un sinónimo de *S. lycopersici* con variación intraespecífica^{107,142}. Estos resultados brindan apoyo adicional a esta hipótesis.

La agresividad es una de las características más importantes de las especies patógenas de *Stemphylium*. La agresividad de los aislados de *Stemphylium* en folíolos desprendido de tomate cv. Elpida variaron considerablemente, lo cual no estuvo relacionado con el cultivar de tomate de donde provinieron los aislados ni del origen geográfico de los aislados. Se encontró que una carga de inóculo de 10^3 conidios ml^{-1} era suficiente para provocar síntomas de la enfermedad en folíolos de tomate desprendidos. Además, los fragmentos de micelio en una concentración del mismo orden de magnitud desarrollaron síntomas de la enfermedad en las hojas desprendidas, aunque la agresividad fue menor. Los aislados CIDEFI-201, CIDEFI-210, CIDEFI-212 y CIDEFI-231, que no

Capítulo II

esporularon en APG fueron menos agresivos que los aislados productores de esporas, ya que afectaron un área foliar menor de $1,07 \pm 0,35 \text{ cm}^2$. Curiosamente, estos aislados compartieron características de la colonia, como el color amarillo verdoso intenso y un pigmento que difundió al medio de cultivo tiñéndolo de rojo intenso.

Las secuencias de ADN satelital y microsatélite de los genomas de hongos son herramientas útiles para evaluar la diversidad. Existen varios métodos diferentes para evaluar la diversidad, como RAPD, ERIC, REP e ISSR-PCR. Sin embargo, la técnica ISSR-PCR fue utilizada debido a su velocidad, confiabilidad, simplicidad, relación costo-efectividad y el hecho de que no requiere un conocimiento previo de la secuencia del genoma. La variabilidad genética basada en la huella digital ISSR-PCR distinguió 18 genotipos, entre los 27 aislados de *S. lycopersici*. Aún así, el nivel de similitud entre las accesiones fue alto y no hubo relación entre los grupos genéticos y las características fenotípicas, virulencia, identidad del huésped y origen geográfico de los aislados, a excepción del grupo formado por el aislado CIDEFI-230 y CIDEFI-231. En vista de estos resultados, el hongo patógeno pudo haber sido introducido en las áreas de cultivo de tomate por algunas fuentes de inóculo y posteriormente se propagó al mover material vegetal infectado de un lugar a otro. Además, también es evidente que el hongo está experimentando un proceso de variación genética, como se puede ver en la cantidad de genotipos encontrados. De ser así este último aspecto, debería ser motivo de preocupación, ya que una alta variabilidad podría conducir a la aparición de aislados resistentes a los fungicidas o nuevas razas que pondrían en peligro el uso de los cultivares de tomate resistentes actualmente en uso.

Merece una mención especial la recuperación de los aislados de *S. lycopersici* CIDEFI-234 y *C. cassiicola* CIDEFI-235 a partir de la misma porción de tejido necrótico de material vegetal con síntomas típicos de la mancha gris de la hoja del tomate provenientes de Orán, Salta. *Corynespora cassiicola* es un hongo necrótrofo que produce la enfermedad de la mancha anillada en varios hospedadores alrededor del mundo, sin embargo, nunca ha sido asociado con el tomate en Argentina^{3,25,146}. En este país, en cambio, *C. cassiicola* ha sido identificado como patógeno en el cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) y de soja (*Glycine max*)^{146 147}. Notablemente, el tejido de tomate afectado a partir del cual se aislaron CIDEFI-234 y CIDEFI-235 no presentaba síntomas característicos de la mancha

Capítulo II

anillada, distinguiéndose únicamente los síntomas de la mancha gris de la hoja del tomate. En concordancia con esto, en el ensayo de patogenicidad *in vitro* se encontró que *S. lycopersici* CIDEFI-234 fue mucho más agresivo que *C. cassicola* CIDEFI-235 en hojas desprendidas de tomate cv. Elpida. Esto hace pensar que, posiblemente, el aislado *C. cassicola* CIDEFI-235 es un patógeno oportunista que infecta a las plantas de tomate estresadas, como lo que pudo haber ocurrido en la naturaleza con una eventual infección previa de *S. lycopersici* (CIDEFI-234).

Por otra parte, esta tesis da cuenta del primer reporte de *S. lycopersici* como agente causal de la mancha gris de la hoja del pimiento en Argentina. Los aislados de *S. lycopersici* provenientes de pimiento también enfermaron las hojas de tomate cv. Elpida. Por lo tanto, se verificó que el patógeno cuenta con una opción adicional para poder cumplir su ciclo de vida. Este dato ha de tenerse en cuenta durante el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad; más aún cuando es común observar el cultivo de pimiento en las proximidades de los cultivos de tomate.

En síntesis, en este capítulo se incluyó la identificación molecular y la caracterización morfológica y molecular, además del estudio de la agresividad, de patógenos aislados de plantas de tomate con síntomas típicos de mancha gris, encontrándose que *S. lycopersici* es el agente causal de esta enfermedad en las principales zonas productoras de tomate de Argentina. La variabilidad fenotípica exhibida por los aislados estudiados sugiere que el patógeno se encuentra en un proceso de cambio, dato importante para tener en cuenta en el desarrollo de programas fitosanitarios.

Capítulo III: Genoma Borrador de *Stemphylium lycopersici*

CIDEFI-216

Capítulo III

III. I. Introducción

En abril de 1953 ocurrió un gran hito en la historia de la biología, en particular, y de la ciencia, en general: Watson y Crick resolvieron la estructura terciaria del ADN, a partir de datos cristalográficos de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins ^{148 152}. Este descubrimiento contribuyó significativamente a la creación de marcos conceptuales para la replicación del ADN y la codificación de proteínas en los ácidos nucleicos. Sin embargo, el conocimiento de la estructura primaria del ADN continuó siendo un desafío por largo tiempo. Pues, las tecnologías para secuenciar proteínas, disponibles en aquel tiempo, no eran aplicables al ADN; las moléculas de ADN eran mucho más largas y estaban formadas por menos monómeros muy similares entre sí ¹⁵³. Se necesitaban nuevas tecnologías.

En 1977, Frederick Sanger y sus colaboradores publicaron el método de terminación de cadena, una novedosa tecnología que permitía secuenciar el ADN ¹⁵⁴. Al mismo tiempo, Allan Maxam y Walter Gilbert, hacen lo propio al reportar el método de fragmentación ¹⁵⁵. La secuenciación Sanger requería menos manejo de químicos tóxicos y radioisótopos que la secuenciación Maxam-Gilbert, por lo que el método de terminación de la cadena, también llamado método dideoxi, adquirió mayor aceptación, convirtiéndose en la tecnología de secuenciación de ADN predominante. De esta manera, en 1977, se obtuvo el primer genoma de virus de ADN, el del bacteriófago ϕ X174X17; en 1995, se consiguió el primer genoma de un organismo de vida libre, el de la bacteria *Haemophilus influenzae*; en 1996, se obtuvo el primer genoma de un eucariota de vida libre, el de la levadura *Schizosaccharomyces cerevisiae*; y en 2004, tras 14 años de trabajo y una inversión de \$ 30000000000, la técnica de Sanger también permitió completar la primera secuencia del genoma humano ^{156 159}. A la vista de estos números, resultaba evidente la necesidad de tecnologías de secuenciación más rápidas, de mayor rendimiento y más económicas.

Las tecnologías secuenciación de alto rendimiento no tardaron en llegar: en el 2005, 454 Life Sciences (ahora Roche) lanzó la primera plataforma de secuenciación de alto rendimiento empleando pirosecuenciación ¹⁶⁰. Esta tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, *next-generation sequencing*) representó una caída de 50000 veces en el precio del genoma humano ¹⁶¹. Luego de este éxito, surgieron una serie de metodologías

Capítulo III

de NGS, entre las cuales el método de secuenciación de Solexa (hoy Illumina) probablemente haya sido el más importante. Las tecnologías de NGS trajeron consigo tres mejoras claves respecto a las tecnologías previas, desde entonces tecnologías de secuenciación de primera generación (FGS, *first-generation sequencing*): en primer lugar, la preparación de bibliotecas a partir de un sistema libre de células; en segundo lugar, el clonado del molde mediante millones de reacciones en paralelo; y, en tercer lugar, la detección de los nucleótidos de manera cíclica, también en paralelo. Además, estas introdujeron la estrategia de *paired-end sequencing*. A diferencia del enfoque clásico *single-end sequencing*, en el cual el ADN molde es secuenciado solamente desde una dirección, en la estrategia *paired-end sequencing* el ADN molde es secuenciado (35-300 pb) desde ambas direcciones; haciéndose la distinción de *mate-pair sequencing* para el caso particular en el que el molde superara los 2000 pb ^{161 165}. El enorme número de lecturas generadas por la tecnología de NGS, a precio un bajo, permitió la secuenciación de genomas a una velocidad sin precedentes. No obstante, la longitud inherentemente corta de sus lecturas representa una limitación fundamental para el abordaje de regiones repetitivas (de longitud igual o mayor que las lecturas en sí), derivando en rupturas en la contigüidad de la secuencia genómica ^{166 169}.

La solución a los genomas borradores fragmentados empezó a gestarse en el 2010 con la plataforma PacBio RS, de Pacific Biosciences. Esta plataforma fue la primera en ofrecer la secuenciación en tiempo real de una única molécula (SMRTS, *single-molecule real-time sequencing*) ¹⁷⁰. De esta manera, hubo un nuevo punto de inflexión, a partir del cual la, hasta entonces, NGS pasó a ser secuenciación de segunda generación (SGS, *second-generation sequencing*), para dar lugar a la secuenciación de tercera generación (TGS, *third-generation sequencing*) ^{163,169,171}. Si bien las primeras tecnologías de TGS proporcionaban lecturas de apenas 1500 pb, recientemente se ha podido superar la barrera de los 800000 pb con el dispositivo MinION, de Oxford Nanopore Technologies. Este es un dispositivo portable tan chico que cabe en la palma de la mano y cuya alimentación se realiza simplemente a través del puerto USB de la computadora a la cual está conectado; su valor, \$ 1000. El MinION es capaz de secuenciar un genoma humano, a una cobertura de 30x, en tan solo 9 días. Como si esto fuera poco, Oxford Nanopore Technologies

Capítulo III

recientemente lanzó el PromethION, una plataforma que tiene el potencial de secuenciar un genoma humano, a una cobertura de 30x, en apenas 2 horas ^{169,172,173}.

La vertiginosa evolución de las tecnologías de secuenciación de nucleótidos ha alterado de modo drástico el costo y la facilidad asociados con la secuenciación de ADN. Las capacidades de los secuenciadores de ADN han aumentado a un ritmo incluso más rápido que el observado en la revolución informática descrita por la Ley de Moore. Esta ley establece que la complejidad de los microchips se duplica aproximadamente cada dos años; las capacidades de secuenciación entre 2004 y 2010 se duplicó cada 5 meses (Figura III. 1) ¹⁷⁴. Hoy en día, tanto la SGS como la TGS se han convertido en una herramienta estándar para muchas aplicaciones en biología básica, así como para investigación clínica y agronómica ¹⁶⁹.

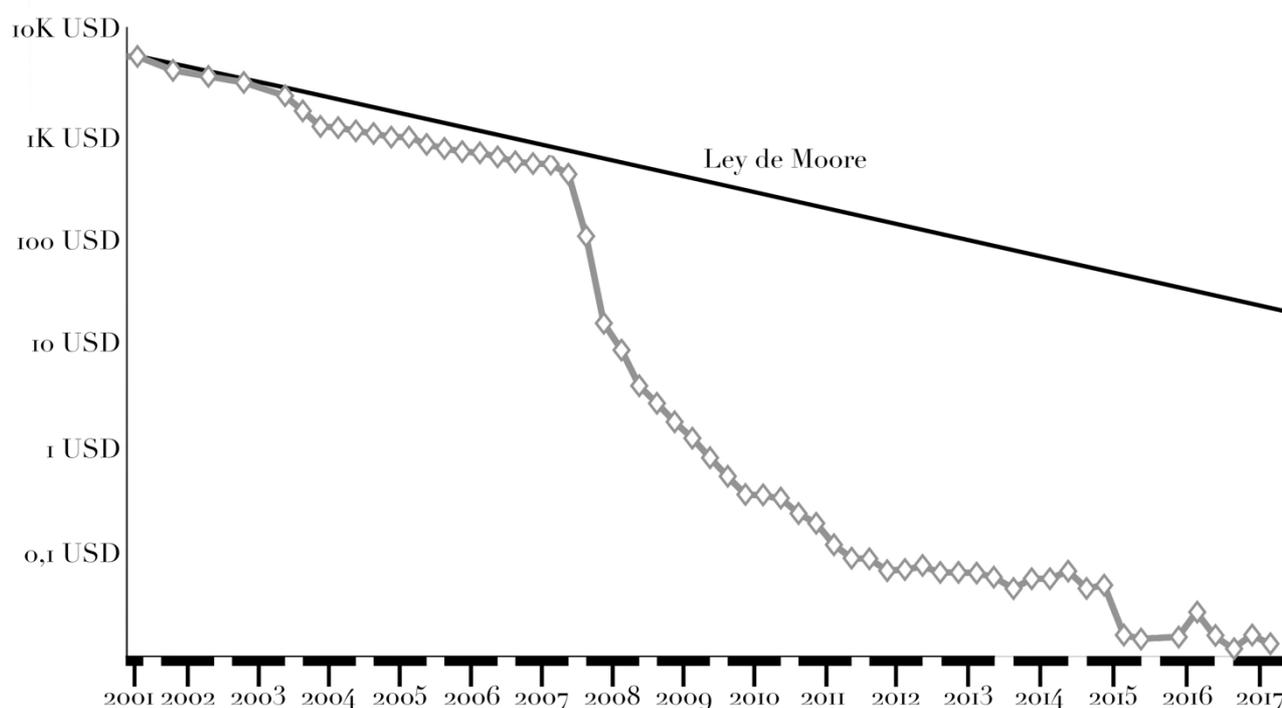


Figura III. 1. Evolución del costo de secuenciación por megabase de secuencia y su comparación con la Ley de Moore. Nótese la repentina y profunda desviación respecto a la Ley de Moore a partir del 2008. Esto representa el momento de transición de las tecnologías de FGS a las tecnologías de SGS en los centros de secuenciación. Fuente: Wetterstrand, 2018.

El proceso de obtención de un genoma consta de tres pasos principales: secuenciación, ensamblaje y anotación ^{162,175}. El ensamblaje del genoma es el proceso de

Capítulo III

unir las lecturas generadas por el secuenciador (previo filtro de calidad) para generar secuencias de ADN más largas, los *contigs* y, si la tecnología lo permite, *scaffolds*, que abarquen al genoma completo. Los *contigs* son secuencias consenso contiguas que se derivan de colecciones de lecturas superpuestas; los *scaffolds* son conjuntos ordenados y orientados de contigs que están unidos entre sí por lecturas *paired-ends*. Se distinguen dos enfoques de ensamblaje: el ensamblaje guiado por referencia, en el cual las lecturas son mapeadas a un genoma de referencia que sirve de molde; y el ensamblaje *de novo*, en el cual el genoma se ensambla sin ninguna información adicional más que la provista por las lecturas^{162,176}. Asimismo, existen tres enfoques básicos para diseñar algoritmos de ensamblaje *de novo*: enfoques codiciosos (*greedy*), métodos de superposición-disposición-consenso (OLC, *Overlap-Layout-Consensus*) y métodos basados en gráficos de de Bruijn (DBG, *de Bruijn graphs*). Los algoritmos *greedy* tienen como objetivo determinar el ensamblaje óptimo global mediante la búsqueda de ensamblajes óptimos locales en cada paso. Para ello, buscan el mejor solapamiento entre dos lecturas cualesquiera y las unen formando una nueva secuencia que será incluida al espacio de búsqueda; este proceso se repetirá hasta que no existan candidatos susceptibles de unión. Dado que estos algoritmos no consideran la relación global (si no local) entre las lecturas, no aprovechan la información que ofrecen las lecturas *paired-end*. Por otra parte, los algoritmos de OLC identifican las regiones superpuestas de las lecturas y crean un gráfico en el que cada lectura es representada como un nodo y las superposiciones son representadas como bordes que unen los dos nodos implicados. Luego, determinan el mejor camino/circuito hamiltoniano, descartando la información redundante. Este proceso es llevado a cabo varias veces, hasta que, finalmente, las secuencias resultantes se combinan para dar la secuencia consenso final. El algoritmo OLC es computacionalmente muy costoso, principalmente en tiempos de corrida, por lo que es contraindicado para manipular la enorme cantidad de lecturas cortas generadas por los instrumentos de SGS^{176,177}. En cuanto a los métodos basados en DBG, estos primero dividen las lecturas en *k*-mers, es decir, en subsecuencias de longitud *k*. A partir de estas, crean un gráfico (de de Bruijn) en el cual cada (*k*-1)-mer posible es asignada a un nodo y donde determinado nodo (*k*-1)-mer es conectado por un borde direccionado a otro (*k*-1)-mer siempre que el prefijo del primero

Capítulo III

se superponga con el sufijo del segundo; aquí, el k-mer compuesto por estos dos vértices es la etiqueta del borde direccionado que los conecta. Entonces, al atravesar cada borde en el gráfico se obtiene un camino cuyas etiquetas de borde dan la secuencia más pequeña que contiene a todos los k-mer posibles. Por lo tanto, finalmente, estos métodos buscan el camino euleriano dentro del DBG para resolver el problema de la reconstrucción de la secuencia. Encontrar un camino de Euler en un DBG es un problema computacionalmente sencillo, haciendo que el enfoque de Bruijn sea el preferido para encarar ensamblajes de lecturas SGS ^{176 178}.

Una vez que se dispone de un genoma ensamblado, el siguiente paso es su anotación. En sentido general, se entiende por anotación al proceso computacional de adjuntar información biológicamente relevante a los datos de la secuencia del genoma. Este proceso, a su vez, se divide en dos: la anotación estructural y la anotación funcional. La anotación estructural es el proceso de identificación de genes y sus estructuras intrón-exón. Por otra parte, la anotación funcional hace referencia al proceso de adjuntar metadatos a las anotaciones estructurales que describan el rol biológico del gen en cuestión. Los métodos de anotación estructural pueden ser *ab initio* o basados en evidencia (también llamados basados en homología o en similitud). Los primeros hacen uso de modelos estadísticos, a menudo modelos ocultos de Markov (HMM, *Hidden Markov Models*), para encontrar características estructurales de genes simplemente a partir de la secuencia nucleotídica del genoma. Estos modelos pueden (o no) estar entrenados por un conjunto de estructuras génicas conocidas del genoma/organismo en cuestión, a partir de lo cual optimiza los parámetros para encontrar las características estructurales de los genes, como exones, sitios de corte y empalme, codones de inicio y terminación, entre otros parámetros. En cambio, los métodos basados en evidencia se valen de datos extrínsecos para localizar y caracterizar la estructura de los genes dentro de la secuencia genómica problema. Estos datos extrínsecos provienen de evidencias experimentales verificadas, tales como secuencias etiquetadas expresadas (EST, *expressed tag sequences*), ARN mensajero (ARNm) y/o proteínas ^{162,175,179}. Asimismo, las anotaciones funcionales también pueden provenir de datos experimentales verificados que prueban el rol biológico del gen en cuestión. Sin embargo, este no suele ser el escenario en un proyecto de secuenciación genómica. En estos casos, lo común es realizar la anotación funcional con métodos automatizados que

Capítulo III

buscan, bajo rigurosos criterios, genes relacionados que disponen de anotaciones funcionales soportadas experimentalmente a fin de transferirlas al gen problema. Estas caracterizaciones funcionales generalmente incluyen la asignación de términos de ontología génica (GO terms), números de la Comisión de Enzimas (EC numbers) y dominios proteicos a través de códigos InterPro ^{179 183}.

Por último, aunque no menos importante, cabe mencionar la existencia de herramientas para evaluar la calidad de un ensamblaje de genoma. Una métrica estándar para evaluar la contigüidad del ensamblaje es el valor N50. Esta es una media estadística ponderada definida tal que el 50 % de los nucleótidos ensamblados se encuentran en *contigs* (*contig* N50) o *scaffolds* (*scaffold* N50) de al menos esta longitud. Otra métrica básica es la proporción del genoma contenida en el ensamblaje. El tamaño esperado del genoma puede inferirse a partir de los datos del valor-C o, alternativamente, a partir de los enfoques basados en la frecuencia k-mer. Asimismo, la completitud de un genoma puede estimarse mediante herramientas bioinformáticas que inspeccionan en un ensamblaje genómico la presencia de colecciones de genes universales de copia única para el linaje taxonómico investigado ^{162,175,184,185}.

Se han realizado varios estudios centrados principalmente en la variación morfológica, fisiológica, patógena y genética en diferentes poblaciones de *S. lycopersici*, pero aún queda mucho por investigar sobre los mecanismos moleculares subyacentes a todos estos aspectos ^{29,60,62,79}. En este sentido, el proyecto de secuenciación del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 podría arrojar luz sobre muchos de estos temas, como así también, podría contribuir a una mejor comprensión de la historia evolutiva de *Stemphylium*.

Capítulo III

III. I. I. Hipótesis del Capítulo

I. El ensamblaje *de novo* del genoma de *S. lycopersici* a partir de lecturas *paired-end* de tecnologías de secuenciación de segunda generación produce un genoma borrador cuya completitud del espacio génico es superior al 98 %.

III. I. II. Objetivos del Capítulo

- I. Secuenciar y ensamblar *de novo* el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216.
- II. Realizar la anotación génica estructural y funcional.
- III. Determinar la completitud del espacio génico del genoma borrador.

III. II. Materiales y Métodos

III. II. I. Material Fúngico

El aislado *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue el elegido para la obtención del genoma borrador. La elección obedece a que el mismo presenta valores intermedios o rasgos comunes en las características morfológicas analizadas previamente; está ubicado dentro del grupo más numeroso del dendrograma ISSR; y posee una agresividad elevada en foliolos desprendidos de tomate cv. Elpida.

III. II. II. Extracción de ADN Genómico

Se extrajo ADN genómico total de alta calidad a partir de cultivos axénicos de *S. lycopersici* CIDEFI-216 mediante el producto comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La calidad del ADN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa (1 %, 90 Volts por 30 minutos) y la calidad y cantidad fue determinada mediante el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

III. II. III. Secuenciación y Ensamblaje *De Novo* del Genoma

Se preparó una biblioteca genómica con un tamaño de inserto de 300 pb a partir de 300 ng de ADN fragmentado utilizando el kit TruSeq Nano DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc.). La secuenciación fue llevada a cabo utilizando un enfoque *2x100 bp paired-end reads* en un instrumento Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc.) (Figura III. 2). Las lecturas crudas fueron inspeccionadas utilizando el software FastQC versión 0.11.4 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las mismas fueron filtradas por calidad, de modo que cada lectura *paired-end* tenga más del 70 % de bases con una calidad de base mayor o igual a Q20. La puntuación Q es una predicción de la probabilidad de que se realice una llamada de base incorrecta: una puntuación Q de 20 (Q20) da cuenta de 1 error de base por cada 100 pb; una puntuación Q de 40 (Q40) da cuenta de 1 error de base por cada 10000 pb. Luego, el software Jellyfish 2.0 fue utilizado para realizar el análisis k-mer ¹⁸⁶, a partir del cual se estimó el tamaño del genoma y la cobertura alcanzada. Finalmente, las lecturas filtradas por calidad fueron utilizadas para el ensamblaje *de novo*

Capítulo III

utilizando un enfoque basado en gráficos de De Bruijn mediante el software SOAPdenovo2¹⁸⁷.

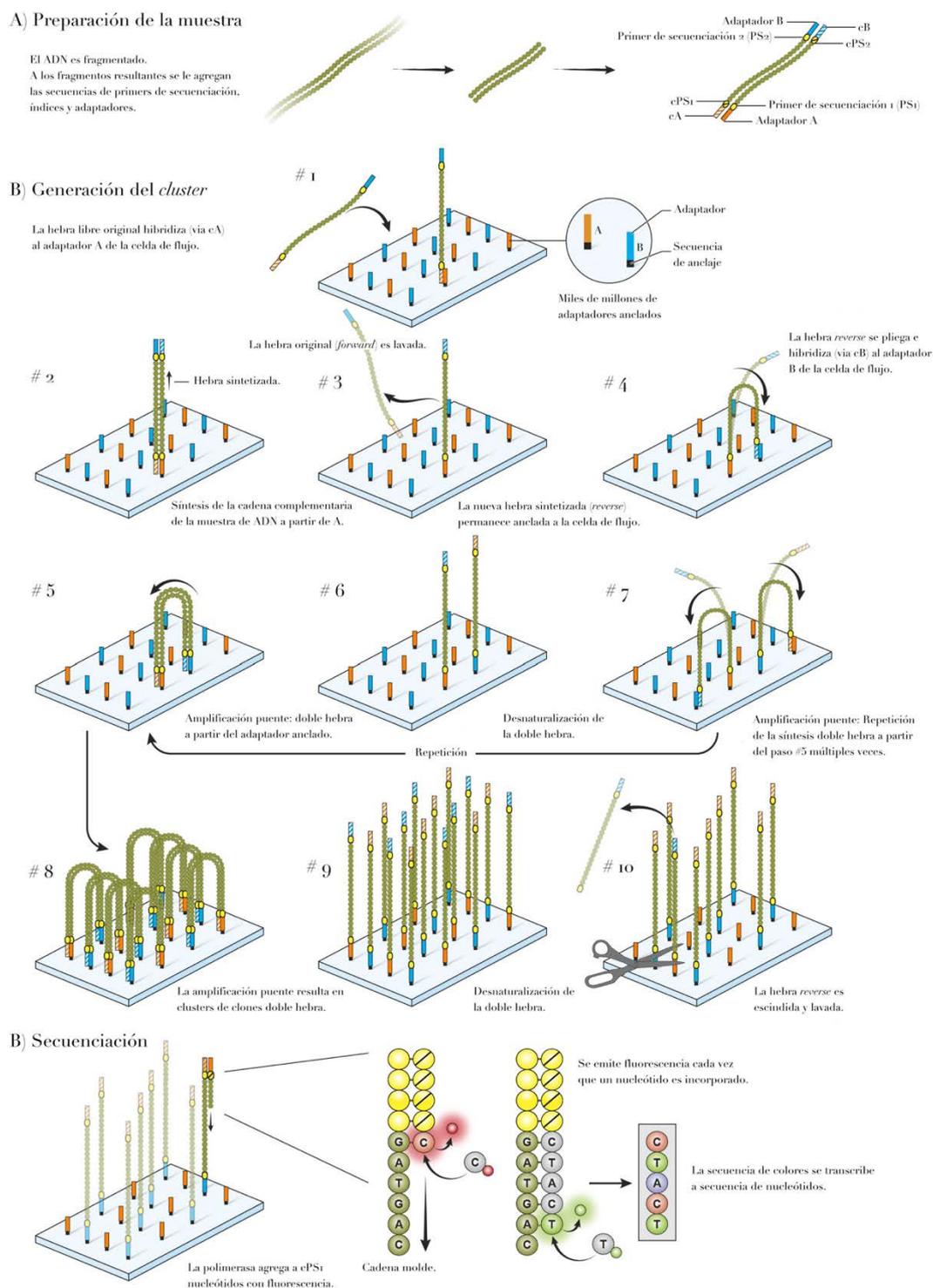


Figura III. 2. Secuenciación *paired-end* utilizando la plataforma Illumina. A) El primer paso corresponde al de preparación de la muestra. Aquí, el ADN se fragmenta aleatoriamente y, a través de la Amplificación de Ciclo Reducido, se agregan secuencias para la unión de los cebadores, los índices y los adaptadores

Capítulo III

terminales. B) El siguiente paso es la generación del *cluster*, un proceso en el que cada fragmento se amplifica isotérmicamente. Para lograr esto, los fragmentos se cargan en una celda de flujo que tiene oligonucleótidos complementarios a sus adaptadores y la hibridación es permitida por el primero de los dos tipos de oligos de la celda de flujo. Luego, cada fragmento unido se amplifica mediante un proceso conocido por amplificación de puente. En este proceso, la cadena amplificada cae y la región del adaptador se hibrida al segundo tipo de oligonucleótido de la célula de flujo (formando un puente). La polimerasa genera la cadena complementaria, y la desnaturalización subsiguiente del ADN simple hebra resultante (que forma un puente de doble cadena) da como resultado dos copias de cadena simple, cada una unida a la celda de flujo a través de uno de los dos adaptadores. Este paso se repite varias veces simultáneamente desde varias partes de la celda de flujo, lo que resulta en una amplificación clonal de todos los fragmentos. Finalmente, las hebras *reverse* se eliminan y el extremo 3' de las hebras *forward* se bloquean. C) El tercer paso, la secuenciación, sigue un enfoque de secuenciación por síntesis basado en el método de terminación reversible cíclica. Aquí, se añaden cebadores, ADN polimerasa y nucleótidos modificados. Estos nucleótidos modificados tienen la particularidad de que están bloqueados de manera reversible en sus extremos 3', lo que obliga a la ADN polimerasa a agregar solo un nucleótido (modificado) por hebra por ciclo, y que también están marcados con un fluoróforo específico de base y escindible. Después de la adición de cada nucleótido, la celda se lava y se toma una imagen mediante microscopía de fluorescencia de reflexión interna total para detectar qué base se incorporó. El extremo 3' se desbloquea químicamente y se puede iniciar otro ciclo de adición de nucleótidos, elongación y escisión. La cantidad de ciclos determina la longitud de las lecturas y la longitud de onda de emisión, junto con la intensidad de la señal, determina la llamada de base. Después de la finalización de la primera lectura, la hebra analizada se elimina (No se muestra en la figura). Luego, se introduce el primer índice, se hibrida con el molde y se polimeriza. Ahora, los extremos 3' del molde están desprotegidos; el molde se pliega y se une al segundo oligo de la celda de flujo. La ADN polimerasa extiende el segundo oligo de la celda de flujo formando un nuevo puente de doble cadena, que luego se linealiza y se bloquea su extremo 3'. Luego, la cadena original (*forward*) se descarta por lavado, y la secuenciación se repite para la cadena inversa. El paso final es el análisis de datos, en el que los índices únicos introducidos en cada muestra se utilizan para separar las lecturas de cada muestra ^{161,188}. Fuente: Meerzaman et al., 2016.

III. II. IV. Anotación Génica Estructural y Funcional

La anotación estructural de genes codificantes de proteínas fue llevada a cabo por medio del software Fgenesh 2.6 entrenado en un algoritmo optimizado para *Alternaria brassicicola*, el más cercano filogenéticamente a *S. lycopersici* entre los disponibles ¹⁸⁹. La anotación funcional de los marcos abiertos de lectura (ORFs, *open reading frames*) fue llevada a cabo empleando un enfoque automático basado en homología de secuencia mediante el software Blast2GO Basic ¹⁸⁰. Para ello, las secuencias proteicas resultantes de la traducción de los marcos abiertos de lectura fueron utilizadas como secuencias de consulta en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI, mediante la herramienta BLASTp, a fin de recuperar un máximo de 20 secuencias homólogas (e-value de 1.10^{-6}). A partir de las secuencias recuperadas, se transfirieron sus respectivas anotaciones utilizando las opciones por defecto del programa. De esta manera,

Capítulo III

estimativamente, se asignaron nombres, términos de ontología génica (GO terms), número de la Comisión de Enzimas (EC numbers) y códigos InterPro^{181 183}. Los ARNts y ARNrs se predijeron utilizando las herramientas tRNAscan-SE y hmmsearch 3.0 del servidor WebMGA^{190 195}.

III. II. V. Evaluación de la Completitud del Espacio Génico

Se evaluó la completitud del espacio génico del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 utilizando el software BUSCO (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) v3¹⁸⁴. Este, evalúa cuantitativamente la completitud del genoma en base a las expectativas evolutivamente informadas por el contenido de genes ortólogos de copia única y casi universales seleccionados de la base de datos OrthoDB v9¹⁸⁵. Para ello, el programa identifica primero las regiones candidatas que se evaluarán con búsquedas tBLASTn usando secuencias de consenso BUSCO. Las estructuras génicas se predicen utilizando Augustus con perfiles de bloques BUSCO¹⁹⁶. Estos genes predichos luego se evalúan utilizando HMMER y perfiles BUSCO específicos del linaje¹⁹⁷. Las coincidencias recuperadas se clasifican como “completas” si sus longitudes están dentro de lo esperado de las longitudes de coincidencia del perfil BUSCO; como “duplicados”, si se encuentran más de una vez; como “fragmentadas”, si se recuperan de manera incompleta; y como “faltantes”, si no se recuperan. El presente análisis fue realizado ejecutando el software BUSCO v3 con la configuración por defecto, bajo el perfil BUSCO específico de linaje Pezizomycotina *odb9*: anotación génica estructural por Augustus utilizando los parámetros para *Aspergillus nidulans*; perfil de linaje con 3156 grupos BUSCO, de un total de 50 especies Pezizomycotina.

III. III. IV. Disponibilidad de Datos

El proyecto de secuenciación, ensamblaje y anotación del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 ha sido asociado a la base de datos BioProject del GenBank según el código PRJNA274742. El aislado *S. lycopersici* CIDEFI-216 ha sido incorporado a la base de datos BioSample del GenBank bajo la identificación SAMNo3332054. Las lecturas crudas resultantes de la secuenciación han sido depositadas en la base de datos Sequence Read

Capítulo III

Archive del GenBank bajo el número de acceso SRX872418. El genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue depositado en las bases de datos DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) y GenBank bajo el número de acceso LGLRo0000000.

III. III. Resultados

III. III. I. Secuenciación y Ensamblaje

La secuenciación proporcionó 3,76 Gpb de datos crudos, de los cuales 3,14 Gpb pasaron el filtro de calidad (Tabla III. 1 y Figuras III.1 a III.4). En el análisis k-mer, la distribución de frecuencias 25-mer estimó un genoma de aproximadamente 40,6 Mpb con una cobertura de 60x (Figura III. 5). Utilizando un k=27, el genoma borrador se ensambló *de novo* en 5588 contigs y 414 scaffolds (>1000 pb; N50 498048 pb) que sumaron una longitud total de 35,18 Mpb con un contenido CG de 50,8 % (Tabla III. 2).

Tabla III. 1. Características las lecturas Illumina.

Biblioteca	Datos crudas		Datos filtrados	
	Lecturas	Bases	Lecturas	Bases
1	21462952	2167758152	17644638	1782108438
2	15802564	1596058964	13472916	1360764516

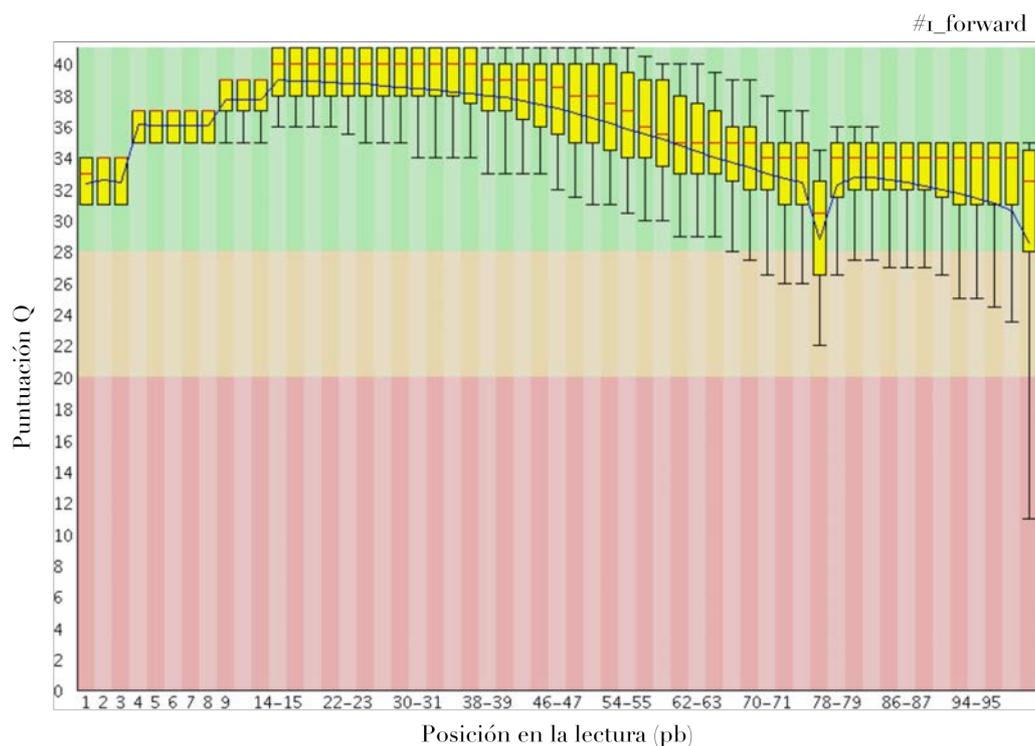


Figura III. 1. Diagrama de caja generado por el software FastQC 0.11.4 a partir de las lecturas filtradas #1_forward.

Capítulo III

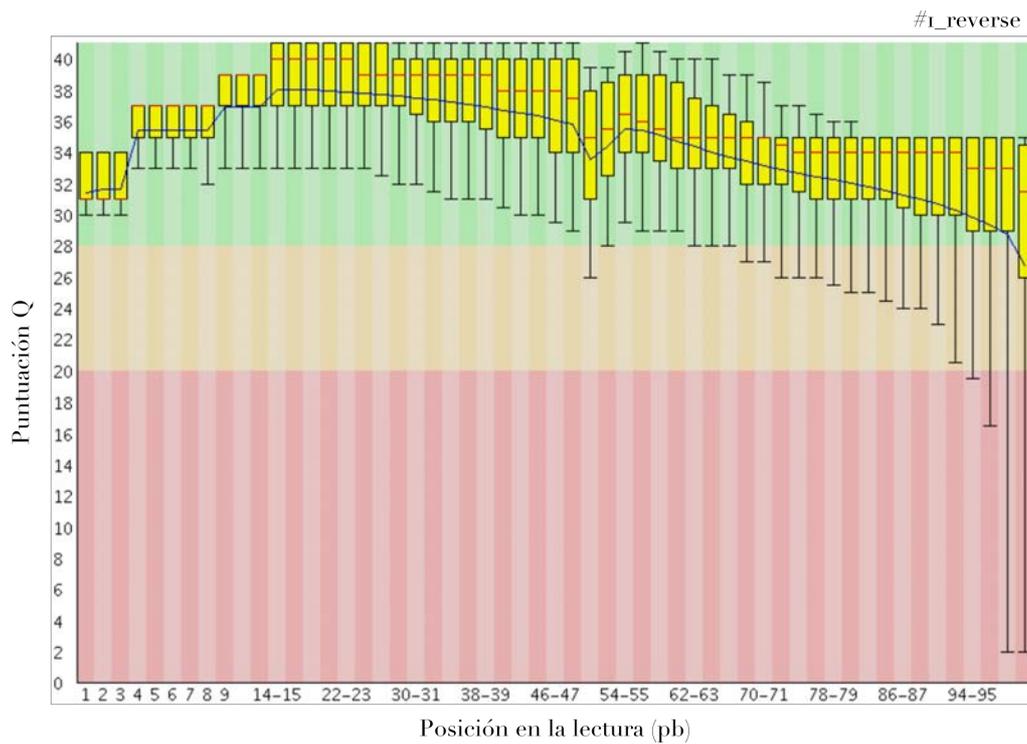


Figura III. 2. Diagrama de caja generado por el software FastQC 0.11.4 a partir de las lecturas filtradas #1_reverse.

