

Caracterización de aislados de *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous provenientes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de cultivo protegido

**Alexander Bernal Cabrera
Benedicto Martínez Coca
Felipe Lidcay Herrera Isla**

Edición: Liset Ravelo Romero

Corrección: Fernando Gutiérrez Ortega

Diagramación: Roberto Suárez Yera

Alexander Bernal Cabrera, Benedicto Martínez Coca y Felipe Lidcay Herrera Isla, 2010

Editorial Feijóo, 2010

ISBN: 978-959-250-572-8



EDITORIAL
Feijóo

Editorial Samuel Feijóo, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

RESUMEN

En Cuba, el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) constituye el principal renglón hortícola en los sistemas de cultivo protegidos. Entre los agentes causales de enfermedades, que más pueden influir en la merma de los rendimientos y disminuir el período de vida útil de las plantaciones se encuentra el hongo fitopatógeno *Passalora fulva*. Tomando en cuenta las variaciones intraespecíficas que se presentan en esta especie y la necesidad de contribuir al fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético del cultivo, los objetivos de este trabajo estuvieron encaminados a realizar caracterizaciones combinando aspectos culturales, fisiológicos, patogénicos y genéticos de 36 aislados de *P. fulva* procedentes de diferentes localidades del país. Como aporte científico se detectó la presencia de cuatro razas fisiológicas incidiendo en las plantaciones de tomate establecidas en casas de cultivo del país. Estos resultados sientan las bases para la interpretación de los eventos epifitiológicos que ocurran en condiciones de producción, así como son fundamentales para la organización de un programa de mejora dirigido a la obtención de variedades de tomate con resistencia a las razas determinadas en el estudio. Los resultados permitieron brindar recomendaciones prácticas dirigidas de forma especial a los fitomejoradores y se propuso una nueva escala evaluativa para la determinación de razas fisiológicas del hongo fitopatógeno. Estos son los primeros resultados en el país sobre *P. fulva* donde se combinan tres de los aspectos más importantes que caracterizan la variabilidad de este hongo fitopatógeno.

INDICE	Contenido	Pág.
1	INTRODUCCIÓN.....	7
2	DESARROLLO.....	9
2.1	ESTADO DEL ARTE.....	9
2.1.1.	El moho de las hojas.....	9
2.1.1.1	Historia y distribución geográfica.....	9
2.1.1.2	Sintomatología.....	9
2.1.2.	Agente causal.....	10
2.1.2.1	Principales características taxonómicas y morfológicas.....	10
2.1.2.2	Identificación.....	12
2.1.3	Interacción tomate- <i>Passalora fulva</i>	14
2.1.3.1	Ciclo de infección sobre plantas susceptibles: Interacción compatible.....	14
2.1.3.2	Ciclo de infección sobre plantas resistentes: Interacción incompatible.....	14
2.1.3.3	Ciclo de infección sobre plantas no hospedantes: Incompatibilidad básica.....	16
2.1.4	Mecanismos de patogenicidad.....	16
2.1.4.1	Supuestas proteínas relacionadas con la virulencia: <i>Avrs</i> y <i>Ecps</i>	17
2.1.5	Razas fisiológicas.....	21
2.1.6	Epifitiología.....	22
2.2	PROCEDIMIENTOS.....	23

2.2.1	Aislamiento e identificación de aislados de <i>P. fulva</i>	23
2.2.1.1	Toma de muestras.....	23
2.2.1.2	Aislamiento, purificación e identificación.....	23
2.2.2	Caracterización cultural.....	26
2.2.3	Influencia de diferentes factores físicos y nutricionales en el desarrollo de <i>P. fulva</i>	27
2.2.3.1	Influencia de diferentes medios de cultivo en el crecimiento micelial y esporulación.....	27
2.2.3.2	Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial.....	28
2.2.3.3	Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial, esporulación y la germinación conidial...	29
2.2.4	Variabilidad patogénica.....	29
2.2.4.1	Determinación de razas fisiológicas de <i>P. fulva</i> ...	29
2.2.4.2	Evaluación de la respuesta de genotipos de <i>Solanum lycopersicum</i> a la inoculación artificial con <i>P. fulva</i>	31
2.2.5	Determinación de genes de avirulencia y genes que codifican para las proteínas extracelulares en los aislados de <i>P. fulva</i>	32
2.2.5.1	Amplificación de los genes <i>Avr</i> mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	32
2.2.5.1.1	Análisis de las secuencias de los genes <i>Avr2</i> y <i>Avr4</i> de diferentes aislados cubanos de <i>P. fulva</i> .	33
2.2.5.2	Amplificación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (<i>Ecp</i>) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
2.3	RESULTADOS	35
2.3.1	Aislamiento e identificación de aislados de <i>P. fulva</i>	35

2.3.2	Caracterización cultural.....	37
2.3.3	Influencia de diferentes factores físicos y nutricionales en el desarrollo de <i>P. fulva</i>	40
2.3.3.1	Influencia de diferentes medios de cultivo en el crecimiento micelial y esporulación.....	40
2.3.3.2	Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial.....	43
2.3.3.3	Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial, esporulación y la germinación conidial..	47
2.3.4	Variabilidad patogénica.....	52
2.3.4.1	Determinación de razas fisiológicas de <i>P. fulva</i> ...	52
2.3.4.2	Evaluación de la respuesta de genotipos de <i>Solanum lycopersicum</i> a la inoculación artificial con <i>P. fulva</i>	57
2.3.5	Determinación de genes de avirulencia y genes que codifican para las proteínas extracelulares en los aislados de <i>P. fulva</i>	60
2.3.5.1	Amplificación de los genes <i>Avr</i> mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	60
2.3.5.1.1	Análisis de las secuencias de los genes <i>Avr2</i> y <i>Avr4</i> de diferentes aislados cubanos de <i>P. fulva</i> .	63
2.3.5.2	Amplificación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (<i>Ecp</i>) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	67
3	CONCLUSIONES.....	71
4	BIBLIOGRAFIA.....	73

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor distribución geográfica y consumo en el mundo. En Cuba ocupa un lugar importante, y con un desarrollo creciente por el incremento de las casas de cultivo en todo el país (Cardoza y otros, 2006).

El cultivo protegido es considerado mundialmente una tecnología agrícola novedosa (Gómez y otros, 2000). En contradicción con el nivel tecnológico alcanzado, las enfermedades en este ambiente se tornan más severas que en el cultivo tradicional, principalmente por el manejo del cultivo, período de siembra, las variaciones climáticas, nutricionales y fisiológicas, entre otros factores que predisponen las plantas a la infección de los agentes patógenos (Marrero, 2003; Vida y otros, 2004) y, por ende, las estrategias de control se hacen más complejas.

Entre las enfermedades fúngicas foliares de importancia en el cultivo del tomate en los sistemas de cultivo protegidos se destaca la conocida como “moho de las hojas”, cuyo agente causal es el hongo *Passalora fulva* (sin. *Cladosporium fulvum* (Cooke) (Braun *et al.*, 2003). Los síntomas de la enfermedad son foliares y se caracterizan por la aparición de manchas amarillas en el haz; por el envés coincidente con las manchas se observan los folíolos completamente cubiertos de los conidios pardo oliváceos del hongo (Blancard, 1992; Thomma *et al.*, 2005). En ataques intensos, gran parte de la superficie foliar queda inutilizada para realizar la fotosíntesis, lo que se traduce en un descenso en el rendimiento y calidad del fruto (Joosten y Wit, 1999).

El método de control de la enfermedad más empleado en la actualidad es el químico, recomendándose aplicaciones semanales de fungicidas tanto de contacto como sistémicos para garantizar la protección del cultivo (Almandoz, 2001; MINAGRI, 2006).

El conocimiento de las poblaciones del agente patógeno contribuye a los esfuerzos del mejoramiento y al desarrollo de estrategias que alarguen la vida útil de las variedades (Correa-Victoria y Zeigler, 1993; Leung *et al.*, 1993). El éxito, tanto de las medidas de control como del mejoramiento, depende del entendimiento de la variación en las

poblaciones del organismo patógeno (McDonald y Linde, 2002). La especie *P. fulva* ha sido estudiada por diversos investigadores (Wit, 1977; Oliver *et al.*, 2000; Wit *et al.*, 2002; Esse *et al.*, 2006) durante varias décadas del siglo pasado hasta la actualidad y es considerado como un sistema modelo en fitopatología molecular para estudiar las relaciones gen a gen (Day, 1957; Wit, 1992, 2000; Oliver, 1992).

En varias provincias de Cuba, se han notificado altos porcentajes de incidencia del hongo patógeno *P. fulva* sobre diferentes híbridos de tomate bajo condiciones de cultivo protegido, que junto a otros organismos fitopatógenos foliares ocasionan importantes pérdidas en el cultivo, sobre todo en la época de invierno (Bernal y otros, 2001; Busto y Rivas, 2004; Castellanos y otros, 2005).

A nivel mundial, los estudios de este hongo fitopatógeno se refieren principalmente a países de clima templado. En Cuba son escasos, y se desconocen las características biológicas y fisiológicas del mismo, aspectos importantes para una resistencia duradera de las variedades comerciales obtenidas en los programas de mejoramiento genético del cultivo, así como para el desarrollo de estrategias de control diferenciadas.

Por esta razón, los objetivos de este trabajo están encaminados a realizar la caracterización cultural y fisiológica de aislados de *P. fulva* procedentes de diferentes localidades del país, para determinar la variabilidad patogénica de este hongo fitopatógeno en las condiciones de Cuba y finalmente relacionar la capacidad patogénica del mismo con la presencia de genes relacionados con la patogenicidad.

La novedad científica de los resultados obtenidos está dada por:

1. Se determina por primera vez en Cuba la presencia de razas fisiológicas de *P. fulva*.
2. Se informa por primera vez en el mundo evidencias de subdivisiones dentro de las razas de *P. fulva*.

La novedad práctica de esta investigación consiste en:

1. Se ofrece una nueva escala de evaluación cualitativa basada en la manifestación de síntomas, que puede ser empleada para la determinación y evaluación de razas de *P. fulva*.

2. Se sugiere la inclusión de los genotipos silvestres *S. pimpinellifolium*, *S. esculentum* var. *cerasiforme* y *S. peruvianum* para los programas de mejora genética del tomate para la resistencia al hongo patógeno *P. fulva*.