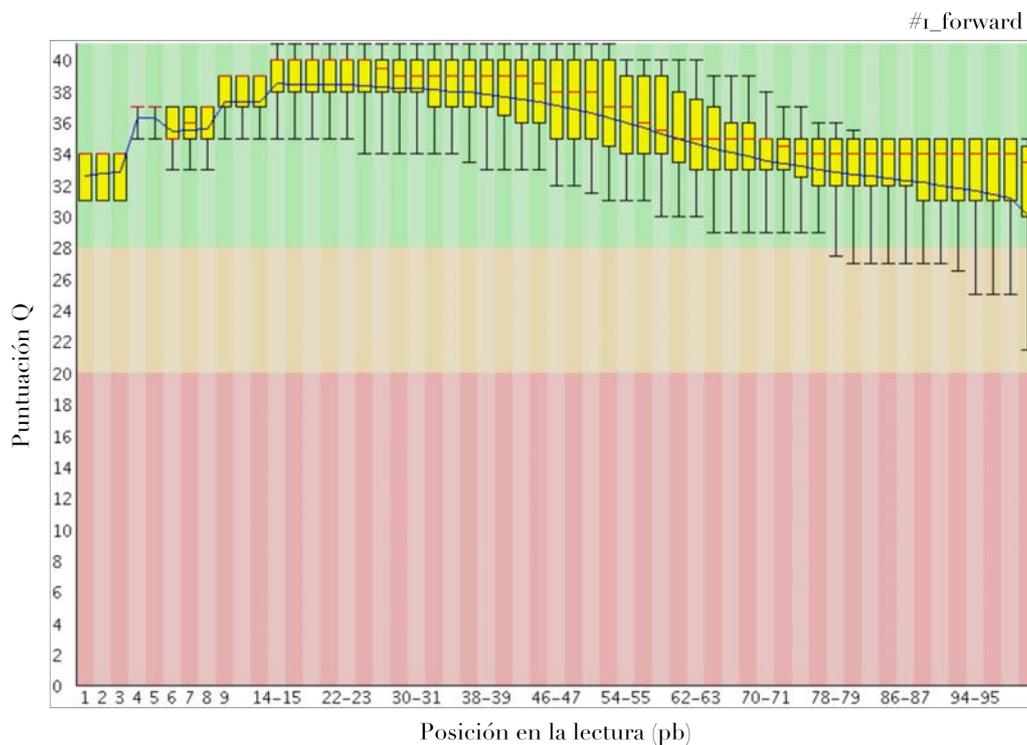


Figura III. 3. Diagrama de caja generado por el software FastQC 0.11.4 a partir de las lecturas filtradas #2_reverse.

Capítulo III

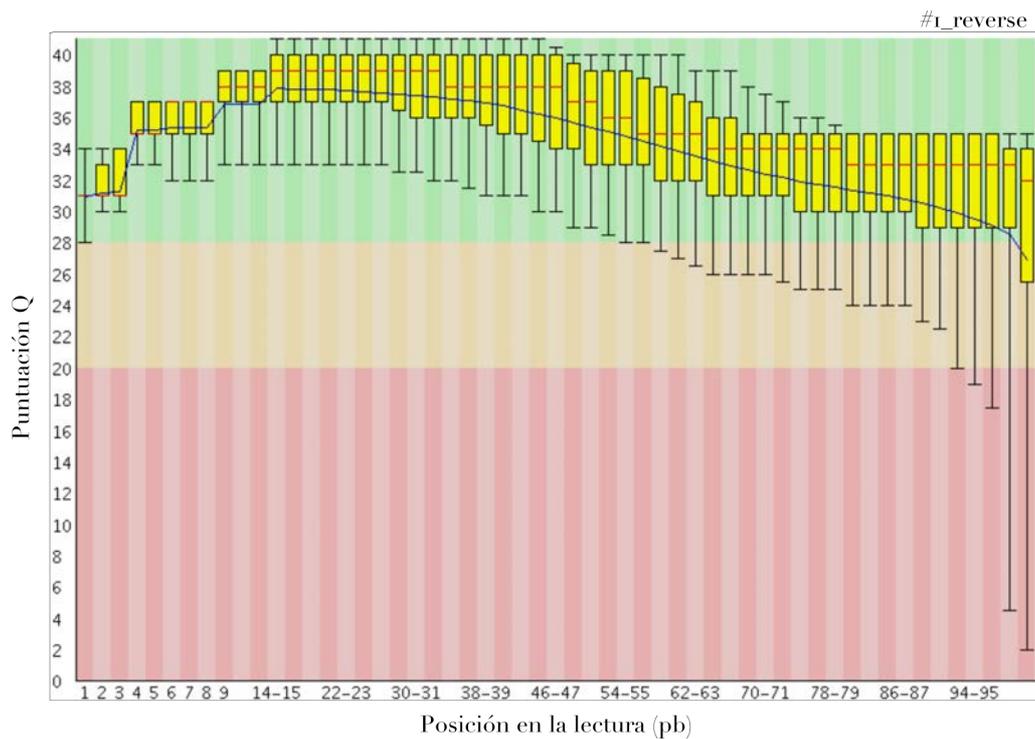


Figura III. 4. Diagrama de caja generado por el software FastQC 0.11.4 a partir de las lecturas filtradas #2_reverse.

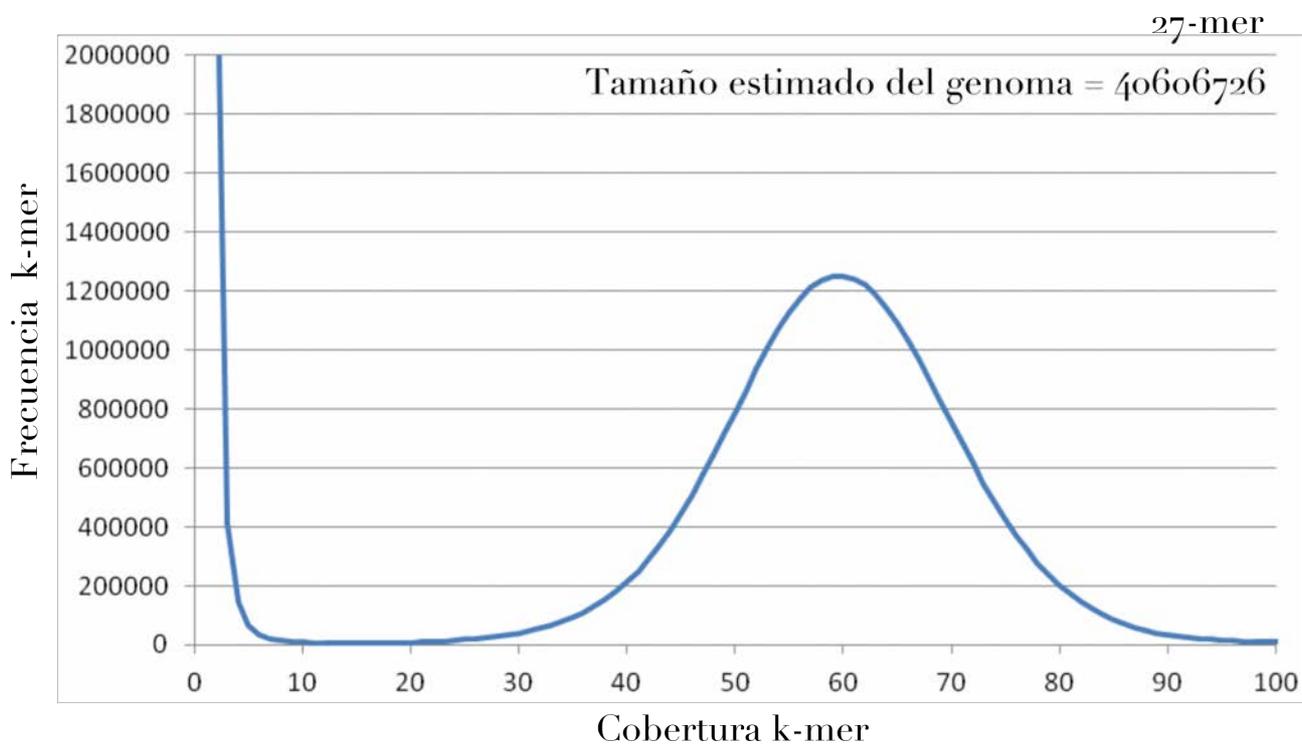


Figura III. 5. Histograma de frecuencias k-mer para k=27 calculado con el software Jellyfish 2.0.

Capítulo III

III. III. II. Anotación

La anotación estructural resultó en la predicción de 8997 genes codificantes de proteínas (Tabla III. 2). Los mismos fueron anotados funcionalmente a partir de especies, en su mayoría, estrechamente relacionadas filogenéticamente a *S. lycopersici* (Figura III. 6 y III. 7). De este modo, del total de genes codificantes de proteínas, 6885 fueron asignados con 26524 términos GO (42,8 % función, 40,7 % proceso y 16,5 % componente), 1526 con 1723 números EC y 8169 con 99069 códigos InterPro (Figuras III. 8 a III. 10). Además, se encontraron 94 ARNts y 16 ARNrs (Tabla III. 2).

Tabla III. 2. Características del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Característica	<i>Contigs</i>	<i>Scaffolds</i>
Número de secuencias	5588	419
Suma de secuencias (pb)	35011709	35187764
Nºo	36073	498048
Secuencia más larga (pb)	171373	1567143
Secuencia más corta (pb)	8	1004
Tamaño promedio de secuencia (pb)	6265	83980
Tamaño estimado (Mpb)		40,6
Cobertura estimada (veces)		60
Tamaño total (Mpb)		35,18
GC (%)		50,5
ORFs		8997
ARNts		94
ARNrs		44

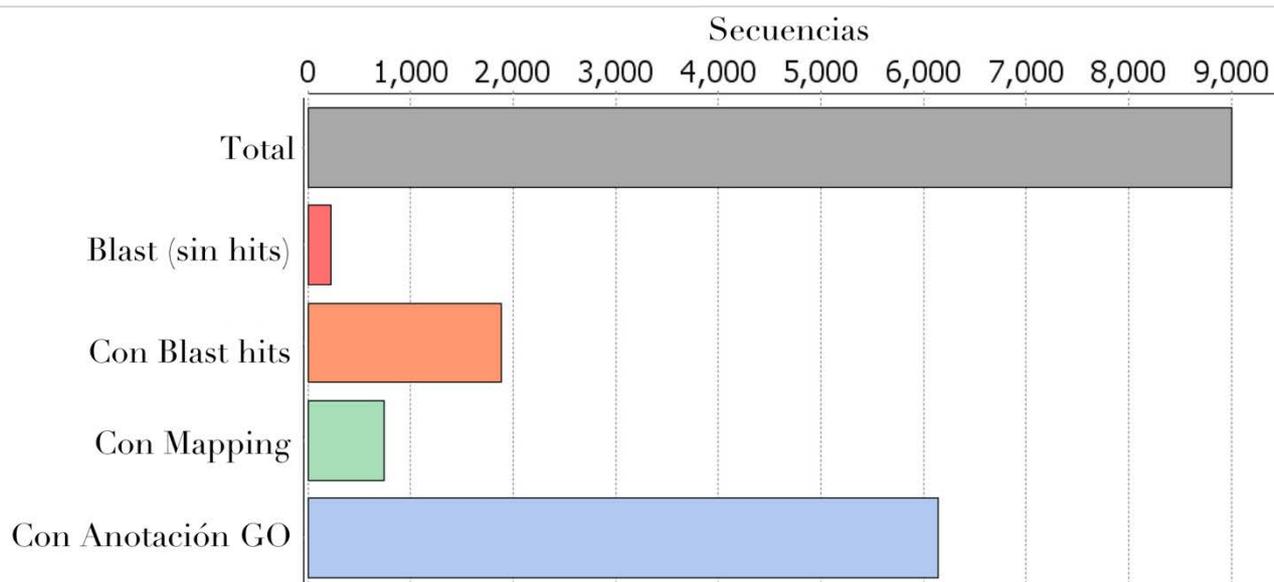


Figura III. 6. Resumen de la anotación funcional del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 utilizando el software Blast2GO Basic.

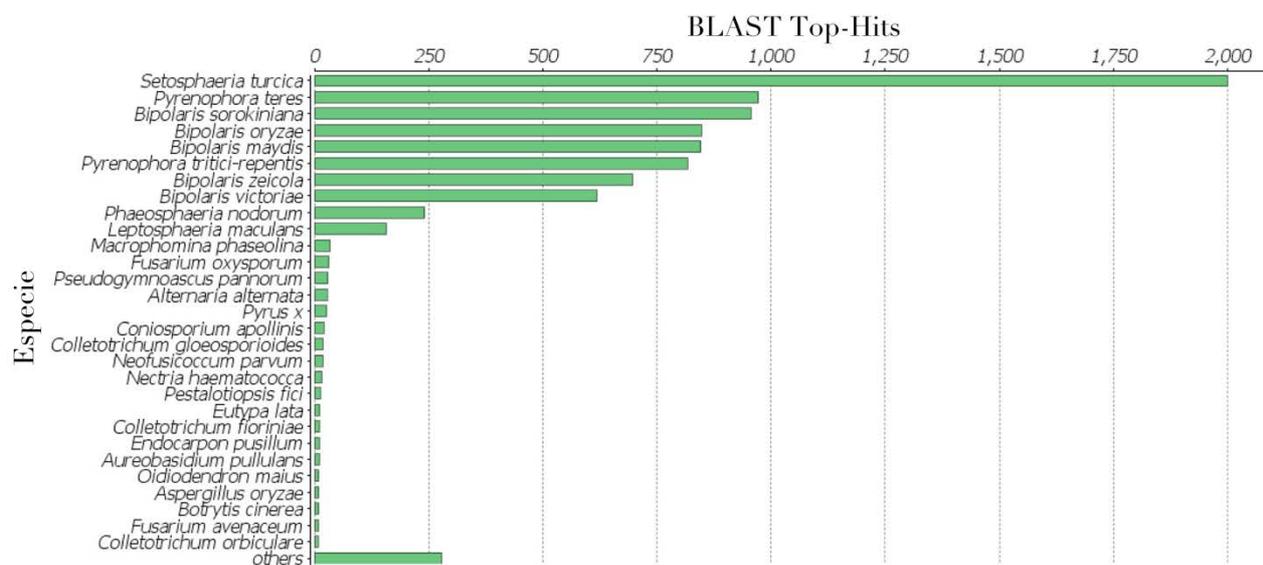


Figura III. 7. Distribución de especies utilizadas para la asignación de función (anotación funcional) basada en homología de secuencias utilizando el software Blast2GO Basic.

Capítulo III

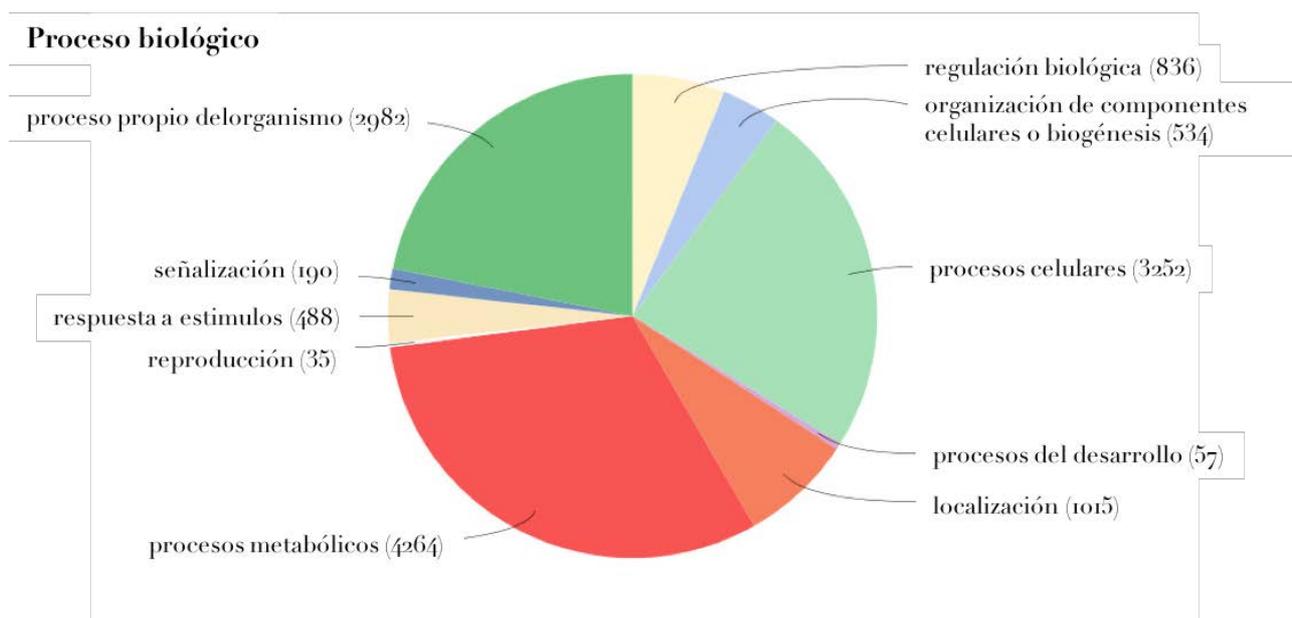


Figura III. 8. Distribución de los términos GO anotados en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 para el segundo nivel de la categoría de proceso biológico.

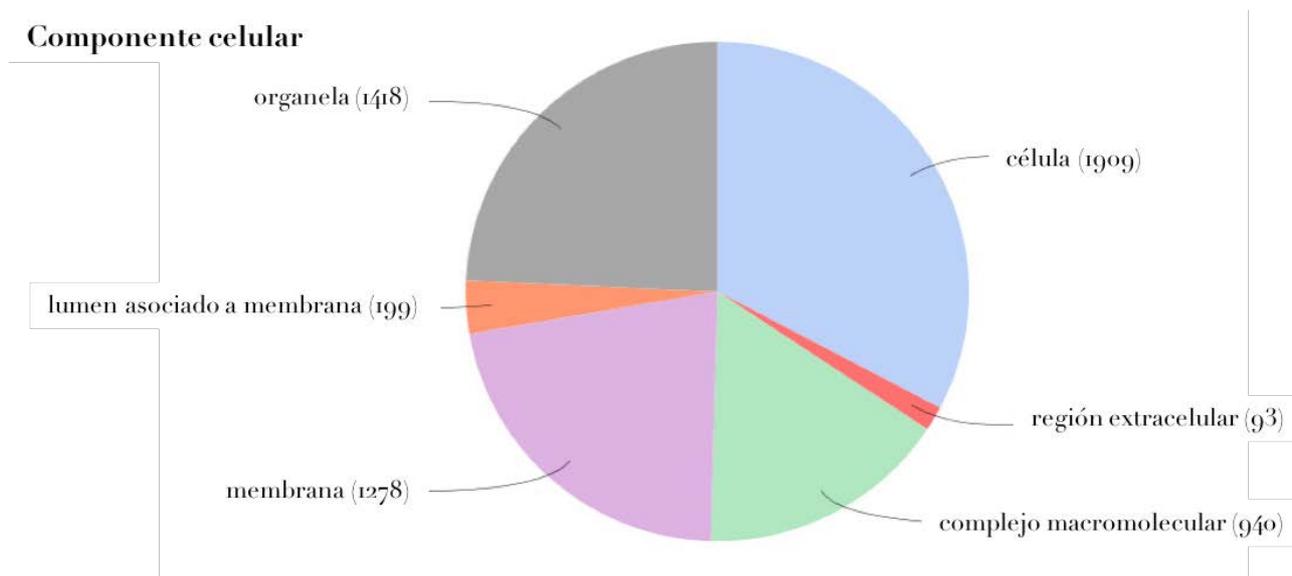


Figura III. 9. Distribución de los términos GO anotados en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 para el segundo nivel de la categoría de componente celular.

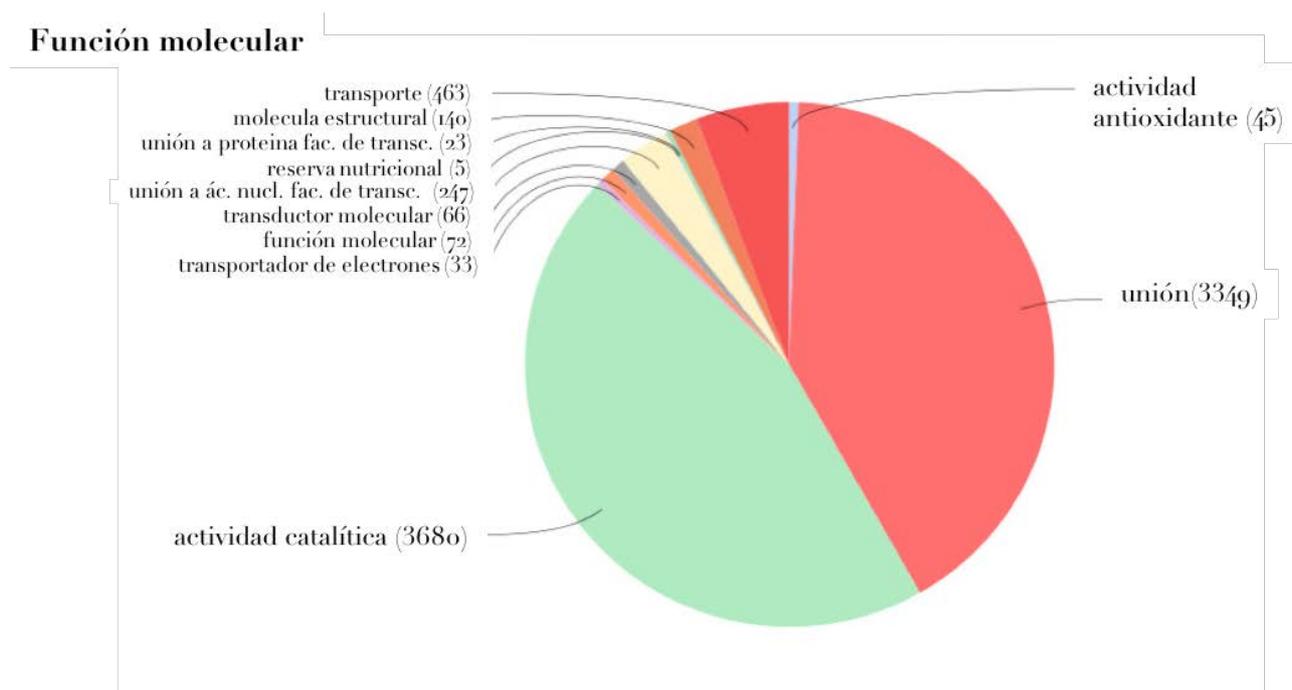


Figura III. 10. Distribución de los términos GO anotados en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 para el segundo nivel de la categoría de función molecular.

III. III. III. Completitud del Genoma Borrador

La evaluación de la completitud del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 mediante el software BUSCO v3 permitió encontrar 3118 genes ortólogos universales de referencia completos y de copia única; 6 genes ortólogos universales de referencia completos, pero duplicados; y 16 genes ortólogos universales de referencia fragmentados. Dado que el perfil BUSCO específico de linaje Pezizomycotina *odb9* está compuesto por 3156 genes ortólogos universales de referencia, por lo tanto, la completitud del espacio génico del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 es del 99 %.

Tabla III. 3. Resumen del análisis de completitud del genoma borrador.

Genes ortólogos universales de referencia	Conteo	Porcentaje (%) ^a
Completos	3124	99,0
Completos y únicos	3118	98,8
Completos y duplicados	6	0,2
Fragmentados	16	0,5
Faltantes	16	0,5

^a Sobre la base de un total de 3156 genes ortólogos universales de referencia del perfil BUSCO específico del linaje Pezizomycotina *odb9*.

III. IV. Discusión

El genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue ensamblado satisfactoriamente empleando un enfoque *paired-end* de SGS. Su publicación en la base de datos del GenBank el 24 de junio de 2015 lo convierte en el primer genoma borrador de una especie de *Stemphylium* disponible para toda la comunidad científica (Número de acceso al GenBank: LGLR00000000). El primero de junio de 2017, el Joint Genome Institute, del Departamento de Energía de los Estados Unidos, incorpora el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 a su portal de genómica fúngica MycoCosm, posibilitando así el acceso a diversos análisis de genómica comparativa a gran escala de manera simplificada (<https://genome.jgi.doe.gov/Stely1/Stely1.home.html>)¹⁹⁸. Esto último servirá como insumo para discutir, a continuación, sobre la calidad del ensamblaje y la anotación del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Como se ha señalado oportunamente, uno de los parámetros más usados para evaluar la contigüidad de un ensamblaje de genoma es el estadístico N50. Pero ¿cuál es el valor que debería tomar N50 para considerar un ensamblaje genómico aceptable, al menos en términos de contigüidad, y que justifique su anotación? Lo cierto es que no existe una regla para definirlo. Sin embargo, se podría considerar un ensamblaje de genoma aceptable si su valor de *contig* N50 es igual o mayor que el tamaño promedio de un gen. Esta consideración surge de razonar que, si el valor de *contig* N50 está alrededor de la longitud media del gen, entonces aproximadamente el 50 % de los genes estarán contenidos en un solo *contig*; estos genes completos, junto con los fragmentos del resto del genoma, proporcionarán un recurso considerable para un análisis posterior¹⁷⁵. Dado que el *contig* N50 del ensamblaje del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 es de 36073 pb y que el tamaño promedio de un gen en dicho genoma borrador es de 2128 pb, entonces se puede asumir que el ensamblaje en cuestión cumple con los requisitos mínimos de contigüidad para abordar su anotación. Aún así, el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue ensamblado en 5588 *contigs* y 419 *scaffolds* (>1000 pb). Por lo tanto, es un ensamblaje genómico fragmentado. Llamativamente, la calidad de las lecturas de SGS utilizadas para su construcción fue buena (Figuras III. 1 a III. 4) . Por otra parte, el genoma borrador mostró una completitud del 99 % (Tabla III. 3). A la luz de estas observaciones,

Capítulo III

cabe pensar que el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 es rico en regiones repetitivas de ADN no codificante. Esta hipótesis concuerda con lo observado en los genomas de varios hongos filamentosos fitopatógenos, en los que la presencia de múltiples secuencias repetitivas compromete la contigüidad de cualquier ensamblaje derivado de lecturas de tecnologías de SGS. Por lo tanto, este obstáculo podría superarse mediante TGS, las cuales son capaces de producir lecturas cuya longitud es incluso superior al de las repeticiones más grandes^{199 201}. Así, por ejemplo, se han secuenciado los genomas de varias especies de *Alternaria*. Sus primeros ensamblajes genómicos se basaron en tecnologías de SGS y, consecuentemente, resultaron altamente fragmentados^{202 205}. Luego, mediante la introducción de las tecnologías de TGS, particularmente PacBio RSII, se logró un gran avance al ensamblar el genoma de *A. alternata* en 33,5 Mpb distribuidos en tan solo 27 *scaffolds*²⁰⁶. Sin embargo, recientemente se logró ensamblar el genoma completo de *A. solani* a partir de la misma tecnología. Este ensamblaje resultó en 10 *contigs* (cromosomas), con telómeros en ambos extremos, y un tamaño combinado de 32,8 Mpb²⁰⁷.

El portal MycoCosm ofrece la posibilidad de navegar por un gran árbol filogenómico construido a partir de los más de los más de mil genomas fúngicos alojados en dicho portal (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/>)¹⁹⁸. Para su confección, todas estas especies de hongos se dividen según la taxonomía de NCBI en 3 grupos: Ascomycota, Basidiomycota y demás hongos. Cada uno de estos grupos contiene a pocas especies de los otros dos grupos que sirven de grupo externo. Los proteomas de las especies fúngicas del MycoCosm son agrupados mediante el algoritmo MCL²⁰⁸. En base a esto, se selecciona un número de grupos de genes de un solo miembro (idealmente, un gen por especie por grupo). Luego, estos grupos se alinean utilizando el software MAFFT y, posteriormente, se eliminan las posiciones no confiables utilizando el software Trimal^{209,210}. Todos estos alineamientos se concatenan en una súper matriz que es utilizada para inferir la filogenia mediante el software FastTree²¹¹. Finalmente, estos tres árboles son unidos por sus raíces para producir el árbol final de especies fúngicas (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/help/species-tree/index.creole>). Este análisis filogenómico exhaustivo resulta en un árbol que ubica a especies de *Cochliobolus* y a *Setosphaeria turcica* en un grupo hermano a *S. lycopersici* CIDEFI-216 con buen soporte de

Capítulo III

nodo. Destacablemente, *S. turcica* fue la especie más utilizada para la asignación de función basada en homología de secuencias (Figura III. 7). *Cochliobolus*, *Setosphaeria* y *Stemphylium*, a su vez, conforman el grupo hermano de *Alternaria alternata* y *A. brassicicola*, aunque este agrupamiento se sustenta sobre la base de un nodo de soporte moderado (Figura III.11). El análisis en cuestión ratifica la elección de *A. brassicicola* como modelo de entrenamiento para la predicción ORFs mediante el software Fgenesh. Además, sirve para establecer comparaciones en torno al genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 respecto al sus *taxa* más cercanos. Tomando en cuenta los 16 genomas de Pleosporaceae, el tamaño del ensamblaje del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 (35173254 pb) está en el rango de valores promedio para esta familia, $34150747 \text{ pb} \pm 3420714 \text{ pb}$. Sin embargo, su valor real fue estimado en 40,6 Mpb según el análisis de k-mer; aproximándose al límite superior en Pleosporaceae impuesto por los 43 Mpb del genoma borrador de *Setosphaeria turcica* Et28A. Lamentablemente, la información disponible no es suficiente para atribuir la diferencia observada a un desacierto del análisis de k-mer o a alguna falla en el ensamblaje del genoma. Sin embargo, el análisis de completitud del genoma, llevado a cabo mediante el software BUSCO, dio cuenta de un genoma 99 % completo. Este resultado ha de ser interpretado con cautela, puesto que dicho análisis da cuenta de la completitud del espacio génico *stricto sensu*. Pero si se asume la distribución uniforme de los genes ortólogos universales de referencia y de copia única a lo largo del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216, entonces es válido trasladar tal valor de completitud a la secuencia genómica total.

Capítulo III

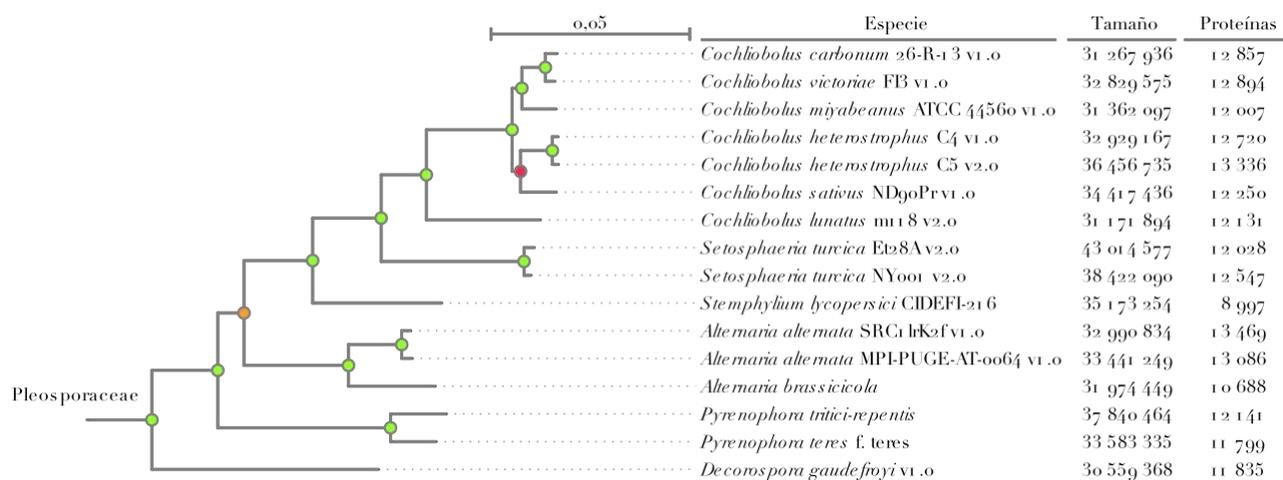


Figura III.11. Clado para la familia Pleosporaceae del árbol de especies (>1000) del portal MycoCosm. Los colores en los nodos indican los valores de soporte de FastTree: verde para 1; naranja para mayor o igual que 0,70; rojo para menor que 0,70. La barra de escala indica número de sustituciones por sitio. Fuente: <https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/help/species-tree/index.creole>.

Otro aspecto importante para tener en cuenta en un genoma es la cantidad de genes anotados. El número de genes codificantes de proteínas predichos en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue de 8997. Este número es considerablemente inferior al valor promedio de 12385 ± 713 de los genomas borradores de otros miembros de la familia Pleosporaceae del MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/species-tree/tree;bDkHyE?organism=Pleosporaceae>). La mayoría de estos genomas de Pleosporaceae fueron anotados a través del canal de anotación del Joint Genome Institute (*JGI annotation pipeline*). Este canal integra varias herramientas para la predicción de genes codificantes de proteínas, tanto *ab initio* como basadas en homología^{179,198}. Por lo tanto, no es de sorprender que el canal de anotación del JGI prediga grandes conjuntos de genes con el mejor soporte. Por ejemplo, mientras que los softwares Fgenesh, GenMark y EuGene predijeron 8409, 9609 y 11547 estructuras génicas, respectivamente, en el genoma del basidiomiceto *Heterobasidion annosum*, el canal de anotación del JGI predijo 12290 modelos de genes. Asimismo, mientras que el canal de anotación MAKER predijo 9949 estructuras génicas en el genoma del basidiomiceto *Dichomitus squalens*, el canal de anotación del JGI predijo 12290 modelos de genes (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/benchmarks.jsf>). La elección del software Fgenesh para realizar la predicción de genes en la secuencia del genoma borrador de *S.*

Capítulo III

lycopersici CIDEFI-216 se fundamentó en que el mismo era el único programa *ab initio* de uso (parcialmente) gratuito que disponía de un modelo de entrenamiento precargado de un organismo filogenéticamente cercano a *S. lycopersici*, específicamente *A. brassicicola*. Interesantemente, el canal de anotación del JGI encontró 10688 genes codificantes de proteínas en el genoma de *A. brassicicola*; el número más bajo para los representantes de la familia Pleosporaceae presentes en MycoCosm, después del de *S. lycopersici* CIDEFI-216 (<https://genome.jgi.doe.gov/Altbr1/Altbr1.info.html>). Por otra parte, cabe notar que la falta aparente de genes (predichos) en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 no respondería a la carencia de una porción considerable de su secuencia producto de un ensamblaje incompleto, puesto que, como se discutió en el párrafo anterior, el genoma borrador en cuestión contiene al 99 % del espacio génico esperado para un genoma completo. Por todo lo expuesto, resulta evidente la necesidad de mejorar la predicción génica de esta primera versión del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Para ello, las futuras versiones de dicho genoma deberán de valerse de múltiples herramientas de predicción génica, con énfasis los programas de anotación estructural basados en evidencia experimental.

Capítulo IV: Genoma Mitocondrial de *Stemphylium lycopersici*

CIDEFI 216: Caracterización, Taxonomía y Evolución

IV. I. Introducción

Las mitocondrias son orgánulos semiautónomos presentes en la mayoría de las células eucarióticas y son los principales responsables de una variedad de procesos celulares cruciales, como la producción de energía, el crecimiento celular y la apoptosis^{212,213}. Se cree que descienden de una α -proteobacteria endosimbiótica que fue fagocitada por una célula hospedadora protoeucariota hace más de mil millones de años, en un evento que dio lugar a una de las relaciones simbióticas más extremas y efectivas en la naturaleza. Durante esta coevolución, el genoma del antiguo endosimbionte ha sufrido una notable reducción de tamaño ya que gran parte de su material genético se ha transferido al hospedador o se ha perdido^{214,215}.

En general, los ADN mitocondriales fúngicos son pequeñas moléculas de ADN bicatenario con una organización genética compacta y presentes en múltiples copias en cada célula. La topología real que estas moléculas adoptan *in vivo* está bajo debate; mientras que algunos autores asumen una conformación monomérica circular, otros autores sugieren una estructura concatémica lineal que, una vez ensamblado, también conduciría a una molécula cuyo mapa es circular. De hecho, dada la posibilidad que el ADN mitocondrial de la mayoría de las especies fúngicas se replique por el mecanismo de círculo rodante, también se propuso que su arquitectura real es una combinación de repeticiones circulares y lineales. Los genomas mitocondriales fúngicos generalmente albergan 14 genes conservados que codifican proteínas involucradas en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, incluyendo el apocitocromo b (*cob*), tres subunidades de la citocromo c oxidasa (*cox1*, *cox2*, *cox3*), siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*) y tres subunidades de la ATP sintasa (*atp6*, *atp8*, *atp9*). Respecto a estos últimos, cabe mencionar la particular ausencia de los genes *atp8* y *atp9* en los genomas mitocondriales de los Pleosporales conocidos a la fecha. Asimismo, los genomas mitocondriales fúngicos contienen los genes correspondientes a las subunidades pequeña y grande del ARN ribosomal (ARNr) (*rns* y *rnl*, respectivamente) y un conjunto de genes de ARN de transferencia (ARNt). Otros genes que se encuentran ocasionalmente dentro de los genomas mitocondriales de hongos son aquellos que codifican a la proteína ribosomal S3 (RPS3, codificada por *rps3*) y a la

Capítulo IV

subunidad de ARN de la ARNasa P mitocondrial (*rnpB*). Por último, pero no menos importante, los genomas mitocondriales fúngicos también se caracterizan por portar un número variable de intrones del grupo I y del grupo II que pueden albergar genes de endonucleasas homing con motivos LAGLIDADG o GIY-YIG^{214 218}. Las endonucleasas homing son elementos genéticos móviles que codifican endonucleasas de ADN específicas de sitio, pero tolerantes a cierta degeneración, cuya actividad catalítica promueve su propia propagación mediante la introducción de roturas de doble cadena en el ADN en alelos que carecen de su secuencia codificante y mediante la posterior reparación de estas rupturas por recombinación homóloga utilizando al alelo que contiene endonucleasa como molde^{219 221}. Este mecanismo de propagación puede resultar en la inserción, eliminación o mutación de secuencias de ADN²²². De hecho, los intrones móviles y las endonucleasas homing representan una de las principales fuentes de variabilidad dentro de los genomas mitocondriales fúngicos^{217,223,224}.

Los genomas mitocondriales son una valiosa fuente de información para estudiar la biología evolutiva y la sistemática en eucariotas. La razón de esto es que albergan los genes del sistema de fosforilación oxidativa y transporte de electrones, los cuales son ampliamente conservados, y que el ADN mitocondrial evoluciona más rápido que el ADN nuclear, por lo que permiten el desarrollo de un análisis filogenético robusto^{225,226}. Tanto es así que se han utilizado con éxito en la resolución de filogenias poco claras^{227,228}. Además, el tamaño relativamente pequeño, la topología de mapeo circular y la naturaleza de múltiples copias de los genomas mitocondriales facilitan su secuenciación y ensamblaje completo y, por lo tanto, su estudio como entidad. Este último aspecto es de gran importancia, porque una secuencia completa del genoma mitocondrial no solo revela el contenido, sino que también proporciona información adicional sobre la organización de los genes, permitiendo así la evaluación de reordenamientos estructurales mediante estudios comparativos^{214,229,230}. Además, el alto polimorfismo que se encuentra con frecuencia dentro de intrones o regiones intergénicas de genes mitocondriales conservados hace que estas secuencias sean útiles para el estudio de la diversidad genética entre poblaciones o dentro de ellas^{231 233}. Los genomas mitocondriales también son importantes en el control de fitopatógenos, ya que son el blanco de las estrobilurinas, fungicidas que evitan la síntesis de ATP al bloquear la transferencia de electrones en el

Capítulo IV

sitio de oxidación de quinol por el complejo citocromo *bc₁*. Tal es así que la resistencia de varios hongos patógenos de plantas a las estrobilurinas ha sido asociada con mutaciones en el gen mitocondrial *cob*^{234,235}.

Casi todos los proyectos de SGS y todos los proyectos de TGS aportan la información necesaria para el ensamblaje de un genoma mitocondrial (promedio) completo. Sin embargo, en los primeros, el genoma mitocondrial tiene un valor agregado. Esta valoración no responde a la esencia de la molécula en sí, que será la misma según un método u otro, sino a su contexto. Específicamente, lo que lo vuelve aún más atractivo es el hecho de que en un ensamblaje fragmentado, propio de tecnologías de SGS, el *contig* mitocondrial suele ser el único que existe como tal entidad en la naturaleza. Por lo tanto, considerando lo expuesto en el párrafo anterior, en un proyecto de SGS, el genoma mitocondrial es un excelente candidato para estudios de (mito)genómica comparativa. En línea con esto, el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 podría ser ensamblado a partir de su proyecto de SGS y ser utilizado para arrojar luz sobre muchos aspectos de la biología evolutiva de este fitopatógeno, en particular, y del género *Stemphylium*, en general.

Capítulo IV

IV. I. I. Hipótesis del Capítulo

- I. El ensamblaje *de novo* del genoma de *S. lycopersici* a partir de lecturas *paired-end* de tecnologías de secuenciación de segunda generación produce un *contig* con topología circular que corresponde al genoma mitocondrial completo.
- II. El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* contiene 12 genes conservados que intervienen en la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa: *atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*. Los genes *atp8* y *atp9* están contenidos en su genoma nuclear. Asimismo, el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* contiene a los genes ribosomales *rns* y *rnl*, y a todos los genes ARNt necesarios para decodificar los codones de los aminoácidos requeridos para la síntesis de las proteínas que codifica.
- III. El orden y la orientación de los genes del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* difiere respecto a los genomas mitocondriales de los Pleosporales *D. pinodes*, *P. nodorum* y *S. bambusicola*.
- IV. La reconstrucción filogenética de Pezizomycotina a partir de los 12 genes mitocondriales conservados (*atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*) conduce a un filograma cuyos nodos están bien soportados y cuya topología concuerda con la sistemática actual del subphylum.

IV. I. II. Objetivos del Capítulo

- I. Ensamblar *de novo* el genoma mitocondrial completo de *S. lycopersici* CIDEFI-216.
- II. Realizar la anotación génica estructural y funcional.
- III. Caracterizar el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 y utilizarlo como herramienta de estudio de biología evolutiva.
- IV. Realizar un análisis filogenético del subphylum Pezizomycotina utilizando los 12 genes mitocondriales conservados: *atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*.

Capítulo IV

IV. II. Materiales y Métodos

IV. II. I. Ensamblaje *De Novo*

Dado que la mayoría de las células eucariotas contienen múltiples mitocondrias, cada una con varias copias de su genoma, se espera que la fracción de lecturas provenientes del genoma mitocondrial este sobrerrepresentada en comparación con la del genoma nuclear. Por lo tanto, para el ensamblaje *de novo* del genoma mitocondrial solo se utilizó un subconjunto de 4000000 lecturas filtradas. El genoma mitocondrial se ensambló utilizando el ensamblador Geneious *de novo* assembler, provisto en el software Geneious 9.1.2, utilizando la opción de baja sensibilidad y permitiendo la circularización de contigs con extremos coincidentes²³⁶. Al momento de la escritura de la presente tesis, este software es uno de los únicos capaces de circularizar contigs a medida que los ensambla, opción de gran utilidad para el ensamblaje de plásmidos, mitocondrias y cloroplastos. El procedimiento se repitió usando diferentes conjuntos de 4000000 lecturas para verificar la recuperación de la misma molécula de ADN mitocondrial.

IV. II. II. Anotación Estructural y Funcional de Genes

La anotación de genes se realizó usando el software especializado MFannot (<http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl>) utilizando la Tabla de traducción 4 del NCBI. Las predicciones de MFannot se verificaron individualmente para confirmar los límites de los genes, así como los límites intrón-exón, alineando los genes predichos con sus ortólogos en especies fúngicas estrechamente relacionadas. Las anotaciones de los ARNt fueron confirmadas por tRNAscan-SE 1.21¹⁹¹. La anotación funcional de los ORFs se complementó con el software Blast2GO Basic¹⁸⁰. Se creó un mapa físico del genoma mitocondrial con el software OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) v 1.2, el cual fue posteriormente modificado con el software Inkscape 0.91 (<http://inkscape.org/>)²³⁷.

IV. II. III. Secuencias Repetitivas

Las secuencias repetitivas se identificaron usando el software Vmatch (<http://www.vmatch.de/>). Se buscaron tanto las repeticiones directas como las invertidas

Capítulo IV

(palíndromos) extendiendo una semilla de 30 nucleótidos de longitud en ambas direcciones, permitiendo coincidencias, desajustes, inserciones y deleciones con un valor X-drop valor para editar la extensión de distancia de 3. La detección se restringió a secuencias repetitivas de al menos 30 nucleótidos de longitud y con una identidad de coincidencia mínima del 80 %. Después del análisis, las repeticiones superpuestas se eliminaron manualmente. Un mapa físico de las secuencias repetitivas en el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 se creó con Circos y se modificó con Inkscape 0.91 (<http://inkscape.org/>)²³⁸.

IV. II. IV. Mitogenómica Comparativa

La extensión de los reordenamientos estructurales en los genomas mitocondriales de *S. lycopersici* CIDEFI-216 y las especies de Pleosporales cuyos genomas mitocondriales estaban disponibles públicamente en la base de datos del genoma del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/>) a finales de diciembre de 2016, concretamente *Didymella pinodes* (número de acceso GenBank KT946597), *Parastagonospora nodorum* (número de acceso GenBank EU053989²³⁹) y *Shiraia bambusicola* (número de acceso GenBank KM382246²⁴⁰), se evaluó mediante una alineación múltiple usando Mauve²⁴¹. Para fines comparativos, el primer residuo de *rnl* se estableció arbitrariamente como el origen de todas las secuencias mitocondriales. Mauve se ejecutó utilizando la configuración predeterminada y su resultado fue posteriormente modificado con Inkscape 0.91 (<http://inkscape.org/>).

IV. II. V. Filogenia

La filogenia del subphylum Pezizomycotina se infirió a partir de las secuencias de aminoácidos concatenados de 12 proteínas codificadas por los genes conservados mitocondriales implicados en la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones, a saber: *atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*. Este conjunto de datos excluyó los productos de los genes *atp8* y *atp9*, ya que estos no son comunes en todo el subphylum. El análisis incluyó a todas las especies de Pezizomycotina cuyo genoma mitocondrial contenía a los 12 genes mitocondriales conservados mencionados

Capítulo IV

anteriormente disponibles públicamente en la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/>) a finales de diciembre de 2016. Siguiendo este criterio, un representante del subphylum Taphrinomycotina (*Pneumocystis carinii*) y dos representantes del subphylum Saccharomycotina (*Yarrowia lipolytica* y *Komagataella pastoris*) se seleccionaron como grupo externo. Por lo tanto, el análisis involucró un total de 85 especies representando 54 géneros (Tabla IV. 1). Las secuencias de aminoácidos se concatenaron y se alinearon con MUSCLE en Geneious 9.1.2^{236,242}. La alineación resultante se seleccionó automáticamente con el software Gblocks 0.91b utilizando la configuración predeterminada, excepto por la longitud mínima de un bloque que se estableció en 2²⁴³. La selección del modelo de evolución de proteína más adecuado se llevó a cabo con el software ProtTest 3.2 utilizando el Criterio de información de Akaike^{127,244}. La filogenia se reconstruyó utilizando el criterio de máxima verosimilitud en PhyML 3.0 e inferencia bayesiana en MrBayes 3.2^{129,245}. El soporte del árbol de máxima verosimilitud se evaluó a través de 1000 réplicas de *bootstrap*. Para el análisis bayesiano, dos cadenas Markov Monte Carlo con acoplamiento de Metropolis con cuatro cadenas (una fría y tres calientes) se ejecutaron a través de un millón de generaciones. Los árboles en cada cadena se muestrearon cada 250^a generación, los primeros 25 % árboles fueron descartados como quemaduras y las probabilidades posteriores se determinaron a partir de los árboles restantes. Los árboles filogenéticos se editaron con el software FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e Inkscape 0.91 (<http://inkscape.org/>).

Capítulo IV

Tabla II. 4. Especies adicionales usadas en el análisis filogenético mitocondrial.

Especie	Cepa/Aislado	Genoma mitocondrial ^a
<i>Acremonium chrysogenum</i>	ATCC 11550	KF757229
<i>Acremonium fuci</i>	3a34	KR864757
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	SD	KF545917
<i>Arthroderma obtusum</i>	ATCC 42129	FJ385029
<i>Arthroderma otae</i>	ATCC 36299	FJ385030
<i>Arthroderma uncinatum</i>	ATCC 28454	FJ385028
<i>Aspergillus flavus</i>	TCM2014	KP725058
<i>Aspergillus kawachii</i>	IFO 4308	AP012272
<i>Aspergillus niger</i>	N909	DQ207726
<i>Aspergillus tubingensis</i>	932	DQ217399
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb13	EU371503
<i>Beauveria caledonica</i>	fh11	KT201150
<i>Beauveria malawiensis</i>	k89	KT201147
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	C1010	KF297618
<i>Cairneyella variabilis</i>	VPRI 42388	KU168424
<i>Ceratocystis cacaofunesta</i>	C1593	JX185564
<i>Chrysosporthe austroafricana</i>	CMW2113	KT380883
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	CMW 10028	KT380885
<i>Chrysosporthe deuterocubensis</i>	CMW 8650	KT380884
<i>Cladophialophora bantiana</i>	SD	KX257489
<i>Colletotrichum acutatum</i>	KCo5	KR349346
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	SD	KU375885
<i>Colletotrichum graminicola</i>	M1.001	CM001021
<i>Colletotrichum lupini</i>	CBS 119142	KT918406
<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	SD	KU196965
<i>Cordyceps brongniartii</i>	IMBST95031	EU100743
<i>Cordyceps militaris</i>	EFCC-C2	KF432176
<i>Diaporthe longicolla</i>	ATCC 60325	KP137411
<i>Didymella pinodes</i>	165/T	KT946597
<i>Epichloe festucae</i>	AR5	KX066186
<i>Epichloe typhina</i>	E8	KX066185
<i>Epidermophyton floccosum</i>	ATCC 26072	AY916130
<i>Exophiala dermatitidis</i>	NIH/UT8656	CM001238
<i>Fusarium circinatum</i>	MRC 7870	JX910419
<i>Fusarium culmorum</i>	CBS 139512	KP827647
<i>Fusarium gerlachii</i>	CBS 123666	KM486533
<i>Fusarium mangiferae</i>	SD	KP742838

Capítulo IV

Tabla IV. 1. (Continuación).

Especie	Cepa/Aislado	Genoma mitocondrial ^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	F11	AY945289
<i>Fusarium solani</i>	mpVI	JN041209
<i>Gibberella moniliformis</i>	7600	JN041210
<i>Glarea lozoyensis</i>	74030	KF169905
<i>Hirsutella minnesotensis</i>	3608	KR139916
<i>Hirsutella rhossiliensis</i>	USA-87-5	KU203675
<i>Hypomyces aurantius</i>	SD	KU666552
<i>Ilyonectria destructans</i>	2007/P/476	KU881725
<i>Komagataella pastoris</i>	CBS 7435	FR839632
<i>Lecanicillium muscarium</i>	C42	AF487277
<i>Lecanicillium saksenae</i>	CGMCC5329	KT585676
<i>Madurella mycetomatis</i>	mm55	JQ015302
<i>Nectria cinnabarina</i>	5175	KT731105
<i>Neurospora crassa</i>	OR74A	KC683708
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Pb18	AY955840
<i>Peltigera dolichorrhiza</i>	SD	KT946595
<i>Peltigera malacea</i>	DB3992	JN088164
<i>Peltigera membranacea</i>	LA-31632	JN088165
<i>Penicillium digitatum</i>	pdo1	HQ622809
<i>Penicillium nordicum</i>	UASWS BFE487	KR952336
<i>Penicillium polonicum</i>	NI	KU530219
<i>Penicillium roqueforti</i>	UASWS P1	KR952335
<i>Penicillium solitum</i>	20-01	JN696111
<i>Pestalotiopsis fici</i>	W106-1	KX870077
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	SN15	EU053989
<i>Phialocephala subalpina</i>	UAMH:11012	JN031566
<i>Pneumocystis carinii</i>	SD	JX499145
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	NN050741	KR055655
<i>Pyronema omphalodes</i>	CBS 100304	KU707476
<i>Rhynchosporium agropyri</i>	04CH-RAC-A.6.1	KF650572
<i>Rhynchosporium commune</i>	UK7	KF650573
<i>Rhynchosporium orthosporum</i>	04CH-BAR-A.1.1.3	KF650574
<i>Rhynchosporium secalis</i>	02CH4-6a.1	KF650575
<i>Sclerotinia borealis</i>	F-4128	KJ434027
<i>Shiraia bambusicola</i>	zzz816	KM382246
<i>Sporothrix schenckii</i>	ATCC 10268	AB568599
<i>Talaromyces marneffei</i>	MP1	AY347307

Capítulo IV

Tabla IV. 1. (Continuación).

Especie	Cepa/Aislado	Genoma mitocondrial ^a
<i>Tolypocladium ophioglossoides</i>	L2	KX455872
<i>Trichoderma asperellum</i>	Bo5	KR952346
<i>Trichoderma gamsii</i>	KUC1747	KU687109
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	BMU 03104	FJ385027
<i>Trichophyton rubrum</i>	BMU 01672	FJ385026
<i>Verticillium dahliae</i>	76	DQ351941
<i>Verticillium nonalfalfae</i>	SD	KR704425
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CLIB89(W29)	CP017559
<i>Zasmidium cellare</i>	ATCC 36951	KX011536
<i>Zymoseptoria tritici</i>	IPO323	EU090238

^a Número de acceso al GenBank.

SD: Sin datos.

IV. II. VI. Disponibilidad de Datos

El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue depositado en las bases de datos DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) y GenBank bajo el número de acceso KX453765.

IV. III. Resultados

IV. III. I. Características Generales

El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue ensamblado *de novo* en una única molécula circular de ADN de doble cadena de 75911 pb, con una cobertura media de 117,74 (cobertura mínima de 24, cobertura máxima de 200). Contiene un conjunto de 37 genes que codifican proteínas, 2 genes de ARNr (*rns* y *rnl*) y 28 genes de ARNt. Los genes se transcriben a partir de ambas hebras de ADN, siendo el 62,9 % ADN no codificante. Con un contenido de GC del 29,6 %, alcanza el límite superior de los valores normales para mitocondrias fúngicas ($24,4 \pm 7,3$ %, estimado de todos los genomas mitocondriales fúngicos depositados en la base de datos del Genoma del NCBI en enero de 2016). El contenido de GC de los genes que codifican proteínas es bastante similar al contenido general de GC (29,1 %), sin embargo, se encuentran desviaciones considerables en el contenido de GC de los ARNrs y los genes de ARNts, alcanzando 35 % y 39 %, respectivamente (Figura IV. 1, Tablas IV. 1 y IV. 2).

Tabla IV. 1. Características del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Característica	Valor
Tamaño del genoma (pb)	75911
Contenido GC (%)	29,6
No. de genes codificantes de proteínas	37
Contenido GC en genes codificantes de proteínas (%)	29,1
No. de ARNrs	2
Contenido GC en genes ARNrs (%)	35
No. de ARNts	28
Contenido GC en genes ARNts (%)	39,6
No. de intrones	15
Regiones intragénicas (%)	30,2
Regiones intergénicas (%)	32,7
Regiones repetitivas (%)	5,6

Capítulo IV

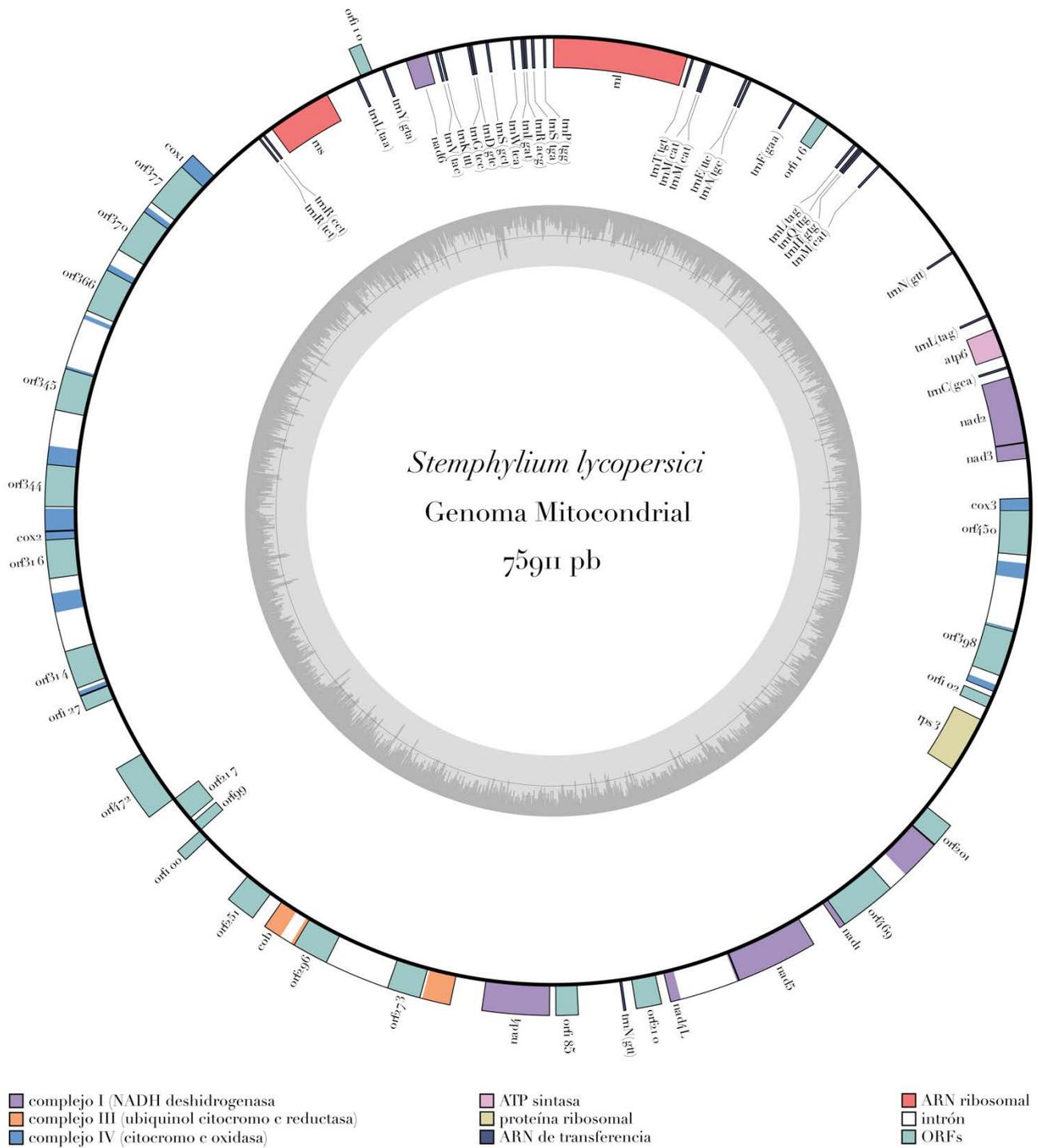


Figura IV. 1. Mapa circular del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Los genes están representados por cuadros coloreados de acuerdo con su función. Los cuadros interiores representan genes que se transcriben en el sentido horario y los recuadros externos muestran genes transcritos en sentido antihorario. El gráfico interno muestra el contenido del GC, con la línea negra que marca el 50 %. Las posiciones exactas de los genes se indican en la Tabla IV. 2. El mapa físico se creó con OGDRAW.

Capítulo IV

Tabla IV. 2. Organización del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Gen	Posición inicial	Posición terminal	Tamaño	Orientación
<i>rnl</i>	1	3459	3459	forward
<i>trnT(tgt)</i>	3559	3629	71	forward
<i>trnM(cat)</i>	3937	4007	71	forward
<i>trnM(cat)</i>	4013	4085	73	forward
<i>trnE(ttc)</i>	5014	5086	73	forward
<i>trnA(tgc)</i>	5119	5190	72	forward
<i>trnF(gaa)</i>	6366	6438	73	forward
<i>orf116</i>	7077	7427	351	forward
<i>trnL(tag)</i>	8240	8322	83	forward
<i>trnQ(ttg)</i>	8393	8464	72	forward
<i>trnH(gtg)</i>	8470	8543	74	forward
<i>trnM(cat)</i>	9059	9130	72	forward
<i>trnN(gtt)</i>	11959	12029	71	forward
<i>trnL(tag)</i>	13797	13869	73	forward
<i>atp6</i>	14170	14943	774	forward
<i>trnC(gca)</i>	15216	15287	72	forward
<i>nad2</i>	15490	17220	1731	forward
<i>nad3</i>	17221	17643	423	forward
<i>cox3</i>	18638	23719	5082	forward
<i>orf450</i>	18971	20323	1353	forward
<i>orf398</i>	22090	23286	1197	forward
<i>orf102</i>	23847	24155	309	forward
<i>orf490</i>	24489	25961	1473	forward
<i>orf201</i>	27104	27709	606	reverse
<i>nad1</i>	27709	30731	3023	reverse
<i>orf469</i>	29178	30587	1410	reverse
<i>nad5</i>	31440	33431	1992	reverse
<i>nad4L</i>	33431	35147	1717	reverse
<i>orf210</i>	35347	35979	633	reverse
<i>trnN(gtt)</i>	36210	36280	71	reverse
<i>orf185</i>	37345	37902	558	reverse
<i>nad4</i>	38034	39671	1638	reverse
<i>cob</i>	40418	45259	4842	reverse
<i>orf273</i>	41156	41977	822	reverse
<i>orf296</i>	43538	44428	891	reverse
<i>orf251</i>	45585	46340	756	reverse
<i>orf100</i>	47708	48010	303	reverse

Tabla IV. 2. (Continuación).

Gen	Posición inicial	Posición terminal	Tamaño	Orientación
<i>orf99</i>	47994	48293	300	forward
<i>orf217</i>	48394	49047	654	forward
<i>orf472</i>	49044	50462	1419	reverse
<i>orf127</i>	52012	52395	384	reverse
<i>cox2</i> ^a	52395	56445	4051	reverse
<i>orf314</i>	52587	53531	945	reverse
<i>orf316</i>	55300	56250	951	reverse
<i>cox1</i> ^a	56446	66406	9961	reverse
<i>orf344</i>	57032	58066	1035	reverse
<i>orf345</i>	59369	60406	1038	reverse
<i>orf366</i>	61869	62969	1101	reverse
<i>orf370</i>	63510	64622	1113	reverse
<i>orf377</i>	64886	66019	1134	reverse
<i>trnR(tct)</i>	67861	67931	71	forward
<i>trnR(cct)</i>	67995	68065	71	forward
<i>rns</i>	68284	69953	1670	forward
<i>trnL(taa)</i>	70768	70850	83	forward
<i>orf110</i>	70908	71240	333	reverse
<i>trnY(gta)</i>	71478	71562	85	forward
<i>nad6</i>	72116	72691	576	forward
<i>trnV(tac)</i>	72876	72948	73	forward
<i>trnK(ttt)</i>	72981	73052	72	forward
<i>trnG(tcc)</i>	73711	73783	73	forward
<i>trnD(gtc)</i>	73786	73857	72	forward
<i>trnS(gct)</i>	74188	74267	80	forward
<i>trnW(tca)</i>	74820	74891	72	forward
<i>trnI(gat)</i>	75077	75148	72	forward
<i>trnR(acg)</i>	75153	75224	72	forward
<i>trnS(tga)</i>	75345	75429	85	forward
<i>trnP(tgg)</i>	75655	75727	73	forward

^a Tanto *cox1* como *cox2* están codificados por un único ORF continuo.

IV. III. II. Genes Codificantes de Proteínas

La anotación estructural y funcional del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 llevó a la identificación de 37 genes que codifican proteínas. Doce de ellos estarían relacionados con el transporte de electrones y el sistema de fosforilación oxidativa, e incluían *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6* y *atp6*, que se son considerados los principales genes codificantes de proteínas mitocondriales. También se encontró un gen homólogo a *rps3*, 13 genes homólogos a homing endonucleasas GIY-YIG o LAGLIDADG, un gen con homología a una N-acetiltransferasa y 10 genes codificadores de proteínas con función desconocida (Tabla IV. 3 y IV. 4). Los genes se transcriben en ambos sentidos, horario y antihorario. Los genes que codifican proteínas representan alrededor del 57,81 % del genoma mitocondrial, mientras que sus secuencias codificantes representan el 44,69 %. La diferencia observada se atribuye a la presencia de 15 intrones del grupo I, muchos de los cuales albergan ORFs que codifican principalmente endonucleasas GIY-YIG o LAGLIDADG. Los genes que codifican de proteínas centrales exhibieron algunas características notables. Sin lugar a duda, la característica más llamativa fue la fusión entre *cox1* y *cox2*, sugerida por su arquitectura genética. Esta supuesta fusión del gen *cox1/2* se observó que estaba plagada de intrones, representando casi la mitad de los intrones encontrados en el genoma mitocondrial. Otra característica notable fue la ausencia de genes que codifican las subunidades 8 y 9 de la ATP sintasa (*atp8* y *atp9*, respectivamente), ya que ambos son genes conservados entre las mitocondrias fúngicas^{179,217,229}. Estas características se discuten más a detalladamente a continuación.

Capítulo IV

Tabla IV. 3. Características de los genes codificantes de proteínas del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216

Gen	Tamaño (pb)	Intrones	Porcentaje codificante (%)	Codón de Inicio	Codón de Terminación	Producto	Tamaño (aa)
atp6	774	0	100	ATG	TAG	ATP sintasa Fo subunidad a	257
cob	4842	2	23,9	ATG	TAG	apocitocromo b	385
cox1 ^a	9961	6	16,6	ATG	TGT ^b	citocromo c oxidasa subunidad 1	551
cox2 ^a	4051	2	17,7	GAT ^c	TAA	citocromo c oxidasa subunidad 2	238
cox3	5082	3	15,9	ATG	TAG	citocromo c oxidasa subunidad 3	269
nad1	3023	1	36,9	ATG	TAA	NADH deshidrogenasa subunidad 1	371
nad2	1731	0	100	ATG	TAA	NADH deshidrogenasa subunidad 2	576
nad3	423	0	100	ATG	TAG	NADH deshidrogenasa subunidad 3	140
nad4	1638	0	100	ATG	TAA	NADH deshidrogenasa subunidad 4	545
nad4L	270	1	100	ATG	TAA	NADH deshidrogenasa subunidad 4L	89
nad5	1992	0	100	ATG	TAA	NADH deshidrogenasa subunidad 5	663
nad6	576	0	100	ATG	TAA	NADH deshidrogenasa subunidad 6	191
rps3	1473	0	100	ATG	TAA	proteína ribosomal S3	490
orf99	300	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	99
orf100	303	0	100	ATG	TAG	proteína hipotética	100
orf102	309	0	100	ATG	TAA	proteína con dominio LAGLIDADG	102
orf110	333	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	110
orf116	351	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	116
orf127	384	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	127
orf185	558	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	185
orf201	606	0	100	ATG	TAG	proteína con dominio GIY-YIG	201
orf210	633	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	210
orf217	654	0	100	ATG	TAA	N-acetiltransferasa	217
orf251	756	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	251
orf273	822	0	100	ATG	TAA	proteína con dominio LAGLIDADG	273
orf296	891	0	100	AAA ^c	TAG	proteína con dominio LAGLIDADG	296
orf314 ^d	945	0	100	ATG	TAA	proteína con dominio GIY-YIG	314
orf316 ^d	951	0	100	AAA ^c	TAA	proteína con dominio GIY-YIG	316
orf344 ^d	1035	0	100	CAA ^c	TAA	proteína con dominio LAGLIDADG	344
orf345 ^d	1038	0	100	AAA ^c	TAG	proteína hipotética	345
orf366 ^d	1101	0	100	AAA ^c	TAA	proteína con dominio LAGLIDADG	366
orf370 ^d	1113	0	100	GGA ^c	TAA	proteína con dominio GIY-YIG	370
orf377 ^d	1134	0	100	GAA ^c	TAG	proteína con dominio LAGLIDADG	377
orf398 ^d	1197	0	100	ATG	TAG	proteína con dominio LAGLIDADG	398
orf450 ^d	1353	0	100	AAA ^c	TAA	proteína con dominio LAGLIDADG	450
orf469 ^d	141	0	100	TGT ^c	TAA	proteína con dominio GIY-YIG	469
orf472	1419	0	100	ATG	TAA	proteína hipotética	472

Los genes mitocondriales conservados implicados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa están en letra negra.

a Tanto cox1 como cox2 parecen estar codificados por un solo ORF continuo.

b Codón de terminación no determinado. Posiblemente, el ORF se cotraduce con los exones posteriores y luego se procesa para producir las proteínas maduras correspondientes.

c Codón de inicio no determinado. Posiblemente, el ORF se cotraduce con el(los) exón(s) aguas arriba y luego se procesa para producir las proteínas maduras correspondientes.

d Gen ubicado en un intrón.

Capítulo IV

Tabla IV. 4. Anotación funcional de los genes no conservados del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Gen	InterPro IDs	GO IDs	Enzyme Codes
<i>orf99</i>	-	-	-
<i>orf100</i>	-	-	-
<i>orf102</i>	IPR004860; IPR027434	F:GO:0004519	-
<i>orf110</i>	-	-	-
<i>orf116</i>	-	-	-
<i>orf127</i>	-	-	-
<i>orf185</i>	-	-	-
<i>orf201</i>	IPR000305; IPR003611; IPR006350; IPR027299	F:GO:0003677; F:GO:0004519; P:GO:0006810	-
<i>orf210</i>	-	-	-
<i>orf217</i>	IPR000182 ; IPR016181	P:GO:0042967; F:GO:0008080	-
<i>orf251</i>	-	-	-
<i>orf273</i>	IPR004860; IPR027434	C:GO:0005743; F:GO:0003677; F:GO:0003723; F:GO:0004519; F:GO:0004536; F:GO:0008121; F:GO:0009055; F:GO:0046872; P:GO:0000372; P:GO:0006118; P:GO:0006122; P:GO:0006308; P:GO:0034337; P:GO:0090305; P:GO:1902600	EC:1.10.2.2
<i>orf296</i>	IPR004860; IPR027434	C:GO:0005743; C:GO:0045275; C:GO:0045275; F:GO:0003723; F:GO:0004519; F:GO:0008121; F:GO:0009055; F:GO:0046872; P:GO:0006118; P:GO:0006122; P:GO:0006397; P:GO:0008380; P:GO:0090305; P:GO:1902600	EC:1.10.2.2
<i>orf314</i>	IPR003647	C:GO:0005739; F:GO:0004519; P:GO:0090305	-
<i>orf316</i>	IPR000305; IPR003611; IPR003647; IPR027299	C:GO:0005743; C:GO:0016021; C:GO:0045277; F:GO:0003677; F:GO:0004129; F:GO:0004519; F:GO:0005507; P:GO:0006123; P:GO:0090305; P:GO:1902600	EC:1.9.3.1
<i>orf344</i>	IPR004860; IPR027434	C:GO:0005739; C:GO:0016021; F:GO:0004519; F:GO:0009055; F:GO:0016491; F:GO:0046872; P:GO:0006091; P:GO:0006118; P:GO:0044763; P:GO:0055114; P:GO:0090305;	-
<i>orf345</i>	-	-	-
<i>orf366</i>	IPR004860; IPR027434	C:GO:0005739; C:GO:0044425; F:GO:0003677; F:GO:0003723; F:GO:0004519; F:GO:0004536; P:GO:0000372; P:GO:0006308; P:GO:0034337; P:GO:0044710; P:GO:0090305;	-
<i>orf370</i>	IPR000305; IPR000305; IPR003647; IPR027299	C:GO:0005739	-
<i>orf377</i>	IPR004860; IPR027434	C:GO:0005739; C:GO:0016021; F:GO:0004519; F:GO:0005488; P:GO:0044710; P:GO:0090305;	-
<i>orf398</i>	IPR027434; IPR004860	F:GO:0004519; P:GO:0090305	-
<i>orf450</i>	IPR004860; IPR027434	C:GO:0005739; C:GO:0044425; F:GO:0004519; F:GO:0015002; P:GO:0022904; P:GO:0090305	-
<i>orf469</i>	IPR000305; IPR003647; IPR010896; IPR027299	P:GO:0090305; F:GO:0003677; F:GO:0004519; C:GO:0005739; C:GO:0016020; C:GO:0016021;	-
<i>orf472</i>	-	C:GO:0005739; C:GO:0016020; C:GO:0016021	-

IV. III. III. *Atp8* y *Atp9*

Se pudo verificar que el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 carece de genes *atp8* y *atp9*, lo que está de acuerdo con lo observado en otros representantes de Pleosporales. Al buscar la presencia de estos genes en el genoma nuclear de *S. lycopersici* CIDEFI-216 realizando búsquedas BLAST utilizando como entrada a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *atp8* y *atp9* de *Z. cellare* y *Z. tritici*, *taxa* más cercanos cuyos genes en cuestión son codificados por el genoma mitocondrial, en una base de datos

Capítulo IV

compuesta por los 214 scaffolds del genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 y su proteoma hipotético, se encontró un gen altamente homólogo a *atp8* (locus tag TW65_04673) en el scaffold 66 (número de acceso de GenBank LGLR01000223) y otro altamente homólogo a *atp9* (locus tag TW65_03276) en el scaffold 40 (número de acceso de GenBank LGLR01000197). Ambos genes nucleares eran más grandes que sus homólogos mitocondriales, dejando una secuencia flanqueante en sus extremos 3' (extremo N de cada proteína). El refinamiento de la alineación (ClustalW, configuración predeterminada) a las regiones homólogas arrojó una identidad de 66,2 % y 70,7 % en el nivel de nucleótidos y 64,7 % y 70,2 % en el nivel de aminoácidos para *atp8* y *atp9*, respectivamente (Figura IV. 2)²⁴⁶. Además, el software TargetP 1.1 detectó péptidos N-terminales de localización mitocondrial en los productos de los homólogos nucleares de *atp8* y *atp9* (Tabla IV. 5)²⁴⁷.

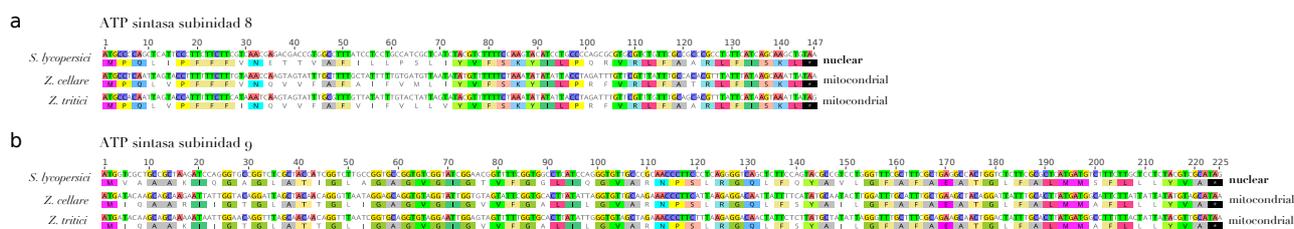


Figura IV. 2. Alineamientos de secuencia de los genes nucleares *atp8* (a) y *atp9* (b) de *S. lycopersici* CIDEFI-216 con sus homólogos mitocondriales en *Z. cellare* y *Z. tritici*. Los nucleótidos y aminoácidos conservados se destacan con colores. Las secuencias de nucleótidos se alinearon usando ClustalW con la configuración predeterminada y se tradujeron automáticamente usando la tabla de traducción 4 del NCBI en Geneious 9.1.2. Además, para el caso particular de *S. lycopersici*, la traducción automática también se llevó a cabo utilizando la tabla de traducción 1 (Estándar), obteniendo los mismos resultados.

Tabla IV. 5. Resultados del software TargetP 1.1.

Gen	Tamaño de proteína	mTP ^a	SP ^b	Otra ^c	Ubicación	Confiabledad ^d	Tamaño del prepéptido
<i>atp8</i> nuclear	1729	0,916	0,063	0,65	Mitocondria	1	120
<i>atp9</i> nuclear	133	0,914	0,012	0,13	Mitocondria	2	15

^a Puntaje de predicción para el péptido de dirección mitocondrial.

^b Puntaje de predicción para el péptido señal.

^c Puntaje de predicción para otro tipo de señal.

^d De 1 a 5, donde 1 indica la mejor predicción.

IV. III. IV. *Cox1* y *Cox2*

La anotación estructural del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 evidenció la organización génica inusual de dos subunidades de la citocromo-c oxidasa. Específicamente, COX_I y COX₂ están codificados por un único ORF continuo de 2370 pb de longitud que comienzan y termina con los codones de inicio y terminación canónicos ATG y TAA, respectivamente. Este ORF, denominado *cox1/2*, contiene las secuencias codificantes de COX_I y COX₂ en el mismo marco a la vez que carece de un codón de parada canónico entre ellas, lo que plantea la posibilidad de transcripto y/o proteína de fusión. En transcripto hipotético, la secuencia COX_I se extiende al nucleótido 1653, donde comienza la secuencia COX₂. Así, la secuencia del gen *cox1/2* tiene una longitud de 14012 nucleótidos, contiene 8 intrones del grupo I, cinco de los cuales albergan ORFs que podrían codificar endonucleasas homing, como podría esperarse por sus dominios predichos LAGLIDADG o GIY-YIG.

Esta peculiar organización genética también se encontró en otros representantes de los Pleosporales tales como *D. pinodes* (KT946597) y *P. nodorum*²³⁹. En *S. bambusicola*, sin embargo, las subunidades antes mencionadas están codificadas por un par de genes adyacentes entre sí y sin nucleótidos intergénicos o superpuestos²⁴⁰. Del mismo modo, un ORF *cox1/2* se encontró en los protozoos *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum* y *Polysphondylium pallidum* (AY700145), y el cercozo *Paracercomonas marina* (KP165385)^{225,248 251}. De hecho, los bloques homólogos conservados que pertenecen a ambas subunidades se pueden distinguir claramente dentro del alineamiento de secuencia múltiple de la proteína COX_{I/2} con secuencias homólogas de Pleosporales y los protistas mencionados anteriormente (Figura IV. 3).

Capítulo IV



Figura IV. 3. Alineación de secuencia esquemática de COX₁ y COX₂ con dos configuraciones de genes diferentes. Los aminoácidos idénticos se destacan con colores. Las regiones COX₁, COX₂ y COX_{1/2} se indican con recuadros verde, amarillo y azul, respectivamente. Las posiciones de intrones están representadas por una discontinuidad en los cuadros. La presencia de ORFs intrónicos cuyos productos presentan dominios de endonucleasas homing (general), LAGLIDADG y/o GIY-YIG se representan con las letras H, L y G, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando MUSCLE con la configuración predeterminada en Geneious 9.1.2.

III. II. V. *Rps3*

El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 contiene un gen de 1473 pb de longitud que codifican para una proteína de 490 aminoácidos con homología parcial a varias RPS3 fúngicas, componente proteico clave del ribosoma y, por lo tanto, esencial para la traducción de proteínas. Genes homólogos se encontraron también en los genomas mitocondriales de los hongos Pleosporales *D. pinodes*, *S. bambusicola* y *P. nodorum*, solo que en este último el gen en cuestión contiene adicionalmente una secuencia parcial de *cox1* (Figura IV. 4).



Figura IV. 4. Alineamiento de secuencia esquemática de RPS3 de especies de Pleosporales. Se pueden observar claramente bloques conservados de homología con RPS3 compartidos entre las especies de Pleosporales analizadas. Las regiones de RPS3 que se conservan entre Pleosporales se indican con recuadros verdes. La región homóloga a COX₁ particularmente encontrada en *P. nodorum* está indicada con un recuadro rojo. Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando MUSCLE con la configuración predeterminada en Geneious 9.1.2.

IV. III. VI. Intrones y Endonucleasas Homing

En el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 se encontraron 15 intrones, todos correspondientes al grupo I, muchos de los cuales albergan ORF que codifican principalmente proteínas que contienen el dominio GIY-YIG o LAGLIDADG. Todos los intrones se localizaron dentro de genes conservados implicados en el transporte de electrones y el sistema de fosforilación oxidativa, que, ordenados por frecuencia, son: *cox1/2* (8), *cox3* (3), *cob* (2), *nad1* (1) y *nad4L*. (1) (Tabla IV. 3). El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 también contiene 13 genes, cuyas proteínas hipotéticas presentan dominios característicos de endonucleasas de homing. Mientras que 8 de las proteínas hipotéticas portaban el dominio LAGLIDADG, 5 de ellas portaban el dominio GIY-YIG. La mayoría de los genes de endonucleasa homing en el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 se colocan dentro de intrones del grupo I, sin embargo, dos de ellos existen como genes independientes (*orf102*, cuyo producto hipotético contiene el dominio LAGLIDADG, y *orf201*, cuyo producto contiene el dominio GIY-YIG). Llamativamente, este número representa más de un tercio de los genes codificantes de proteínas totales del genoma mitocondrial.