2. DESARROLLO

2.1. ESTADO DEL ARTE

2.1.1. El moho de las hojas

2.1.1.1 Historia y distribución geográfica

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1883 por M. C. Cooke en Inglaterra, sobre muestras de hojas enviadas desde Carolina del Sur (Cooke, 1883). El tomate se fue llevado a Europa desde América Central en el siglo XVI, pero 300 años después la enfermedad era desconocida o por lo menos no descrita. Es probable que el requisito de alta humedad previniera el desarrollo de la enfermedad en climas más templados en Europa y Norte América, hasta que el cultivo intensivo en invernaderos comenzó a diseminarse a inicios del siglo XX. La enfermedad estaba en 1908 presente en todas las áreas cultivadas de tomate (Makemson, 1918). En la literatura científica se informa que aunque parece ser que *P. fulva* (sin. *C. fulvum*) se originó en el propio hábitat natural de las especies del género *Solanum* (sin. *Lycopersicon*) en Suramérica, el cultivo de invernaderos también propició condiciones favorables para el hongo patógeno en las áreas de clima templado. Como resultado, durante décadas, la enfermedad moho de las hojas se hizo persistente en los invernaderos de estas regiones (Thomma *et al.*, 2005).

2.1.1.2 Sintomatología

Generalmente el follaje es el único tejido afectado por el hongo patógeno, aunque ocasionalmente los tallos, flores, pecíolos y raramente los frutos son afectados (Ellis, 1971; Holliday y Mulder, 1976; Curtis *et al.*, 1994; Fox, 1997; Jones *et al.*, 1997 y Ho *et al.*, 1999). El primer síntoma es un área verde claro o amarillento por el haz de las hojas. Al mismo tiempo que estas manchas están desarrollándose, el hongo fitopatógeno produce

conidios en el envés, coincidiendo las mismas con un moho oliváceo o marrón (Blancard, 1992). En fases avanzadas de desarrollo de la enfermedad, los estomas no funcionan adecuadamente al quedar bloqueados por la acumulación de conidióforos que utilizan los orificios para salir de las hojas y liberar los conidios.

Como resultado de esta afectación de los estomas, la respiración de la planta es severamente dañada (Butler y Jones, 1949; Chupp y Sherf, 1960). También puede manifestarse marchitamiento de las hojas, defoliación parcial y en infecciones severas muerte de la planta (Jones *et al.*, 1997).

En Cuba se ha notificado sobre las hojas de *S. lycopersicum* (sin. *L. esculentum*) (Mayea *et al.*, 1983; Arnold, 1986; Urtiaga, 1986; Castañeda, 2001).

2.1.2 Agente causal

2.1.2.1 Principales características taxonómicas y morfológicas

El género *Passalora* (sin. *Cladosporium*) es extremadamente heterogéneo y agrupa principalmente a hongos saprobióticos; así como algunas especies patógenas (Oliver *et al.*, 2000). Dentro de estas últimas se encuentra *P. fulva* (sin. *C. fulvum*), el cual es un hongo biotrófico del tipo no obligado (Joosten y Wit, 1999).

En el caso de las especies de los hongos anamórficos (hongos conidiales), la identificación se realiza a través de la conidiogénesis y sus eventos, y raramente se sustenta sobre la filogenia del ácido desoxirribonucleico (ADN). La clasificación de *P. fulva* (sin. *C. fulvum*) ha sido algo polémica. Este fue clasificado primeramente como *Cladosporium* (Cooke, 1883). Más tarde, fue nombrado *Fulvia fulva* por Ciferri (1952), colocando esta especie en un nuevo género. Posteriormente, von Arx (1983) sugirió que el género *Cladosporium* era sinónimo del género *Mycovellosiella* y que *C. fulvum* debía ser llamado *Mycovellosiella fulva*. Aunque el nombre recomendado es *Fulvia fulva* (Ciferri, 1952), el nombre *C. fulvum* continúa siendo todavía muy usado por los investigadores, genetistas, productores, así como por los fitopatólogos. La introducción de más de un enfoque filogenético ha resultado en una simplificación en muchos de estos conceptos genéricos anamorfo en los miembros

de *Mycosphaerellaceae* (Crous *et al.*, 2000, 2001). También, fue determinado que *C. fulvum* pertenece al género *Mycosphaerella*, el género más amplio de los *Ascomycetes* con más de 2000 especies descritas (Crous y col., 2001; Goodwin y col., 2001). Actualmente, las especies de este género han sido diferenciadas de acuerdo a su morfología y análisis filogenético en un grupo de nuevos géneros, quedando *C. fulvum* por su similitud en el análisis filogenético con varias especies, incluidos el género *Passalora* y la especie nombrada *P. fulva*, pertenecientes a la familia *Mycosphaerelleaceae*, dentro del nuevo género *Davidiella* (con la salvedad de que no existe teleomorfo conocido en la especie). Este nuevo nombre ha sido aceptado en diferentes índices de hongos como son Index fungorum; el Garden Web, el índice de nombres botánicos de Nueva Zelandia, CAB y el Centro de Biodiversidad de Hongos (CBS, por sus siglas en inglés), Institución que realizó los estudios para la propuesta (Crous y Braun, 2003).

Las colonias de *P. fulva* sobre sustrato natural son efusas, pilosas, velludas o flocosas, de color grises, pardo oliváceo o negro. El micelio superficial está bien desarrollado, inmerso en el sustrato. Las hifas son septadas, ramificadas, oliváceas pálidas, pardas o pardas oscuras, con pared celular compuesta principalmente de polisacáridos (glucano y quitina). El estroma posee textura globulosa o angular; los conidióforos diferenciados densamente fasciculados, septados, simples o ramificados, erectos, flexuosos, nodulosos unilateralmente hacia el ápice, lisos, pardos pálidos, con un tamaño de 50-150 x 4-8 μm . Presenta células conidiógenas hologénicas simpodiales o determinadas, multilocales o unilocales, integradas o discretas, terminales y/o intercalares. Posee loci conidiógeno protuberante, pigmentado, apical y/o lateral. La separación conídica es esquizólita. Presentan ramoconidios subcilíndricos o irregulares con una cicatriz basal y varias cicatrices apicales, ligeramente curvados, con (0-) 1-3 septos, 20-45 x 4-7 μm . Los conidios pueden ser cilíndricos, elipsoides, fusiformes, oviformes, globosos, doliformes o limoniformes, unicelulares o septados, cicatrizados en los extremos, lisos u ornamentados, subhialinos u oliváceos, pardos, vinosos o negros, usualmente blastocatenulados u ocasionalmente solitarios con 0-1 septo, 12-32 x 4,0-6,5 μm (Ellis, 1971, 1976; Sivanesan, 1984; Kirk, 1986 a, b; Farr *et al.*, 1995; Castañeda, 2001).

Sobre el medio de cultivo Agar-Extracto de malta a 25 °C, las colonias de *P. fulva* presentan crecimiento lento, alcanzando 10 mm de diámetro a las dos semanas de cultivo. El micelio es de color gris oliváceo, afieltrado, tornándose a púrpura. Las hifas son septadas, hialinas a olivo pálido, lisas, con un tamaño de 2,2-2,5 µm de ancho. Los conidióforos son oliváceos pálido, septados, erectos o flexuosos, frecuentemente ramificados, estrechos en la base, gruesos hacia el ápice, algunas veces nodulosos unilateralmente, lisos, pueden llegar a medir 115 µm de largo, pero usualmente son más pequeños, 30-63 µm, con un ancho de (1,8)-2,3-2,8(-3,0) µm. Los conidios forman cadenas ramificadas y son cilíndricos, elipsoidales, catenulados, elípticos, fusiformes, globosos hasta limoniformes, de color olivo claro a olivo, con 0-1-(3) septos, lisos, cicatrizados en los extremos, (11,8-) 18,2-23,4 (-28,8) µm x (3,3-) 4,8-5,5 (-6,3) µm. Presentan ramoconidios de 0-3 septos, (18,8-) 23,2-29,2 (-39,4) µm x (3,3-) 4,3-5,1 (-6,3) µm (Ho *et al.*, 1999).

2.1.2.2 Identificación

Los hongos anamórficos (hongos conidiales, Deuteromycetes u hongos Imperfectos) han sido identificados principalmente a partir de observaciones microscópicas del modo de desarrollo de los conidios, tipos de separación conídica, las células conidiógenas y los eventos de la conidiogénesis, loci conidiógenos y cicatrices en las células conidiógenas (Castañeda, 2001). A pesar de lo antes citado, algunas veces su identificación se hace difícil, debido a que su base genética está pobremente definida (Curtis *et al.*, 1994).

La introducción de métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha incrementado significativamente el nivel de actividad en la sistemática de los hongos. La sencillez de las técnicas, aparejado con el uso general de regiones particulares del genoma ha resultado en muchas ventajas para el entendimiento de agrupamientos taxonómicos; así como para el conocimiento de la historia evolutiva y las propiedades funcionales asociadas con ellos (Bridge y Arora, 1998; Edel, 1998).

Los métodos de amplificación de la PCR con cebadores específicos son herramientas convincentes ya que le dan seguridad y alta sensibilidad al diagnóstico. Además, el desarrollo de cebadores específicos ha facilitado muchos estudios sobre parásitos obligados

y simbioses. Por ejemplo, la amplificación específica del ADN de hongos micorrizógenos puede ser llevada a cabo desde raíces de plantas colonizadas (Bonito otros., 1995).

En los últimos años, la tendencia internacional ha estado dirigida a lograr sistemas múltiples de diagnóstico que acorten el tiempo y costo de la detección, de forma que se garantice un apoyo efectivo a los servicios de cuarentena y certificación de material de siembra. El uso de la PCR constituye una importante herramienta para el diagnóstico que ha sido empleada en la detección de diferentes agentes fitopatógenos, tales como bacterias (Díaz, 2000; Iglesia, 2005); fitoplasmas (Arocha *et al.*, 2004); virus (Martínez *et al.*, 2001; Quiñónez *et al.*, 2004) y hongos (Eibel *et al.*, 2005; Shen y col., 2005), con valores de sensibilidad, especificidad y eficacia superiores al 98 %, demostrando de esta manera su confiabilidad.

La taxonomía fúngica a partir de secuencias nucleotídicas de subunidades ribosomales y del espaciador interno transcrito (ITS) continúa siendo una de las principales herramientas en las estrategias de identificación molecular. La misma, ha sido usada para diferenciar especies de *Pythium* (Chen, 1992; Chen *et al.*, 1992), *Verticillium* (Li *et al.*, 1994) y *Colletotrichum acutatum* (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). Levesque *et al.* (1994), también usaron un fragmento de ADN de la región ITS para determinar relaciones interespecíficas de *Pythium ultimum*.

Berbee y Taylor (1992) emplearon secuencias del ADN ribosomal para diferenciar especies de las clases Plectomycetes o Pyromycetes, pertenecientes al orden Ascomycotina.

Con respecto a *P. fulva*, Curtis *et al.*, (1994) realizaron comparaciones de secuencias nucleotídicas de subunidades del ADN ribosomal y del espaciador interno transcrito (ITS 1 y ITS 2) de varias razas de este agente fitopatógeno y de otras especies ubicadas en el género e informaron de una completa homología en sus secuencias, así como una estrecha relación entre las especies del género, confirmando estos resultados en investigaciones realizadas con otras razas del hongo patógeno (Kock., 2004).

2.1.3 Interacción tomate-*Passalora fulva*

2.1.3.1 Ciclo de infección sobre plantas susceptibles: Interacción compatible

Los conidios de *P. fulva* son generalmente diseminados por el viento o salpicaduras del agua. La infección comienza con la germinación bipolar de los conidios en la superficie de las hojas de tomate. Si la humedad relativa es superior al 85 %, la espora germinará y se desarrollará una hifa delgada denominada hifa primaria que crece sobre la superficie de la hoja. Aproximadamente después de tres días, el tubo germinativo principal o una ramificación de las hifas penetra en la hoja de tomate por un estoma abierto (abundantes en el envés), proceso que ocurre al azar. Una vez en el interior de la hoja esta hifa engrosará su diámetro y se formarán hifas secundarias que colonizarán extensivamente los espacios intercelulares del parénquima esponjoso del mesófilo (Lazarovits y Higgins, 1976 a, b; Wit, 1977).

A los 10-12 días post infección, a través de los estomas emergerán los conidióforos, a partir de los cuales se dispersarán los conidios, cerrándose así el ciclo, que demora de 12-17 días bajo condiciones ideales. Aunque no se han observado estructuras de alimentación parecidas a haustorios, el desarrollo del agente patógeno parece depender del contacto cercano entre las hifas fúngicas y las células del hospedante (Wit, 1977). Este contacto cercano sugiere que el hongo patógeno retira activamente nutrientes desde el hospedante (Bond, 1938; Lazarovits y Higgings, 1976 a, b). Sin embargo, varios cambios ultraestructurales ocurren, incluyendo la posición del retículo endoplasmático paralelo a la membrana plasmática en el sitio de contacto fúngico y cuerpos lipídicos citoplasmáticos y microcuerpos que contienen inclusiones cristalinas. En lesiones avanzadas, las células del mesófilo manifiestan señales de degeneración de organelos celulares, más específicamente mitocondrias y cloroplastos. Ocasionalmente, ha sido observada la liberación del contenido citoplasmático debido a daños de la membrana plasmática e incluso del tonoplasto (Lazarovits y Higgings, 1976 a, b).

2.1.3.2 Ciclo de infección sobre plantas resistentes: Interacción incompatible

En la germinación conidial, formación de hifa primaria y penetración estomática no existen diferencias entre las interacciones compatibles e incompatibles (Lazarovits y Higgings,

1976 b; Wit, 1977). Aunque las etapas iniciales de las interacciones compatibles e incompatibles son muy similares, ocasionalmente en las interacciones incompatibles el hongo crece fuera del estoma otra vez, después de haber entrado a éste (Wit, 1977). Esto sugiere que la hifa primaria entra al apoplasto a través de una apertura del estoma, elicitando respuestas de defensa del hospedante, que con éxito repelen al hongo. Sin embargo, la mayoría de las hifas no crecen fuera del estoma, y la defensa del hospedante entonces está relacionada con la detención del crecimiento fúngico 1 ó 2 días después de la penetración (Wit, 1977). Por esto, apenas el hongo tiene crecimiento desde la cavidad estomática, dentro del apoplasto, la hifa aparece hinchada y arrollada. Las células hifales que están en contacto cercano con las células del mesófilo del hospedante a menudo colapsan. Se forman deposiciones de calosa en la pared de la célula, resultando destacable el incremento del espesor de la pared de la célula y las deposiciones de material extracelular en la proximidad a la hifa fúngica (Lazarovits y Higgings, 1976 b; Wit, 1977). En el nivel molecular, se acumulan fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Wit and Flach, 1979; Wit and Kodde, 1981; Wit and Meer, 1986; Joosten and Wit, 1989), y estas últimas cerca del estoma (Wubben *et al.*, 1993). Aunque la acumulación de PR-proteínas ocurre también en interacciones compatibles, en interacciones incompatibles ésta se produce más rápidamente. Las quitinasas y β -1,3-glucanasas se pueden almacenar en agregados proteicos vacuolares en material extracelular alrededor de las células del mesófilo (Wubben *et al.*, 1992).

La característica más notoria de defensa del hospedante en la interacción incompatible es la respuesta de hipersensibilidad (HR), en la cual las células del mesófilo contiguas a la hifa intracelular (además ocasionalmente células guardianes y algunas células epidermales) colapsan. Como resultado de esta respuesta de defensa, el hongo está contenido en un área limitada de sitios de infección, expuesto a los componentes que son liberados por las células hospedantes afectadas y de este modo no puede establecer una infección exitosa (Joosten and Wit, 1999).

2.1.3.3 Ciclo de infección sobre plantas no hospedantes: Incompatibilidad básica

El rango de hospedantes de *P. fulva* está limitado a especies de *Solanum* (sin. *Lycopersicon*) (Bond, 1938). Ya en 1938, este autor describió experimentos donde se evaluó el crecimiento de *P. fulva* sobre plantas hospedantes, plantas resistentes y diversos “hospedantes inapropiados”. La penetración estomática ocurrió en casi todas las especies, aunque usualmente menos frecuente que sobre tomate. El crecimiento máximo fue registrado en un número de especies de solanáceas que permitieron crecimiento sobre tejidos jóvenes, mientras que en tejidos maduros solo fuera de las cavidades subestomáticas y a menudo necrosis. El crecimiento fúngico más limitado fue observado en *Callistephus* sp., *Antirrhinum majus* y *Bryonia dioica*, donde las hifas apenas pudieron entrar a la cavidad subestomática.

Hasta el presente, la resistencia no hospedante es un mecanismo de defensa poco entendido (Mysore and Ryu, 2004). Al evaluar el reconocimiento asociado a la respuesta de hipersensibilidad (HR) de los componentes extracelulares de *P. fulva* en plantas no hospedantes, *Ecp2* manifestó actividad elicitora en varias especies de *Nicotiana* (Laugé *et al.*, 2000; Kock *et al.*, 2004). Esta observación justifica la respuesta que el reconocimiento de *Ecp2* demuestra resistencia no hospedante en esas especies.

Sobre especies de *Nicotiana*, no hospedantes, los conidios de *P. fulva* germinaron y produjeron una hifa primaria. Posteriormente, hubo penetración estomática, pero el crecimiento hifal se detuvo. Además, no fueron observadas diferencias entre el reconocimiento de la proteína *Ecp2*. Es discutido si esto es debido a la falta de factores de patogenicidad imprescindibles para el hongo patógeno ó a la producción y acumulación de componentes de defensa efectivos para la planta (Bond, 1938; Kock *et al.*, 2004).

2.1.4 Mecanismos de patogenicidad

La patogenicidad se define como la capacidad de un organismo de causar enfermedad en un hospedante susceptible. Los análisis moleculares de patogenicidad, por consiguiente, involucran el estudio de los genes que codifican para la síntesis de ácido ribonucleico

mensajero (ARNm), proteínas y otros componentes que son expresados o producidos durante el crecimiento de la planta. La virulencia es un grado de la patogenicidad (Lenne, 2002).

P. fulva es un hongo patógeno que penetra las células del estoma del hospedante en su ciclo de vida. Aunque las hifas crecen en contacto íntimo con las células del mesófilo, la comunicación e intercambio de componentes entre el hongo patógeno y el hospedante sucede en el espacio apoplástico y la matriz extracelular de ambos (Thomma y col., 2005). A partir de fluidos apoplásticos de hojas de tomate infectadas obtenidos por infiltración al vacío con agua o tampón y centrifugación a baja velocidad, pueden ser identificados fácilmente componentes de virulencia (Wit y Spikman, 1982).

Ya en los años ochentas del siglo XIX, se caracterizaron moléculas presentes en el fluido intercelular de interacciones compatibles (cuando hay desarrollo del hongo patógeno). En este sentido, se describió la acumulación de fitoalexinas (fenilpropanoides con actividad antimicrobiana) y proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs; siglas del inglés) algunas también con actividad antimicrobiana (β -1,3-glucanasas y quitinasas), como parte de los mecanismos defensivos de la planta, así como el aislamiento y purificación de proteínas extracelulares secretadas por el fitopatógeno (Joosten y Wit, 1989; Wubben *et al.*, 1992, 1993).

2.1.4.1 Supuestas proteínas relacionadas con virulencia: *Avrs* y *Ecps*

Se han identificado proteínas que son secretadas por *P. fulva* en el apoplasto de hojas de especies de tomate susceptibles. Al parecer, el cultivo ha construido al menos parte de su sistema de vigilancia para reconocer esos péptidos y mostrar resistencia en la percepción de su presencia o actividad, mediada por los genes de resistencia *Cf* (Kruijt *et al.*, 2005).

Los péptidos secretados por *P. fulva* son clasificados en proteínas extracelulares (*Ecps*) y proteínas de avirulencia (*Avrs*). Las primeras son producidas por todas las cepas mientras que las segundas son raza específica. De forma general, tanto las *Ecps* como *Avrs* son elicitores específicos reconocidos solo por unas pocas plantas. Los genes *Avr* y *Ecp*

actualmente conocidos, se expresan en plantas y no en cultivos axénicos del hongo (Thomma y col., 2005).