IV. III. VII. ARNts y Uso de Codones

El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 tiene un conjunto de 28 genes ARNts, que incluye a todos los necesarios para decodificar los codones de cada uno de los 20 aminoácidos requeridos para la síntesis de las proteínas codificadas mitocondrialmente (Tabla IV. 6). El repertorio de genes ARNt de *S. lycopersici* CIDEFI-216 incluye 3 copias de *trnM* (*cat*), 2 de *trnN* (*gtt*) y 2 de *trnL* (*tag*). También tiene genes ARNt con diferentes anticodones que incorporan el mismo aminoácido, a saber: *trnR* (*acg*), *trnR* (*cct*) y *trnR* (*tct*) para Arginina; *trnE* (*ttc*) y *trnE* (*ttc*) para la Glutamina; y *trnS* (*tga*) y *trnS* (*gct*) para Serina. La mayoría de los genes ARNt se transcriben en sentido horario desde una región que abarca aguas arriba de *rns* y aguas abajo de *atp6*. La única excepción es una de las dos copias de *trnN* (*gtt*), que se encuentra considerablemente más lejos de la región rica en ARNt y se transcribe en sentido antihorario (Figura IV. 1). Todos los genes codificantes de proteínas comienzan con el codón de iniciación canónico ATG y terminan con el codón

Capítulo IV

TAA ocre el codón TAG ámbar (Tabla IV. 3). En la tabla IV. 7 se exhibe el uso de codones en el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Tabla IV. 6. ARNs del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216

Aminoácido	Anticodón	Número
Ala	UGC	1
Arg	ACG	1
Arg	CCU	1
Arg	UCU	1
Asn	GUU	2
Asp	GUC	1
Cys	GCA	1
Gln	UUG	1
Glu	UUC	1
Gly	UCC	1
His	GUG	1
Ile	GAU	1
Leu	UAA	1
Leu	UAG	2
Lys	UUU	1
Met	CAU	3
Phe	GAA	1
Pro	UGG	1
Ser	GCU	1
Ser	UGA	1
Thr	UGU	1
Trp	UCA	1
Tyr	GUA	1
Val	UAC	1

Capítulo IV

Table IV. 7. Codon usage of the protein-coding genes in the mitochondrial genome of *S. lycopersici* CIDEFI-216

Codón	Aminoácido	Porcentaje	Frecuencia
GCA	Ala	33,7	179
GCC	Ala	8,5	45
GCG	Ala	5,6	30
GCT	Ala	52,2	277
AGA	Arg	68,7	266
AGG	Arg	9,8	38
CGA	Arg	3,6	14
CGC	Arg	1,8	7
CGG	Arg	2,6	10
CGT	Arg	13,4	52
AAC	Asn	24,9	175
AAT	Asn	75,1	527
GAC	Asp	18,6	77
GAT	Asp	81,4	336
TGC	Cys	13,0	18
TGT	Cys	87,0	120
CAA	Gln	79,9	226
CAG	Gln	20,1	57
GAA	Glu	74,0	333
GAG	Glu	26,0	117
GGA	Gly	33,7	207
GGC	Gly	4,2	26
GGG	Gly	11,9	73
GGT	Gly	50,2	309
CAC	His	27,4	65
CAT	His	72,6	172
ATA	Ile	47,8	506
ATC	Ile	9,8	104
ATT	Ile	42,3	448
CTA	Leu	12,4	177
CTC	Leu	1,3	19
CTG	Leu	2,7	38
CTT	Leu	15,1	215
TTA	Leu	60,6	865

Capítulo IV

Table IV. 7. (Continuación).

Codón	Aminoácido	Porcentaje	Frecuencia
TTG	Leu	8,0	114
AAA	Lys	85,4	653
AAG	Lys	14,6	112
ATG	Met	100	215
TTC	Phe	26,4	204
TTT	Phe	73,6	568
CCA	Pro	21,8	81
CCC	Pro	8,4	31
CCG	Pro	11,9	44
CCT	Pro	58,0	215
AGC	Ser	7,3	70
AGT	Ser	29,3	282
TCA	Ser	23,0	222
TCC	Ser	4,9	47
TCG	Ser	2,8	27
TCT	Ser	32,8	316
ACA	Thr	39,2	235
ACC	Thr	7,2	43
ACG	Thr	5,8	35
ACT	Thr	47,8	287
TGA	Trp	72,8	99
TGG	Trp	27,2	37
TAC	Tyr	27,1	155
TAT	Tyr	72,9	416
GTA	Val	43,2	275
GTC	Val	3,9	25
GTG	Val	10,2	65
GTT	Val	42,7	272
TAA	*	72,2	26
TAG	*	27,8	10

* Codon de terminación

IV. III. VIII. Elementos Repetitivos

Se encontraron 84 elementos repetitivos de más de 30 nucleótidos, representando aproximadamente el 5,6 % del genoma mitocondrial y exhibiendo un contenido total de GC del 25,1 %. Estas secuencias repetitivas se distribuyeron de forma desigual a lo largo de las regiones intergénicas del genoma mitocondrial y mostraron una notable preferencia por algunas regiones, entre las cuales las más evidentes estaban aguas arriba y abajo del *rns* y *rnl*, entre el *orf185* y el *orf210* y aguas abajo de *rps3* (Figura IV. 4.). También se observó la aparición de una gran región duplicada que contiene una secuencia parcial de *nad2* (Figura IV. 4, cinta verde). Esta duplicación tiene 1332 nucleótidos de largo y sus primeros 558 nucleótidos tienen una identidad de pares del 99,6 % con el primer tercio de *nad2*, sin embargo, hay una mutación sin sentido en el codón 17 que da como resultado la conversión de una Serina en un codón de parada (S17Stop). Dentro de esta secuencia parcial, también hay un polimorfismo de un solo nucleótido más que puede dar como resultado una mutación silenciosa (I219I). La secuencia aguas abajo del nucleótido 558 no tenía homología con ninguna proteína conocida (Figura IV. 5.).

Capítulo IV

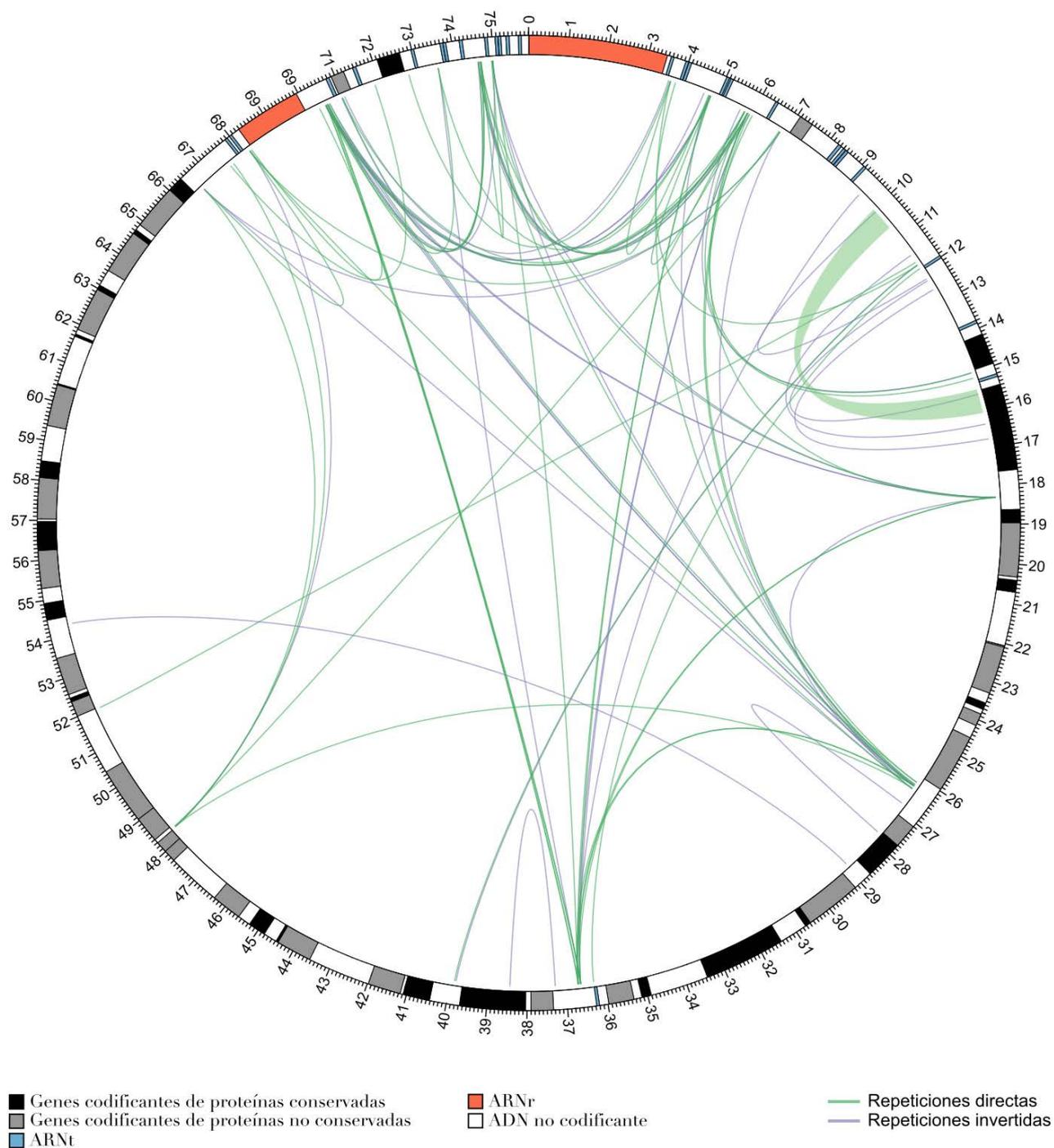


Figura IV. 4. Mapa de las secuencias repetitivas en el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Las líneas conectan secuencias repetitivas de al menos 30 nucleótidos de longitud y con una identidad de coincidencia mínima del 80 %. La cinta verde muestra la gran duplicación. Las referencias se detallan en la figura.

Capítulo IV

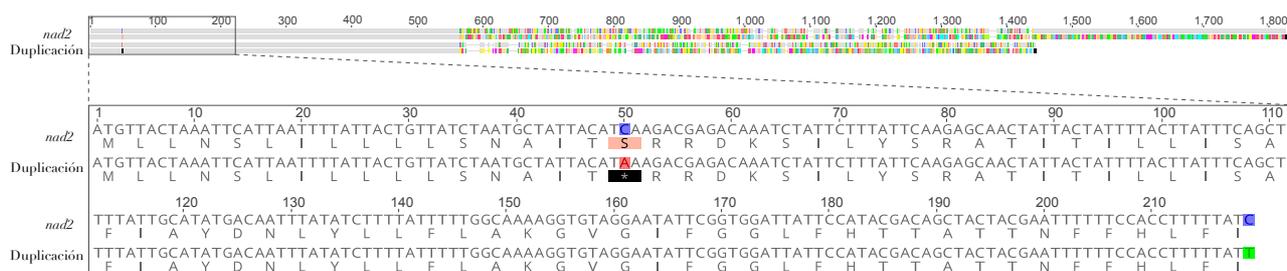


Figura IV. 5. Alineación de secuencia entre *nad2* y la gran región duplicada encontrada en el genoma mitocondrial de *S. lycopersici*. La región duplicada tiene una longitud de 630 nucleótidos, abarcando los primeros 590 nucleótidos de *nad2* y presentando dos SNP (S17Stop e I219I) (véase la Figura IV. 4). Las discrepancias de nucleótidos y aminoácidos se resaltan con colores. Las secuencias de nucleótidos se alinearon usando ClustalW con la configuración predeterminada y se tradujeron automáticamente usando la tabla de traducción 4 del NCBI.

IV. III. IX. Mitogenómica Comparativa

La alineación de los genomas mitocondriales de *S. lycopersici* (KX453765), *D. pinodes* (KT946597), *P. nodorum* y *S. bambusicola* reveló una variación notable en el orden y orientación de genes (Figura IV. 6) ^{239,240}. Sin embargo, hay algunos arreglos conservados, como los pares de genes *nad2-nad3* y *cox1-cox2*, que están uno al lado del otro, o incluso fusionados. Además, *nad4L* está al lado de *nad5*, aunque en *P. nodorum* se encontró un ORF no conservado entre ellos ²³⁹. De forma similar, se encontró que el gen *nad6* está situado entre los genes *rns* y *rnl*, en una región rica en genes ARNt, pero un ORF no conservado se coloca entre *rns* y *nad6* en *D. pinodes* (KT946597) y *P. nodorum* ²³⁹. En *S. bambusicola*, además *nad6*, *cox1* y *cox2* también están situados entre *rns* y *rnl* ²⁴⁰. También es interesante notar la gran diferencia de tamaño entre los genomas mitocondriales de los hongos Pleosporales estudiados.

Capítulo IV

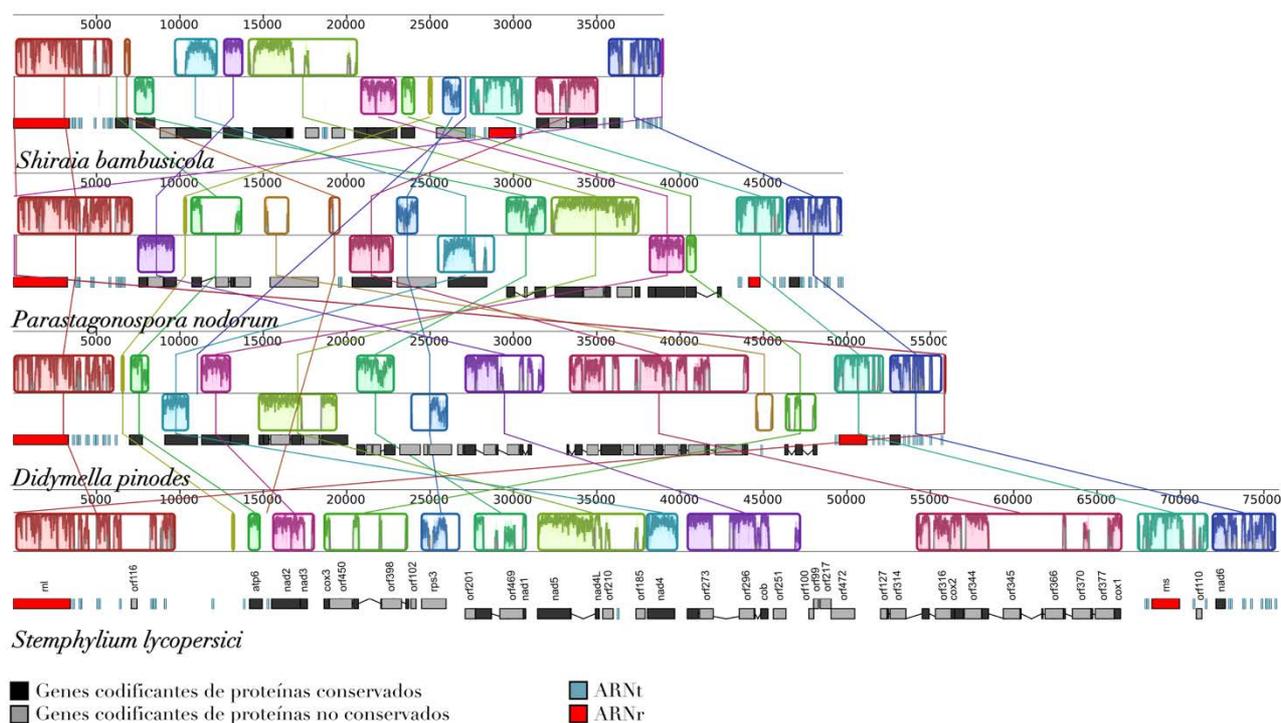


Figura IV. 6. Orden de genes y orientación entre los genomas mitocondriales de las especies de Pleosporales *S. lycopersici* (KX453765), *D. pinodes* (KT946597), *P. nodorum* (EU053989) y *S. bambusicola* (KM382246). Los bloques colineales locales están representados por los mismos colores. La trama dentro de ellos indica el nivel de similitud de secuencia. La regla sobre cada genoma representa las posiciones de nucleótidos. Las referencias detalladas se dan en la figura.

IV. III. X. Análisis Filogenético de Pezizomycotina

Tanto el enfoque de máxima verosimilitud como la inferencia Bayesiana condujeron a árboles con topologías similares, con excepción de algunos nodos internos (Figura IV. 7). Los miembros de Pezizomycotina se agruparon junto con el representante de Taphrinomycotina conformando un grupo bien respaldado (*bootstrap* = 100 % y probabilidades posteriores = 1), el cual tuvo como grupo hermano al conformado por los representantes de Saccharomycotina. El análisis filogenético soporta fuertemente (*bootstrap* \geq 99 % y probabilidades posteriores = 1) que Pezizomycotina es un subfilo monofilético que incluye el clado Leotiomyceta, Pezizomycetes (específicamente su orden Pezizales), Eurotiomycetes y sus órdenes (Chaetothyriales, Onygenales y Eurotiales), Lecanoromycetes y su orden (Peltigerales) y Sordariomycetes y sus órdenes (Ophiostomatales, Diaporthales, Sordariales, Xylariales, Glomerellales y Microascales). Además, la clase Dothideomycetes se resolvió como monofilética, aunque con un apoyo

Capítulo IV

moderado (*bootstrap* = 88 %) en el enfoque de máxima verosimilitud, pero con un fuerte respaldo (probabilidades posteriores = 0,99) en la inferencia bayesiana. Sin embargo, tanto Capnodiales como Pleosporales se mostraron claramente como monofiléticos (*bootstrap* = 1 y probabilidad posterior = 1). De manera similar, la clase Lecanoromycetes se resolvió como monofilética, pero con menor soporte (*bootstrap* = 83 % y probabilidades posteriores = 0,95), sin embargo, los miembros de los órdenes Helotiales y Leotiomycetes *inc. sed.* permaneció sin resolver. En cuanto a las relaciones entre los taxones pertenecientes a Pleosporales, se encontró que *S. lycopersici* (Pleosporaceae) se agrupó junto con *P. nodorum* (Phaeosphaeriaceae) en un grupo con soporte moderado (*bootstrap* = 75 % y probabilidades posteriores = 1), el cual tuvo a *S. bambusicola* (Shiraiaceae) como taxón hermano. Estos, a su vez, se distinguieron de *D. pinodes* (Didymellaceae), aunque con bajo soporte.

Capítulo IV

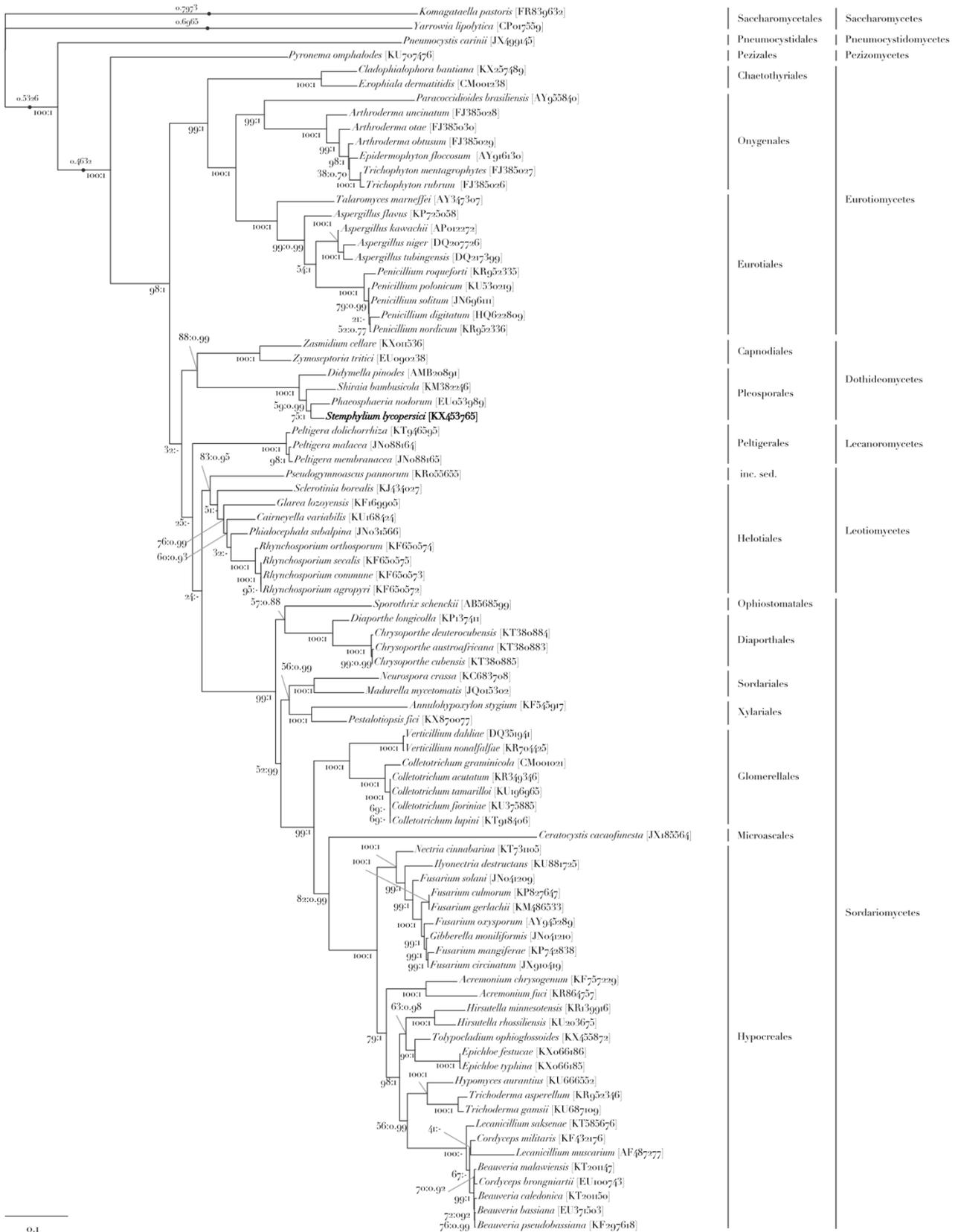


Figura IV. 7. Filograma de Pezizomycotina inferido a partir de las secuencias de aminoácidos concatenadas de 12 proteínas conservadas mitocondriales (*atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*). Los números de acceso GenBank de los genomas mitocondriales se dan entre corchetes. Se muestra

Capítulo IV

la topología de árbol de máxima verosimilitud ($-\ln L = -74201,930323$). Los números en los nodos representan valores de soporte *bootstrap* de máxima verosimilitud (como un porcentaje de 1000 réplicas) y probabilidades posteriores Bayesianas, respectivamente. Un guion (-) se utiliza para indicar cuando un nodo particular no se recuperó en la inferencia bayesiana. Las ramas con un punto representan ramas cuyas longitudes no están a escala y sus longitudes reales están indicadas por los valores colocados encima de ellas. La barra de escala representa la cantidad de cambios por sitio.

IV. IV. Discusión

En billones de años de coevolución con su célula hospedadora y especialización en un orgánulo productor de energía, el antecesor de las mitocondrias perdió la mayor parte de su material genético. Esto pudo haber llevado a la eliminación de genes cuya función se volvió obsoleta o bien de aquellos genes cuya función fue reemplazada por su contraparte nuclear. De hecho, su material genético ha estado migrando al núcleo como parte de un proceso que todavía está en curso. Esto es tal que casi todo el proteoma mitocondrial en realidad está codificado por genes nucleares, sintetizados en el citosol e importado a la mitocondria por varios mecanismos diferentes, entre los cuales se encuentra el reconocimiento de un péptido dirigido a la mitocondria unido al extremo N del precursor proteico correspondiente ^{215,252}. Los genomas mitocondriales de hongos secuenciados hasta ahora generalmente tienen un conjunto estándar de 14 genes codificantes de proteínas que incluyen *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6* ^{179,214,229}. Sin embargo, hay excepciones, como lo atestigua la ausencia de los genes *cox3* y *nad6* en *Acremonium implicatum* (Hypocreales); de los genes *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6* en el genoma mitocondrial de varias levaduras; del gen *atp9* en *Podospora anserina* (Sordariales); y de los genes *atp8* y *atp9* en los Pleosporales *S. lycopersici*, *D. pinodes* (KT946597), *P. nodorum* y *S. bambusicola* ^{239,240,252 258}. En el caso particular de *S. lycopersici* CIDEFI-216, se pudo verificar la presencia de los genes *atp8* y *atp9* en el genoma nuclear (Figura IV.2 y Tabla IV. 5). Curiosamente, estos genes están presentes en el genoma mitocondrial de Capnodiales *Zasmidium cellare* y *Zymoseptoria tritici*, lo que sugiere que estos genes podrían haberse perdido en algún momento después de la divergencia entre Dothideomycetidae y Pleosporomycetidae (Dothideomycetes) ^{239,259}.

La citocromo-c oxidasa (EC 1.9.3.1) es un gran complejo enzimático oligomérico que media en el paso final de la cadena respiratoria. En eucariotas, este complejo está compuesto por tres subunidades grandes, las subunidades I, II y III de citocromo-c oxidasa (COX₁, COX₂ y COX₃, respectivamente), que comprenden el centro catalítico del complejo enzimático junto con un número variable de polipéptidos codificados en el núcleo ²⁶⁰. En general, COX₁, COX₂ y COX₃ están codificados por tres genes independientes (*cox1*, *cox2* y *cox3*, respectivamente) que se encuentran en el genoma

Capítulo IV

mitocondrial, con algunas excepciones en *cox2* y *cox3*^{214,261}. Dado el importante proceso biológico que cumplen, se conservan en gran medida incluso entre especies emparentadas distantes. Debido a esto, *cox1* ha sido utilizado ampliamente como un código de barras molecular en varios estudios taxonómicos y evolutivos^{262,263}. El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 muestra una estructura génica inusual en relación con las subunidades 1 y 2 de la citocromo-c oxidasa. El ORF *cox1/2*, contiene las secuencias codificantes de COX1 y COX2 de manera continua y sin un codón de terminación canónico entre ellas, lo que plantea la posibilidad de transcripto y/o proteína de fusión (Figura IV. 1 y Tabla IV. 3). Esta particular arquitectura de genes fue reportada por primera vez por Burger y sus colaboradores en 1995, describiendo el genoma mitocondrial de *A. castellanii*²⁴⁸. Un año después, Lonergan y Gray demostraron que, en *A. castellanii*, este ORF se transcribe en un ARNm policistrónico grande que tras la traducción da lugar a dos productos²⁴⁹. A continuación, Pellizzari y sus colaboradores encontraron en el genoma mitocondrial de *D. discoideum* evidencias de un transcripto similar a *cox1/2*²⁵⁰. Sin embargo, en *S. lycopersici*, se desconoce si COX1 y COX2 se sintetizan por separado o como una proteína fusionada. Se podría pensar que estas subunidades pueden estar codificadas por el genoma nuclear, mientras que el gen mitocondrial *cox1/2* representa una copia disfuncional. No obstante, no se encontraron a las secuencias codificantes de ambas subunidades en el genoma nuclear de *S. lycopersici* CIDEFI-216 realizando búsquedas BLAST contra su ORFeoma y proteoma hipotético. Por lo tanto, parece que el locus mitocondrial *cox1/2* es único y, por lo tanto, funcional. También se podría argumentar que el transcripto *cox1/2* puede contener un codón de terminación inusual inmediatamente después de la región codificante a *cox1*, pero esto es improbable si se tiene en cuenta el uso de codones encontrado en los genes conservados codificantes de proteínas de este genoma mitocondrial. Finalmente, no se puede descartar que el transcrito primario de *cox1/2* pudiera ser editado para incluir un codón de terminación en el ARNm maduro, o ser procesado endonucleolíticamente para producir dos ARNm maduros. Estudios futuros deberán responder esta pregunta.

Otra característica importante del genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 es la presencia de intrones del grupo I y endonucleasas homing (Tablas IV. 3 y IV. 4).

Capítulo IV

Los intrones del grupo I y del grupo II son ribozimas que catalizan su corte y empalme a partir de un ARN precursor, restaurando el marco de lectura y generando, de esta manera, un producto funcional. Este ADN egoísta está frecuentemente presente en los genomas mitocondriales, aunque mientras que los intrones del grupo I son abundantes en los genomas mitocondriales fúngicos, los intrones del grupo II predominan en los de las plantas ²¹⁸. Ambos tipos de intrones se propagan como elementos genéticos móviles, pero a través de diferentes mecanismos. La movilidad del intrón del grupo I se debe a la actividad de endonucleasas homing, cuyas secuencias de codificación residen en secuencias no críticas del intrón. Por otro lado, la movilidad de los intrones del grupo II se basa en un mecanismo conocido como retro-homing, que es catalizado por una proteína codificada por un intrón con transcriptasa inversa y dominios de maduración, y algunas veces un dominio de endonucleasa ²⁶⁴. En sí, las propias endonucleasas homing pueden ser elementos móviles, moviéndose independientemente de su intrón hospedador, como es el caso de las endonucleasas homing independientes (*free-standing homing endonucleases*), que son frecuentes dentro de los genomas de fagos ²²¹. Resulta intrigante cómo tales genes se asentaron dentro de intrones intactos para producir estos elementos móviles compuestos. Cualquiera sea la razón, esta coevolución dejó varias huellas en los genomas a lo largo de eones y, por lo tanto, estos fósiles genéticos son una valiosa fuente de información para los estudios evolutivos. Tal es así que, como se verá a continuación, los mismos servirán de base para intentar explicar varias de las particularidades encontradas en el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Por ejemplo, ¿cuál será el origen de esta fusión génica entre *cox1* y *cox2*? Quizá la respuesta esté en los intrones. El gen *cox1/2* está plagado de intrones y la ubicación de algunos de estos está bien conservada, incluso entre especies relacionadas de forma distante (Figura IV. 3). Al parecer *cox1* es una puerta de acceso para la inserción de intrones del grupo I ^{265,266}. Existe evidencia sustancial de que las endonucleasas de homing codificadas por el intrón del grupo I están involucradas en procesos tales como reordenamientos del genoma y transferencia horizontal de genes, lo que sugiere dos posibles escenarios que podrían explicar las fusiones génicas observadas entre *cox1* y *cox2* en taxones relacionados remotamente ^{267 269}. Por una parte, la fusión pudo haber surgido de forma independiente en diferentes linajes debido a la reorganización del exón

Capítulo IV

promovida por la movilidad mediada por las endonucleasas homing de los intrones del grupo I. Alternativamente, la fusión podría haber sido el resultado de un evento de transferencia horizontal de genes ocurrido en algún momento durante la evolución de Dothideomycetes y protozoos.

Por otro lado, resulta interesante comparar las posiciones de los intrones dentro de la secuencia *cox1/2* (*cox1* y *cox2*) de los Dothideomycetes, protozoos y cercozoos anteriormente mencionados (Figura III. 3). Entre las secuencias conocidas de *cox1/2* en Dothideomycetes, *S. lycopersici* tiene el mayor número de intrones (8 intrones que albergan 5 endonucleasas homing), seguido de *D. pinodes* (7 intrones, pero 6 endonucleasas homing) (número de acceso GenBank KT946597). Además, mientras *S. bambusicola* tiene un *cox1* que contiene un único intrón (1 endonucleasa homing), su *cox2* carece de intrones²⁴⁰. Por otro lado, *cox1/2* en *P. nodorum* y *cox1* y *cox2* en *Z. cellare* y *Z. tritici* (Capnodiales) carecen de intrones^{239,259,270}. En el distante *D. discoideum*, *cox1/2* contiene 4 intrones con 4 endonucleasas homing (dos en el mismo intrón), mientras que los protozoos *A. castellanii* y *P. pallidum* y el cercozoo *P. marina* (número de acceso de GenBank KP165385) carece de intrones^{248 250}. La presencia de un intrón en la misma posición en un organismo distante sugiere que esta característica estructural podría ser el resultado de un evento de inserción ancestral. Considerando esto, el primer intrón de *D. pinodes* y el primer intrón de *D. discoideum* podrían tener un origen ancestral común, aunque este último perdió su enzima de movilidad del intrón. Sin embargo, todos los demás organismos estudiados perdieron este intrón en algún momento de su historia evolutiva. Por lo tanto, se puede hipotetizar que los intrones restantes podrían haber surgido de eventos de inserción más recientes. Curiosamente, la posición del tercer intrón de *D. pinodes* y el único intrón dentro de *cox1* de *S. bambusicola* se correlaciona, con un ligero desplazamiento, con la posición del segundo intrón de *D. discoideum*. Del mismo modo, el sexto intrón de *S. lycopersici* y el cuarto intrón de *D. pinodes* también están correlacionados con el tercer intrón de *D. discoideum*. En efecto, esto podría tratarse de eventos de pérdida y ganancia, no solo por la ligera variación en la posición de intrones antes mencionada entre estos organismos distantemente relacionados, sino también por el bajo nivel de identidad de aminoácidos compartido por sus proteínas de movilidad. Así, se podría especular que el evento de

Capítulo IV

inserción más temprano fue aquel que dio lugar al séptimo intrón en *S. lycopersici* y al sexto intrón en *D. pinodes*, ya que ambos contienen endonucleasas con el dominio LAGLIDADG con un alto nivel de identidad de aminoácido (Pairwise % Identity: 87,9 %; Pairwise % Positive (BLSM62): 94,8 %).

El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 alberga un gen *rps3* independiente (Figura IV. 1 y Tabla IV. 3). *Rps3* está ampliamente distribuido en todos los reinos de la vida y es ciertamente diverso en secuencia, estructura y ubicación ^{271,272}. La primera proteína ribosomal mitocondrial descrita en hongos, específicamente en levaduras, fue VAR_I codificada por el gen independiente *var1* ²⁷³. Más tarde, Burke y RajBhandary describieron al gen codificante de la proteína ribosomal S3 dentro del intrón del grupo I rnl U_{II} (también conocido como intrón grupo I mL2449) en *Neurospora crassa* (Sordariales) ²⁷⁴. Actualmente, el consenso general es que RPS3, VAR_I y S5 son homólogos ^{271,272}. Aunque los ortólogos de proteína más largos normalmente contienen secuencias parciales sin homología significativa con ninguna proteína conocida, a veces contienen secuencias parciales homólogas a proteínas conocidas, como en algunas especies de *Ophiostoma*. (Ophiostomatales), donde *rps3* se fusiona con los dominios endonucleasa de homing ²⁷⁵. Además, mientras que *rps3* de *P. nodorum* también contiene una secuencia interna altamente homóloga a una secuencia parcial de *cox1*, *rps3* de *Sphaeronemella fimicola* (Microascales) contiene una inserción micro-satélite en marco que se traduce en la presencia de 16 alaninas consecutivas ^{239,272}. A la luz de estos hallazgos, es evidente que *rps3* tiene una historia evolutiva bastante compleja. Esto motivó la búsqueda de *rps3* en todos los genomas mitocondriales de Ascomycota disponibles en el GenBank (consultados en abril de 2017) para su análisis. Se prestó particular atención en la estructura del gen *rnl*, ya que, en algunos casos, suele albergar genes con homología a *rps3*. Se encontró que, en Saccharomycotina, la proteína ribosomal S3 está codificada por un gen autónomo y, por otro lado, *rnl* normalmente contiene un intrón que en algunos casos alberga un ORF homólogo a endonucleasas homing. En Taphrinomycotina, *rps3* existe como un gen libre, mientras que ningún intrón se encontró en sus *rnl*. Dentro de Pezizomycotina, se encontró a *rps3* dentro del intrón del grupo I mL2449 en miembros de Eurotiomycetes y Sordariomycetes. Sin embargo, en Leotiomycetes y Lecanoromycetes, *rps3* existe tanto

Capítulo IV

como un gen independiente como dentro del intrón del grupo I mL2449 de *rnl*. Llamativamente, Dothideomycetes contiene un *rnl* sin intrón y, mientras que los genomas mitocondriales de *Z. cellare* y *Z. tritici* (Capnodiales) carecen de la *rps3*, los de *S. lycopersici*, *D. pinodes*, *S. bambusicola*, y *P. nodorum* (Pleosporales) contienen un *rps3* independiente, que en este último caso se fusiona con una secuencia parcial de *cox1* (Figura IV. 4). Probablemente, los eventos de ganancia y pérdida que condujeron a las configuraciones descritas podrían haber sido condicionados por la presencia de un gen esencial como *rps3* dentro del intrón del grupo I mL2449, lo que aseguró el mantenimiento de este elemento neutral que, de otro modo, podría haberse perdido. Asimismo, la movilidad mediada por la endonucleasa homing podría ser responsable de la reubicación de *rps3* desde su posición original, cualquiera que esta haya sido, al intrón del grupo I mL2449 y/o su asentamiento como gen autónomo. Esto se ve respaldado por la presencia de fusiones génicas del tipo endonucleasa homing LAGLIDADG-*rps3* dentro del intrón del grupo I en algunas especies de *Ophiostoma*, así como también por el hecho de que el *rps3* de *P. nodorum* presenta la huella de una inserción previa de *cox1*; un gen que, como ya se ha discutido, generalmente es invadido por estos elementos genéticos móviles^{231,267 269,272,275}. Vale la pena mencionar que no se encontró la contraparte *rps3* en el genoma nuclear de ningún representante estudiado de Dothideomycetes.

En el genoma mitocondrial de *S. lycopersici* CIDEFI-216 abundan las secuencias repetitivas, tanto directas como palindrómicas (Figura IV. 4). Aunque no tienen una función obvia, las secuencias repetitivas pueden desempeñar un papel en la dinámica y la evolución de los genomas mitocondriales. De hecho, se acepta que las secuencias repetitivas están frecuentemente implicadas en eventos de recombinación que pueden, no solo conducir a cambios en el orden y la orientación de los genes, sino también a la generación de genes nuevos^{276,277}. Un ejemplo de esto representa la duplicación parcial del gen *nad2*. Aquí, sin embargo, la presión selectiva podría haber generado un codón de terminación prematuro dentro del gen surgido de la duplicación parcial de *nad2*, lo que podría evitar la expresión de una proteína no funcional tan grande, un proceso bastante costoso e inasequible en términos de energía celular (Figura IV. 5). Más allá de su origen y función, las secuencias repetitivas mitocondriales representan marcadores moleculares

Capítulo IV

atractivos para estudios poblacionales, considerando que pueden amplificarse fácilmente debido a su alto número de copias.