Aunque el grado de conservación de secuencias es limitado entre individuos *Avrs* y *Ecps*, las proteínas son pequeñas (variando entre 3 y 15 kDa) y contienen hasta un número de cisteínas entre 4 y 8. En la mayoría de estos péptidos, las cisteínas están unidas por puentes de azufre que contribuyen a la estabilidad y actividad en el apoplasto del hospedante (Kooman-Gersmann *et al.*, 1997; Hooven *et al.*, 2001; Luderer *et al.*, 2002; Burg *et al.*, 2003).

Durante la colonización, *P. fulva* secreta al menos diez pequeñas proteínas diferentes ricas en cisteína dentro del espacio apoplástico de las células de la planta. Ocho de estas, han sido caracterizados detalladamente y sus correspondientes genes han sido clonados (Joosten y Wit, 1999; Laugé otros., 2000; Luderer *et al.*, 2002; Westerink *et al.*, 2002; Thomma *et al.*, 2005). Estas comprenden las proteínas de avirulencia razas específicas *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* y *Avr9*, y las proteínas extracelulares *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4* y *Ecp5* de las cuales los correspondientes genes han sido encontrados en todas las cepas de *P. fulva* (Thomma *et al.*, 2005). De todas, cuatro genes *Avr* de *P. fulva* han sido clonados y también los correspondientes genes de resistencia *Cf* (Jones *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997; Takken *et al.*, 1998). Además, los genes de resistencia *Cf* que confieren reconocimiento de los genes *Ecp* han sido descritos (Laugé *et al.*, 1998 b; Kock *et al.*, 2005; Kruijt *et al.*, 2004).

Entre estas últimas destacan los elicitores *Avr9* y *Avr4*, péptidos muy abundantes en el fluido intercelular, que cuando son inyectados en hojas disparan la respuesta de hipersensibilidad (HR) en plantas de tomate portadoras de los genes de resistencia complementarios *Cf9* y *Cf4*, respectivamente (Burg *et al.*, 2003).

En la última década, se ha profundizado en la interacción a nivel molecular. A partir de secuencias aminoacídicas parciales de los péptidos *Avr9* y *Avr4* se diseñaron oligonucleótidos degenerados que permitieron el aislamiento de los genes de avirulencia (que inducen HR) correspondientes, *Avr9* (el primer gen de avirulencia de origen fúngico

clonado) (Kan *et al.*, 1991) y *Avr4*. La introducción de estos genes en cepas de *P. fulva* carentes de los mismos transfirió a su vez la capacidad de inducir avirulencia en el hongo patógeno y resistencia en los genotipos de tomate correspondientes, confirmándose así el modelo gen-gen para estas combinaciones de genes de avirulencia/genes de resistencia. Aparte de este carácter negativo para el hongo, la avirulencia, la actividad biológica de ambos péptidos para *P. fulva* se desconoce. No obstante, la estructura tridimensional de *Avr9* ha revelado una gran similitud con inhibidores de proteasas (Vervoort *et al.*, 1997), pero tal actividad no ha podido ser demostrada. Un aspecto a destacar es la manera en que cepas de *P. fulva* han conseguido escapar de la resistencia mediada por el gen de resistencia *Cf-4*. Simplemente mutaciones puntuales en el gen *Avr4* son capaces de crear alelos "virulentos" en el gen (Joosten *et al.*, 1994, 1997). La ausencia de *Avr4*, al igual que de *Avr9*, sin embargo, no afecta a la virulencia del hongo, ya que tanto la disrupción génica de *Avr9* como la existencia de cepas naturales de *P. fulva* carentes del mismo, permiten la colonización del hospedante sin una apreciable disminución en virulencia. Al parecer existen otros genes capaces de provocar la infección (Kruijt y col., 2004).

En este mismo sentido, en la literatura científica internacional se han informado estudios recientes relacionados con las variaciones alélicas en los genes de avirulencia (*Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* y *Avr9*) de *P. fulva* (Kock, 2004; Stergiopoulos *et al.*, 2007 a). Estos autores, han notificado la presencia de una variación limitada en las secuencias de nucleótidos, al analizar una colección mundial de cepas del agente causal del moho de las hojas mediante el empleo de la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de amplificación (AFLP) con marcaje fluorescente; además de encontrar altos porcentajes de variaciones en los genes *Avr2* y *Avr4*.

Otras proteínas extracelulares de *P. fulva* son indispensables para la virulencia del hongo patógeno. Este es el caso de las proteínas *Ecp1* y *Ecp2*. Laugé y otros. (1997) informaron que la disrupción de ambos genes causa una severa reducción de la virulencia de *P. fulva*.

Sobre la base de que estas proteínas eran factores de virulencia esenciales para el hongo, se postuló que tales proteínas podrían ser a su vez elicitores y que deberían existir genotipos de tomate capaces de reconocer ambas proteínas y responder con HR, y por lo tanto, tales

plantas deberían ser portadoras de genes de resistencia potencialmente más duraderos (Kruijt *et al.*, 2005). Para identificar tales genotipos se utilizó el vector de expresión PVX (virus X de la papa) ya que este virus tiene la capacidad de replicarse en varias especies de solanáceas. La idea era que un derivado del virus portando un ADN complementario codificante para un posible elicitor permitiría una síntesis masiva de tal proteína en el hospedante que se traduciría en HR, si el hospedante es portador del gen de resistencia complementario. El ADNc de *Ecp2* se insertó en el genoma de PVX y se inocularon diferentes líneas de tomate originadas en antiguos programas de mejora de la resistencia de tomate frente a *P. fulva*. Cuatro plantas derivadas de un mismo ancestro de *S. pimpinellifolium* mostraron necrosis (HR). El análisis genético de la descendencia demostró que el reconocimiento de *Ecp2* estaba basado en la presencia de un único gen dominante designado *Cf-Ecp2* (Laugé y otros, 1998 b). Todas las cepas de *P. fulva* analizadas hasta la fecha son avirulentas sobre estas plantas. La introducción de *Cf-Ecp2* en cultivares de tomate comerciales demostrará si este gen confiere una protección duradera frente a *P. fulva*. Idéntica aproximación experimental se siguió para *Ecp1* y para otras tres proteínas extracelulares de *P. fulva*: *Ecp3*, *Ecp4* y *Ecp5*. En todos los casos se identificaron plantas de *S. pimpinellifolium* que mostraron HR.

Otras proteínas como las hidrofobinas contribuyen a la virulencia del hongo. Las hidrofobinas son proteínas que se encuentran en la pared celular de los hongos filamentosos y que confieren una repelencia al agua (Thomma *et al.*, 2005). Estas, están involucradas en varios procesos evolutivos, tales como la formación de micelio aéreo, esporulación, formación de estructuras de infección, formación de cuerpos fructíferos y dispersión de conidios (Wösten, 2001; Whiteford and Spanu, 2002; Whiteford *et al.*, 2004).

En *P. fulva* han sido aislados seis genes de hidrofobinas (*HCf-1* a *HCf-6*), mostrando contornos de expresión diferentes (Spanu, 1997; Segers *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2001). *HCf-1*, parece ser expresado específicamente después de la emergencia de los conidióforos en la planta y durante el comienzo de la producción de conidios, y se encontró que juega un papel en la dispersión de los conidios mediada por el agua (Whiteford y Spanu, 2001; Whiteford *et al.*, 2004).

El papel que juegan estos genes y sus proteínas codificadas todavía es incierto o no claro. *P. fulva* es extraordinariamente resistente a las enzimas que degradan la pared celular (Joosten *et al.*, 1995) pudiendo inferirse por la diversidad de hidrofobinas que pueden tener su papel en la virulencia.

En resumen, para todas las proteínas extracelulares de *P. fulva* analizadas hasta la fecha existen genotipos de *Solanum* (sin. *Lycopersicon*) capaces de responder específicamente con HR, o lo que es lo mismo, las proteínas secretadas por *P. fulva* parecen ser "antigénicas" para la población de *Solanum* (Joosten y Wit., 1999).

2.1.5 Razas fisiológicas

La nomenclatura de las razas se refiere completamente a la interacción observada con los cultivares de tomate. La interacción entre las razas y el cultivar es totalmente consistente con la hipótesis gen a gen (Flor, 1942, 1971). Así las razas son definidas por la expresión de varios genes de avirulencia (*Avr*). La definición de raza no es completamente satisfactoria cuando ésta solamente está basada en la expresión de un número pequeño de genes, y una raza puede ser dividida si además se usan los genes diferenciales de resistencia. Esta nomenclatura dice poco sobre la evaluación o las relaciones filogenéticas de aislados individuales. Todavía es incierto si cada raza evolucionó de las razas pre existentes o ya estaban presentes en la población. Ningún marcador molecular conveniente se ha usado todavía para examinar poblaciones de este hongo y contestar esas preguntas (Oliver *et al.*, 2000).

Muchos genes de resistencia han sido notificados, pero nuevas razas vencen estos genes (Boukema, 1981; Laterrot *et al.*, 1985; Laterrot, 1986). Hasta ahora, el empleo de variedades resistentes ha reducido la ocurrencia de *P. fulva* en la producción comercial de tomate en Holanda a un nivel aceptablemente bajo (Lindhout *et al.*, 1989).

Se han descrito con mayor o menor certeza unos 25 genes de resistencia, incluyendo cuatro que han sido clonados (Jones *et al.*, 1993, 1994; Dixon *et al.*, 1996, 1998). Los genes de resistencia se han generado por cruces interespecíficos que involucran *S. hirsutum*, *S. peruvianum*, *S. pimpinellifolium* y *S. glandosum*.

Hasta la fecha se han descrito 13 razas fisiológicas (raza 0; 2; 4; 5; 2.4; 2.4.5; 2.4.5.9; 2.5; 2.4.11; 2.5.9; 2.4.5.11; 2.4.9.11 y 2.4.5.9.11) (Holliday y Mulder, 1976; Scholtens-Toma, 1989 y Fox, 1997).

Con fines investigativos se han incorporado dentro del cultivar de tomate *Moneymaker* (MM) genes de resistencia tales como *Cf2*, *Cf4*, *Cf5* y *Cf9* contra *P. fulva* (Boukema, 1981) a partir de retrocruzamientos sucesivos, resultando más tarde en líneas isogénicas cercanas de este que portan genes individuales de resistencia al hongo patógeno. Estas líneas han permitido estudios relacionados con mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de reconocimiento específico del hongo patógeno por su hospedante basado en la presencia de simples parejas gen a gen (Joosten and Wit, 1999).

En Cuba, no se han realizado estudios con este hongo patógeno en cuanto a su especialización fisiológica, por lo que el conocimiento de las variaciones patogénicas de este fitopatógeno constituye un aspecto importante para poder seleccionar genotipos resistentes.

2.1.6 Epifitología

El conocimiento de las condiciones que favorecen la aparición y desarrollo de una epifitotía, ya sea por el incremento o depresión del potencial de inóculo, o por la persistencia o no de las condiciones ambientales favorables constituye una premisa a seguir contra cualquier anomalía de origen parasitario en los vegetales. Tales circunstancias han inducido a los especialistas a búsquedas de métodos científicos que permitan una mayor información sobre el desarrollo de las epifitotias (Rivas, 1981; Rivera, 1995; Castellanos, 2000).

La enfermedad moho de las hojas está grandemente influenciada por la temperatura y la humedad relativa. En la literatura científica, existen variaciones en los datos publicados concernientes a la influencia de estas dos variables climáticas en el desarrollo de la infección del hongo patógeno.

Chupp y Sherf (1960) y Wit (1977) informan que la germinación de las esporas y el desarrollo del micelio de *P. fulva* tienen lugar a temperaturas desde 4 °C a 32 °C, la infección de las plantas ocurre a partir de los 10 °C, con valor óptimo entre 21-25 °C; otros autores, plantean que el óptimo de temperatura se encuentra entre 22–24 °C (Jones y col., 1997; Thomma *et al.*, 2005); mientras Mayea y otros. (1983) señalan que este valor óptimo es de 22 °C aunque la enfermedad se puede presentar a temperaturas entre 10-34 °C.

Jones *et al.* (1997) y Thomma *et al.* (2005) informan que este agente fitopatógeno se desarrolla a humedades relativas superiores al 85 % y que la germinación de esporas ocurre en agua libre; en este mismo sentido se ha notificado que la humedad relativa óptima para la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio de este hongo es de 95 % o más, con 90 % como límite inferior para la germinación (Chupp y Sherf., 1960; Mayea y otros 1983).

Las principales vías de diseminación de los conidios son el viento, el agua de lluvia y regadío, las herramientas, las ropas, los trabajadores y, posiblemente, las semillas contaminadas. En una atmósfera húmeda ellos germinan rápidamente, penetran a través del estoma y causan infección. El hongo no tiene una fase sexual, pero permanece vivo en forma de micelio y esclerocios en la semilla, los restos de cosecha, en los tomates silvestres que permanecen en el país durante todo el año y sobre las estructuras de las casas de cultivo. Los conidios son muy resistentes a la desecación, permaneciendo viables de 9 a 12 meses (Chupp y Sherf, 1960; Mayea y otros, 1983).

2.2 PROCEDIMIENTOS

2.2.1 Aislamiento e identificación de aislados de *P. fulva*

a. Toma de muestras

Se colectaron muestras de hojas jóvenes de diferentes híbridos de tomate con síntomas típicos del moho de las hojas, en instalaciones de cultivo protegido de diez provincias del país; en el occidente: Pinar del Río (Empresa Cítricos Troncoso), La Habana (Santiago de las Vegas, San José de Las Lajas y Quivicán); Ciudad de La Habana (Empresa de Cultivos Varios de Boyeros); en el centro: Cienfuegos (Empresa Cítricos Arimao, Junco), Villa Clara

(Empresa Integral Agropecuaria de Caibarién, Las Marianas, AGROFAR en Santo Domingo y el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de Las Villas); Sancti Spíritus (CAI Tunicú); Ciego de Ávila (Empresa de Cítricos Ceballos, CPA Paquito González; en el oriente: Camagüey (ECV de Camagüey); Granma (ECV Veguitas) y Santiago de Cuba (Siboney).

En las instalaciones de cultivos protegidos las muestras se tomaron de manera aleatoria en los cuatro puntos cardinales.

El traslado de las hojas se realizó plegando la parte esporulada y se mantuvieron entre hojas de papel para su conservación y transportación, siguiendo las recomendaciones del CABI (2004).

b. Aislamiento, purificación e identificación

Los aislamientos se realizaron transfiriendo conidios de las manchas esporuladas, con la ayuda de una aguja de inoculación, a placas Petri (100 x 20 mm) con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Biocen) + Cloranfenicol (50 mg.L⁻¹). Las placas se incubaron en una cámara climatizada marca *Gallenkamp* a la temperatura de 25 °C y a la oscuridad, condición óptima informada para el crecimiento de la especie (Wit, 1977), chequeándolas diariamente hasta observar colonias típicas de *P. fulva*. Posteriormente, éstas se transfirieron a una placa Petri con medio PDA para obtener los cultivos puros.

Para la obtención de los cultivos monoconidiales se inocularon placas Petri (100 x 20 mm) con medio de cultivo PDA + Cloranfenicol (50 mg.L⁻¹) con 3 µL de una suspensión de 10⁴ conidios.mL⁻¹ de un cultivo del hongo patógeno de 15 días de cultivo, los que se dispersaron con una espátula de vidrio y se marcaron conidios solitarios en el reverso de las placas. La incubación se realizó en iguales condiciones que las descritas anteriormente. Se seleccionaron las colonias formadas a partir de los conidios marcados y se transfirieron individualmente a placas Petri con medio PDA. Las mismas fueron tomadas con una aguja de inoculación bajo el microscopio estereoscópico. Una vez obtenido el cultivo puro, los aislados se conservaron a 4 °C en tubos de ensayo con cuñas del mismo medio de cultivo.

La identificación de los aislados se realizó a partir de la descripción de las colonias del hongo patógeno en el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM) a 25 °C a las dos semanas de incubación. Se realizaron microcultivos sobre portaobjetos con AEM, y se midieron las dimensiones de 20 conidios por cada aislado a las 72 horas, con la ayuda de un microscopio óptico Karl Zeiss con objetivo de 40 x y micrómetro de tornillo (Präzision aus Jena) (Ho *et al.*, 1999).

Posteriormente, se comprobó la identidad de los aislados a partir de la amplificación de la región 28S del gen que codifica para el ARNr mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el empleo de cebadores específicos descritos en la literatura científica para la confirmación de la especie (Kock, 2004).

Con este objetivo, se tomó un fragmento de micelio de cada uno de los aislados, provenientes de tubos de ensayo con medio de cultivo PDA, conservados a 4 °C, éstos se inocularon en erlenmeyers (250 mL de capacidad) con 100 mL de medio de cultivo líquido B5 (Gamborg *et al.*, 1968) con Sacarosa 2 % (Spanu, 1998). Los mismos se colocaron en agitación (zaranda orbital GFL) a 120 rpm, temperatura de 25 ± 1 °C durante tres semanas. Transcurrido este período se separaron los micelios por filtración y se conservaron en congelación (-20 °C) hasta su utilización. La extracción del ADN genómico total se realizó por el método de Moller *et al.* (1992) modificado por Peteira y col. (1999). Las concentraciones de ADN se midieron en un espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer Pharmacia, LKB) a D. O = 260 nm. Las muestras fueron conservadas a -20 °C.

La mezcla de reacción de PCR para cada muestra fue hecha en un volumen final de 25 µL, mezclando 100 ng de ADN, Tampón de PCR 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl y 1,5 mM de MgCl₂), 0,2 µM de cada cebador específico (*ARNr-F*: 5' GCT TAA GTT CAG CGG GTA TCC 3' y *ARNr-R*: 5' CGG CAA CGA CCA CCC AGG 3'), 200 µM de dNTPs y 1,0 U de la enzima Taq Polimerasa Amplicen (CENSA). Las amplificaciones fueron ejecutadas en un termociclador (PTC-100; MJ Research, Inc). El programa de PCR consistió de un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 29 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 segundos), Hibridación a 55 °C (30 segundos) y

extensión a 72 °C (1 minuto). Un paso de extensión final a 72 °C por 7 minutos concluyó la reacción (Stergiopoulos *et al.*, 2007). Los productos de la amplificación por PCR se analizaron en geles de agarosa (2%) en TBE 0,5 X y se tiñeron con Bromuro de Etidio mediante electroforesis a 100 V por 30 minutos. El largo del fragmento de ADN amplificado fue estimado por comparación con el marcador de peso molecular comercial de 1 Kb (Fermentas) y visualizado en un transiluminador de luz UV.

El aislado raza 0 (R-0), donado gentilmente por el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Wageningen, se utilizó como control positivo en la identificación molecular de los aislados cubanos de *P. fulva* y en las amplificaciones de los genes de avirulencia (*Avr*) y genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecp*) del agente fitopatógeno.

2.2.2 Caracterización cultural

Con el objetivo de conocer la variabilidad cultural se evaluaron todos los aislados de *P. fulva* obtenidos en el acápite anterior.

La caracterización cultural de los aislados de *P. fulva* se realizó sobre la base de los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos: color de la colonia y textura superficial según criterios establecidos (Fey *et al.*, 1979), forma de los bordes, apariencia del reverso y diámetro de la colonia; este último se determinó midiendo el diámetro promedio de diez colonias (mm) por placas. Para ello se usaron placa Petri, (100 x 20 mm) con 15 mL de medio de cultivo PDA, las cuales se inocularon con 5 µL de una suspensión de 10^4 conidios.mL⁻¹ de cultivos de 15 días de cada uno de los aislados. Las condiciones de incubación se realizaron de igual forma que en el acápite anterior. Las evaluaciones se realizaron a los 14 días de incubación y se emplearon diez repeticiones (placas) por aislado. Para clasificar los aislados se realizó un análisis de conglomerados jerárquico por el método de Ward (dentro de los grupos) y la distancia Euclidiana empleando como variable el promedio del diámetro de las colonias (mm). Se realizó un análisis discriminante para confirmar los grupos formados. Se relacionaron las características del crecimiento micelial con el origen geográfico de los aislados. Se utilizó para el procesamiento el programa estadístico SPSS v. 11.5 para Windows (SPSS Inc., 2000).