Una de las principales ventajas de disponer de un genoma mitocondrial completo es la posibilidad de realizar estudios de mitogenómica comparativa. En relación con esto, la comparación del orden y la orientación de genes de *S. lycopersici* con sus *taxa* cercanos en el orden Pleosporales reveló la plasticidad de sus genomas mitocondriales. Al parecer, tal expansión está relacionada con la presencia de ORFs no conservados, intrones y elementos repetitivos, los cuales son particularmente comunes en las regiones intergénicas (Figuras IV. 4 y IV. 6). Por otra parte, la reconstrucción de la filogenia de Pezizomycotina utilizando los genes mitocondriales conservados (*de atp6, cob, cox1, cox2, cox3, nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5* y *nad6*) fueron consistentes con los resultados descritos anteriormente por Spatafora y colaboradores, quienes reconstruyeron la filogenia de Pezizomycotina basada en cinco *loci* nucleares ampliamente utilizados en la taxonomía fúngica, a saber: subunidad pequeña de ADN ribosomal (SSU rDNA), subunidad grande de ADN ribosomal (LSU rDNA), el factor de elongación τ - α (EF- τ - α) y las dos subunidades mayores de la ARN polimerasa II (RPB1 y RPB2) (Figura IV. 7)²⁷⁸. Sin embargo, el análisis filogenético mitocondrial de la presente tesis agrupa a los miembros de Pezizomycotina junto con el representante de Taphrinomycotina en un clado bien respaldado (*bootstrap* = 100 % y probabilidades posteriores = 1), a diferencia de la mayoría de los datos publicados que respaldan que Pezizomycotina y Saccharomycotina forman un grupo monofilético²⁷⁹²⁸¹. En relación con esto, se puede argumentar que la diferencia observada podría deberse a algún artefacto de nuestra reconstrucción filogenética, en particular, al efecto de atracción de ramas largas (LBA, *long branch attraction*). El efecto LBA puede entenderse como la agrupación de linajes de evolución rápida independientemente de sus relaciones evolutivas. De hecho, se sabe que los datos mitocondriales de algunas especies de Taphrinomycotina y Saccharomycotina están sujetos a artefactos al LBA^{282,283}. Además, vale la pena mencionar que *K. pastoris* y *Y. lipolytica* (ambas Saccharomycotina) y *P. carinii* (Taphrinomycotina) tienen una característica particular que las distingue de algunos otros taxones de su subphylum, que es la presencia atípica de *atp6, cob, cox1, cox2, cox3, nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5* y *nad6* dentro de sus genomas mitocondriales, una

Capítulo IV

característica que, de hecho, se utilizó como un criterio para el muestreo de taxones ^{282,284,285}. Por último, es importante señalar que no se encontró ninguna correlación entre la agrupación filogenética de los representantes de Pleosporales y la longitud de sus genomas mitocondriales (Figuras III. 6 y III. 7).

Capítulo V: Análisis *In Silico* del Secretoma y Metaboloma

Secundario de *Stemphylium lycopersici* CIDEFI-216

V. I. Introducción

Los hongos son organismos osmótrofos sésiles que han logrado adaptarse con éxito a una amplia variedad de nichos ecológicos. Gran parte de este éxito se debe a que durante su evolución han adquirido la capacidad de secretar las enzimas necesarias para digerir diversas fuentes de alimento y de generar un metabolismo primario capaz de asimilarlo. La digestión extracelular, sin embargo, implica que los alimentos digeridos por el hongo estén igualmente disponibles para otros organismos que ocupen el mismo nicho. Frente a esto, los hongos desarrollaron una notable diversidad de metabolitos secundarios que actúan como verdaderas armas moleculares para eliminar a sus competidores ^{286,287}. Los hongos patógenos además secretan moléculas de diversa naturaleza cuya finalidad es la de burlar las defensas del hospedador para tomar el control de este y posibilitar así su crecimiento, reproducción y dispersión ^{93,100,288,289}. De hecho, la efectividad de los hongos fitopatógenos para colonizar exitosamente a sus hospedadores los posiciona entre los agentes etiológicos de enfermedades infecciosas más devastadores, causando enormes pérdidas económicas en la producción de cultivos y representado una amenaza a la seguridad alimentaria mundial ²⁹⁰.

El término secretoma fue acuñado por primera vez para describir a todas las proteínas secretadas por la célula (bacteriana, en este caso), incluyendo al conjunto de proteínas involucradas en las vías secretoras. ²⁹¹. Esta definición, sin embargo, ha sufrido reiteradas modificaciones según diferentes autores. Así, por ejemplo, mientras que algunos autores definieron al secretoma como la población de proteínas estrictamente externas a la membrana celular; otros, lo restringieron a las proteínas solubles en el exterior de la pared celular (cuando corresponda) ²⁹². En este capítulo, se utilizará el término secretoma para describir únicamente a las proteínas secretadas por un organismo ²⁹³.

Tanto en procariotas como eucariotas, la mayoría de las proteínas secretadas se exportan a través de la vía secretora clásica que reconoce un péptido señal de localización extracelular, de típicamente de 15 a 30 aminoácidos, en el extremo N-terminal de la proteína. En los eucariotas, el reconocimiento de este péptido señal dirige al péptido en síntesis a la membrana del retículo endoplásmico y lo trasloca co-traduccionalmente a

Capítulo V

través de la membrana. Durante la translocación, el péptido señal es escindido por una enzima conocida como complejo peptidasa señal (en eucariotas). Sin embargo, cabe mencionar que la presencia de un péptido señal de localización extracelular en una proteína no asegura que esta sea efectivamente secretada, pues la presencia de al menos una hélice transmembrana aguas abajo del péptido señal es suficiente para retener la proteína en cuestión en la membrana celular. Más aún, en eucariotas las proteínas que presenten péptido señal también podrían ser retenidas en cualquiera de los compartimientos que componen esta vía secretoria (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosoma/vacuola) ^{247,294}. También es importante mencionar que una pequeña porción de las proteínas secretadas son secretadas a través de vías alternativas (no clásicas) independientes del péptido señal, como, por ejemplo, la exocitosis mediante vesículas recubiertas, lisosomas secretores, microvesículas o transportadores de casete de unión a ATP ²⁹⁵. De todos modos, hay consenso general que la vasta mayoría de las proteínas secretadas por los hongos son procesadas mediante la vía secretoria clásica ^{293,296,297}. De hecho, la presencia del péptido señal de localización extracelular y ausencia de región(es) transmembrana es un criterio ampliamente utilizado para inferir qué proteínas serán secretadas a partir de la traducción *in silico* de genomas ^{293,294}. Remarcablemente, varias de las proteínas que cumplan con estos requisitos son buenos candidatos a efectores.

El término efector proviene de la literatura médica y fue originalmente introducido y adaptado en fitopatología para explicar la interacción planta-bacteria y, posteriormente, planta-hongo/oomicete ^{100,298,299}. De acuerdo con las definiciones iniciales, los efectores fúngicos son pequeñas proteínas, ricas en cisteína, cuya función es la de manipular las respuestas inmunes de las hospedador a favor del hongo ³⁰⁰. Sin embargo, luego se supo que moléculas de otra naturaleza, como algunos metabolitos secundarios y ARN pequeños, también tienen la facultad de cumplir funciones relacionadas con la patogénesis. Asimismo, se pudo verificar que algunos efectores cumplen otras funciones, por ejemplo, relacionadas con la nutrición. Para complicar aún más el cuadro, incluso se encontraron moléculas homologas de efectores (de patógenos) en simbioses mutualistas y saprótrofos ^{93,289,300,301}. Por lo tanto, esta definición, que fijaba un tipo de molécula y una función particular, resultó ser muy estrecha. En consecuencia, recientemente se ha sugerido ampliar la definición de efectores a modo de incluir a todas aquellas moléculas secretadas

Capítulo V

por un organismo que contribuyan a la colonización del nicho ecológico ^{289,300}. Dado que la presente tesis se enmarca en un contexto fitopatológico, aquí se hará uso del término efectores solamente para describir a las moléculas secretadas por el patógeno para manipular a su favor la interacción con su hospedador. También con fines prácticos, la naturaleza de estas moléculas se restringirá a proteínas de origen ribosomal.

La predicción de efectores basada en secuencia presenta un gran obstáculo: la gran mayoría de los efectores son diversos en estructura primaria y secundaria ^{288,302 304}. Esta diversidad es inherente a los efectores y encuentra su justificación en las fuerzas coevolutivas que los moldean; por ejemplo, la carrera armamentista *ad infinitum* que se da entre los patógenos y sus hospedadores ^{288,305}. La falta de características universales en sus secuencias ha llevado al uso de enfoques de predicción basados en la combinación de varias características observadas en los efectores conocidos; presencia de péptido señal y ausencia de dominio transmembrana, tamaño pequeño, alto contenido de cisteína, evidencia de selección disruptiva, ubicación del gen en regiones de rápida evolución del genoma y/o evidencia de expresión *in planta* ^{302,303}. Sin embargo, tal como señalaron Sperschneider y sus colaboradores, el uso de criterios predefinidos para la predicción de efectores hereda la visión potencialmente sesgada del investigador respecto a sus características y, por lo tanto, imposibilita el descubrimiento de nuevos efectores (con nuevas características). Frente a esto, los autores presentaron un enfoque alternativo basado en aprendizaje automático que lo implementaron en su software EffectorP. El enfoque basado en aprendizaje automático “aprende” patrones que hacen a los efectores a partir de su entrenamiento con conjuntos de datos positivos y negativos; este conocimiento, finalmente, es aplicado en la predicción ^{303,306}. Complementariamente, algunos efectores también pueden ser inferidos a partir de la homología de sus secuencias con las de otros efectores experimentalmente caracterizados y depositados en bases de datos especializadas ^{307 309}.

Mientras que los productos finales del metabolismo primario son la energía (acumulada en los enlaces macroérgicos de ATP, por ejemplo) y los intermedios para la síntesis de macromoléculas esenciales como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, el metabolismo secundario es el responsable de la producción de una amplia gama de compuestos bioactivos de bajo peso molecular que son prescindibles cuando los

Capítulo V

microorganismos se cultivan *in vitro* pero proporcionan ventajas adaptativas en la naturaleza ^{310,311}. Aunque los metabolitos secundarios se han descrito en plantas, algas verdes y protistas, los hongos y las bacterias producen la gran mayoría de estos compuestos naturales ³¹². Esto no es de sorprender, en vista a los complejos nichos ecológicos en los que estos microorganismos compiten e interactúan con otros organismos, desde bacterias, hongos y algas hasta protozoos e incluso metazoos ³¹³. En lo que respecta a los hongos filamentosos fitopatógenos, se ha encontrado que la virulencia de los necrótrofos está estrechamente relacionada con la producción de metabolitos secundarios fitotóxicos ^{99,314} ³¹⁶. Así, por ejemplo, la toxina-T de *Cochliobolus heterostrophus* es un policétido y la toxina ToxI de *Cochliobolus carbonum* es un péptido no ribosomal, al igual que la toxina Victorin de *Cochliobolus victoriae* ^{317,318}. Otro ejemplo importante lo constituye la melanina; metabolito secundario compuesto por polímeros heterogéneos complejos. Varias clases de melaninas fúngicas han sido descritas, como, por ejemplo: la γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB) melanina, la 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN) melanina, la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) melanina, la catecol-melanina, la piomelanina y la p-aminofenol (PAP) melanina, entre otras. También son varias las funciones que se les ha atribuido, por ejemplo: morfogénesis, resistencia al estrés, virulencia y transducción de energía ³¹⁹. Los genes responsables de la biosíntesis, la exportación y la regulación transcripcional de los metabolitos secundarios se encuentran a menudo en grupos de genes contiguos que se caracterizan por la presencia de enzimas "backbone" y varias enzimas "decorativas" con un contenido de dominio de proteína característico. De hecho, estas características distintivas son la base de varias herramientas bioinformáticas especializadas en el relevamiento genómico de *clusters* de genes de metabolitos secundarios ^{286,311,320}.

Los hongos fitopatógenos han adoptado diversos estilos de vida como parte de sus estrategias de infección. En general, hay consenso que el repertorio de efectores guarda estrecha relación con el estilo de vida y rango de hospedadores de los patógenos. El análisis de las características genómicas asociadas con la producción de efectores de un hongo fitopatógeno y su comparación con las de otros hongos puede arrojar información sustancial acerca de su patogénesis ^{321,322}. Por lo tanto, el análisis (individual y comparativo)

Capítulo V

del secretoma *in silico* y los *clusters* de genes de metabolitos secundarios en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 será de gran ayuda para identificar a los efectores claves para el establecimiento de la enfermedad. Esta información, a su vez, podría ser utilizada para identificar a su contraparte molecular responsable de la resistencia del hospedador y, de este modo, diseñar estrategias eficaces para el manejo de la mancha gris de la hoja del tomate.

Capítulo V

V. I. I. Hipótesis del Capítulo

I. La composición del secretoma y el perfil de *clusters* de genes de metabolitos secundarios de *S. lycopersici* CIDEFI-216 concuerdan con los de otros hongos fitopatógenos necrótrofos.

V. I. II. Objetivos del Capítulo

I. Caracterizar el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

II. Identificar los *clusters* de genes de metabolitos secundarios en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

III. Comparar el secretoma *in silico* y los *clusters* de genes de metabolitos secundarios de *S. lycopersici* CIDEFI-216 con el de otros hongos.

Capítulo V

V. II. Materiales y Métodos

V. II. I. Secretoma *In Silico*

El secretoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 se predijo por la presencia de péptidos señal de localización extracelular y ausencia de dominios transmembrana en el proteoma teórico utilizando el software SignalP 4.1²⁹⁴. A partir de este subconjunto de datos, se evaluó el contenido de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes, *carbohydrate-active enzymes*) utilizando la base de datos dbCAN (*Database for Automated Carbohydrate-active Enzyme Annotation*); de peptidasas y sus inhibidores, a través de la base de datos MEROPS; de lipasas y otras hidrolasas de éster carboxílico, utilizando la base de datos LED (*Lipase Engineering Database*); y de efectores, a través del software EffectorP 1.0 y la base de datos PHI-base (*Pathogen-Host Interaction Database*), ambos especializados pero con diferente criterio^{303,307,323 325}. De los resultados provistos por la base de datos PHI-base, se filtraron y descartaron aquellos cuya única descripción sea *unaffected pathogenicity*; es decir, aquellos productos génicos que al ser expresados en niveles alterados en una cepa transgénica causan el mismo nivel de enfermedad en comparación con la cepa de referencia de tipo salvaje³⁰⁷. Finalmente, se comparó el secretoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 con el de otros hongos cuyos genomas están disponibles en la base de datos MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/fungi/fungi.info.html>).

V. II. II. Identificación de *Clusters* de Genes de Metabolitos Secundarios

A fin de identificar los *clusters* de genes biosintéticos de metabolitos secundarios, el proteoma teórico de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fue procesado con las herramientas bioinformáticas SMURF (*Secondary Metabolite Unknown Region Finder*) y antiSMASH (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) utilizando sus configuraciones por defecto^{311,326}. A su vez, los resultados arrojados por estas herramientas fueron sometidos a búsquedas en las bases de datos del GenBank, Swiss-Prot e InterPro a fin de localizar los (*clusters* de) genes intervinientes en la síntesis de melanina y determinar qué tipo(s) de melanina(s) sintetiza *S. lycopersici*. Finalmente, se comparó el perfil de *clusters* de metabolitos secundarios de *S. lycopersici* CIDEFI-216 con el de otros hongos cuyos

Capítulo V

genomas están disponibles en la base de datos MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/fungi/fungi.info.html>).

V. II. Resultados

V. II. I. Secretoma *In Silico*

Se encontraron péptidos señal de localización extracelular en 1005 proteínas del total que componen el proteoma teórico de *S. lycopersici* CIDEFI-216. En este secretoma *in silico* se pudieron distinguir 321 CAZymes (Tabla V. I), 121 peptidasas (Tabla V. II), 9 inhibidores de peptidasas (Tabla V. III) y 134 hidrolasas de éster carboxílico (Tabla V. IV). Además, la herramienta EffectorP estimó la presencia de 141 efectores, en tanto que la búsqueda en PHI-base dio cuenta de 229 proteínas relacionadas con la patogénesis. En la figura V. I y en la tabla V. V se detallan estos los resultados.

Tabla V. I. Frecuencia de las familias CAZymes en el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Frecuencia	Familia	Actividad en la Familia
29	AA7	Glucosilglicosarido oxidasa (EC 1.1.3.-); Quitoilglicosarido oxidasa (EC 1.1.3.-)
26	AA9	Monooxigenasas liticas de polisacáridos dependientes de Cobre
21	CE10	Aristesterasa (EC 3.1.1.-); carboxilesterasa (EC 3.1.1.3); acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7); colinesterasa (EC 3.1.1.8); esterol esterasa (EC 3.1.1.13); Brefeldina A esterasa (EC 3.1.1.-)
13	CBM18	Unión a quitina
13	CE5	Acetil-xilanoesterasa (EC 3.1.1.72); cutinasa (EC 3.1.1.74)
11	CBM1	Unión a quitina
11	GH5	Endo- β -1,4-glucanasa / celulasa (EC 3.2.1.4); endo- β -1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8); β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); β -manosidasa (EC 3.2.1.25); β -glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45); glucano β -1,3-glucosidasa (EC 3.2.1.58); liqueninasa (EC 3.2.1.73); exo- β -1,4-glucanasa / celodextrinasa (EC 3.2.1.74); glucano endo-1,6- β -glucosidasa (EC 3.2.1.75); manano endo- β -1,4-manosidasa (EC 3.2.1.78); celulosa β -1,4-celobiosidasa (EC 3.2.1.91); esteril- β -glucosidasa (EC 3.2.1.104); endoglicoceramidasa (EC 3.2.1.123); quitosanasa (EC 3.2.1.132); β -primeverosidasa (EC 3.2.1.149); endo- β -1,4-glucanasa específica de xiloglucano (EC 3.2.1.151); endo- β -1,6-galactanasa (EC 3.2.1.164); hesperidin 6-O- α -L-ramnosil- β -glucosidasa (EC 3.2.1.168); β -1,3-mananasa (EC 3.2.1.-); endo- β -1,4-xilanasa específica de arabinoxilano (EC 3.2.1.-); Manano transglicosilasa (EC 2.4.1.-)
10	AA3	Celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18); glucosa r-oxidasa (EC 1.1.3.4); aril-alcohol oxidasa (EC 1.1.3.7); alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13); piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10)
10	GH6	Xiloglucano: xiloglucosil transferasa (EC 2.4.1.207); Keratan-sulfato endo-1,4- β -galactosidasa (EC 3.2.1.103); endo-1,3- β -glucanasa (EC 3.2.1.39); endo-1,3 (4) - β -glucanasa (EC 3.2.1.6); liqueninasa (EC 3.2.1.73); β -agarasa (EC 3.2.1.81); κ -carragenasa (EC 3.2.1.83); xiloglucanasa (EC 3.2.1.151); endo- β -1,3-galactanasa (EC 3.2.1.181); β -porfirinasa (EC 3.2.1.178); hialuronoglucosaminidasa (EC 3.2.1.35); endo- β -1,4-galactosidasa (EC 3.2.1.-); quitina β -1,6-glucanosiltransferasa (EC 2.4.1.-); endo- β -1,4-galactosidasa (EC 3.2.1.-)
9	CE1	Acetil-xilano esterasa (EC 3.1.1.72); cinamil esterasa (EC 3.1.1.-); feruloil esterasa (EC 3.1.1.73); carboxil esterasa (EC 3.1.1.1); S-formilglutamina hidrolasa (EC 3.1.2.12); diacilglicerol O-aciltransferasa (EC 2.3.1.20); trehalosa O-micoiltransferasa (EC 2.3.1.122)
9	PL1	Pectato liasa (EC 4.2.2.2); pectato disacárido-liasa (EC 4.2.2.9); pectina liasa (EC 4.2.2.10).
7	CE8	Pectina metilesterasa (EC 3.1.1.11)
7	GH8	Quitinasa (EC 3.2.1.14); lisozima (EC 3.2.1.17); Manosil-glicoproteína endo- β -N- acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.96); hidrolasa de peptidoglucano con especificidad de endo- β -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.-); Nod factor hidrolasa (EC 3.2.1.-); inhibidor de xilanasa; concanavalina B; narbonina
7	GH28	Poligalacturonasa (EC 3.2.1.15); α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40); exo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.67); exo-poligalacturonosidasa (EC 3.2.1.82); ramnogalacturonano hidrolasa (EC 3.2.1.171); ramnogalacturonano galacturonohidrolasa (EC 3.2.1.173); endo-xilogalacturonano hidrolasa (EC 3.2.1.-)

Tabla V. I. (Continuación).

Frecuencia	Familia	Actividad en la Familia
7	GH76	α -1,6-mananasa (EC 3.2.1.101)
6	GH3	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); xilano 1,4- β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); β -glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45); β -N-acetilhexosaminidasa (EC 3.2.1.52); α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); glucano 1,3- β -glucosidasa (EC 3.2.1.58); glucano 1,4- β -glucosidasa (EC 3.2.1.74); oligoxiloglucano β -glicosidasa (EC 3.2.1.120); coniferina β -glucosidasa (EC 3.2.1.126); exo-1,3-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.1); β -N-acetilglucosaminida fosforilasa (EC 2.4.1.-)
6	GH43	β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); arabinanasa (EC 3.2.1.99); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactano 1,3- β -galactosidasa (EC 3.2.1.145); α -1,2-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.-); exo- α -1,5-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.-); exo- α -1,5-L-arabinanasa (EC 3.2.1.-); β -1,3-xilosidasa (EC 3.2.1.-)
6	PL3	Pectato liasa (EC 4.2.2.2)
5	AAII	Monooxigenasas líticas de polisacáridos dependientes de Cobre
5	GHII	Endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8); endo- β -1,3-xilanasas (EC 3.2.1.32)
5	GH92	Manosil-oligosacárido α -1,2-manosidasa (EC 3.2.1.113); manosil-oligosacárido α -1,3-manosidasa (EC 3.2.1.-); manosil-oligosacárido α -1,6-manosidasa (EC 3.2.1.-); α -manosidasa (EC 3.2.1.24); α -1,2-manosidasa (EC 3.2.1.-); α -1,3-manosidasa (EC 3.2.1.-); α -1,4-manosidasa (EC 3.2.1.-); manosil-1-fosfodiéster α -1, P-manosidasa (EC 3.2.1.-)
4	GH10	Endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8); endo-1,3- β -xilanasas (EC 3.2.1.32); tomatinasa (EC 3.2.1.-); xiloglucano-endotransglucosilasa (EC 2.4.2.-)
4	GH17	Glucano endo-1,3- β -glucosidasa (EC 3.2.1.39); glucano 1,3- β -glucosidasa (EC 3.2.1.58); liqueninasa (EC 3.2.1.73); β -D-glucopiranosil abscisato β -glucosidasa (EC 3.2.1.175); β -1,3-glucanosiltransglucosilasa (EC 2.4.1.-)
4	GH2	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23); β -manosidasa (EC 3.2.1.25); β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31); α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); manosilglicoproteína endo- β -manosidasa (EC 3.2.1.152); exo- β -glucosaminidasa (EC 3.2.1.165); α -L-arabinopiranosidasa (EC 3.2.1.-); β -galacturonidasa (EC 3.2.1.-)
4	GH31	α -glucosidasa (EC 3.2.1.20); α -galactosidasa (EC 3.2.1.22); α -manosidasa (EC 3.2.1.24); α -1,3-glucosidasa (EC 3.2.1.84); sucrosa-glucosidasa (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); α -xilosidasa (EC 3.2.1.177); α -glucano liasa (EC 4.2.2.13); isomaltosiltransferasa (EC 2.4.1.-); oligosacárido α -1,4-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.161); sulfoquinovosidasa (EC 3.2.1.-)
4	GH55	exo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.58); endo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39)
4	GH72	β -1,3-glucanosiltransglucosilasa (EC 2.4.1.-)
3	AA1	Lacasa / p-difenol: oxígeno oxidorreductasa / ferroxidasa (EC 1.10.3.2); ; ferroxidasa (EC 1.10.3.-); Oxidasa multicapa similar a la lacasa (EC 1.10.3.-)
3	AA2	Manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13); peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16); peroxidasa de lignina (EC 1.11.1.14); peroxidasa (EC 1.11.1.-)
3	AA5	Oxidasa con oxígeno como aceptor (EC 1.1.3.-); galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9); glioxal oxidasa (EC 1.2.3.15); alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13)

Tabla V. I. (Continuación).

Frecuencia	Familia	Actividad en la Familia
3	AA8	Dominio de hierro reductasa
3	CBM50	Unión a enzimas GH8, GH9, GH23, GH24, GH25 y GH73 (Ej. Enzimas líicas de quitina o peptidoglicano); Dominio LysM
3	CEr6	Acetilsterasa (EC 3.1.1.6)
3	GH28	Glucano endo-1,3- β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.39)
3	GH31	Exo- β -1,3 / 1,6-glucanasa con actividad endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.-)
3	GH35	β -galactosidasa (EC 3.2.1.23); exo- β - glucosaminidasa (EC 3.2.1.165); exo- β -1,4-galactanosa (EC 3.2.1.-); β -1,3-galactosidasa (EC 3.2.1.-)
3	GH6	Endoglucanasa (EC 3.2.1.4); celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)
3	GH7	Endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4); Celulosa 1,4- β -celobiosidasa (final reductor) (EC 3.2.1.176); quitosanasa (EC 3.2.1.132); endo- β -1,3-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.73)
3	GH74	Endoglucanasa (EC 3.2.1.4); oligoxiloglucano celobiohidrolasa reductora de final específico (EC 3.2.1.150); xiloglucanasa (EC 3.2.1.151)
3	PL4	Ramnogalacturonano endoliasa (EC 4.2.2.23)
2	AA12	Oxidorreductasa dependiente de pirroloquinolina quinona
2	CBM19	Unión a quitina
2	CEr5	4-O-metil-glucuronoil metilesterasa (EC 3.1.1.-)
2	CE3	Acetilxilam esterasa (EC 3.1.1.72)
2	CE4	Acetilxilam esterasa (EC 3.1.1.72); quitina desacetilasa (EC 3.5.1.4); quitooligosacárido desacetilasa (EC 3.5.1.-); desacetilasa de GlcNAc de peptidoglicano (EC 3.5.1.-); desacetilasa del ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano (EC 3.5.1.-).
2	GH105	Ramnogalacturonil insaturado hidrolasa (EC 3.2.1.172); β -glucuronil hidrolasa (EC 3.2.1.-); d-4,5- α -galacturonidasa (EC 3.2.1.-)
2	GH15	Xilano α -1,2-glucuronidasa (3.2.1.131); α - (4-O-metil) -glucuronidasa (3.2.1.-)
2	GH2	Endoglucanasa (EC 3.2.1.4); xiloglucano específica endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.151); β -1,3-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.73); xiloglucan:xiloglucosil transferasa (EC 2.4.1.207)
2	GH20	β -hexosaminidasa (EC 3.2.1.52); lacto-N-biosidasa (EC 3.2.1.140); β -1,6-N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.-); β -6-SO3-N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.-)
2	GH27	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22); α -N-acetilgalactosaminidasa (EC 3.2.1.49); glucano 1,6- α -isomaltosidasa (EC 3.2.1.94); β -L-arabinopiranosidasa (EC 3.2.1.88); galactan: galactan galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-)

Tabla V. I. (Continuación).

Frecuencia	Familia	Actividad en la Familia
2	GH125	UDP-glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.17); zeatina O- β -xilosisiltransferasa (EC 2.4.2.40); 2-hidroxiacliesfingosina 1- β -galactosiltransferasa (EC 2.4.1.45); N-acilesfingosina galactosiltransferasa (EC 2.4.1.47); flavonol 3-O-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.91); antocianidina 3-O-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.15); sinapato 1-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.120); indol-3-acetato β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.121); flavonol L-ramnosiltransferasa (EC 2.4.1.159); esteroil 3 β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.173); UDP-Glc: 4-hidroxibenzoato 4-O- β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.194); zeatina O- β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.203); limonoide glucosiltransferasa (EC 2.4.1.210); UDP-GlcA: baicaleína 7-O- β -glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.253); UDP-Glc: chalcona 4'-O- β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.286); ecisteroide UDP-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-); β -glucosiltransferasa del ácido salicílico (EC 2.4.1.-); antocianina 3-O-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-); antocianina 5-O-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-); dTDP- β -2-desoxi-L-fucosa: α -L-2-desoxifucosiltransferasa (EC 2.4.1.-); UDP- β -L-ramnosa: α -L-ramnosiltransferasa (EC 2.4.1.-); zeaxantina glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
2	GH30	Endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8); β -glucosidasa (3.2.1.21); β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31); β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); β -fucosidasa (EC 3.2.1.38); glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45); β -1,6-glucanasa (EC 3.2.1.75); glucuronoarabinosilano endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.136); endo- β -1,6-galactanasas (EC: 3.2.1.164); β -xilosidasa (extremo reductor) (EC 3.2.1.-)
2	GH32	Invertasa (EC 3.2.1.26); inulinasa (EC 3.2.1.7); β -2,6-fructan 6-levanbiohidrolasa (EC 3.2.1.64); endo-levanasa (EC 3.2.1.65); exoinulinasa (EC 3.2.1.80); fructano β -(2,1)-fructosidasa (EC 3.2.1.153); fructano β -(2,1)-fructosidasa (EC 3.2.1.154); sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (EC 2.4.1.99); 2,1-fructosano:2,1-fructosano 1-fructosiltransferasa (EC 2.4.1.100); levansucrasa (EC 2.4.1.10); 6 ^C -fructosiltransferasa (EC 2.4.1.243); fevan fructosiltransferasa (EC 2.4.1.-); sacarosa: sacarosa 6-fructosiltransferasa (6-SST) (EC 2.4.1.-); Cicloinulo-oligosacárido fructanotransferasa (EC 2.4.1.-)
2	GH45	Endoglucanasa (EC 3.2.1.4)
2	GH62	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)
2	GH63	Manosil-oligosacárido glucosidasa (EC 3.2.1.106); α -1,3-glucosidasa (EC 3.2.1.84); α -glucosidasa (EC 3.2.1.20); manosilglicerato hidrolasa (EC 3.2.1.170)
2	GH79	β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31); hialuronoglucuronidasa (EC 3.2.1.36); heparanasa (EC 3.2.1.166); baicalina β -glucuronidasa (EC 3.2.1.167); β -4-O-metil-glucuronidasa (EC 3.2.1.-)
2	GH93	Exo- α -L-1,5-arabinanasa (EC 3.2.1.-)
2	GH95	α -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51); α -1,2-L-fucosidasa (EC 3.2.1.63); α -L-galactosidasa (EC 3.2.1.-)
2	GTr5	Glicolípido 2- α -manosiltransferasa (EC 2.4.1.131); GDP-Man: α -1,2-manosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
2	GT22	Dol-P-Man:Man6GlcNAc2-PP-Dol α -1,2-manosiltransferasa (EC 2.4.1.259); Dol-P-Man:Man8GlcNAc2-PP-Dol α -1,2-manosiltransferasa (EC 2.4.1.261); Dol-P-Man: Man2-GlcNAc-fosfatidilinositol α -1,2-manosiltransferasa (EC 2.4.1.-); Dol-P-Man: Man3-GlcNAc-fosfatidilinositol α -1,2-manosiltransferasa (EC 2.4.1.-)

Tabla V. I. (Continuación).

Frecuencia	Familia	Actividad en la Familia
I	CBM25	Unión al almidón
I	CBM35	Unión a xilano en xylanases; unión a mananos solubles en mananas; unión a β -galactano en 1,3- β -galactosidasa
I	CBM37	Unión a xilano, quitina y celulosa
I	CBM42	Unión a arabinofuranosa
I	CBM46	Unión a la celulosa
I	CE12	Pectina acetilsterasa (EC 3.1.1.-); ramnogalacturonano acetilsterasa (EC 3.1.1.-); acetilxilam esterasa (EC 3.1.1.72)
I	CE2	Acetilxilam esterasa (EC 3.1.1.72)
I	GH1	β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); β -galactosidasa (EC 3.2.1.23); β -manosidasa (EC 3.2.1.25); β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31); β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); β -D-fucosidasa (EC 3.2.1.38); glicosilceramidasa (EC 3.2.1.62); exo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.74); 6-fosfo- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85); 6-fosfo- β -glucosidasa (EC 3.2.1.86); estrictosidina β -glucosidasa (EC 3.2.1.105); lactasa (EC 3.2.1.108); amigdalina β -glucosidasa (EC 3.2.1.117); prunasina β -glucosidasa (EC 3.2.1.118); vicianina hidrolasa (EC 3.2.1.119); raucalfricina β -glucosidasa (EC 3.2.1.125); tioglucosidasa (EC 3.2.1.147); β -primeverosidasa (EC 3.2.1.149); β -apiosil- β -glucosidasa (EC 3.2.1.161); β -D-glucopiranosil absicisato β -glucosidasa (EC 3.2.1.175); DIMBOA β -glucosidasa (EC 3.2.1.182); β -glucosidasa (EC 3.2.1.-); Hidroxisourato hidrolasa (EC 3.-.-.-)
I	GH14	Endogalactosaminidasa (EC 3.2.1.109)
I	GH34	Manan endo-1,4- β -manosidasa (EC 3.2.1.78)
I	GH15	Glucamilasa (EC 3.2.1.3); glucodextranasa (EC 3.2.1.70); α , α -trehalasa (EC 3.2.1.28); dextrano dextrinasa (EC 2.4.1.2)
I	GH26	β -mananasa (EC 3.2.1.78); exo- β -1,4-mannobiohidrolasa (EC 3.2.1.100); β -1,3-xilanasa (EC 3.2.1.32); liquenasa / endo- β -1,3-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.73); exo- β -mananasa (EC 3.2.1.-)
I	GH36	α -galactosidasa (EC 3.2.1.22); α -N-acetilgalactosaminidasa (EC 3.2.1.49); Galactinol-rafínosa galactosiltransferasa (EC 2.4.1.67); galactinol-sucrosa galactosiltransferasa (EC 2.4.1.82)
I	GH37	α , α -trehalasa (EC 3.2.1.28)
I	GH47	α -manosidasa (EC 3.2.1.113)
I	GH51	Endoglucanasa (EC 3.2.1.4); endo- β -1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8); β -xilosidasa (EC 3.2.1.37); α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)
I	GH53	endo- β -1,4-galactanasa (EC 3.2.1.89)
I	GH54	α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55); β -xilosidasa (EC 3.2.1.37)
I	GH67	α -glucuronidasa (EC 3.2.1.139); xilano α -1,2-glucuronidasa (EC 3.2.1.131)
I	GH71	α -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.59)

Tabla V. I. (Continuación).

Frecuencia	Familia	Actividad en la Familia
I	GH81	endo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39)
I	GT1	UDP-glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.17); zeatina O- β -xilosiltransferasa (EC 2.4.2.40); 2-hidroxiacilfingosina 1- β -galactosiltransferasa (EC 2.4.1.45); N-acilfingosina galactosiltransferasa (EC 2.4.1.47); flavonol 3-O-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.91); antocianidina 3-O-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.115); sinapato 1-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.120); indol-3-acetato β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.121); flavonol L-ramnosiltransferasa (EC 2.4.1.159); esterol glucosiltransferasa (EC 2.4.1.173); UDP-Glc: 4-hidroxibenzoato 4-O- β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.194); zeatina O- β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.203); limonoide glucosiltransferasa (EC 2.4.1.210); UDP-GlcA: baicaleína 7-O- β -glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.253); UDP-Glc: chalcona 4'-O- β -glucosiltransferasa (EC 2.4.1.286); ecdisteroide UDP-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-); β -glucosiltransferasa del ácido salicílico (EC 2.4.1.-); antocianina 3-O-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-); antocianina 5-O-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-); dTDP- β -2-desoxi-L-fucosa: α -L-2-desoxifucosiltransferasa (EC 2.4.1.-); UDP- β -L-ramnosa: α -L-ramnosiltransferasa (EC 2.4.1.-); zeaxantina glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
I	GT32	α -1,6-manosiltransferasa (EC 2.4.1.-); α -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.-); α -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa (EC 2.4.1.-); GDP-Man: inositol-fosforilceramida transferasa (EC 2.4.1.-); UDP-Gal: β -galactoside α -1,4-galactosyltransferase (EC 2.4.1.-); UDP-Gal: lactosa / N-acetil-lactosamina α -1,4-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
I	GT34	UDP-Gal: galactomanano α -1,6-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-); UDP-Xyl: xiloglucan α -1,6-xilosyltransferase (EC 2.4.2.39); α -1,2-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
I	GT58	Dol-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-Dol α -1,3-manosiltransferasa (EC 2.4.1.258)
I	GT8	Lipopolisacárido α -1,3-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.44); UDP-Glc: (glucosil) lipopolisacárido α -1,2-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-); lipopolisacárido glucosiltransferasa 1 (EC 2.4.1.58); glucogenina glucosiltransferasa (EC 2.4.1.186); inositol 1- α -galactosiltransferasa (galactinol sintasa) (EC 2.4.1.123); homogalacturonan α -1,4-galacturonosyltransferase (EC 2.4.1.43); UDP-GlcA: xilana α -glucuroniltransferasa (EC 2.4.1.-)
I	PL24	Ulvano liasa (EC 4.2.2.-)
I	PL9	Pectato liasa (EC 4.2.2.2); pectato disacárido-liasa (EC 4.2.2.g); tiopeptidoglucano liasa (EC 4.2.2.-)

Mayor información acerca de la clasificación en <http://www.cazy.org/Definitions-and-Terminology.html>.

Tabla V. II. Frecuencia de las familias de peptidasas MEROPS en el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Frecuencia	Familia	Tipo Catalítico	Contenido de la Familia
34	S9	Serina	Peptidasas dependientes de Serina
10	S33	Serina	Principalmente exopeptidasas N-terminales
8	M14	Metalo	Metalo-carboxipeptidasas
8	M28	Metalo	Amino-peptidasas y carboxipeptidasas
8	S10	Serina	Carboxipeptidasas
7	A1	Aspártico	Endopeptidasas; la mayoría activa a pH ácidos
7	S8	Serina	Subtilisina y sus homólogos
5	M20	Metalo	Exopeptidasas: carboxipeptidasas, dipeptidasas y una amino-peptidasa especializada
5	S53	Serina	Endopeptidasas de acción ácida y una tripeptidil-peptidasa
3	A2	Aspártico	Endopeptidasas
3	M38	Metalo	Omega peptidasa
3	S1	Serina	Peptidasas dependientes de Serina
2	C56	Cisteína	Endopeptidasa
2	G1	Glutámico	Endopeptidasa fúngica
2	M24	Metalo	Exopeptidasas que requieren iones co-catalíticos de cobalto o manganeso
2	S28	Serina	Exopeptidasas que hidrolizan enlaces de prolil, eucariotas
2	S49	Serina	Endopeptidasas
1	C13	Cisteína	Asparaginil endopeptidasas y glicosilfosfatidilinositol:proteína transamidasa
1	C69	Cisteína	Dipeptidasas y amino-peptidasas
1	C10	Cisteína	Endopeptidasas
1	M10	Metalo	Metaloendopeptidasas
1	M35	Metalo	Metaloendopeptidasas fúngicas
1	M43	Metalo	Metaloendopeptidasas
1	S12	Serina	D-Ala-D-Ala carboxipeptidasas tipo serina
1	S41	Serina	Endopeptidasas
1	S51	Serina	Exopeptidasas que hidrolizan enlaces alfa-aspartilo
1	T3	Treonina	Peptidasas componentes del proteasoma y peptidasas compuestas relacionadas

Mayor información acerca de la clasificación: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P.

Tabla V. III. Frecuencia de las familias de inhibidores de peptidasas MEROPS en el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Frecuencia	Familia	Contenido de la Familia
5	I51	Un inhibidor de la serin-carboxipeptidasa Y; sus homólogos inhiben varias quinasas
1	I5	Un inhibidor de serín-peptidasas
1	I63	Un Inhibidor de la metalopeptidasa pappalisina-1
1	I71	Inhibidores de cisteín-peptidasas
1	I9	Inhibidores de serín-peptidasas de la familia de las subtilisinas (S8)

Mayor información acerca de la clasificación: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=I

Capítulo V

Tabla V. IV. Frecuencia de las superfamilias LED en el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Frecuencia	Superfamilia
56	abH32 - Xilanasas esterasas
13	abHo3 - Similares a lipasa de <i>Candida rugosa</i>
13	abH36 - Cutinasas
11	abHo8 - Hidrolasas citosólicas
11	abHo9 - Hidrolasas microsomales
8	abH34 - Similares a proteína protectora lisosomal
7	abHo1 - Carboxilesterasas
6	abH23 - Lipasas de hongos filamentosos
5	abHo4 - Similares a lipasa 2 de <i>Moraxella</i>
3	abH20 - Lipasas de lipoproteínas
3	abH27 - Similares a dipeptidil peptidasa iv
2	abHo7 - Similares a lipasa 3 de <i>Moraxella</i>
1	abH21 - Esterasas bacterianas
1	abH28 - Prolil-endorpeptidasas
1	abH38 - Similares a lipasa a de <i>Candida antarctica</i>

Mayor información acerca de la clasificación: <http://www.led.uni-stuttgart.de>

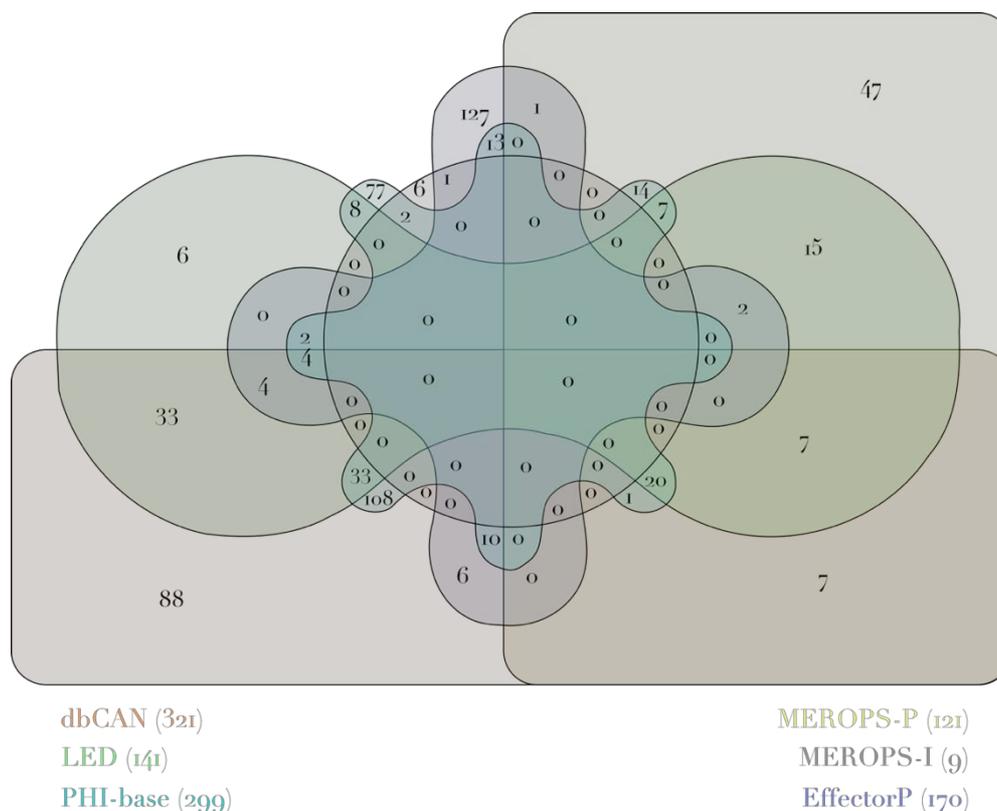


Figura V. I. Diagrama de Venn que exhibe las relaciones entre los resultados de las distintas herramientas utilizadas para caracterizar el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216. MEROPS-P, MEROPS-Peptidasas; MEROPS-I, MEROPS-Inhibidores de peptidasas. La tabla V. V provee la identidad de las proteínas en cuestión.

Capítulo V

Tabla V. V. Proteínas secretadas identificadas por las distintas herramientas.

Herramienta	Resultados	Proteína ¹
EffectorP	127	KNG44828, KNG48362, KNG47651, KNG50367, KNG49916, KNG49439, KNG50033, KNG50634, KNG44806, KNG44912, KNG48395, KNG48043, KNG46697, KNG49872, KNG50641, KNG50032, KNG50366, KNG46207, KNG46224, KNG49358, KNG45713, KNG45354, KNG47034, KNG48762, KNG52264, KNG48427, KNG51303, KNG45224, KNG51591, KNG50799, KNG51886, KNG47081, KNG46415, KNG45375, KNG52235, KNG52218, KNG51520, KNG51621, KNG47264, KNG50371, KNG49012, KNG52772, KNG50031, KNG44343, KNG44745, KNG46663, KNG51588, KNG49945, KNG49347, KNG44617, KNG50380, KNG47515, KNG44604, KNG46354, KNG51953, KNG46894, KNG47345, KNG52253, KNG49652, KNG52438, KNG50781, KNG52217, KNG49607, KNG46870, KNG44313, KNG52211, KNG44913, KNG45280, KNG48544, KNG48788, KNG46899, KNG51666, KNG45263, KNG49559, KNG44972, KNG49483, KNG44880, KNG49360, KNG52731, KNG44704, KNG48029, KNG44662, KNG51124, KNG46348, KNG48794, KNG50835, KNG51022, KNG48559, KNG51100, KNG47225, KNG45971, KNG45399, KNG46316, KNG52398, KNG47243, KNG47204, KNG47043, KNG46423, KNG46295, KNG45456, KNG52831, KNG51809, KNG52893, KNG44368, KNG52884, KNG49654, KNG45672, KNG52663, KNG45104, KNG47981, KNG46087, KNG52239, KNG46312, KNG50988, KNG46981, KNG52751, KNG50447, KNG45566, KNG50493, KNG49655, KNG46873, KNG51615, KNG46472, KNG50960, KNG46070, KNG51697, KNG47560
PHI-Base dbCAN	108	KNG48707, KNG47829, KNG51113, KNG51875, KNG50758, KNG50074, KNG50505, KNG46186, KNG51726, KNG44340, KNG52032, KNG51838, KNG45293, KNG52188, KNG48867, KNG46377, KNG46131, KNG44425, KNG46114, KNG51744, KNG46562, KNG51614, KNG52407, KNG45754, KNG50944, KNG44113, KNG44547, KNG47032, KNG50731, KNG51474, KNG47480, KNG49839, KNG47954, KNG50269, KNG48495, KNG50658, KNG49831, KNG52497, KNG45691, KNG51924, KNG46084, KNG44766, KNG52049, KNG51915, KNG49438, KNG46078, KNG46673, KNG46990, KNG50705, KNG48647, KNG48600, KNG45773, KNG43926, KNG46221, KNG49412, KNG47157, KNG46659, KNG48497, KNG46420, KNG45059, KNG49361, KNG50334, KNG44194, KNG45774, KNG45760, KNG46113, KNG51072, KNG45573, KNG51066, KNG45634, KNG46732, KNG48940, KNG47520, KNG47465, KNG51081, KNG52516, KNG52719, KNG47782, KNG50216, KNG45567, KNG45264, KNG47937, KNG50037, KNG52092, KNG43943, KNG51587, KNG47732, KNG51010, KNG47022, KNG47075, KNG52019, KNG46344, KNG51445, KNG47828, KNG44063, KNG45821, KNG45220, KNG43949, KNG44543, KNG46158, KNG52247, KNG47944, KNG48573, KNG47356, KNG48376, KNG50938, KNG46052, KNG48551
dbCAN	88	KNG49906, KNG48390, KNG46255, KNG48954, KNG48494, KNG49160, KNG49519, KNG46994, KNG44860, KNG51171, KNG50142, KNG49319, KNG50023, KNG50548, KNG52789, KNG48816, KNG50421, KNG50513, KNG48250, KNG52401, KNG51415, KNG51246, KNG51921, KNG48605, KNG44331, KNG52098, KNG49563, KNG49564, KNG45892, KNG47492, KNG47968, KNG48498, KNG46067, KNG46395, KNG44922, KNG44289, KNG47004, KNG47962, KNG45651, KNG44234, KNG47740, KNG47153,

Capítulo V

Tabla V. V. (Continuación).

Herramienta	Resultados	Proteína (Número de acceso al GenBank)
		KNG47004, KNG47962, KNG45651, KNG44234, KNG47740, KNG47153, KNG52015, KNG44188, KNG44330, KNG44715, KNG45988, KNG47095, KNG52355, KNG45090, KNG49974, KNG44253, KNG52737, KNG47761, KNG46613, KNG45189, KNG44098, KNG46055, KNG50685, KNG51722, KNG48297, KNG45989, KNG50182, KNG48740, KNG51834, KNG45321, KNG52111, KNG46244, KNG50881, KNG48076, KNG52033, KNG45527, KNG50258, KNG45379, KNG45282, KNG50104, KNG46730, KNG45020, KNG45595, KNG51720, KNG45081, KNG45149, KNG48628, KNG49430, KNG52083, KNG52832, KNG52623, KNG52514
PHI-Base	77	KNG44051, KNG50552, KNG45429, KNG47875, KNG45497, KNG44743, KNG49799, KNG50806, KNG45362, KNG47277, KNG48356, KNG44381, KNG44257, KNG45824, KNG44414, KNG49825, KNG45206, KNG49477, KNG45428, KNG49271, KNG52525, KNG46779, KNG45620, KNG49749, KNG44329, KNG52600, KNG49702, KNG52294, KNG47224, KNG50590, KNG51755, KNG44339, KNG50826, KNG50268, KNG49265, KNG50504, KNG47650, KNG44638, KNG48755, KNG46282, KNG52896, KNG46998, KNG46886, KNG49991, KNG52216, KNG50171, KNG50202, KNG45732, KNG51186, KNG49756, KNG46283, KNG50020, KNG44756, KNG44659, KNG51564, KNG51282, KNG45532, KNG50388, KNG51204, KNG46049, KNG52621, KNG49758, KNG50813, KNG45393, KNG45307, KNG50507, KNG47302, KNG48022, KNG50854, KNG51320, KNG44568, KNG43952, KNG52729, KNG46360, KNG47883, KNG44446, KNG48946
Merops-P	47	KNG50392, KNG51635, KNG49084, KNG47779, KNG52110, KNG47694, KNG50103, KNG44245, KNG48187, KNG51864, KNG49658, KNG47969, KNG47811, KNG43939, KNG52754, KNG45895, KNG51981, KNG48044, KNG52181, KNG51019, KNG44646, KNG49648, KNG49413, KNG50584, KNG44477, KNG47489, KNG50350, KNG48448, KNG51162, KNG51565, KNG51756, KNG48502, KNG44060, KNG45978, KNG46825, KNG50204, KNG44345, KNG51011, KNG50122, KNG49374, KNG50527, KNG49333, KNG45208, KNG46542, KNG50723, KNG44723, KNG45528
LED PHI-Base dbCAN	33	KNG52048, KNG51107, KNG49292, KNG47674, KNG51801, KNG45283, KNG50852, KNG44456, KNG52084, KNG52116, KNG49625, KNG45825, KNG50248, KNG47716, KNG45018, KNG46699, KNG48104, KNG49167, KNG46356, KNG45522, KNG48769, KNG52361, KNG46109, KNG51088, KNG47868, KNG51743, KNG44529, KNG51056, KNG51034, KNG51865, KNG47485, KNG48784, KNG48927
LED dbCAN	33	KNG45990, KNG48040, KNG51151, KNG50879, KNG47754, KNG44923, KNG44441, KNG50753, KNG48162, KNG50521, KNG45207, KNG49316, KNG51281, KNG52549, KNG46577, KNG50008, KNG45205, KNG49317, KNG51977, KNG47947, KNG44481, KNG47909, KNG45331, KNG51024, KNG48455, KNG46465, KNG51533, KNG50486, KNG47097, KNG45935, KNG52169, KNG46424, KNG52474
LED PHI-Base Merops-P dbCAN	20	KNG47360, KNG49894, KNG45897, KNG50079, KNG48724, KNG52062, KNG46775, KNG50858, KNG48255, KNG48135, KNG49934, KNG49315, KNG45443, KNG52655, KNG48998, KNG45896, KNG47995, KNG47234, KNG51840, KNG52705

Capítulo V

Tabla V. V. (Continuación).

Herramienta	Resultados	Proteína (Número de acceso al GenBank)
LED Merops-P	15	KNK50816, KNK45415, KNK51262, KNK49803, KNK48910, KNK49525, KNK46382, KNK48507, KNK49057, KNK47337, KNK44482, KNK49915, KNK48501, KNK51192, KNK46727
PHI-Base Merops-P	14	KNK51008, KNK47024, KNK47511, KNK49154, KNK44108, KNK44392, KNK50676, KNK47033, KNK50766, KNK47970, KNK49844, KNK49101, KNK51985, KNK47233
EffectorP PHI-Base	13	KNK51227, KNK44183, KNK48768, KNK50436, KNK46314, KNK49653, KNK45861, KNK52402, KNK44823, KNK48201, KNK48760, KNK49171, KNK44611
EffectorP PHI-Base dbCAN	10	KNK46723, KNK44433, KNK52447, KNK51646, KNK50651, KNK52702, KNK49969, KNK50869, KNK51099, KNK51272
LED PHI-Base	8	KNK44781, KNK49008, KNK49752, KNK47321, KNK47290, KNK49261, KNK44541, KNK45818
LED Merops-P dbCAN	7	KNK44037, KNK50098, KNK47948, KNK52082, KNK48929, KNK49324, KNK43961
LED PHI-Base Merops-P	7	KNK51237, KNK51264, KNK48895, KNK49890, KNK50431, KNK48833, KNK49667
Merops-P dbCAN	7	KNK45103, KNK45123, KNK51094, KNK48699, KNK45991, KNK44206, KNK52590
EffectorP dbCAN	6	KNK49621, KNK47745, KNK45830, KNK47900, KNK50819, KNK51568
Merops-I	6	KNK44560, KNK50775, KNK47700, KNK46119, KNK51833, KNK50160
LED	6	KNK46153, KNK44463, KNK52793, KNK44710, KNK46904, KNK44036
EffectorP LED PHI-Base dbCAN	4	KNK50087, KNK45749, KNK50043, KNK47549
EffectorP LED dbCAN	4	KNK46432, KNK51197, KNK46412, KNK46000
EffectorP LED Merops-P	2	KNK46392, KNK49297
EffectorP LED PHI-Base	2	KNK49846, KNK44231
Merops-I PHI-Base	2	KNK47393, KNK52206

Capítulo V

Tabla V. V. (Continuación).

Herramienta	Resultados	Proteína (Número de acceso al GenBank)
PHI-Base Merops-P dbCAN	1	KNG49302
EffectorP Merops-P	1	KNG51080
EffectorP Merops-I	1	KNG50345

¹ Número de acceso al GenBank.

Merops-P: peptidasas; Merops-I, inhibidores de peptidasas.

Por otra parte, al comparar el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216 con el de otras especies fúngicas de diversos hábitos, se pudo corroborar que su perfil de efectores concuerda con el de otros hongos de hábito necrotrófico y saprotrófico, principalmente con relación al porcentaje (respecto al secretoma) de CAZymes (Tabla V. VI).

Tabla V. VI. CAZymes, peptidasas e inhibidores de peptidasas de secretomas de hongos con diferentes hábitos.

Hábito	Especie	CAZymes	Peptidasas (P)	Inhibidores de P	Secretoma	Proteoma
Saprótrofo	<i>Aspergillus nidulans</i> A	335 (29,33)	64 (5,60)	2 (0,1751)	1142 (10,69)	10680
	<i>Chaetomium globosum</i> A	400 (30,75)	81 (6,23)	3 (0,2306)	1301 (11,70)	11124
	<i>Neurospora crassa</i> A	262 (24,53)	61 (5,71)	5 (0,4682)	1068 (9,90)	10785
	<i>Rhizidhysteron rufulum</i> A	360 (27,61)	73 (5,60)	3 (0,2301)	1304 (10,76)	12117
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> B	246 (19,31)	131 (10,28)	1 (0,0785)	1274 (9,37)	13602
	<i>Alternaria alternata</i> A	454 (26,20)	108 (6,23)	4 (0,2308)	1733 (12,87)	13469
	<i>Botrytis cinerea</i> A	276 (22,90)	78 (6,47)	2 (0,1660)	1205 (7,33)	16447
	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> A	351 (23,05)	90 (5,91)	5 (0,3283)	1523 (11,97)	12720
	<i>Pyrenophora teres</i> f. sp. <i>terres</i> A	322 (24,36)	94 (7,11)	4 (0,3026)	1322 (11,20)	11799
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> A	254 (24,66)	57 (5,53)	2 (0,1942)	1030 (7,10)	14503
Hemibiótrofo	<i>Stagonospora nodorum</i> A	307 (22,05)	93 (6,68)	4 (0,2874)	1392 (11,24)	12380
	<i>Stemphylium lycopersici</i> A	321 (31,94)	121 (12,04)	9 (0,8955)	1005 (11,17)	8997
	<i>Cochliobolus sativus</i> A	380 (25,73)	91 (6,16)	5 (0,3934)	1271 (14,13)	8997
	<i>Dothistroma septosporium</i> A	188 (16,71)	65 (5,78)	4 (0,2708)	1477 (12,06)	12250
	<i>Fusarium graminearum</i> A	333 (21,65)	113 (7,35)	1 (0,0889)	1125 (8,94)	12580
	<i>Leptosphaeria maculans</i> A	292 (22,83)	73 (5,71)	10 (0,6502)	1538 (11,54)	13322
	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> A	462 (24,19)	114 (5,97)	0 (0,0000)	1279 (10,26)	12469
	<i>Setosphaeria turcica</i> A	340 (20,95)	86 (5,30)	6 (0,3141)	1910 (13,35)	14311
	<i>Zymoseptoria pseudotritici</i> A	228 (17,12)	121 (9,08)	1 (0,0751)	1332 (12,06)	11044
	Biótrofo facultativo	<i>Cladosporium fulvum</i> A	273 (19,32)	82 (5,80)	1 (0,0708)	1413 (10,00)
<i>Sporisorium reilianum</i> B		108 (13,67)	32 (4,05)	1 (0,1266)	790 (11,88)	6648
<i>Ustilago maydis</i> B		110 (14,12)	31 (3,98)	0 (0,0000)	779 (11,48)	6785

Tabla V. VI. (Continuación).

Hábito	Especie	CAZymes	Peptidasas (P)	Inhibidores de P	Secretoma	Proteoma
	<i>Oidiodendron maius</i> A En	423 (22,99)	139 (7,55)	1 (0,0543)	1840 (11,02)	16703
	<i>Piloderma croceum</i> B Ec	180 (13,34)	91 (6,75)	1 (0,0741)	1349 (6,25)	21583
	<i>Scleroderma citrinum</i> B Ec	100 (9,61)	52 (5,00)	1 (0,0961)	1041 (4,95)	21012
	<i>Sebacina vermifera</i> B En	311 (24,13)	56 (4,34)	5 (0,3879)	1289 (8,42)	15312
	<i>Tuber melanosporium</i> A Ec	130 (17,15)	30 (3,96)	2 (0,2639)	758 (7,54)	10058
Biótrofo obligado	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. hordei A	72 (8,89)	23 (2,84)	2 (0,2469)	810 (11,38)	7118
	<i>Erysiphe necator</i> A	66 (16,06)	19 (4,62)	2 (0,4866)	411 (6,34)	6484
	<i>Cronartium quercuum</i> f. sp. fusiforme B	148 (11,26)	28 (2,13)	2 (0,1522)	1314 (9,45)	13903
	<i>Melampsora lini</i> B	138 (16,22)	25 (2,94)	0 (0,0000)	851 (5,21)	16335
	<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici B	176 (8,66)	37 (1,82)	4 (0,1968)	2033 (12,72)	15979
	<i>Rhizophagus irregularis</i> G En	61 (4,65)	39 (2,97)	2 (0,1526)	1311 (4,92)	26659

La composición del secretoma de *S. lycopersici* en negrita corresponde a la calculada en la presente tesis según la metodología descrita anteriormente; los demás valores fueron calculados a partir de la información provista en MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/fungi/fungi.info.html>).

Porcentaje respecto al secretoma; Porcentaje respecto al proteoma

A: Ascomycota; B: Basidiomycota; G: Glomeromycota; Ec: Ectomicorrízico; En: Endomicorrízico

V. II. II. *Clusters* de Genes de Metabolitos Secundarios

Los programas antiSMASH y SMURF encontraron un total de 36 *clusters* de genes de metabolitos secundarios en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216; antiSMASH halló 34 *clusters* (Tabla V.VII), mientras que SMURF localizó 24 de *clusters* (Tabla V. VIII). Esta diferencia a favor de antiSMASH es consistente con lo reportado en otros estudios^{327,328}. Aún así, SMURF logró encontrar dos *clusters* adicionales que no habían podido ser localizados a través de antiSMASH (*clusters* 17 y 26).

El genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 cuenta con los genes que intervienen en la síntesis de melanina DHN. El *cluster* 2 contiene 9 genes; 3 de ellos homólogos a genes fúngicos cuyos productos han sido asociados con la síntesis de melanina DHN. Entre estos se encuentra el gen TW65_00090, cuyo producto fue anotado como policétido sintasa. Los dominios de este producto hipotético guardan estrecha relación con los de la Pks/AlbI de *Aspergillus fumigatus* y la policétido sintasa de *C. cassicola*³²⁹. En la ruta biosintética de la melanina DHN, esta proteína cataliza la síntesis de 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN) a partir de los precursores acetil-CoA y malonil-CoA³³⁰. Otro gen clave del *cluster* es el gen TW65_90091, que codificaría a la proteína KNG52673, anotada como 1,3,8-naftalentiol reductasa y que, en efecto, su secuencia es homóloga a las secuencias de otros genes fúngicos codificantes de la enzima 1,3,6-trihidroxinaftaleno (1,3,6-THN) reductasa. Esta enzima cataliza la reducción de 1,3,8-THN para la formación de vermelona. Asimismo, la misma es capaz de reducir 1,3,6,8-THN a scitalona, aunque con menor especificidad³³¹. Finalmente, este *cluster* también posee al gen TW65_90091, que codificaría al factor de transcripción *cmr1*. Interesantemente, cepas mutantes $\Delta cmr1$ de *M. oryzae* y *C. lagenarium* son capaces de producir melanina en apresorio, pero no en hifas vegetativas³³². En consecuencia, este factor de transcripción podría cumplir un rol en la regulación del proceso de melanización en *S. lycopersici*. Por otra parte, el *cluster* 34 alberga 22 genes; uno de ellos es homólogo a genes fúngicos cuyos productos han sido asociados a la síntesis de melanina DHN. El gen en cuestión es TW65_08623 y su proteína hipotética KNG44544 fue anotada como versicolorin reductasa. El análisis estructural de esta proteína hipotética mediante la Base de Datos de Dominio Conservado (CDD, *Conserved Domain Database*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) da cuenta de dominios relacionados a la scitalona

Capítulo V

deshidratasa (pfam02982) y la tri/tetrahidroxinaftaleno reductasa (cdo5362). La 1,3,6,8-THN reductasa es la enzima que cataliza la reducción de 1,3,6,8-THN a scitalona. Sin embargo, ésta también puede llevar a cabo la reducción del 1,3,6-THN a vermelona, aunque con menor especificidad. En cuanto a la scitalona deshidratasa, es la enzima que cataliza la deshidratación tanto de scitalona como de vermelona para dar 1,3,8-THN y DHN, respectivamente ³³ⁱ. Más aún, el análisis de la versicolorin reductasa hipotética (KNG44544) en InterPro sugirió que ésta posee actividad de scitalona deshidratasa (GO:0030411) y que intervendría en algún proceso (biológico) metabólico de la melanina (GO:0006582). Esto llevó a considerar que, probablemente, el gen TW65_08623 sea un artefacto producido por Fgenesh al fusionar genes aledaños. Efectivamente, la reanotación estructural de esta región utilizando el software Augustus, entrenado con *Magnaporthe grisea*, generó 4 genes; uno de ellos con homología a la scitalona deshidratasa y otro a la 1,3,6,8-THN reductasa. De esta manera, se completa el eslabón de enzimas necesarias para la síntesis de melanina vía DHN (Figura V. III). Cabe mencionar que también se encontraron genes claves para la biosíntesis de melanina vía L-DOPA y de piomelanina en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216, aunque no exclusivamente formando parte de clusters. Por ejemplo, se encontró que los productos de los genes TW65_03425 (*scaffold* LGLR01000200), TW65_03454 (*cluster* 11, LGLR01000200), TW65_04553 (LGLR01000218), TW65_06290 (LGLR01000254), TW65_06893 (LGLR01000283) y TW65_08545 (*cluster* 33, LGLR01000381) poseen el dominio central común de la tirosinasa, responsable de catalizar la conversión de tirosina a L-DOPA y, luego, a dopaquinona. Asimismo, se encontró que el producto de TW65_08800 (LGLR01000391) posee dominios característicos de lacasas fúngicas que han sido implicadas en el proceso de polimerización para la síntesis de la DHN-melanina y en la oxidación de L-DOPA a dopaquinona en la síntesis de la L-DOPA melanina. Por otra parte, el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 cuenta con el gen codificante de la enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (TW65_02235, *scaffold* LGLR01000193), encargada de convertir el 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato, intermediario de la piomelanina; sin embargo, no se halló al gen de la tirosina aminotransferasa, necesaria para convertir tirosina en 4-hidroxifenilpiruvato.

Tabla V. VII. *Clusters* de genes de metabolitos secundarios encontrados en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 por antiSMASH.

<i>Cluster</i>	<i>Scaffold</i>	Posición	<i>Backbone</i>	Tipo	Anotación
1	LGLR01000164	1908 - 62553 nt	KNKG52744 KNKG52741 KNKG52742	NRPS-Terpeno	Sintasa de péptido no ribosomal Sintasa de péptido no ribosomal Tricodieno sintasa
2	LGLR01000165	301560 - 348140 nts	KNKG52671 KNKG52673	tiPKS	Policétido sintasa 1,3,8-naftalenotriol reductasa
3	LGLR01000170	1 - 37630 nt	KNKG51973	tiPKS	Policétido sintasa
4	LGLR01000171	157263 - 201082 nt	KNKG51904	tiPKS	Chalcona sintasa b
5	LGLR01000178	942572 - 986420 nt	KNKG51506 KNKG51499	Ouro	Tirocidina sintetasa 1 Transportador de ácidos grasos de cadena larga
6	LGLR01000181	1 - 44001 nt	KNKG51071 KNKG51074	NRPS	Destruxina sintetasa Deshidrogenasa/reductasa sdr de cadena corta
7	LGLR01000182	39016 - 86887 nt	KNKG51057	tiPKS	Policétido sintasa
8	LGLR01000188	19732 - 63494 nt	KNKG50459 KNKG50466	Ouro	Proteína hipotética Enzima similar a NRPS
9	LGLR01000196	931701 - 975289 nt	KNKG50261	Ouro	Subunidad grande de L-aminoadipato-semialdehído deshidrogenasa
10	LGLR01000197	75512 - 118709 nt	KNKG49932	Ouro	Enzima similar a NRPS
11	LGLR01000200	432405 - 479637 nt	KNKG49863 KNKG49866	NRPS	Sintasa de péptido no ribosomal 6 Acil-CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga
12	LGLR01000205	1 - 30070 nt	KNKG49339	tiPKS	Policétido sintasa
13	LGLR01000205	981167 - 1037425 nt	KNKG49613	NRPS	Sintetasa no ribosómica 2
14	LGLR01000205	1508521 - 1546674 nt	KNKG49728 KNKG49726	NRPS-tiPKS	Policétido sintasa Proteína hipotética
15	LGLR01000212	1022295 - 1065929 nt	KNKG49242	Ouro	Proteína que contiene repetición de anquirina
16	LGLR01000224	210959 - 258797 nt	KNKG48389 KNKG48385	tiPKS	Precursor de la subunidad beta tipo 1 del proteasoma Superfamilia del facilitador principal, transportador de sustrato general

Tabla V. VII. (Continuación).

<i>Cluster</i>	<i>Scaffold</i>	<i>Posición</i>	<i>Backbone</i>	<i>Tipo</i>	<i>Anotación</i>
18	LGLRo1000227	1 - 21613 nt	KNG48017	Terpeno	Oxidosesualenol:lanosterol ciclasa
19	LGLRo1000228	1 - 26873 nt	KNG48001 KNG48002	nrPKS	Policétido sintasa Proteína hipotética
20	LGLRo1000241	79008 - 120787 nt	KNG47890	nrPKS	Síntesis de fenolpiocero, policétido sintasa ppsa
21	LGLRo1000242	148756 - 170136 nt	KNG47833	Terpeno	Geranilgeranil pirofosfato sintetasa
22	LGLRo1000242	232307 - 285126 nt	KNG47857 KNG47856	nrPKS-NRPS	Feniloxazolina sintasa mbtb Policétido sintasa
23	LGLRo1000245	1 - 17198 nt	KNG47736	Terpeno	Proteína que contiene el dominio de unión a terpeno sintasa
24	LGLRo1000249	344315 - 365945 nt	KNG47342	Terpeno	Escualeno sintetasa
25	LGLRo1000251	34559 - 61869 nt	KNG47232	Otro	Proteína similar a la acetyl-CoA sintetasa
27	LGLRo1000278	3008 - 25070 nt	KNG46670	Terpeno	Aristoloceno sintasa
28	LGLRo1000285	43114 - 498048 nt	KNG46671 KNG46389	NRPS	O-acetilhomoserina (tio)-liasa Proteína hipotética
29	LGLRo1000289	25936 - 76224 nt	KNG46190 KNG46188	nrPKS	Policétido sintasa Oxidoreductasa de la familia deshidrogenasa de unión al zinc
30	LGLRo1000318	37747 - 426290 nt	KNG45813 KNG45819	nrPKS	Lovastatina nonacétido sintasa Policétido sintasa
31	LGLRo1000318	240667 - 290893 nt	KNG45818 KNG45775	nrPKS	Policétido sintasa Policétido sintasa
32	LGLRo1000381	123385 - 171344 nt	KNG45780 KNG45776 KNG44599 KNG44600	nrPKS	Miembro 6 de la familia 16c deshidrogenasa/reductasa de cadena corta Familia de la deshidrogenasa reductasa de cadena corta Policétido sintasa
33	LGLRo1000381	202410 - 240128 nt	KNG44624 KNG44619	Lantipeptido	Deshidrogenasa de cadena corta Pisatina desmetilasa Proteína r similar a lantionina sintetasa c

Tabla V. VII. (Continuación).

<i>Cluster</i>	<i>Scaffold</i>	<i>Posición</i>	<i>Backbone</i>	<i>Tipo</i>	<i>Anotación</i>
34	LGLRo1000386	110 - 73068 nt	KNG44542	trPKS-indol	Policétido sintasa
			KNG44541		Proteína hipotética
			KNG44544		Versicolorina reductasa
			KNG44546		Dimetilalil triptófano sintasa 1
			KNG44548		Policétido sintasa
35	LGLRo1000392	1 - 9699 nt	KNG44310	trPKS	Ácido 6-metilsalicílico sintasa
36	LGLRo1000402	188687 - 211923 nt	KNG44260	Terpeno	Fitoeno sintetasa licopeno ciclasa
			KNG44257		Fitoeno deshidrogenasa
			KNG44263		Peroxióxido de hidrógeno tsar

Tabla V. VIII. Clusters de genes de metabolitos secundarios encontrados en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216 por SMURF.

<i>Cluster</i>	<i>Scaffold</i>	Posición	<i>Backbone</i>	Tipo	Anotación
1	LGLR01000164	16047-42553 nt	KNG52744	NRPS	Sintasa de péptido no ribosomal
3	LGLR01000170	5311-38298 nt	KNG51973	PKS	Policétido sintasa
6	LGLR01000181	16310-84650 nt	KNG51071	NRPS	Destruxina sintetasa
7	LGLR01000182	59016-88712 nt	KNG51057	PKS	Policétido sintasa
8	LGLR01000188	34735-43494 nt	KNG50459	Símil NRPS	Proteína hipotética
10	LGLR01000197	95512-100971 nt	KNG49932	Símil NRPS	Enzima similar a NRPS
11	LGLR01000200	424200-491794 nt	KNG49863	NRPS	Sintasa de péptido no ribosomal 6
12	LGLR01000205	4439-22797 nt	KNG49339	PKS	Policétido sintasa
13	LGLR01000205	995247-1017425 nt	KNG49613	NRPS	Sintasa de péptido no ribosomal 2
14	LGLR01000205	1474846-1541190 nt	KNG49728	PKS	Policétido sintasa
15	LGLR01000212	1031872-1067043	KNG49242	Símil NRPS	Proteína que contiene repetición de anquirina
16	LGLR01000224	218359-259344 nt	KNG48389	PKS	Policétido sintasa
17	LGLR01000226	904697-929482 nt	KNG48283	Símil PKS	Proteína de transporte de níquel de alta afinidad nici
19	LGLR01000228	76-12557 nt	KNG48001	PKS	Policétido sintasa
20	LGLR01000241	840650-120366 nt	KNG47890	PKS	Síntesis de fenolpiocero, policétido sintasa ppsa
22	LGLR01000242	250144-264441 nt	KNG47857	NRPS	Feniloxazolina sintasa mbtb
25	LGLR01000251	38676-57833 nt	KNG47232	Símil NRPS	Proteína similar a la acetil-CoA sintetasa
26	LGLR01000258	12490-41637 nt	KNG46901	Símil NRPS	Ligasa sintetasa dependiente de amp
28	LGLR01000285	61802-474901 nt	KNG46389	NRPS	Proteína hipotética
29	LGLR01000289	36155-56224 nt	KNG46190	PKS	Policétido sintasa
30	LGLR01000318	357121-421224 nt	KNG45813	PKS	Lovastatina nonacétido sintasa
31	LGLR01000318	239819-315971 nt	KNG45775	PKS	Policétido sintasa
32	LGLR01000381	114632-168416 nt	KNG44599	PKS	Policétido sintasa
34	LGLR01000386	4260-53068 nt	KNG44542	PKS	Policétido sintasa

Capítulo V

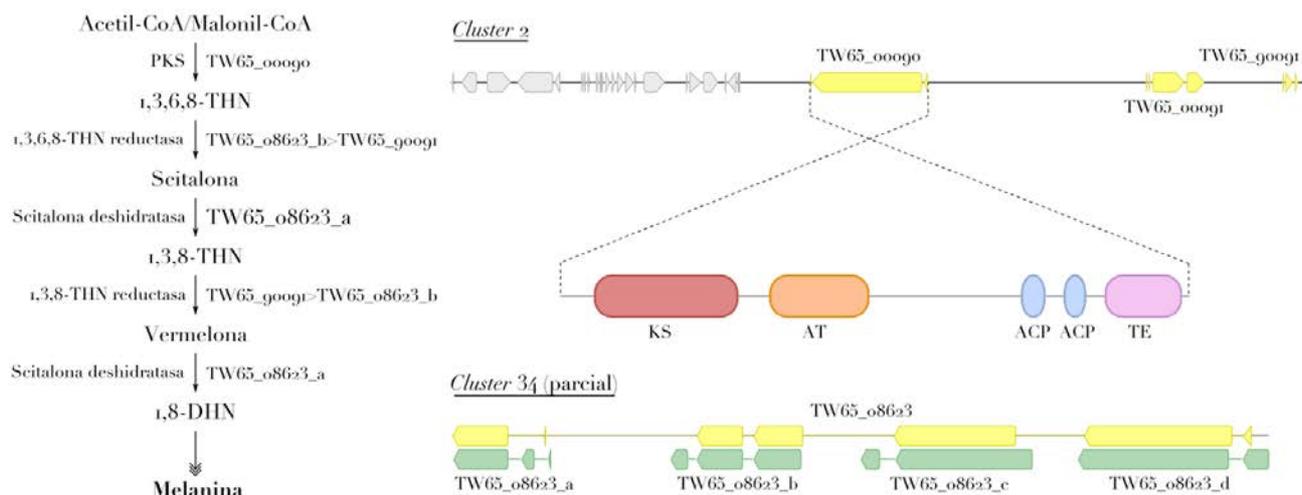


Figura V. III. Ruta biosintética de la melanina DHN en hongos y genes relacionados encontrados formando *clusters* en el genoma borrador de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Se proveen el locus_tag (TW65_#) de los genes intervinientes. Amarillo, genes del *cluster* que intervienen en la síntesis de la melanina DHN; gris, genes del *cluster* que no intervienen en la síntesis de melanina DHN; rojo, dominio cetosintasa (KS) de la policétido sintasa (PKS); naranja, dominio aciltransferasa (AT) de la policétido sintasa; celeste, dominio proteína portadora de acilo (ACP) de la policétido sintasa; lila, dominio tioesterasa (TE) de la policétido sintasa; verde, genes re-annotados (*Augustus*, *Magnaporthe grisea*). 1,3,6,8-THN, 1,3,6,8 tetrahidroxinaftaleno; 1,3,8-THN, 1,3,8 trihidroxinaftaleno; 1,8-DHN, dihidroxinaftaleno.

El número y perfil de *clusters* de genes de metabolitos secundarios encontrados en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 concuerda con el de otros hongos necrótrofos, caracterizados por un elevado número de *clusters* de genes de metabolitos secundarios, en general, pero de PKS y Terpenos, en particular (Tabla V. IX).

Tabla V. IX. Clusters de genes de metabolitos secundarios de hongos con diferentes hábitos.

Hábito	Especie	DMAT	PKS-NRPS	NRPS	Símil NRPS	PKS	Símil PKS	TC	Total
Saprótrofo	<i>Aspergillus nidulans</i> A	5 (8,9 ³)	1 (1,79)	9 (16,07)	13 (23,21)	22(39,29)	5 (8,9 ³)	1 (1,79)	56
	<i>Chaetomium globosum</i> A	1 (2,44)	3 (7,32)	10 (24,39)	3 (7,32)	17(41,46)	4 (9,76)	3 (7,32)	41
	<i>Neurospora crassa</i> A	1 (6,25)	0 (0,00)	3 (18,75)	3 (18,75)	7(43,75)	2 (12,50)	0 (0,00)	16
	<i>Rhizidhysteron rufulum</i> A	1 (1,56)	5 (7,81)	11 (17,19)	10 (15,63)	28(43,75)	4 (6,25)	5 (7,81)	64
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> B	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (4,17)	19 (79,17)	2(8,33)	0 (0,00)	2 (8,33)	24
	<i>Alternaria alternata</i> A	1 (3,45)	1 (3,45)	5 (17,24)	7 (24,14)	9(31,03)	3 (10,34)	3 (10,34)	29
	<i>Botrytis cinerea</i> A	2 (4,44)	1 (2,22)	7 (15,56)	14 (31,11)	13(28,89)	6 (13,33)	2 (4,44)	45
	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> A	2 (4,17)	1 (2,08)	10 (20,83)	8 (16,67)	19(39,58)	2 (4,17)	6 (12,50)	48
	<i>Pyrenophora teres</i> f. sp. teres A	1 (1,72)	1 (1,72)	24 (41,38)	11 (18,97)	17(29,31)	3 (5,17)	1 (1,72)	58
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> A	1 (2,94)	1 (2,94)	5 (14,71)	10 (29,41)	15(44,12)	2 (5,88)	0 (0,00)	34
Necrótrofo	<i>Stagonospora nodorum</i> A	2 (5,88)	1 (2,94)	9 (26,47)	6 (17,65)	13(38,24)	1 (2,94)	2 (5,88)	34
	<i>Stemphylium lycopersici</i> A	0 (0,00)	3 (8,33)	5 (13,89)	4 (11,11)	14(38,89)	1 (2,78)	6 (16,67)	36
	<i>Cochliobolus sativus</i> A	0 (0,00)	1 (3,33)	5 (16,67)	6 (20,00)	14(46,67)	2 (6,67)	2 (6,67)	30
	<i>Dothistroma septosporum</i> A	3 (7,14)	0 (0,00)	11 (26,19)	6 (14,29)	13(30,95)	4 (9,52)	5 (11,90)	42
	<i>Fusarium graminearum</i> A	1 (4,17)	1 (4,17)	5 (20,83)	9 (37,50)	4(16,67)	3 (12,50)	1 (4,17)	24
	<i>Leptosphaeria maculans</i> A	0 (0,00)	1 (2,70)	9 (24,32)	11 (29,73)	8(21,62)	3 (8,11)	5 (13,51)	37
	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> A	1 (3,57)	0 (0,00)	5 (17,86)	7 (25,00)	10(35,71)	3 (10,71)	2 (7,14)	28
	<i>Setosphaeria turcica</i> A	2 (5,13)	0 (0,00)	8 (20,51)	7 (17,95)	17(43,59)	2 (5,13)	3 (7,69)	39
	<i>Zymoseptoria pseudotritici</i> A	2 (4,08)	2 (4,08)	8 (16,33)	9 (18,37)	22(44,90)	5 (10,20)	1 (2,04)	49
	<i>Cladosporium fulvum</i> A	0 (0,00)	0 (0,00)	8 (27,59)	9 (31,03)	10(34,48)	2 (6,90)	0 (0,00)	29
Biótrofo facultativo	<i>Sporisorium reilianum</i> B	0 (0,00)	1 (2,63)	10 (26,32)	15 (39,47)	8(21,05)	3 (7,89)	1 (2,63)	38
	<i>Ustilago maydis</i> B	2 (12,50)	0 (0,00)	3 (18,75)	7 (43,75)	2(12,50)	2 (12,50)	0 (0,00)	16
	<i>Oidiodendron maius</i> A En	2 (3,08)	4 (6,15)	5 (7,69)	14 (21,54)	34(52,31)	4 (6,15)	2 (3,08)	65
	<i>Piloderma croceum</i> B Ec	3 (10,71)	0 (0,00)	1 (3,57)	12 (42,86)	6(21,43)	1 (3,57)	5 (17,86)	28

Tabla V. IX. *Clusters* de genes de metabolitos secundarios de hongos con diferentes hábitos.