2.2.3 Influencia de diferentes factores físicos y nutricionales en el desarrollo de *P. fulva*

Este experimento consistió en caracterizar y diferenciar aislados representativos seleccionados a partir de los resultados obtenidos en el acápite anterior y tomando en cuenta que hubiera representatividad de cada región geográfica de los aislados, en base a su crecimiento en diferentes medios de cultivo, temperaturas y condiciones de iluminación.

2.2.3.1 Influencia de diferentes medios de cultivo en el crecimiento micelial y esporulación

Se probaron los medios de cultivo siguientes de la firma BIOECEN: PDA, Czapek Dox Agar (Cz Dox), Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Dextrosa de Sabouraud (ADS).

Para ello, se utilizaron placas Petri (100 x 20 mm) con 15 mL por cada medio de cultivo separadamente; estas se inocularon con 5 μL de una suspensión (10^4 conidios. mL^{-1}) de un cultivo de 15 días de incubación de forma individual para cada aislado, crecido sobre PDA. Se emplearon cuatro placas Petri por aislado y medio de cultivo. Las condiciones de incubación y evaluación del diámetro de las colonias se realizaron de la misma forma que en el experimento anterior.

En el caso de la esporulación se emplearon, para cada aislado, tres tubos de ensayo (150 x 22 mm) con 15 mL de los medios de cultivo en cuña, los que se inocularon con 200 μL de una suspensión de 10^4 conidios. mL^{-1} y se incubaron a igual temperatura durante 14 días. Transcurrido ese tiempo a cada tubo de ensayo se le adicionaron 5 mL de agua desionizada estéril más Tween 80 al 0,05 %. Estos se agitaron en un Vortex para obtener la suspensión de conidios. En cada uno de los aislados se determinó la concentración de conidios en cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico Olympus (aumento 400 x). Se compararon los resultados y se seleccionó el medio de cultivo donde se obtuvo la mayor concentración de conidios. Los datos de las variables crecimiento micelial y esporulación se analizaron por medio de un análisis de varianza de clasificación simple y doble, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Las diferencias entre las medias se procesaron a través de la prueba de rangos múltiples de

Duncan. Para la aplicación de los métodos, procedimientos y pruebas de análisis se utilizó el paquete estadístico SAS para Windows.

2.2.3.2 Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial

En tres condiciones de iluminación: luz constante, luz alterna (16 horas luz + 8 horas oscuridad) y oscuridad continua se evaluaron las variables crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial.

La variante con luz constante fue provocada en cámaras climatizadas *Gallenkamp* con luz fluorescente continua de $60 \mu\text{moles.m}^2\text{s}^{-1}$ colocadas a 5 cm de distancia de la superficie de las placas Petri. En el caso de la variante de oscuridad continua se realizaron en cámaras similares con las lámparas desconectadas. Para la variante de alternancia luz-oscuridad se utilizó la combinación de las condiciones antes descritas.

La inoculación de cada uno de los aislados representativos se realizó en medio de cultivo PDA de la misma forma que fue descrita en los experimentos anteriores. Se utilizaron 4 placas Petri por aislado y regímenes de luz. La incubación se hizo a temperatura de 25 ± 1 °C. Las evaluaciones y procesamientos estadísticos se realizaron iguales a las descritas en el acápite 2.2.3.1.

Para evaluar el efecto de los regímenes de luz sobre la germinación conidial de los aislados se emplearon los valores de humedad siguientes: 80 %, 90 % y 100 %, los cuales fueron obtenidos con soluciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 95-97 % p.a (Fluka) según Waller (2002). Además, se evaluó la germinación conidial sobre agua libre por la técnica de gota colgante (Novo, 1983). Para ello, se utilizaron dos placas Petri (120 x 20 mm) con 17 mL de las soluciones antes descritas, a las cuales se les colocaron dos portaobjetos sobre soportes de vidrio. A estas láminas se le vertieron $3 \mu\text{L}$ de una suspensión de 10^4 conidios. mL^{-1} de cada aislado y se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos. Las placas Petri fueron selladas herméticamente con cinta adhesiva. La incubación fue realizada a los regímenes de luz en estudio y temperatura de 25 ± 1 °C. La evaluación se

hizo a las 24 horas mediante el conteo de conidios germinados de un total de 30. El conidio se consideró germinado cuando emitió el tubo germinativo. Los datos de las variables crecimiento micelial y esporulación se analizaron de igual forma que en el acápite anterior. En el caso de la germinación conidial, los valores de conidios germinados fueron transformados por la expresión $\sqrt{x+0,375}$. Para la aplicación de los métodos, procedimientos y pruebas de análisis se utilizó el paquete estadístico SAS para Windows.

2.2.3.3 Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial, esporulación y la germinación conidial

El rango de temperaturas se ensayó desde 15 °C hasta 30 °C a intervalos de 5 °C, en cámaras climatizadas marca *Gallenkamp*. Se utilizaron cuatro placas Petri para cada uno de los aislados y temperaturas. La inoculación del hongo patógeno se realizó en medio de cultivo PDA y se siguió un protocolo similar al descrito en el acápite 2.2.3.1 La incubación fue realizada en ausencia de luz a las temperaturas en estudio. Se evaluó el crecimiento micelial y esporulación de igual forma que en los acápites anteriores.

El montaje y evaluación del efecto de la temperatura sobre las variables crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial se realizó como en el acápite 2.2.3.2.

Los datos de las variables crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial (conidios germinados) fueron transformados por la expresión $\sqrt{x+0.375}$. Para la aplicación de los métodos, procedimientos y pruebas de análisis se utilizó el paquete estadístico SAS para Windows.

2.2.4 Variabilidad patogénica

2.2.4.1 Determinación de razas fisiológicas de *P. fulva*

Con vistas a determinar las razas fisiológicas de *P. fulva* se inocularon todos los aislados monoconidiales (Anexo 1) y el aislado raza 0 (R-0; testigo de referencia) sobre líneas isogénicas cercanas del cultivar susceptible *Moneymaker* (MM) que portan genes individuales de resistencia, MM (*Cf0*), LA3043 (*Cf2*) y LA3045 (*Cf4*) al moho de las hojas. Este experimento se realizó en casas de cristal.

Material vegetal: Semillas de tomate de las líneas diferenciadoras de razas fueron sembradas en bandejas metálicas (59 x 35 x 14 cm) sobre un sustrato compuesto por compost (100 %) húmedo y se mantuvieron en estas condiciones durante dos semanas. Pasado este tiempo, las posturas fueron trasplantadas a macetas plásticas de 1 kg de capacidad con un sustrato compuesto por suelo ferralítico rojo + compost (1:1, v/v) durante 4 semanas. Las plantas fueron mantenidas en casas de cristal con temperatura diurna media de 27,2 °C y la humedad relativa diurna media de 61,9 % con un fotoperíodo natural (meses de enero a mayo).

Obtención del Inóculo: Se emplearon tubos de ensayo (150 x 22 mm) con 15 mL de medio de cultivo PDA inclinado, los cuales se inocularon con 200 µL de una suspensión de 10^4 conidios.mL⁻¹ de cada uno de los aislados monoconidiales y se incubaron a 25 ± 1 °C durante 14 días. Transcurrido ese tiempo a cada tubo de ensayo se le adicionaron 5 mL de agua desionizada estéril más Tween 80 al 0,05 %. Estos se agitaron en Vortex (Vortex Genie-1) para obtener la suspensión de conidios. Las suspensiones conidiales fueron filtradas a través de gasa. En cada uno de los aislados se determinó la concentración de conidios en cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico Zeiss (aumento 400 x).

Inoculación: Se utilizaron plantas de cinco semanas de sembradas en macetas. Las hojas inferiores de una planta/aislado/línea diferencial fueron inoculadas por el envés con una suspensión de 1×10^5 u.f.c.mL⁻¹, mediante aspersion uniforme de 10 mL por planta con un atomizador manual. Las plantas inoculadas fueron cubiertas individualmente con un nylon de polietileno transparente por 48 horas para asegurar las condiciones de alta humedad (cercas al 100 %). El material vegetal se mantuvo en casa de cristal con condiciones semicontroladas (temperatura media de 26,2 °C y humedad relativa media de 85,4 %), garantizada con riegos a la instalación varias veces al día.

Se incluyó además otra planta adicional para cada línea diferencial asperjada con agua estéril e incubada en igualdad de condiciones para ser usada como control.

El experimento se evaluó diariamente durante 21 días y se repitió tres veces. Se confeccionó una escala para la evaluación cualitativa del material vegetal inoculado, basada en la descripción de los estados de desarrollo de los síntomas.

2.2.4.2 Evaluación de la respuesta de genotipos de *Solanum lycopersicum* a la inoculación artificial con *P. fulva*

Para este estudio se seleccionaron genotipos de *S. lycopersicum*, que incluyeron líneas isogénicas cercanas al cultivar *MoneyMaker* que portan genes de resistencia al moho de las hojas (*Cf-Ecp1*, *Cf-Ecp2*, *Cf-Ecp4* y *Cf-Ecp5*) e híbridos F₁ cubanos (*LTM 12*, *LTM 32*, *LTM 48*, *LTM 60*), así como especies silvestres (*S. peruvianum* (L.) Mill); Mex 121-A (*S. pimpinellifolium* (Just) Mill) y P-531 *S. esculentum* var. *cerasiforme* (Dun.) Gray) y cuatro aislados del hongo patógeno seleccionados de acuerdo con su variabilidad patogénica en el experimento anterior.

Las semillas originales fueron donadas gentilmente por el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt y el Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, La Habana.

El material vegetal, inóculo y método de inoculación se realizó según los procedimientos detallados en el acápite anterior. Se emplearon 10 plantas por cada una de las interacciones (raza x genotipo). Como controles se utilizaron cinco plantas de cada genotipo, asperjadas con agua estéril e incubadas en igualdad de condiciones.

2.2.5 Determinación de genes de avirulencia y genes que codifican para las proteínas extracelulares en los aislados de *P. fulva*

En este estudio se emplearon todos los aislados de *P. fulva* de distintos orígenes geográficos cubanos y como control positivo se utilizó el aislado raza 0 (R-0).

2.2.5.1 Amplificación de los genes *Avr* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El crecimiento del hongo patógeno, extracción de ADN, mezcla de reacción de PCR y visualización de los fragmentos de ADN se realizó de la misma forma que fue descrita en el acápite 2.2.1. Los cebadores específicos utilizados se encuentran descritos en la literatura científica y aparecen publicados en el NCBI (Gen Bank) para *Avr2* (Luderer *et al.*, 2002; AJ421628), *Avr4* (Joosten *et al.*, 1997; Y08356), *Avr4E* (Westerink *et al.*, 2004; AY546101) y *Avr9* (Ackerveken *et al.*, 1992; X60284) (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores específicos utilizados en el estudio de determinación de genes de avirulencia (*Avrs*) de *P. fulva*

	Cebadores específicos (5'-3')	Productos amplificados
	<i>Avr2</i>	
<i>F</i>	CAT CAG CAT ATC CTC TTC CAT CC	609 pb
<i>R</i>	CAG TAC GTT CAA AAG CAG ATA AGG	
	<i>Avr4</i>	
<i>F</i>	ACG GTA GGT CTG TAC ACG AGC C	841 pb
<i>R</i>	AAC GAA CTG GGT CAT GGA ATG	
	<i>Avr4E</i>	
<i>F</i>	GCC CGG TAT ATC GCT GTG C	680 pb
<i>R</i>	CGG AAC CCC TGG CTG AGA	
	<i>Avr9</i>	
<i>F</i>	AAT ACA ACC TTG AAA CAG CTA GG	751 pb
<i>R</i>	GGA CTC TAC GGG GCT TGG	

El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 segundos), hibridación a 54 °C, 49 °C, 55 °C (30 segundos) y extensión a 72 °C (1 minuto). Un paso de extensión final a 72 °C por 7 minutos concluyó la reacción. Las temperaturas de hibridación variaron para cada cebador específico y fueron: 54 °C para *Avr2*, 49 °C para *Avr4* y 55 °C para *Avr4E* y *Avr9* (Stergiopoulos *et al.*, 2007a). Con la presencia/ausencia de bandas obtenidas a partir de las amplificaciones de los genes de avirulencia (*Avrs*) de los aislados de *P. fulva* se confeccionó una matriz de datos binarios. Para la formación de los grupos se realizó un análisis de conglomerados jerárquico por el método de UPGMA (vinculación Inter. grupos) y la distancia de Nei y Li para generar una matriz de coeficientes de similitud

que se utilizó para la construcción del dendrograma. La confirmación de la calidad de los grupos detectados se realizó con un análisis discriminante. Se empleó el paquete estadístico SPSS v. 11.5 para Windows (SPSS Inc., 2000).

2.2.5.1.1 Análisis de las secuencias de los genes *Avr2* y *Avr4* de diferentes aislados cubanos de *P. fulva*

El experimento se realizó con el objetivo de determinar las posibles variaciones en las secuencias de nucleótidos de los genes de avirulencia (*Avr2* y *Avr4*) en ocho aislados de *P. fulva* (06/6, 7, Quivicán, 10, 6, 20, 22 y 3) seleccionados sobre la base del origen geográfico.

La purificación de los productos de PCR, secuenciación en la dirección (5' - 3') y lectura se realizó en MACROGEN, Inc. (Seoul, Korea del Sur) con el empleo de los cebadores (*Avr2-F*: 5' CAT CCG AAG TAA TAG CAG CAG C 3' y *Avr4-F*: 5' TCA GGA AGA GAT TCA GGA C 3')

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa Clustalx. El programa Blastn (Altschul *et al.*, 1997) fue usado para comparar las secuencias de nucleótidos obtenidas de los aislados de *P. fulva* con las reportadas en la base de datos NCBI; *Avr2* (AJ421628) y *Avr4* (Y08356).

2.2.5.2 Amplificación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecp*) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El crecimiento del hongo patógeno, extracción de ADN, mezcla de reacción de PCR y visualización de los fragmentos de ADN se realizó de la forma descrita en el acápite 2.2.1. Los cebadores específicos utilizados se encuentran descritos en la literatura científica y aparecen publicados en el NCBI (Gen Bank) para *Ecp1* (Z14023), *Ecp2* (Ackerveken *et al.*, 1993; Z14024), *Ecp4* (AJ271890) y *Ecp5* (Lauge *et al.*, no publicado; AJ271891) (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores específicos utilizados en el estudio de determinación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecps*) de *P. fulva*

	Cebadores específicos (5'-3')	Productos amplificados
	<i>Ecp1</i>	
<i>F</i>	ACC AGG ATA AGT TCG CAG TC	817 pb
<i>R</i>	GCC TCC GCG ATG CTT CCT	
	<i>Ecp2</i>	
<i>F</i>	GTC CAA GGA TCG TGT CTC AAG	838 pb
<i>R</i>	TTC TAG CAA ACC CGT CTG A	
	<i>Ecp4</i>	
<i>F</i>	AAC CTA ACA TCA CAA TCT TCA A	
<i>R</i>	TTG CTC AAG CCC AGA CAG	550 pb
	<i>Ecp5</i>	
<i>F</i>	TAT GAA CAC TTT TAC TCT ACT C	
<i>R</i>	CGC GTC GCC TGA TAG AT	900 pb

El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 segundos), Hibridación a 54 °C, 49 °C (30 segundos) y extensión a 72 °C (1 minuto). Un paso de extensión final a 72°C por 7 minutos concluyó la reacción. Las temperaturas de hibridación variaron para cada cebador específico y fueron: 54 °C para *Ecp2*, y *Ecp1* y 49 °C para *Ecp4*, y *Ecp5* (Stergiopoulos *et al.*, 2007 a). El procesamiento estadístico se realizó igual al descrito en el acápite 2.2.5.1.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Aislamiento e identificación de aislados de *P. fulva*

En el presente trabajo se obtuvieron e identificaron un total de 36 aislados de *P. fulva* (Anexo 1).

Como se observa en la Figura 1, los aislados del agente patógeno no mostraron variaciones en las características de las colonias con respecto a las descritas para la especie por Ho y col. (1999). El color de la colonia fue gris – gris y oliváceo, textura afelpada, bordes irregulares, color del reverso negro y crecimiento lento (de 1,3 a 2,1 mm/14 días).

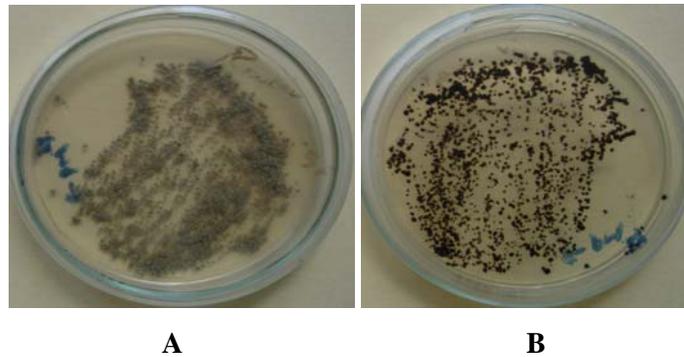


Figura 1 Características de las colonias de los aislados de *P. fulva* en el medio de cultivo AEM a los 14 días (A: anverso, B: reverso)

Los conidióforos son oliváceos pálidos, septados, flexuosos, usualmente ramificados, estrechos en la base y gruesos hacia el ápice. Los conidios al microscopio se observaron de color olivo claro a olivo, cilíndricos y oviformes con 0-1 septo, lisos y cicatrizados en los extremos (Figura 2). En cuanto a su tamaño se encontraron variaciones en sus dimensiones, encontrándose éstos en el intervalo desde 20, 1-23, 2 x 4, 6-5, 1 μm .



Figura 2 Conidióforo y conidios de *P. fulva*

Estos resultados corroboran lo planteado por Farr *et al.* (1995) y Ho *et al.* (1999) quienes informaron que *P. fulva* puede presentar colonias de color gris, gris oliváceo, pardo oliváceo o negro, micelio afieltrado, crecimiento lento (hasta 10 mm/14 días) y las dimensiones de sus conidios encontrarse desde (11.8-) 18.2-23,4(-23,8) μm de largo, hasta (3,3-) 4,8-5,5 (-6,3) μm de ancho.

La comprobación de la identidad desde el punto de vista molecular se observa en la Figura 3. En esta se aprecia la banda obtenida a partir de la amplificación de la región 28S del gen que codifica para el ARNr de los aislados de *P. fulva* con el empleo de cebadores específicos (Kock, 2004). La presencia de una banda de 622 pb en todos los aislados evaluados, confirma la identidad de los mismos.