Hábito	Especie	DMAT	PKS-NRPS	NRPS	Símil NRPS	PKS	Símil PKS	TC	Total
	<i>Sclerotinia citrinum</i> B Ec	0 (0,00)	1 (7,14)	0 (0,00)	7 (50,00)	1 (7,14)	0 (0,00)	5 (35,71)	14
	<i>Sebacina vermifera</i> B En	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (33,33)	1 (33,33)	0 (0,00)	1 (33,33)	3
	<i>Tuber melanosporum</i> A Ec	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (12,50)	3 (37,50)	2 (25,00)	2 (25,00)	0 (0,00)	8
Biótrofo obligado	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. hordei A	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (16,67)	2 (33,33)	1 (16,67)	2 (33,33)	0 (0,00)	6
	<i>Erysiphe necator</i> A	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (20,00)	2 (40,00)	0 (0,00)	2 (40,00)	0 (0,00)	5
	<i>Cronartium quercuum</i> f. sp. fusiforme B	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (55,56)	2 (22,22)	0 (0,00)	2 (22,22)	9
	<i>Melampsora lini</i> B	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	2 (50,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4
	<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici B	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	1 (25,00)	2 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4
	<i>Rhizoglyphus irregularis</i> G En	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	2 (50,00)	0 (0,00)	4

Los *clusters* de metabolitos secundarios de *S. lycopersici* en negrita corresponde a los hallados en la presente tesis según la metodología descrita anteriormente; los demás valores provienen de la base de datos MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/fungi/fungi.info.html>).

Porcentaje respecto al total de *clusters* de genes de metabolitos secundarios para la especie correspondiente.

La diferencia corresponde a otros tipos de *clusters* distintos a los mencionados en la presente tabla.

A: Ascomycota; B: Basidiomycota; G: Glomeromycota; Ec: Ectomicorrízico; En: Endomicorrízico

V. III. Discusión

Durante la interacción entre el patógeno y la planta se desata una verdadera guerra molecular en la cual el primero despliega su arsenal armamentístico con el fin de invadir y tomar el control del segundo, mientras que el último responde haciendo todo lo posible para resistir y abatir al invasor. En esta guerra, el primer frente de batalla se da en el apoplasto y, muchas veces, en el fuego cruzado se esconden las moléculas que determinan el desenlace de la interacción^{333 337}. En el presente capítulo, se caracteriza el repertorio balístico molecular del hongo fitopatógeno *S. lycopersici* CIDEFI-216.

Casi todas las superficies de las plantas están recubiertas por una cutícula cerosa, que representa la primera barrera para la entrada de patógenos. La pared celular de la planta, localizada justo debajo de la cutícula, consiste en microfibrillas de celulosa reticuladas por una matriz amorfa de hemicelulosa y pectina, a menudo encerradas en polímeros de lignina a medida que la planta madura³³⁸. Interesantemente, el 32 % del secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216 corresponde a enzimas activas sobre carbohidratos. Las CAZymes cumplen un rol importante en la adquisición y metabolismo del carbono y, por lo tanto, en el hábito heterotrófico de los hongos. Más aún, muchas de ellas ejercen un rol esencial en la patogénesis de los hongos al posibilitar la degradación de la pared celular vegetal y así posibilitar la infección. De hecho, en los fitopatógenos, las CAZymes con módulos glucósido hidrolasas (GHs) son las que aseguran el ensamblaje de los carbohidratos, mientras que aquellas con módulos carbohidrato esterasas (CEs), glucósido hidrolasas (GHs) y polisacárido liasas (PLs) son las encargadas de llevar a cabo la degradación de la pared celular del hospedador (CWDEs, *cell wall degrading enzymes*)³³⁹. Estas módulos suelen ser asistidos por módulos de unión a carbohidratos (CBMs), cuya función principal, pero no exclusiva, es la de unirse al ligando y dirigirlo a la maquinaria catalítica. Finalmente, los módulos CEs, GHs y PLs pueden ser incluso potenciados por enzimas con módulos de actividades auxiliares (AAs)³⁴⁰. El hecho que el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216 contenga 148 GHs, 84 AAs, 61 CEs, 34 CBMs, 20 PLs y 9 GTs es un indicio del gran potencial patogénico de este hongo. Pues, su arsenal molecular está provisto de una amplia gama de enzimas hidrolíticas que podrían ser utilizadas para degradar las ceras de la cutícula y los polisacáridos que componen la pared celular vegetal.

Capítulo V

La cantidad y variedad de CAZymes concuerda con su amplio espectro de hospedadores. Además, sugiere plasticidad en cuanto a las fuentes de carbono que podría utilizar y, en consecuencia, nichos ecológicos que podría explotar (Tabla V. I). Entre las CAZymes potencialmente secretadas por *S. lycopersici* CIDEFI-216 merecen mención especial las proteínas con módulos CBM5o KNG45020 y KNG47745. También llamado motivo LysM, este motivo tiene la particularidad de unir quitina. La quitina es un componente importante de las paredes celulares de los hongos y su detección en el apoplasto por parte de los receptores de superficie de la planta dispara respuestas inmunes en el hospedador. Los hongos utilizan efectores LysM para secuestrar los oligómeros de quitina del apoplasto y evitar que estos sean detectados por los receptores del hospedador. Los efectores LysM caracterizados hasta la fecha cuentan con 3 dominios LysM, dos de los cuales (LysM-1 y LysM-3) unen monómeros de quitina con alta afinidad al dimerizar formando un surco que envuelve al ligando vía múltiples enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. El motivo LysM restante (LysM-2) también une quitina, aunque con baja afinidad. Aún así, este dominio contribuye en la supresión de la inmunidad del hospedador disparada por quitina, sin embargo es poco probable que sea mediante el secuestro del oligosacárido ³⁴
³⁴³. Interessantemente, la proteína KNG47745 posee solamente dos dominios LysM, mientras que la proteína KNG45020 posee hasta cinco (uno evidenciado por dbCAN, cinco por InterProScan). Futuros experimentos estructurales y funcionales deberán responder si KNG47745 y KNG45020 representan novedosas variantes de estos ubicuos efectores fúngicos.

Las lipasas y otras hidrolasas de éster carboxílico conforman un campo de investigación emergente sobre los mecanismos de virulencia en hongos. En general, se estima que las mismas participan en la patogénesis a través del reconocimiento del hospedador, la adhesión de la esporas, la diferenciación del apresorio, la penetración del patógeno y la adquisición de carbono ³³⁹. Las lipasas (triacilglicerol-acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster carboxilo en los triacilglicérols. Si bien las lipasas pertenecen a varias familias de proteínas diferentes sin similitud de secuencia, tienen la misma arquitectura; el pliegue α/β -hidrolasa y un sitio activo con el motivo conservado GxSxG ³²⁵. En estrecha relación con las lipasas, se

Capítulo V

encuentran las cutinasas (E.C. 3.1.1.74); esterasas que hidrolizan los polímeros de cutina a sus monómeros. Estas se pueden anotar como miembros de la clase CE5 de CAZymes o también como miembros de la superfamilia abH36 en LED, ya que también pertenecen a la clase de enzimas con pliegue α/β -hidrolasa³³⁹. También se pueden encontrar anotaciones compartidas entre CAZymes y LED en otras esterasas (E.C. 3.1.1) con el mismo pliegue y maquinaria catalítica. De hecho, entre las 141 lipasas y otras hidrolasas de éster carboxílico identificadas en el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216 mediante LED, el 52 % también fueron identificadas por dbCAN (Figura V. I y Tabla V. V). Específicamente, *S. lycopersici* CIDEFI-216 tiene el potencial de secretar 30 lipasas que abarcan 6 superfamilias LED. Además, el mismo también dispone de 13 cutinasas (Tabla V. IV). Globalmente, los necrótrofos tienen más cutinasas que los hemibiótrofos, mientras que los saprótrofos y los hongos micorrícicos tienen pocas cutinasas o directamente carecen de estas³³⁹. Así, por ejemplo, mientras que los secretomas (*in silico*) de fitopatógenos Pleosporales y Capnodiales tienen un promedio de 8,9 y 4,5 cutinasas, respectivamente, el número de cutinasas de los saprótrofos oscila entre 3 y 0³²². Por lo tanto, esto afianza la noción, discutida en el párrafo anterior, que el secretoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 posee las herramientas necesarias para degradar el polímero de cutina y así atravesar la cutícula.

Las peptidasas (proteasas o proteinasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de las proteínas (proteólisis). En los secretomas de hongos fitopatógenos, las peptidasas podrían servir tanto para la nutrición del hongo como para la degradación de las proteínas de defensa de la planta y, por lo tanto, podrían interferir con la inmunidad innata del hospedador^{322,339}. Asimismo, los secretomas de los hongos fitopatógenos también pueden estar armados con inhibidores de peptidasas cuya función es la inhibición de aquellas proteasas vegetales que puedan atentar contra la integridad del patógeno^{336,344,345}. De hecho, las proteasas fúngicas son consideradas potenciales blancos para el control de las enfermedades mediante el uso racional de inhibidores de peptidasas^{339,346}. Se ha reportado que los hongos fitopatógenos se caracterizan por tener un repertorio de serín-proteasas con abundantes prolil-oligopeptidasas (S9), carboxipeptidasas Y (S10), D-Ala-D-Ala carboxipeptidasas B (S12), prolil-aminopeptidasas (S33) y sedolisinas (S53)⁷³. En línea con

Capítulo V

esto, las serín-peptidasas S₉ (34), S₃₃ (10), S₁₀ (8), S₅₃ (5) y S₁₂ (1) contemplan el 44 % de las peptidasas del secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Además, éste cuenta con 3 quimiotripsinas (S₁) y 7 subtilisinas (S₈) que, en conjunto con las S₅₃, tendrían un papel en la patogenicidad ya que estarían implicadas en la degradación directa de la pared celular vegetal, siendo las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina sus posibles objetivos ³²². También es interesante notar que el secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216 contiene un mayor número de aspartil-peptidasas A₁ que el sus pares Pleosporales y Dothideomycetes (7 vs 4 y 5 en promedio, respectivamente); de metalo-carboxipeptidasas M₁₄ (8 vs 5,8 y 3,7); y de metalo-exopeptidasas M₂₈ (8 vs 7 y 5,5) ³²². En general, estos resultados sugieren que el secretoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 cuenta con una batería de peptidasas que garantizan la digestión eficaz de proteínas (A₁, S₈, S₉ y S₁₀), incluso en ambientes ácidos u hostiles (A₁, C₁₃, G₁, M₃₅, M₂₀ y S₁₀). Más aún, el mismo cuenta con 9 inhibidores de proteasas que podrían ser utilizados para sortear la maquinaria proteolítica del hospedador.

Se ha discutido la composición del secretoma teórico de *S. lycopersici* CIDEFI-216 a la luz de los hallazgos de dbCAN (CAZymes), MEROPS (peptidasas y sus inhibidores) y LED (lipasas y otras hidrolasas de éster carboxílico). Sin embargo, es particularmente conveniente focalizar la atención en aquellas proteínas que (además) hayan sido identificadas por EffectorP y/o PHI-base. Si bien el objetivo de ambas herramientas es identificar efectores a partir de la estructura primaria de la proteína, éstas difieren en su estrategia; mientras que el primero utiliza un método de aprendizaje automático para la predicción de efectores, el segundo se vale de búsquedas BLAST en una base de datos curada de proteínas relacionadas con la interacción-planta patógeno (PHI-base) ^{303,307}. Por lo tanto, los resultados de dbCAN, MEROPS y LED (y sus combinaciones) que convergen con EffectorP y/o PHI-base, son excelentes candidatos a efectores. Trescientas sesenta y tres proteínas del secretoma *in silico* de *S. lycopersici* CIDEFI-216 fueron identificadas por EffectorP y/o PHI-base, pero 29 fueron identificadas exclusivamente por EffectorP y PHI-base. A su vez, 10 de éstas fueron identificadas únicamente por dbCAN; 2 únicamente por LED; y 4 tanto con dbCAN como LED. La mayoría de estas proteínas encuentran sus homólogos en determinantes de virulencia asociados con la degradación de la pared celular vegetal. Interesantemente, 13 proteínas fueron identificadas por EffectorP y PHI-

Capítulo V

base, pero no por ninguna de las otras herramientas. En este exclusivo grupo se encuentran las peroxidasa KNG52402 y KNG45861 (pfamo1328), la superóxido dismutasa KNG51227 (COGo6o5), la hidrofobina KNG46314 (pfamo6766) y la cerato-platanina KNG48201 (pfamo7249). Las peroxidasa y la superóxido dismutasa podrían ser utilizadas por el patógeno para combatir las especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) generadas en el ambiente hostil del apoplasto durante la respuesta de hipersensibilidad y muerte celular del hospedador³⁴⁷. En cuanto a las hidrofobinas y las cerato-plataninas, se estima que sus funciones estarían relacionadas con el crecimiento y el desarrollo del hongo, y con el contacto físico entre el hongo y su hospedador³⁴⁸. Por otra parte, respecto al 21,5 % del secretoma *in silico* que no fue identificado por dbCAN, MEROPS ni LED, pero sí por EffectorP y/o PHI-base, el 33 % de este subconjunto de proteínas tiene asociado al menos una anotación funcional de *Gene Ontology*. Entre las anotaciones disponibles relacionados con la función molecular, predominó la actividad peroxidasa (GO:0004601) con el 20 %. Además, el 10 % tenía asignada la actividad oxidoreductasa, actuando sobre donantes pareados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular, flavina reducida o flavoproteína como donante, e incorporación de un átomo de oxígeno (GO:0016712). Esto, en línea con los ejemplos de KNG52402 y KNG45861, refuerza la importancia de la defensa contra las especies reactivas del oxígeno³⁴⁷. Finalmente, el hecho que 356 proteínas del secretoma teórico de *S. lycopersici* CIDEFI-216 (34,42 %) no hayan sido anotadas por ninguna de las herramientas da cuenta de la existencia de numerosas proteínas aún desconocidas. Futuros experimentos de proteómica arrojarán luz sobre las estructuras y funciones de estas proteínas; directamente, mediante el estudio del patosistema en cuestión, e indirectamente, a través del estudio de otros sistemas cuyos resultados sirvan para nutrir con homólogos las bases de datos.

Los genes implicados en el metabolismo secundario desempeñan un papel importante en el estilo de vida de los hongos, ya que son los encargados de la producción de una amplia gama de compuestos bioactivos de bajo peso molecular que proporcionan ventajas adaptativas que pueden llegar a ser determinantes para la colonización de su nicho ecológico^{286,311}. El presente estudio encontró la existencia de 36 *clusters* de genes de metabolitos secundarios en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216. En concordancia con

Capítulo V

los perfiles de *clusters* de genes de metabolitos secundarios de otros hongos fitopatógenos, en el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 predominan los *clusters* de PKS, seguidos por los de NRPS (y símil NRPS) e híbridos PKS-NRPS ^{286,349}. Dado que en este repertorio no encontró ninguna dimetilalil triptófano sintasas (DMATs, *dymethylallyl tryptophan synthases*), *S. lycopersici* no sería capaz de sintetizar ningún alcaloide derivado de DMATs, como, por ejemplo, los alcaloides ergóticos. Remarcablemente, este estudio identificó a los principales genes que intervienen en las síntesis de la melanina DHN distribuidos en dos *clusters* de genes de metabolitos secundarios del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216. En hongos, la melanina DHN ha sido relacionada con la protección contra la luz ultravioleta, los metales pesados, las temperaturas extremas, las especies reactivas del oxígeno y los agentes antifúngicos ^{331,350}. Asimismo, las enzimas de su ruta biosintética son el blanco de algunos fungicidas ³³¹. La melanina DHN desempeña diversos papeles en la virulencia fúngica, por ejemplo, al generar presión de turgencia sobre la pared celular de la planta y promover la penetración del hospedador ³⁵¹. Por todo esto, los *clusters* 3 y 34, intervinientes en su síntesis, juegan un rol esencial en la virulencia de *S. lycopersici*. Por otra parte, la presencia de varios genes homólogos a tirosinasa y un gen homólogo a lacasa sugieren que *S. lycopersici* puede sintetizar melanina vía L-DOPA. Finalmente, no se debería descartar la capacidad de *S. lycopersici* de sintetizar piomelanina, pues su genoma contiene un gen cuyo producto es homólogo a la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, y el hecho que no se haya encontrado al gen de la tirosina aminotransferasa podría responder a su ubicación en un nicho genómico de difícil acceso para la tecnología de secuenciación empleada. Finalmente, es interesante notar que 4 *clusters* de genes de metabolitos secundarios, entre ellos uno de los intervinientes en la síntesis de DHN-melanina (*cluster* 3, 8, 12, 34), están localizados próximos a repeticiones teloméricas (TTAGGG). Según la hipótesis de duplicación, diversificación y pérdida diferencial de genes (DDL, *duplication, diversification and differential gene loss*), las regiones subteloméricas son importantes para la rápida evolución, la expansión genética y la adaptación de nichos ecológicos. Esto se debe a que las regiones subteloméricas de hongos filamentosos son ricas en regiones repetitivas y elementos móviles y, en consecuencia, participan frecuentemente en reordenamientos cromosómicos. Adicionalmente, las regiones repetitivas suelen provocar errores en la

Capítulo V

replicación del ADN aumentando así la tasa de mutación de los genes aledaños ^{352,353}. Luego, es probable que estos *clusters* de genes de metabolitos secundarios (3, 8, 12 y 34) estén bajo un proceso de DDL que podría, eventualmente, derivar en la pérdida o generación de nuevos *clusters* cuyos productos impacten en la relación entre *S. lycopersici* CIDEFI-216 y su entorno; por ejemplo, incrementando su virulencia y/o ampliando su rango de hospedadores.

El análisis del secretoma y metaboloma secundario de *S. lycopersici* CIDEFI-216 pone en evidencia su potencial para colonizar diversos nichos ecológicos. Su repertorio de proteínas secretadas incluye proteínas lípicas de la patogénesis de un hongo necrótrofo: variedad y cantidad de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de la planta; efectores LysM; y enzimas que intervienen en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno generadas por el hospedador, tanto en su defensa (ej., respuesta de hipersensibilidad) como durante la muerte celular. Además, su cantidad y variedad de CAZymes sugiere que el mismo podría explotar diversos sustratos como fuentes de carbono como, por ejemplo, los rastrojos de distintos cultivos. De hecho, al comparar los perfiles del secretoma y metaboloma secundario de *S. lycopersici* CIDEFI-216 con los de otros hongos, se encuentran similitudes con los necrótrofos, hemibiótrofos y con algunos saprótrofos. Interesantemente, la genómica comparativa en hongos ha evidenciado que los límites entre estos grupos son menos pronunciados de lo que se había asumido ⁷⁵. Después de todo, parece que Garrett estaba en lo cierto al afirmar que “*como sucedió antes y volverá a suceder, una delimitación aparentemente fina del mundo natural ha resultado ser un artefacto creado por la comprensión imperfecta del hombre*”³⁵⁴.

En resumen, en este capítulo se presentan modelos teóricos para los *clusters* de genes de metabolitos secundarios y para el secretoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Estos datos sientan bases sólidas para el desarrollo de estudios funcionales dirigidos a caracterizar el metabolismo secundario del fitopatógeno, como también su secretoma bajo cualquier condición fisiológica. Así, por ejemplo, estos resultados allanan el camino a estudios del secretoma *in planta* de la interacción entre *S. lycopersici* y *S. lycopersicum* por el método de la huella peptídica al complementar las bases de datos de proteínas existentes de la planta con las de su contraparte fúngica. De todas maneras, debe tenerse en cuenta que tanto los *clusters* de genes de metabolitos secundarios como los genes de efectores

Capítulo V

suelen ocupar nichos genómicos difíciles de recuperar mediante el ensamblaje de lecturas cortas de tecnologías de secuenciación de segunda generación^{92,199,201,286,288,305}. Sin embargo, las perspectivas frente a estas limitaciones son muy alentadoras gracias al aumento de la calidad y el descenso del precio de las tecnologías de secuenciación de tercera generación⁷⁴. El conocimiento de las moléculas intervinientes en la interacción entre *S. lycopersici* y el tomate será clave para el diseño racional de estrategias para el manejo de la mancha gris de la hoja del tomate.

Capítulo VI: Conclusiones y Perspectivas

VI. I. Conclusiones

A partir de los resultados de la presente tesis doctoral se concluye que:

Stemphylium lycopersici es el principal agente causal de la mancha gris de la hoja del tomate en Argentina.

Existe una notable diversidad morfológica, genética y de agresividad en tomate entre los aislados de *S. lycopersici*. Esta diversidad no guarda relación con su origen geográfico o fecha de aislamiento.

El medio ejerce gran influencia en la fisiología y morfología de *S. lycopersici*. Las especies del género *Stemphylium* no pueden ser identificadas mediante el uso exclusivo de características de cultivo y morfológicas.

El estrés ocasionado por la mancha gris de la hoja en tomate cv. Elpida facilita la infección del patógeno oportunista *C. cassiicola* CIDEFI-235.

Aislados de *S. lycopersici* causantes de la mancha gris de la hoja en pimiento cv. Margarita también infectan y desarrollan síntomas de la mancha gris de la hoja en tomate cv. Elpida.

El ensamblaje *de novo* del genoma de *S. lycopersici* a partir de lecturas *paired-end* (secuenciación de segunda generación) produce un genoma borrador cuya completitud del espacio génico es superior al 98 %. Sin embargo, esta metodología da como resultado un genoma borrador altamente fragmentado (>5588 *contigs*). El genoma de *S. lycopersici* es rico en elementos repetitivos.

El ensamblaje *de novo* del genoma de *S. lycopersici* a partir de lecturas *paired-end* de (secuenciación de segunda generación) produce un *contig* con topología circular que corresponde al genoma mitocondrial completo.

Conclusiones y Perspectivas

El genoma mitocondrial de *S. lycopersici* contiene 12 genes conservados que intervienen en la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa: *atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*. Los genes *atp8* y *atp9* residen en el genoma nuclear y sus productos son exportados a la mitocondria. Las subunidades I y II de la citocromo-c oxidasa están codificadas por un único marco abierto de lectura continuo.

No hay sintenia entre los genomas mitocondriales de los Pleosporales *S. lycopersici*, *D. pinodes*, *P. nodorum* y *S. bambusicola*; sus genomas mitocondriales son estructuras plásticas y dinámicas.

Los genes conservados de los genomas mitocondriales de Pezizomycotina (*atp6*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* y *nad6*) proveen la información necesaria para establecer relaciones filogenéticas fidedignas dentro de este subphylum.

Los secretomas proteicos *in silico* de los hongos saprótrofos, necrótrofos y hemibiótrofos tienden a tener un mayor contenido de CAZymes y proteasas que el de los hongos biótrofos. En este sentido, el secretoma proteico *in silico* de *S. lycopersici* es similar al de otros hongos saprótrofos, necrótrofos y hemibiótrofos.

El secretoma proteico *in silico* de *S. lycopersici* contiene numerosas proteínas relacionadas con la patogénesis de hongos necrótrofos y hemibiótrofos; algunas de ellas son homólogas a efectores caracterizados, otras, en cambio, no son homólogas a efectores conocidos, pero presentan patrones estructurales típicos de efectores.

Los *clusters* de genes intervinientes en la biosíntesis de policétidos abundan entre los *clusters* de genes de metabolitos secundarios del genoma de *S. lycopersici*

Conclusiones y Perspectivas

Stemphylium lycopersici no es capaz de sintetizar ningún alcaloide derivado de la dimetilalil triptófano sintasa.

Stemphylium lycopersici es un hongo dematiáceo portador de genes implicados en la síntesis de DHN-melanina, L-DOPA-melanina y piomelanina.

VI. II. Perspectivas

VI. II. I. Genoma de Referencia de Alta Calidad de *Stemphylium lycopersici*

El aumento de la calidad y el descenso del precio de las tecnologías de secuenciación de tercera generación han facilitado la obtención de genomas fúngicos de referencia en los cuales los cromosomas son ensamblados de telómero a telómero sin ruptura alguna^{169,174,207}. Los hongos filamentosos fitopatógenos suelen albergar los genes relacionados con la patogénesis (efectores, *clusters* de genes de metabolitos secundarios) en regiones del genoma ricas en elementos repetitivos. Estas regiones son difíciles de ensamblar, si no imposibles, utilizando lecturas derivadas de tecnologías de secuenciación de segunda generación^{199,355,356}. Teniendo en cuenta esto, se plantea a futuro:

Secuenciar el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 utilizando tecnología de secuenciación de tercera generación a fin de optimizar la contigüidad; reutilizar las lecturas obtenidas en la presente tesis para mejorar la cobertura.

Identificar la estructura de los genes de *S. lycopersici* CIDEFI-216 utilizando ARN-Seq como evidencia experimental. Emplear los transcritos para entrenar un software de aprendizaje automático (Augustus, por ejemplo) y utilizarlo para reanotar el genoma de *S. lycopersici* a fin encontrar genes (hipotéticos) que no hayan sido recuperados mediante la transcriptómica.

Conclusiones y Perspectivas

Estudiar los nichos genómicos de los genes de efectores y de los *clusters* de genes de metabolitos secundarios en el genoma de referencia de alta calidad de *S. lycopersici* CIDEFI-216.

VI. II. II. Fuentes de Diversidad

Esta tesis ha dejado al descubierto la gran diversidad en las características de cultivo, morfológicas, genéticas y de agresividad en tomate (cv. Elpida) entre los aislados de *S. lycopersici*, incluso entre aquellos aislados estrechamente relacionados en cuanto su origen geográfico, fecha de aislamiento y/o cultivar hospedador. Luego, surge la pregunta ¿cuál es el motor que impulsa la rápida evolución y consecuente diversidad de *S. lycopersici*?

La reproducción sexual proporciona un mecanismo importante para introducir variación mediante la combinación de información genética de los linajes parentales³⁵⁶. El proceso de apareamiento en los hongos se inicia con la unión de las feromonas producidas por un individuo haploide a los receptores de membrana del haploide complementario, derivando en la fusión de los núcleos sexualmente compatibles para la producción de esporas recombinantes. Esta compatibilidad reproductiva está determinada por el *locus* MAT: sitio específico del genoma que contiene a los genes codificantes de los factores de transcripción que controlan la producción de estas feromonas y/o sus respectivos receptores de membrana (genes *mat*). En ascomicetos filamentosos existen dos alternativas: especies cuyos individuos contienen a uno de los idiomorfos, *mat1-1* o *mat1-2*, y especies cuyos individuos contienen ambos idiomorfos dentro del *locus* MAT. En las primeras, para que ocurra la reproducción sexual es necesario la intervención de dos individuos con idiomorfos opuestos (complementarios), por lo que se las denomina especies heterotálicas o autoestériles. En cambio, las segundas, al contener ambos idiomorfos, son capaces de autofecundarse y completar su ciclo de vida sexual sin necesidad de otra línea para aparearse, por ello se las denomina especies homotálicas o autofértiles^{357,358}. En lo que respecta a *S. lycopersici*, hasta la fecha no existe registro alguno de su teleomorfo, lo que lleva a pensar que este hongo se reproduce de manera clonal. Sin embargo, el relevamiento del genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 da cuenta de su heterotalismo al revelar la existencia exclusiva del idiomorfo *mat-1-1*. Además, el genoma

Conclusiones y Perspectivas

de *S. lycopersici* CIDEFI-213, recientemente secuenciado por nuestro grupo, descubre al idiomorfo *mat1-2*. Por lo tanto, surge la posibilidad que *S. lycopersici* experimente ciclos sexuales, quizá crípticos, en la naturaleza.

Sorprendentemente, ciertos hongos fitopatógenos han desarrollado mecanismos alternativos que les permiten evolucionar rápidamente y generar diversidad aún en ausencia de reproducción sexual. Concretamente, sus genomas contienen regiones densamente pobladas de genes y escasamente pobladas en elementos repetitivos y elementos móviles y otras regiones escasamente pobladas de genes y densamente pobladas de elementos repetitivos y elementos móviles; los genes esenciales se ubican en las primeras, mientras que los accesorios (efectores, cluster de genes de metabolitos secundarios, etc.) se ubican en las segundas. En estos “genomas de dos velocidades” las regiones ricas en elementos repetitivos y elementos móviles suelen verse implicadas en reordenamientos cromosómicos, mutación puntual inducida por repetición e incluso transferencia horizontal constituyendo así la cuna de la diversidad en ausencia de recombinación sexual^{355,356}. En este sentido, el genoma de *S. lycopersici* CIDEFI-216 es rico en regiones repetitivas, luego, podría tratarse de un “genoma de dos velocidades”.

Debido las importantes implicancias en materia fitosanitaria que tiene la evolución rápida de poblaciones de fitopatógenos, se plantea a futuro:

Desarrollar una PCR/multiplex que permita, de manera rápida, monitorear las frecuencias de los idiomorfos y, así, la potencial reproducción sexual en poblaciones de este fitopatógeno. Evaluar *in vitro* la capacidad de reproducción sexual de los aislados de *S. lycopersici* mediante el enfrentamiento de idiomorfos complementarios.

A partir del genoma de referencia de alta calidad de *S. lycopersici* CIDEFI-216. Evaluar si el genoma de *S. lycopersici* es un “genoma de dos velocidades”. En caso positivo, indagar cuáles son los principales mecanismos que introducen diversidad.

VI. II. III. Secretoma *in vivo*

La disponibilidad de los genomas de *S. lycopersici* y *S. lycopersicum* habilitan la predicción de sus proteomas y las porciones secretadas de los mismos ³⁵⁹. Estos datos son un recurso valioso para la identificación de proteínas mediante la técnica de la huella peptídica ¹⁰². Por ello, se plantea a futuro:

Caracterizar mediante la técnica de la huella peptídica el proteoma del fluido apoplástico foliar del tomate (cv. Elpida) a distintos tiempos de la infección con *S. lycopersici* CIDEFI-216 a fin de determinar las proteínas secretadas claves para el desenlace de la interacción.

VI. II. IV. Melaninas

El genoma de *S. lycopersici* sugiere que este hongo dematiáceo tiene el potencial de sintetizar DHN-melanina, L-DOPA-melanina y piomelanina. Dada la importancia de estos metabolitos secundarios en la biología del hongo, se plantea a futuro:

Indagar en la síntesis de las melaninas de *S. lycopersici* a través de su cultivo en presencia de diferentes concentraciones de inhibidores específicos de distintos tipos melaninas (DHN-melanina, L-DOPA-melanina, piomelanina) y agentes promotores de la melanización; evaluar el efecto en la expresión de los genes relacionados con estos procesos biosintéticos por PCR en tiempo real y/o ARN-Seq.

Bibliografía

Bibliografía

Bibliografía

1. Jenkins, J. A. The origin of the cultivated tomato. *Econ. Bot.* **2**, 379–392 (1948).
2. Blancard, D. *A Colour Handbook. Tomato Diseases. Identification, Biology and Control.* (Manson Publishing Ltd., 2012).
3. Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M. & Miller, S. A. *Compendium of tomato diseases and pests.* (APS Press, 2014).
4. Mattioli, P. A. *Di Pedacio Dioscoride Anazarbeo Libri cinque Della historia, & materia medicinale tradotti in lingua volgare italiana da M. Pietro Andrea Matthiolo Sanese Medico, con amplissimi discorsi, et comentii, et dottissime annotationi, et censure del medesimo inte.* (1544).
5. Mattioli, P. A. *Petri Andreae Matthioli Medici Senensis Commentarii, in Libros sex Pedacii Dioscoridis Anazarbei, de Materia Medica, Adjectis quàm plurimis plantarum & animalium imaginibus, eodem authore.* (1554).
6. Peralta, I. E. & Spooner, D. M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am. J. Bot.* **88**, 1888–1902 (2001).
7. Spooner, D. M., Peralta, I. E. & Knapp, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* **54**, 43–61 (2005).
8. Peralta, I. E., Knapp, S. & Spooner, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genet. Coop. Rep.* **56**, 6–12 (2006).
9. Peralta, I. E., Spooner, D. M. & Knapp, S. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). in *Systematic Botany Monographs* 186 (2008).
doi:10.1126/science.113.2935.3
10. Linneaus, C. *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas.* (Laurentius Salvius, 1753).
11. Miller, P. *The gardeners dictionary.* (1768).
12. Karsten, G. K. W. H. *Deutsche Flora.* (Spaeth).
13. Nicolson, D. H. Paratautonyms, a comment on proposal 146. *Taxon* **24**, 389–390

Bibliografía

- (1975).
14. Argerich, C. & Troilo, L. *Buenas Prácticas Agrícolas en la Cadena de Tomate*. (FAO, 2011).
 15. US Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. (2016). Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
 16. Wang, D. & Seymour, G. B. Tomato Flavor: Lost and Found? *Molecular Plant* **10**, 782–784 (2017).
 17. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT. (2016). Available at: <http://www.fao.org/faostat/>.
 18. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT. (2014). Available at: <http://www.fao.org/faostat/>.
 19. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT. *United Nations* (2016). Available at: <http://faostat.fao.org/>.
 20. Agrios, G. N. *Plant Pathology*. San Diego: Academic Press (Elsevier Academic Press, 2005). doi:10.1016/j.plantsci.2005.02.019
 21. James, T. Y., Porter, T. M. & Martin, W. W. 7 Blastocladiomycota. in *Systematics and Evolution* 177–207 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-55318-9_7
 22. Powell, M. J. & Letcher, P. M. 6 Chytridiomycota o Chytridiomycota , Monoblepharidomycota, o Monoblepharidomycota and Neocallimastigomycota o Neocallimastigomycota. in *Systematics and Evolution* 141–175 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-55318-9_6
 23. Dick, M. W. *Straminipilous Fungi*. (Springer Netherlands, 2001). doi:10.1007/978-94-015-9733-3
 24. Beakes, G. W., Honda, D. & Thines, M. 3 Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. in *Systematics and Evolution* 39–97 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-55318-9_3
 25. Farr, D. F. & Rossman, A. Y. Fungal Databases. *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA* (2015). Available at: <http://nt.ars->

Bibliografía

- grin.gov/fungaldatabases/.
26. Cedeño, L. & Carrero, C. First Report of Tomato Gray Leaf Spot Caused by *Stemphylium solani* in the Andes Region of Venezuela. *Plant Dis.* **81**, 1332–1332 (1997).
 27. Kim, B. S., Yu, S. H., Cho, H. J. & Hwang, H. S. Gray leaf spot in peppers caused by *stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *Plant Pathol. J.* **20**, 85–91 (2004).
 28. Yang, H. H. *et al.* First Report of *Stemphylium lycopersici* Causing Gray Leaf Spot on Eggplant in China. *Plant Dis.* **101**, 834 (2017).
 29. Nasehi, A. *et al.* Analysis of genetic and virulence variability of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of vegetable crops. *Eur. J. Plant Pathol.* **140**, 261–273 (2014).
 30. Sy-Ndir, M., Assigbetse, K. B., Nicole, M., Diop, T. A. & Ba, A. T. Differentiation of *Stemphylium solani* isolates using random amplified polymorphic DNA markers. *African J. Microbiol. Res.* **9**, 915–921 (2015).
 31. Simmons, E. G. Perfect States of *Stemphylium*. *Mycologia* **61**, 1–26 (1969).
 32. Bentes, J. L. S. & Matsuoka, K. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. *Fitopatol. Bras.* **30**, 224–231 (2005).
 33. Savary, S. & Willocquet, L. Simulation Modeling in Botanical Epidemiology and Crop Loss Analysis. *Plant Heal. Instr.* (2014). doi:10.1094/PHI-A-2014-0314-01
 34. Maloy, O. C. Plant Disease Management. *Plant Heal. Instr.* (2005). doi:10.1094/PHI-I-2005-0202-01
 35. Khoury, W. El & Makkouk, K. Integrated Plant Disease Management in Developing Countries. *J. Plant Pathol.* **92**, 35–42 (2010).
 36. Polack, L. A. & Mitidieri, M. Producción de tomate diferenciado. Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. *Ediciones INTA* **18**, (2002).
 37. Yang, H. H. *et al.* Mapping and screening of the tomato *Stemphylium lycopersici* resistance gene, *Sm*, based on bulked segregant analysis in combination with genome resequencing. *BMC Plant Biol.* **17**, 266 (2017).
 38. Dennett, R. K. The association of resistance to fusarium wilt and *stemphylium* leaf

Bibliografía

- spot in tomato, *Lycopersicon esculentum*. in *Proceedings. American Society for Horticultural Science* **56**, 353-357 (1950).
39. Andrus, C. F., Reynard, G. B. & Wade, B. L. Relative resistance of tomato varieties, selections, and crosses to defoliation by *Alternaria* and *Stemphylium*. (1942).
40. Behare, J., Laterrot, H., Sarfatti, D. & Zamir, M. Restriction Fragment Length Polymorphism Mapping of the *Stemphylium* Resistance Gene in Tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 489 (1991).
41. Rouabhi, R. Introduction and Toxicology of Fungicides. in *Fungicides* (InTech, 2010). doi:10.5772/12967
42. Pal, K. K. & McSpadden Gardener, B. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Heal. Instr.* (2006). doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02
43. Saksirirat, W., Chareerak, P. & Bunyatrachata, W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. *As J Food Ag-Ind. Spec. Issue. S99-S104* (2009).
44. Subedi, S. *et al.* Botanical, chemical and biological management of *Stemphylium botryosum* blight disease of lentil in Nepal. *Indian Phytopath* **68**, 415-423 (2015).
45. Rossi, V. & Patteri, E. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biol. Control* **49**, 52-57 (2009).
46. Nainwal, D. & Vishunavat, K. Management of purple blotch and *Stemphylium* blight of onion in Tarai and Bhabar regions of Uttarakhand, India. *J. Appl. Nat. Sci.* **8**, 150-153 (2016).
47. Wallroth, C. F. W. *Flora Cryptogamica Germaniae: pars posterior continens Algas et Fungos. Nürnberg (Norimbergae, Sumtibus JL Schragii). Compendium Flora Germanicae Sectio II, Plantae cryptogamicae S. cellulosa scripterunt Math. Jos. Bluff Carol. Ant. Fingerhath* (1833).
48. Wiltshire, S. P. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **18**, 135-143 (1933).
49. Wiltshire, S. P. The original and modern conceptions of *Stemphylium*. *Trans. Br.*

Bibliografía

- Mycol. Soc.* **21**, 211-IN6 (1938).
50. Neergaard, P. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. *Danish species of Alternaria and Stemphylium*. (1945).
51. Joly, P. Le genre *alternaria*, recherches physiologiques, biologiques et systematiques. *Encycl. Mycol.* **33**, (1964).
52. Groves, J. W. & Skolko, A. J. Notes on Seed-Borne Fungi: I. *Stemphylium*. *Can. J. Res.* **22c**, 190-199 (1944).
53. Simmons, E. G. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* **59**, 67-92 (1967).
54. Simmons, E. G. Perfect states of *Stemphylium* II. *Sydowia, Ann. Mycol. Ser. II* **38**, 284-293 (1985).
55. Rossman, A. Y. *et al.* Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes. *IMA Fungus* **6**, 507-523 (2015).
56. McNeill, J. *et al.* International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants. *Regnum Veg.* **154**, (2012).
57. Ellis, M. B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. (Commonwealth Mycological Institute, 1971).
58. Wolf, F. T. Sporulation and zonation in *Stemphylium*. *J. Tennessee Acad. Sci.* (1981).
59. Leach, C. M. Sporulation of Diverse Species of Fungi Under Near-Ultraviolet Radiation. *Can. J. Bot.* **40**, 151-161 (1962).
60. Li, F., Xue, F. & Yu, X. GC-MS, FTIR and Raman Analysis of Antioxidant Components of Red Pigments from *Stemphylium lycopersici*. *Curr. Microbiol.* **74**, 532-539 (2017).
61. Andersen, B., Solfrizzo, M. & Visconti, A. Metabolite profiles of common *Stemphylium* species. *Mycol. Res.* **99**, 672-676 (1995).
62. Nasehi, A. *et al.* Cultural and physiological characteristics of *Stemphylium lycopersici* causing leaf blight disease on vegetable crops. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **47**, 1658-1665 (2014).
63. Leach, C. M. Regulation of peritheciium development and maturation in *Pleospora herbarum* by light and temperature. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**, 295-315 (1971).

Bibliografía

64. Webster, J. & Weber, R. *Introduction to Fungi*. (Cambridge University Press, 2007).
65. Kurose, D. *et al.* Taxonomic re-examination of several Japanese Stemphylium strains based on morphological and molecular phylogenetic analyses. *J. Gen. Plant Pathol.* **81**, 358–367 (2015).
66. Nirenberg, H. I. & Plate, H.-P. Pleospora drummondii spec. nov. und ihr Anamorph Stemphylium drummondii spec. nov. *J. Phytopathol.* **107**, 362–367 (1983).
67. Pei, Y.-F., Wang, Y., Geng, Y., O'Neill, N. R. & Zhang, X.-G. Three novel species of Stemphylium from Sinkiang, China: their morphological and molecular characterization. *Mycol. Prog.* **10**, 163–173 (2011).
68. Pei, Y.-F., Geng, Y., Wang, Y. & Zhang, X.-G. Two new species of Stemphylium from Sinkiang, China. *Mycotaxon* **109**, 493–497 (2009).
69. Simmons, E. G. Perfect States of Stemphylium IV. *Harvard Pap. Bot.* 199–208 (2001).
70. Weber, G. F. Gray leaf spot of tomato caused by Stemphylium solani, sp. nov. *Phytopathology* **20**, (1930).
71. Woudenberg, J. H. C., Hanse, B., van Leeuwen, G. C. M., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. Stemphylium revisited. *Stud. Mycol.* **87**, 77–103 (2017).
72. Kogel, K.-H., Franken, P. & Hüchelhoven, R. Endophyte or parasite – what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 358–363 (2006).
73. Muszewska, A. *et al.* Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Sci. Rep.* **7**, 9147 (2017).
74. Rai, M. & Agarkar, G. Plant fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? *Crit. Rev. Microbiol.* 1–11 (2014). doi:10.3109/1040841X.2014.958052
75. De Wit, P. J. G. M. Apoplastic fungal effectors in historic perspective; a personal view. *New Phytol.* **212**, 805–813 (2016).
76. Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. & Rossman, A. Y. *Fungi on plants and plant products in the United States*. (APS press, 1989).
77. Liu, Y. *et al.* Trimeric anthracenes from the endophytic fungus Stemphylium globuliferum. *J. Nat. Prod.* **77**, 1734–1738 (2014).

Bibliografía

78. Mirjalili, M. H., Farzaneh, M., Bonfill, M., Rezadoost, H. & Ghassempour, A. Isolation and characterization of *Stemphylium sedicola* SBU-16 as a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus baccata* grown in Iran. *FEMS Microbiol. Lett.* **328**, 122–129 (2012).
79. Queiroz, M. S. R. *et al.* Enantioselective biotransformation of sterically hindered amine substrates by the fungus *Stemphylium lycopersici*. *J. Appl. Microbiol.* **124**, 1107–1121 (2018).
80. Parker, I. M. & Gilbert, G. S. When there is no escape: The effects of natural enemies on native, invasive, and noninvasive plants. *Ecology* **88**, 1210–1224 (2007).
81. Suzui, T. *Stemphylium* leaf spot (*Stemphylium botryosum* Wallr.) on asparagus plants. *Japanese J. Phytopathol.* **39**, 364–366 (1973).
82. Borges, O. L., Stanford, E. H. & Webster, R. K. The host-pathogen interaction of alfalfa and *Stemphylium botryosum*. *Phytopathology* **66**, 749–753 (1976).
83. Koike, S. T., Henderson, D. M. & Butler, E. E. Leaf Spot Disease of Spinach in California Caused by *Stemphylium botryosum*. *Plant Dis.* **85**, 126–130 (2001).
84. Aly, A. H. *et al.* Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. *Mycosphere* **1**, 153–162 (2010).
85. Yang, H. *et al.* First Report of *Stemphylium lycopersici* Causing Gray Leaf Spot on Potato in China. *Plant Dis.* PDIS-03-18-0539-PDN (2018). doi:10.1094/PDIS-03-18-0539-PDN
86. Tomioka, K., Sato, T., Sasaya, T. & Koganezawa, H. Leaf Spot of Kalanchoe Caused by *Stemphylium lycopersici*. *Japanese J. Phytopathol.* **63**, 337–340 (1997).
87. Nishi, N., Muta, T., Ito, Y., Nakamura, M. & Tsukiboshi, T. Ray speck of chrysanthemum caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **75**, 80–82 (2009).
88. Mehta, Y. R. Severe Outbreak of *Stemphylium* Leaf Blight, a New Disease of Cotton in Brazil. *Plant Dis.* **82**, 333–336 (1998).
89. Chai, A.-L., Du, G.-F., Shi, Y.-X., Xie, X.-W. & Li, B.-J. Leaf Spot on Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) Caused by *Stemphylium solani*, a New Disease in

Bibliografía

- China. *J. Phytopathol.* **163**, 1046–1049 (2015).
90. Wu, Y. *et al.* The Role of Endophytic Fungi in the Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni). *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 1–8 (2015).
91. Hotta, F. *et al.* A super-infection in the cornea caused by *Stemphylium*, *Acremonium*, and \square -*Streptococcus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **16**, 11 (2017).
92. Lo Presti, L. *et al.* Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 513–545 (2015).
93. Rodriguez-Moreno, L., Ebert, M. K., Bolton, M. D. & Thomma, B. P. H. J. Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens. *Plant J.* **93**, 664–674 (2018).
94. Flor, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**, 653–669 (1942).
95. de Wit, P. J. G. M. *Cladosporium fulvum* Effectors: Weapons in the Arms Race with Tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* **54**, 1–23 (2016).
96. Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–39 (2006).
97. Oliver, R. P. & Solomon, P. S. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 415–9 (2010).
98. Friesen, T. L., Meinhardt, S. W. & Faris, J. D. The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *Plant J.* **51**, 681–92 (2007).
99. Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S. & Oliver, R. P. Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.* **10**, 1421–1428 (2008).
100. de Wit, P. J. G. M., Testa, A. & Oliver, R. P. Fungal Plant Pathogenesis Mediated by Effectors. *Microbiol Spectr.* **4**, (2016).
101. Tan, K.-C. & Oliver, R. P. 12 Metabolomics and Proteomics to Dissect Fungal Phytopathogenicity. in *Fungal Genomics* 301–319 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-45218-5_12
102. González-Fernández, R., Prats, E. & Jorrín-Novó, J. V. Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 1–36 (2010).

Bibliografía

103. Tan, K., Ipcho, S. V. S., Trengove, R. D., Oliver, R. P. & Solomon, P. S. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 703–715 (2009).
104. Simmons, E. G. Perfect States of Stemphylium III. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* **49**, 305–307 (1989).
105. Chairisook, C. Five Stemphylium spp. Pathogenic to Alfalfa: Occurrence in the United States and Time Requirements for Ascospore Production. *Plant Dis.* **79**, 369 (1995).
106. Graf, S., Bohlen-Janssen, H., Miessner, S., Wichura, A. & Stammler, G. Differentiation of Stemphylium vesicarium from Stemphylium botryosum as causal agent of the purple spot disease on asparagus in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* **144**, 411–418 (2016).
107. Câmara, M. P. S., O'Neill, N. R. & Van Berkum, P. Phylogeny of Stemphylium spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **94**, 660–672 (2002).
108. Leach, C. M. & Aragaki, M. Effects of Temperature on Conidium Characteristics of Ulocladium chartarum and Stemphylium floridanum. *Mycologia* **62**, 1071 (1970).
109. Shenoy, B. D., Jeewon, R. & Hyde, K. D. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Divers.* **26**, 1–54 (2007).
110. Olsen, K. J. K. & Andersen, B. Chemotaxonomy of the genus Stemphylium. *Planta Med.* **81**, S1–S381 (2016).
111. Olsen, K. J. K., Rossman, A. & Andersen, B. Metabolite production by species of Stemphylium. *Fungal Biol.* **122**, 172–181 (2018).
112. Schoch, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6241–6246 (2012).
113. Crous, P. W. *et al.* The Genera of Fungi: fixing the application of type species of generic names. *IMA Fungus* **5**, 141–160 (2014).
114. Inderbitzin, P., Mehta, Y. R. & Berbee, M. L. Pleospora species with Stemphylium anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish

Bibliografía

- among species in the Pleospora herbarum clade. *Mycologia* **101**, 329–339 (2009).
115. Al-Amri, K. *et al.* Population structure of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of tomato in a single field. *Springerplus* **5**, 1642 (2016).
116. Chaisrisook, C., Skinner, D. Z. & Stuteville, D. L. Molecular genetic relationships of five *Stemphylium* species pathogenic to alfalfa. *Sydowia* **47**, 1–9 (1995).
117. Mehta, Y. R. Genetic diversity among isolates of *stemphylium solani* from cotton. *Fitopatol. Bras.* **26**, 703–709 (2001).
118. McDonald, B. A. & Linde, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 349–379 (2002).
119. Colombo, M. del H. & Obregón, V. G. Primera cita de *Stemphylium solani* en plantines de pimiento en almácigo en la Provincia de Corrientes. in *Congreso Argentino de Fitopatología. 1. 2008 05 28-30, 28-30 de mayo de 2008. Córdoba. AR.* (2008).
120. Hogn, S. I., Ramallo, J. C., Quipildor, L., Ramallo, A. C. & Baino, O. ‘*Stemphylium solani*’ en tomate de invernadero en Tucumán, Argentina. *Fitopatología* **40**, 17–22 (2005).
121. Di Rienzo, J. A. *et al.* InfoStat versión 2015l. *Córdoba Univ. Nac. Córdoba* (2015).
122. Bornet, B. & Branchard, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Report.* **19**, 209–215 (2001).
123. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. & Taylor, J. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. a Guid. to methods Appl.* **18**, 315–322 (1990).
124. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599 (2007).
125. Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G. & Bult, C. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**, 315–319 (1994).
126. Swofford, D. L. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 bio. (2003).
127. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat.*

Bibliografía

- Contr.* **19**, 716–723 (1974).
128. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **9**, 772 (2012).
129. Guindon, S. & Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**, 696–704 (2003).
130. Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinforma.* **1**, 117693430500100000 (2005).
131. Lamari, L. *Assess: image analysis software for plant disease quantification*. (APS Press, 2002).
132. Wei, C. T. Notes on *Corynespora*. *Mycol. Pap.* **34**, (1950).
133. Colombo, M. del H., Lencak, M. P. & Ishikawa, A. Mancha gris del tomate causada por *Stemphylium floridanum*. Primera cita en Argentina. *Reun. Comun. Científicas y Técnicas. 12. 2001 08 01-03, 1 al 3 Agosto 2001. Corrientes. AR.* (2001).
134. Griffith, G. W. *et al.* Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**, 165–171 (2007).
135. Malca, I. & Ullstrup, A. J. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium*. *Bull. Torrey Bot. Club* **240–249** (1962).
136. Zhu, Y., Pan, J., Qiu, J. & Guan, X. Optimization of nutritional requirements for mycelial growth and sporulation of entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis* webber. *Brazilian J. Microbiol.* **39**, 770–775 (2008).
137. Hannon, C. I. & Weber, G. F. A leaf spot of tomato caused by *Stemphylium floridanum* sp. nov. *Phytopathology* **45**, (1955).
138. Ellis, M. B. & Gibson, I. A. S. *Stemphylium solani*. *C. Descr. Pathog. fungi Bact.* **472**, 1–2 (1975).
139. Ellis, M. B. & Gibson, I. . . *Stemphylium lycopersici*. *C. Descr. Pathog. fungi Bact.* **471**, (1975).
140. Kwon, J.-H., Jeong, B.-R., Yun, J.-G. & Lee, S.-W. Leaf spot of *Kalanchoe* (*Kalanchoe blossfeldiana*) caused by *Stemphylium lycopersici*. *Res. Plant Dis.* **13**,

Bibliografía

- 122 125 (2007).
141. Tomioka, K. & Sato, T. Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**, 342–344 (2011).
142. Hong, S. K., Choi, H. W., Lee, Y. K., Shim, H. S. & Lee, S. Y. Leaf spot and stem rot on Wilford Swallowwort caused by *Stemphylium lycopersici* in Korea. *Mycobiology* **40**, 268–271 (2012).
143. Kurose, D. *et al.* Pathogenicity of *Stemphylium lycopersici* isolated from rotted tobacco seeds on seedlings and leaves. *J. Gen. plant Pathol.* **80**, 147–152 (2014).
144. Nasehi, A. *et al.* Identification of the New Pathogen (*Stemphylium lycopersici*) Causing Leaf Spot on Pepino (*Solanum muricatum*). *J. Phytopathol.* **164**, 421–426 (2016).
145. SENASA. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. (2016).
146. Hongn, S., Ramallo, A., Baino, O. & Ramallo, J. C. First Report of Target Spot of *Vaccinium corymbosum* Caused by *Corynespora cassiicola*. *Plant Dis.* **91**, 771–771 (2007).
147. Cabrera, M. G., Alvarez, R. E., Raimondo, M. R., Cúndom, M. A. & Gutiérrez, S. A. Importancia de las enfermedades de fin de ciclo de la soja (*Glycine max*), en el NEA. *Comun. científicas y tecnológicas* (2004).
148. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. The Structure of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**, 123–131 (1953).
149. Wilkins, M. H. F., Stokes, A. R. & Wilson, H. R. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature* **171**, 738–740 (1953).
150. Franklin, R. E. & Gosling, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **171**, 740–741 (1953).
151. Franklin, R. E. & Gosling, R. G. The structure of sodium thymonucleate fibres. II. The cylindrically symmetrical Patterson function. *Acta Crystallogr.* **6**, 678–685 (1953).
152. Zallen, D. T. Despite Franklin's work, Wilkins earned his Nobel. *Nature* **425**, 15 (2003).

Bibliografía

153. Hutchison, C. A. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6227–37 (2007).
154. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
155. Maxam, A. M. & Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 560–564 (1977).
156. Sanger, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* **265**, 687–695 (1977).
157. Fleischmann, R. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (80-.)*. **269**, 496–512 (1995).
158. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science (80-.)*. **274**, 546, 563–7 (1996).
159. Human Genome Sequencing Consortium, I. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945 (2004).
160. Margulies, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380 (2005).
161. Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 333–51 (2016).
162. Eklblom, R. & Wolf, J. B. W. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol. Appl.* **7**, 1026–1042 (2014).
163. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
164. Liu, L. *et al.* Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 1–11 (2012).
165. Metzker, M. L. Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
166. Pop, M. & Salzberg, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet.* **24**, 142–149 (2008).
167. Nagarajan, N. *et al.* Finishing genomes with limited resources: lessons from an ensemble of microbial genomes. *BMC Genomics* **11**, 242 (2010).
168. Treangen, T. J. & Salzberg, S. L. Repetitive DNA and next-generation sequencing:

Bibliografía

- computational challenges and solutions. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 36–46 (2012).
169. van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D. & Thermes, C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* **34**, 666–681 (2018).
170. Eid, J. *et al.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* **323**, 133–8 (2009).
171. van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).
172. Loose, M. W. The potential impact of nanopore sequencing on human genetics. *Hum. Mol. Genet.* **26**, R202–R207 (2017).
173. Jain, M. *et al.* Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.* **36**, 338–345 (2018).
174. Wetterstrand, K. A. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). (2018). Available at: www.genome.gov/sequencingcostsdata. (Accessed: 9th February 2018)
175. Yandell, M. & Ence, D. A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 329–342 (2012).
176. Miller, J. R., Koren, S. & Sutton, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* **95**, 315–327 (2010).
177. Angeleska, A., Kleessen, S. & Nikoloski, Z. The Sequence Reconstruction Problem. in *Discrete and Topological Models in Molecular Biology* 23–43 (2014). doi:10.1007/978-3-642-40193-0_2
178. Compeau, P. E. C., Pevzner, P. A. & Tesler, G. How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nat. Biotechnol.* **29**, 987–991 (2011).
179. Haas, B. J., Zeng, Q., Pearson, M. D., Cuomo, C. A. & Wortman, J. R. Approaches to Fungal Genome Annotation. *Mycology* **2**, 118–141 (2011).
180. Conesa, A. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676 (2005).
181. Zdobnov, E. M. & Apweiler, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**, 847–8 (2001).
182. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*

Bibliografía

- 25, 25–29 (2000).
183. Webb, E. C. *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. (Academic Press, 1992).
184. Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. & Zdobnov, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **31**, 3210–3212 (2015).
185. Zdobnov, E. M. *et al.* OrthoDB v9.1: cataloging evolutionary and functional annotations for animal, fungal, plant, archaeal, bacterial and viral orthologs. *Nucleic Acids Res.* **45**, D744–D749 (2017).
186. Marçais, G. & Kingsford, C. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics* **27**, 764–770 (2011).
187. Luo, R. *et al.* SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* **1**, 18 (2012).
188. Meerzaman, D. *et al.* The promise of omics-based approaches to cancer prevention. *Semin. Oncol.* **43**, 36–48 (2016).
189. Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I. & Vorobyev, D. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol.* **7**, S10 (2006).
190. Wu, S., Zhu, Z., Fu, L., Niu, B. & Li, W. WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. *BMC Genomics* **12**, 444 (2011).
191. Lowe, T. M. & Eddy, S. R. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**, 955–964 (1997).
192. Wuyts, J. The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res.* **32**, 101D–103 (2004).
193. Szymanski, M. 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 176–178 (2002).
194. Huang, Y., Gilna, P. & Li, W. Identification of ribosomal RNA genes in metagenomic fragments. *Bioinformatics* **25**, 1338–1340 (2009).
195. Eddy, S. R. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**, 755–763 (1998).
196. Keller, O., Kollmar, M., Stanke, M. & Waack, S. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **27**, 757

Bibliografía

- 763 (2011).
197. Eddy, S. R. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002195 (2011).
198. Grigoriev, I. V. *et al.* MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* **42**, D699–D704 (2014).
199. Thomma, B. P. H. J. *et al.* Mind the gap; seven reasons to close fragmented genome assemblies. *Fungal Genet. Biol.* **90**, 24–30 (2016).
200. Möller, M. & Stukenbrock, E. H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 756–771 (2017).
201. Raffaele, S. & Kamoun, S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 417–30 (2012).
202. Dang, H. X., Pryor, B., Peever, T. & Lawrence, C. B. The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC Genomics* **16**, 239 (2015).
203. Woudenberg, J. H. C. *et al.* *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Stud. Mycol.* **82**, 1–21 (2015).
204. Bihon, W., Cloete, M., Gerrano, A. S., Oelofse, D. & Adebola, P. Draft Genome Sequence of *Alternaria alternata* Isolated from Onion Leaves in South Africa. *Genome Announc.* **4**, (2016).
205. Hu, J. *et al.* Genomic characterization of the conditionally dispensable chromosome in *Alternaria arborescens* provides evidence for horizontal gene transfer. *BMC Genomics* **13**, 171 (2012).
206. Nguyen, H. D. T., Lewis, C. T., Lévesque, C. A. & Gräfenhan, T. Draft Genome Sequence of *Alternaria alternata* ATCC 34957. *Genome Announc.* **4**, (2016).
207. Wolters, P. J. *et al.* Gapless Genome Assembly of the Potato and Tomato Early Blight Pathogen *Alternaria solani*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **31**, 692–694 (2018).
208. Dongen, S. A cluster algorithm for graphs. (2000).
209. Katoh, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3059–3066 (2002).
210. Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J. M. & Gabaldon, T. trimAl: a tool for

Bibliografía

- automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**, 1972–1973 (2009).
211. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1641–1650 (2009).
212. Chan, D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–52 (2006).
213. Basse, C. W. Mitochondrial inheritance in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 712–9 (2010).
214. Lang, B. F., Gray, M. W. & Burger, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 351–97 (1999).
215. Bullerwell, C. E. & Lang, B. F. Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 362–9 (2005).
216. Lambowitz, A. M. & Belfort, M. Mobile Bacterial Group II Introns at the Crux of Eukaryotic Evolution. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0050-2014 (2015).
217. Lang, B. F. Mitochondrial Genomes in Fungi. in *Molecular Life Sciences* 1–7 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-6436-5_113-2
218. Lang, B. F., Laforest, M.-J. & Burger, G. Mitochondrial introns: a critical view. *Trends Genet.* **23**, 119–25 (2007).
219. Burt, A. & Koufopanou, V. Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 609–15 (2004).
220. Stoddard, B. L. Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* **38**, 49–95 (2005).
221. Edgell, D. R. Selfish DNA: homing endonucleases find a home. *Curr. Biol.* **19**, R115–7 (2009).
222. Stoddard, B. L. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure* **19**, 7–15 (2011).
223. Repar, J. & Warnecke, T. Mobile Introns Shape the Genetic Diversity of Their Host Genes. *Genetics* **205**, 1641–1648 (2017).
224. Wu, B. & Hao, W. Horizontal transfer and gene conversion as an important driving

Bibliografía

- force in shaping the landscape of mitochondrial introns. *G3 (Bethesda)*. **4**, 605–12 (2014).
225. Burger, G., Gray, M. W. & Lang, B. F. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* **19**, 709–16 (2003).
226. Pantou, M. P., Kouvelis, V. N. & Typas, M. A. The complete mitochondrial genome of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*: a novel gene order for *Verticillium* and a diagnostic tool for species identification. *Curr. Genet.* **50**, 125–36 (2006).
227. Bullerwell, C. E., Forget, L. & Lang, B. F. Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1614–23 (2003).
228. van de Sande, W. W. J. Phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of *Madurella mycetomatis* confirms its taxonomic position within the order Sordariales. *PLoS One* **7**, e38654 (2012).
229. Aguilera, G. *et al.* High variability of mitochondrial gene order among fungi. *Genome Biol. Evol.* **6**, 451–65 (2014).
230. Paquin, B. *et al.* The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* **31**, 380–95 (1997).
231. Formey, D. *et al.* Comparative analysis of mitochondrial genomes of *Rhizoglyphus irregularis* - syn. *Glomus irregulare* - reveals a polymorphism induced by variability generating elements. *New Phytol.* **196**, 1217–27 (2012).
232. Joardar, V. *et al.* Sequencing of mitochondrial genomes of nine *Aspergillus* and *Penicillium* species identifies mobile introns and accessory genes as main sources of genome size variability. *BMC Genomics* **13**, 698 (2012).
233. Zhang, Y. *et al.* Comparison of mitochondrial genomes provides insights into intron dynamics and evolution in the caterpillar fungus *Cordyceps militaris*. *Fungal Genet. Biol.* **77**, 95–107 (2015).
234. Kim, Y.-S., Dixon, E. W., Vincelli, P. & Farman, M. L. Field Resistance to Strobilurin (QoI) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Phytopathology* **93**, 891–900 (2003).
235. Ma, Z. & Michailides, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of

Bibliografía

- fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* **24**, 853–863 (2005).
236. Kearse, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–9 (2012).
237. Lohse, M., Drechsel, O. & Bock, R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr. Genet.* **52**, 267–74 (2007).
238. Krzywinski, M. *et al.* Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* **19**, 1639–45 (2009).
239. Hane, J. K. *et al.* Dothideomycete plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Plant Cell* **19**, 3347–68 (2007).
240. Shen, X.-Y. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of *Shiraia bambusicola* reveals special features in the order of Pleosporales. *PLoS One* **10**, e0164666 (2015).
241. Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R. & Perna, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* **14**, 1394–403 (2004).
242. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–7 (2004).
243. Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 540–52 (2000).
244. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **27**, 1164–5 (2011).
245. Ronquist, F. *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**, 539–42 (2012).
246. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–402 (1997).
247. Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. Locating proteins in

Bibliografía

- the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2**, 953–71 (2007).
248. Burger, G., Plante, I., Lonergan, K. M. & Gray, M. W. The mitochondrial DNA of the amoeboid protozoon, *Acanthamoeba castellanii*: complete sequence, gene content and genome organization. *J. Mol. Biol.* **245**, 522–37 (1995).
249. Lonergan, K. M. & Gray, M. W. Expression of a continuous open reading frame encoding subunits 1 and 2 of cytochrome c oxidase in the mitochondrial DNA of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Mol. Biol.* **257**, 1019–30 (1996).
250. Pellizzari, R., Anjard, C. & Bisson, R. Subunits I and II of Dictyostelium cytochrome c oxidase are specified by a single open reading frame transcribed into a large polycistronic RNA. The sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ data base under the acces. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1320**, 1–7 (1997).
251. Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476–81 (1999).
252. Yao, Y. *et al.* The complete mitochondrial genome of the nematophagous fungus *Acremonium implicatum*. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, Seq. Anal.* **27**, 3246–7 (2016).
253. Cummings, D. J., McNally, K. L., Domenico, J. M. & Matsuura, E. T. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospira anserina*. *Curr. Genet.* **17**, 375–402 (1990).
254. Solieri, L. Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends Microbiol.* **18**, 521–30 (2010).
255. Freel, K. C., Friedrich, A. & Schacherer, J. Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view. *FEMS Yeast Res.* **15**, fovo23 (2015).
256. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. & Purnelle, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **440**, 325–31 (1998).
257. Bullerwell, C. E., Leigh, J., Forget, L. & Lang, B. F. A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* **31**, 759–68 (2003).
258. Talla, E., Anthouard, V., Bouchier, C., Frangeul, L. & Dujon, B. The complete mitochondrial genome of the yeast *Kluyveromyces thermotolerans*. *FEBS Lett.* **579**,

Bibliografía

- 30–40 (2005).
259. Goodwin, S. B. *et al.* The mitochondrial genome of the ethanol-metabolizing, wine cellar mold *Zasmidium cellare* is the smallest for a filamentous ascomycete. *Fungal Biol.* **120**, 961–974 (2016).
260. Capaldi, R. A. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 569–96 (1990).
261. Gray, M. W. *et al.* Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res.* **26**, 865–78 (1998).
262. Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* **23**, 167–72 (2007).
263. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biol. Sci.* **270**, 313–21 (2003).
264. Bonen, L. & Vogel, J. The ins and outs of group II introns. *Trends Genet.* **17**, 322–31 (2001).
265. Férandon, C. *et al.* The *Agaricus bisporus* *cox1* gene: the longest mitochondrial gene and the largest reservoir of mitochondrial group I introns. *PLoS One* **5**, e14048 (2010).
266. Santamaria, M. *et al.* Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria. *BMC Bioinformatics* **10 Suppl 6**, S15 (2009).
267. Vaughn, J. C., Mason, M. T., Sper-Whitis, G. L., Kuhlman, P. & Palmer, J. D. Fungal origin by horizontal transfer of a plant mitochondrial group I intron in the chimeric *CoxI* gene of *Peperomia*. *J. Mol. Evol.* **41**, 563–72 (1995).
268. Cho, Y. & Palmer, J. D. Multiple acquisitions via horizontal transfer of a group I intron in the mitochondrial *cox1* gene during evolution of the Araceae family. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1155–65 (1999).
269. Sanchez-Puerta, M. V. *et al.* Multiple recent horizontal transfers of the *cox1* intron in Solanaceae and extended co-conversion of flanking exons. *BMC Evol. Biol.* **11**, 277 (2011).
270. Torriani, S. F. F., Goodwin, S. B., Kema, G. H. J., Pangilinan, J. L. & McDonald,

Bibliografía

- B. A. Intraspecific comparison and annotation of two complete mitochondrial genome sequences from the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 628–37 (2008).
271. Bullerwell, C. E., Burger, G. & Lang, B. F. A novel motif for identifying rps3 homologs in fungal mitochondrial genomes. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 363–5 (2000).
272. Sethuraman, J., Majer, A., Iranpour, M. & Hausner, G. Molecular evolution of the mtDNA encoded rps3 gene among filamentous ascomycetes fungi with an emphasis on the Ophiostomatoid fungi. *J. Mol. Evol.* **69**, 372–85 (2009).
273. Groot, G. S., Mason, T. L. & Van Harten-Loosbroek, N. Vari is associated with the small ribosomal subunit of mitochondrial ribosomes in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **174**, 339–42 (1979).
274. Burke, J. M. & Rajbhandary, U. L. Intron within the large rRNA gene of *N. crassa* mitochondria: A long open reading frame and a consensus sequence possibly important in splicing. *Cell* **31**, 509–520 (1982).
275. Sethuraman, J., Majer, A., Friedrich, N. C., Edgell, D. R. & Hausner, G. Genes within genes: multiple LAGLIDADG homing endonucleases target the ribosomal protein S3 gene encoded within an rnl group I intron of *Ophiostoma* and related taxa. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 2299–315 (2009).
276. Bowen, N. J. & Jordan, I. K. Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. *Curr. Issues Mol. Biol.* **4**, 65–76 (2002).
277. Phadnis, N., Sia, R. A. & Sia, E. A. Analysis of repeat-mediated deletions in the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **171**, 1549–59 (2005).
278. Spatafora, J. W. *et al.* A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia* **98**, 1018–28 (2006).
279. Schoch, C. L. *et al.* The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst. Biol.* **58**, 224–39 (2009).
280. Reeb, V., Lutzoni, F. & Roux, C. Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Mol. Phylogenet. Evol.*

Bibliografía

- 32, 1036–60 (2004).
281. Berbee, M. L. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**, 165–187 (2001).
282. Ma, L. *et al.* Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEB J.* **27**, 1962–72 (2013).
283. Liu, Y. *et al.* Phylogenomic analyses support the monophyly of Taphrinomycotina, including *Schizosaccharomyces* fission yeasts. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 27–34 (2009).
284. Magnan, C. *et al.* Sequence Assembly of *Yarrowia lipolytica* Strain W29/CLIB89 Shows Transposable Element Diversity. *PLoS One* **11**, e0162363 (2016).
285. Küberl, A. *et al.* High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *J. Biotechnol.* **154**, 312–20 (2011).
286. Rokas, A., Wisecaver, J. H. & Lind, A. L. The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* (2018). doi:10.1038/s41579-018-0075-3
287. Richards, T. A. & Talbot, N. J. Horizontal gene transfer in osmotrophs: playing with public goods. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 720–727 (2013).
288. Sánchez-Vallet, A. *et al.* The Genome Biology of Effector Gene Evolution in Filamentous Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **56**, 21–40 (2018).
289. Rovenich, H., Boshoven, J. C. & Thomma, B. P. Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**, 96–103 (2014).
290. Fisher, M. C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186–194 (2012).
291. Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 515–47 (2000).
292. Girard, V., Dieryckx, C., Job, C. & Job, D. Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics* **13**, 597–608 (2013).
293. Lum, G. & Min, X. J. FunSecKB: the Fungal Secretome KnowledgeBase. *Database*

Bibliografía

- 2011, bar001-bar001 (2011).
294. Nielsen, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. in *Protein Function Prediction: Methods and Protocols* (ed. Kihara, D.) 59–73 (2017). doi:10.1007/978-1-4939-7015-5_6
295. Nombela, C., Gil, C. & Chaffin, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* **14**, 15–21 (2006).
296. Tsang, A., Butler, G., Powlowski, J., Panisko, E. A. & Baker, S. E. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genet. Biol.* **46**, S153–S160 (2009).
297. Nickel, W. & Rabouille, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 148–155 (2009).
298. Kjemtrup, S. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 73–78 (2000).
299. Birnbaumer, L., Abramowitz, J. & Brown, A. M. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 163–224 (1990).
300. Snelders, N. C., Kettles, G. J., Rudd, J. J. & Thomma, B. P. H. J. Plant pathogen effector proteins as manipulators of host microbiomes? *Mol. Plant Pathol.* **19**, 257–259 (2018).
301. Cook, D. E., Mesarich, C. H. & Thomma, B. P. H. J. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 541–563 (2015).
302. Sperschneider, J. *et al.* Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. *PLoS Pathog.* **11**, e1004806 (2015).
303. Sperschneider, J. *et al.* EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* **210**, 743–761 (2016).
304. Jones, D. A., Bertazzoni, S., Turo, C. J., Syme, R. A. & Hane, J. K. Bioinformatic prediction of plant pathogenicity effector proteins of fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **46**, 43–49 (2018).
305. Fouché, S., Plissonneau, C. & Croll, D. The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **46**, 34–42 (2018).

Bibliografía

306. Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B. & Taylor, J. M. Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Mol. Plant Pathol.* **19**, 2094–2110 (2018).
307. Urban, M. *et al.* PHI-base: a new interface and further additions for the multi-species pathogen-host interactions database. *Nucleic Acids Res.* **45**, D604–D610 (2017).
308. Sonah, H., Deshmukh, R. K. & Bélanger, R. R. Computational Prediction of Effector Proteins in Fungi: Opportunities and Challenges. *Front. Plant Sci.* **7**, (2016).
309. Yang, S., Li, H., He, H., Zhou, Y. & Zhang, Z. Critical assessment and performance improvement of plant pathogen protein-protein interaction prediction methods. *Brief. Bioinform.* (2017). doi:10.1093/bib/bbx123
310. Malik, V. S. Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **5**, 68–72 (1980).
311. Khaldi, N. *et al.* SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 736–741 (2010).
312. Fedorova, N. D., Moktali, V. & Medema, M. H. Bioinformatics Approaches and Software for Detection of Secondary Metabolic Gene Clusters. in *Fungal Secondary Metabolism* 23–45 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-62703-122-6_2
313. Brakhage, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 21–32 (2013).
314. Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R. & De Wit, P. J. G. M. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 67–93 (2013).
315. Pusztahelyi, T., Holb, I. J. & Pácsi, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front. Plant Sci.* **6**, (2015).
316. Markham, J. E. & Hille, J. Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. *Mol. Plant Pathol.* **2**, 229–239 (2001).
317. Baker, S. E. *et al.* Two polyketide synthase-encoding genes are required for biosynthesis of the polyketide virulence factor, T-toxin, by *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**, 139–49 (2006).

Bibliografía

318. Walton, J. D. HC-toxin. *Phytochemistry* **67**, 1406–13 (2006).
319. Toledo, A. V. *et al.* Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **99**, (2017).
320. Medema, M. H. *et al.* antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **39**, W339–W346 (2011).
321. Verma, S. *et al.* Draft genome sequencing and secretome analysis of fungal phytopathogen *Ascochyta rabiei* provides insight into the necrotrophic effector repertoire. *Sci. Rep.* **6**, 24638 (2016).
322. Ohm, R. A. *et al.* Diverse Lifestyles and Strategies of Plant Pathogenesis Encoded in the Genomes of Eighteen Dothideomycetes Fungi. *PLoS Pathog.* **8**, e1003037 (2012).
323. Yin, Y. *et al.* dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **40**, W445–51 (2012).
324. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **38**, D227–33 (2010).
325. Fischer, M. & Pleiss, J. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* **31**, 319–21 (2003).
326. Blin, K., Medema, M. H., Kottmann, R., Lee, S. Y. & Weber, T. The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **45**, D555–D559 (2017).
327. Cairns, T. & Meyer, V. In silico prediction and characterization of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Genomics* **18**, 631 (2017).
328. Inglis, D. O. *et al.* Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* **13**, 91 (2013).
329. Looi, H. K. *et al.* Genomic insight into pathogenicity of dematiaceous fungus *Corynespora cassiicola*. *PeerJ* **5**, e2841 (2017).
330. Franck, W. L., Gokce, E., Oh, Y., Muddiman, D. C. & Dean, R. A. Temporal

Bibliografía

- Analysis of the Magnaporthe Oryzae Proteome During Conidial Germination and Cyclic AMP (cAMP)-mediated Appressorium Formation. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2249–2265 (2013).
331. Liao, D., Basarab, G. S., Gatenby, A. A., Valent, B. & Jordan, D. B. Structures of trihydroxynaphthalene reductase-fungicide complexes: implications for structure-based design and catalysis. *Structure* **9**, 19–27 (2001).
332. Tsuji, G. *et al.* Novel fungal transcriptional activators, Cmr1p of *Colletotrichum lagenarium* and pig1p of *Magnaporthe grisea*, contain Cys²His² zinc finger and Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a de. *Mol. Microbiol.* **38**, 940–54 (2000).
333. Wirthmueller, L., Maqbool, A. & Banfield, M. J. On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 761–776 (2013).
334. Doehlemann, G. & Hemetsberger, C. Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* **198**, 1001–1016 (2013).
335. Asai, S. & Shirasu, K. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **28**, 1–8 (2015).
336. Jashni, M. K., Mehrabi, R., Collemare, J., Mesarich, C. H. & de Wit, P. J. G. M. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* **6**, (2015).
337. Stotz, H. U., Mitrousis, G. K., de Wit, P. J. G. M. & Fitt, B. D. L. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends Plant Sci.* **19**, 491–500 (2014).
338. Escobar-Tovar, L., Guzmán-Quesada, M., Sandoval-Fernández, J. A. & Gómez-Lim, M. A. Comparative analysis of the in vitro and in planta secretomes from *Mycosphaerella fijiensis* isolates. *Fungal Biol.* **119**, 447–470 (2015).
339. Lopez, D. *et al.* Genome-Wide Analysis of *Corynespora cassiicola* Leaf Fall Disease Putative Effectors. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
340. Cantarel, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233–D238 (2009).
341. Franceschetti, M. *et al.* Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**, (2017).

Bibliografía

342. Kombrink, A. & Thomma, B. P. H. J. LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. *PLoS Pathog.* **9**, e1003769 (2013).
343. Sánchez-Vallet, A. *et al.* Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife* **2**, (2013).
344. Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. & Doehlemann, G. Compatibility in the *Ustilago maydis* Maize Interaction Requires Inhibition of Host Cysteine Proteases by the Fungal Effector Pit2. *PLoS Pathog.* **9**, e1003177 (2013).
345. Van't Klooster, J., van der Hoorn, R., Joosten, M., Jones, J. & de Wit, P. Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science (80-.)*. **308**, 1783–1786 (2005).
346. Lowe, R. G. T. *et al.* Extracellular peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Front. Plant Sci.* **6**, (2015).
347. Heller, J. & Tudzynski, P. Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**, 369–390 (2011).
348. Baccelli, I. Cerato-platanin family proteins: one function for multiple biological roles? *Front. Plant Sci.* **5**, (2015).
349. Horbach, R. *et al.* Sfp-Type 4'-Phosphopantetheinyl Transferase Is Indispensable for Fungal Pathogenicity. *Plant Cell* **21**, 3379–3396 (2009).
350. Paolo, W. F. *et al.* Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS_I in *Wangiella* [Exophiala] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiol.* **6**, 55 (2006).
351. Howard, R. J. & Ferrari, M. A. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.* **13**, 403–418 (1989).
352. Cairns, T., Minuzzi, F. & Bignell, E. The host-infecting fungal transcriptome. *FEMS Microbiol. Lett.* **307**, 1–11 (2010).
353. Fedorova, N. D. *et al.* Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* **4**, e1000046 (2008).
354. Garrett, S. D. *Pathogenic root-infecting fungi. Pathogenic root-infecting fungi.*

Bibliografía

- (Cambridge University Press, 1970).
355. Dong, S., Raffaele, S. & Kamoun, S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **35**, 57–65 (2015).
356. Seidl, M. F. & Thomma, B. P. H. J. Sex or no sex: evolutionary adaptation occurs regardless. *Bioessays* **36**, 335–45 (2014).
357. Debuchy, R., Berteaux-Lecellier*, V. & Silar, P. Mating Systems and Sexual Morphogenesis in Ascomycetes. in *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* 501–535 (American Society of Microbiology, 2010).
doi:10.1128/9781555816636.ch33
358. Inderbitzin, P., Harkness, J., Turgeon, B. G. & Berbee, M. L. Lateral transfer of mating system in *Stemphylium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11390–11395 (2005).
359. Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635–41 (2012).