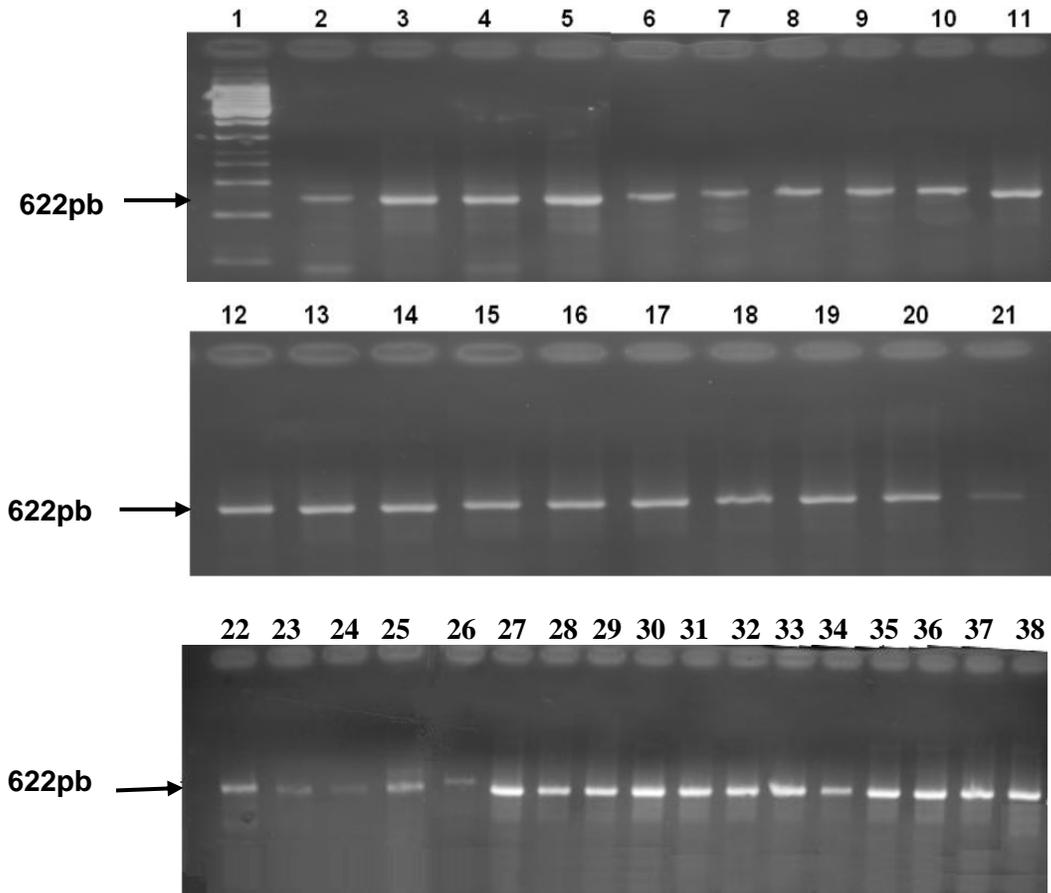


Figura 3 Bandas obtenidas a partir de la amplificación de la región 28S de los aislados de *P. fulva*. Línea 1: marcador de peso molecular (1Kb, Fermentas), 2: 19, 3: 31, 4: 06/6, 5: 33, 6: 13, 7: 18, 8: 25, 9: 26, 10: 7, 11: 28, 12: 39, 13: 30, 14: 06/4, 15: 32, 16: Quivicán, 17: 38, 18: 10, 19: 40, 20: 2, 21: 5, 22: 9, 23: 16, 24: 17, 25: 11, 26: 6, 27: 8, 28: 4, 29: 20, 30: 22, 31: 23, 32: 24, 33: 06/3, 34: 12, 35: 14, 36: 15, 37: 3, 38: R-0.

Los resultados, tanto morfológicos como moleculares, demostraron que todos los aislados analizados pertenecen a la especie *P. fulva*

Las primeras aplicaciones de la PCR en Micología se utilizaron para establecer relaciones filogenéticas y taxonómicas de hongos (White *et al.*, 1990). De esta fecha en adelante, el diseño de secuencias a partir de regiones conservadas (ITSs) de diferentes hongos se ha seguido empleando para investigar relaciones taxonómicas entre especies dentro de géneros diferentes, tales como *Colletotrichum* (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996), *Phytophthora* (Lee and Taylor, 1992), *Penicillium* (Lobuglio y col., 1993) y *Passalora* (Curtis *et al.*, 1994). No obstante, se ha informado en la literatura científica que las regiones ITSs evolucionan mucho más rápido y están más propensas a mutaciones (Soltis y Soltis, 1999).

Sin embargo, los resultados obtenidos por de Kock. (2004) mostraron una conservación completa en las secuencias de los diferentes genes que codifican para el ARNr y los espaciadores internos transcritos (ITS 1 y ITS 2) al estudiar 44 aislados de *P. fulva* procedentes de diferentes partes de Europa, Canadá, Estados Unidos, América del Sur, Australia, Nueva Zelanda y Japón, y a la vez confirmaron los resultados obtenidos por Curtis *et al.* (1994).

En este mismo aspecto, Stergiopoulos *et al.* (2007 b) observaron la presencia de una sola banda de 622 pb, al amplificar la región 28S del gen que codifica para el ARNr con el empleo de estos cebadores específicos, en una colección de 81 aislados de *P. fulva*, procedentes de diferentes regiones geográficas del mundo colectados en un período de 50 años.

2.3.2 Caracterización cultural

Como se puede apreciar en la Figura 4, los aislados de *P. fulva* no mostraron variaciones en los caracteres culturales evaluados en el medio de cultivo PDA. Las colonias de estos presentaron color oliváceo, textura afelpada, bordes irregulares y color del reverso negro.



Figura 4 Colonias de *P. fulva* en el medio de cultivo PDA a las dos semanas de cultivo (A: anverso, B: reverso)

Estas características de las colonias coincidieron con las notificadas para esta especie tanto en el medio de cultivo PDA como en AEM (Ho *et al.*, 1999). En general, el nivel de especialización encontrado dentro de la población de *P. fulva* no está relacionado con las características culturales.

Teniendo en cuenta el diámetro de la colonia de los aislados (Tabla 3), se hizo un agrupamiento mediante el análisis de conglomerados y se formaron dos grupos (Figura 5). Este agrupamiento mostró un 94,3 % de buena clasificación según el análisis discriminante. El análisis de conglomerados evidenció que los grupos formados se empiezan a ramificar a distancias muy bajas, indicando que los mismos son compactos y que la diversidad intragrupos es muy baja.

Tabla 3 Diámetro promedio de las colonias de los aislados de *P. fulva* en PDA

Aislado #	Diámetro promedio de las colonias (mm)
2	1,5
3	2,3
4	1,3
5	2,2
6	2,4
7	2,3
8	1,6
9	1,5
10	2,8
11	2,2
12	1,3
13	2,2
14	1,4
15	2,1
16	1,1
17	1,1
18	1,5
19	1,8
Aislado #	Diámetro promedio de las colonias (mm)
20	2,6
22	1,3
23	1,7
24	1,7
25	1,7
26	1,3

28	1,3
30	1,2
31	1,4
32	1,3
33	1,3
38	1,5

39	1,2
40	1,6
06/3	1,6
06/4	1,9
06/6	3,1
Quivicán	1,7

N=100 colonias x aislado x placa

El grupo I, representado con más del 65 % de los aislados, agrupó aquellos de menores valores de diámetro de la colonia (menores de 2,0 mm) a diferencia del grupo II donde se ubicaron los aislados de mayores valores (mayores de 2,0 mm). Por otra parte, se encontró que no existió una ubicación absoluta de los aislados en los diferentes grupos tomando como base el origen geográfico de su aislamiento. Cada grupo estando representado por aislados que pertenecen a más de una provincia y región del país (Anexo 1).

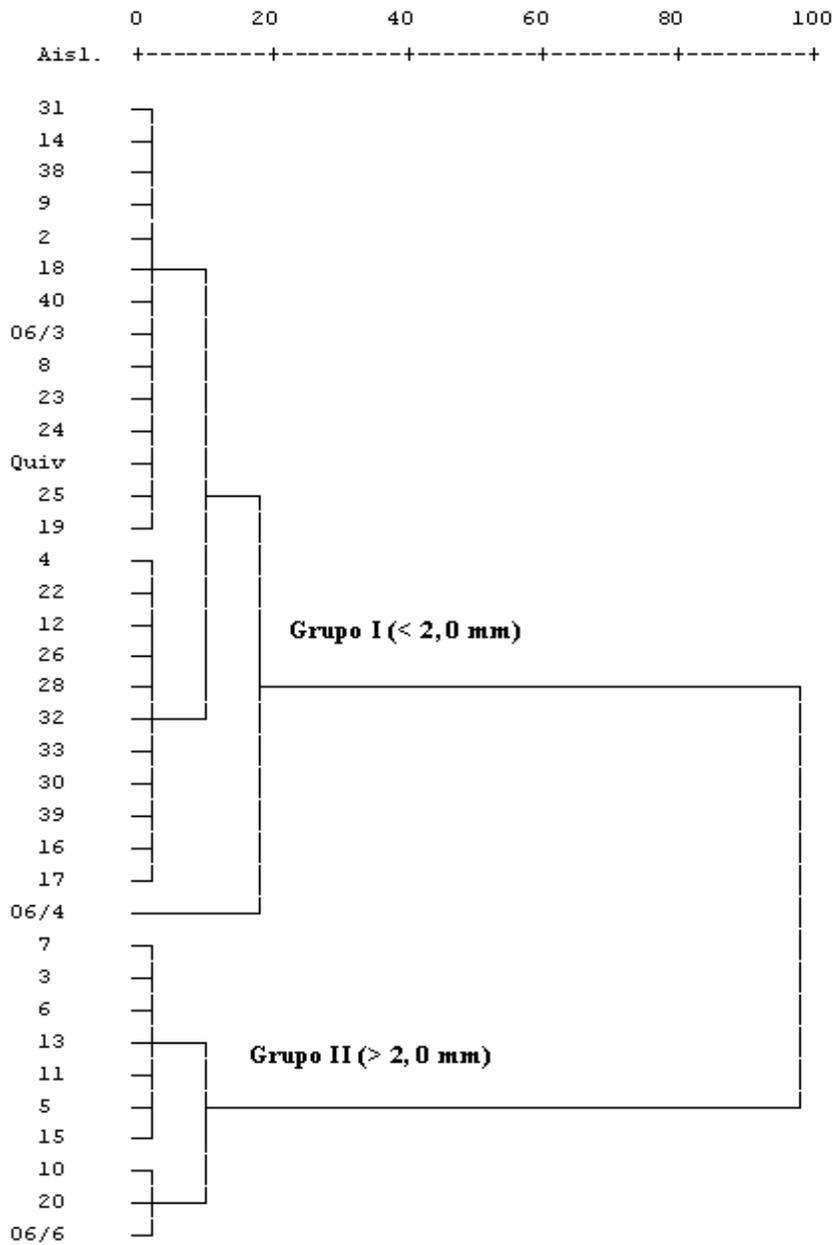


Figura 5 Dendrograma obtenido a partir de los valores del diámetro de las colonias de 36 aislados de *P. fulva* crecidos en PDA durante 14 días

A partir de los resultados respecto al crecimiento (Tabla 3) y tomando en cuenta que hubiera representatividad de cada región geográfica se seleccionaron los aislados (Quivicán, 8, 22, 26, 6, 7, 06/6 y 10) para los estudios de variabilidad en diferentes medios de cultivo, temperaturas y regímenes de luz.

2.3.3 Influencia de diferentes factores físicos y nutricionales en el desarrollo de *P. fulva*

2.3.3.1 Influencia de diferentes medios de cultivo en el crecimiento micelial y esporulación

El diámetro de la colonia y producción de conidios manifestaron diferencias altamente significativas para los factores aislado y medio, y significativa para la interacción aislados-medios. En la Tabla 4 se ofrecen los resultados del ensayo de medios de cultivo. En general los aislados evaluados fueron capaces de crecer en los medios de cultivo probados. Los medios de cultivo donde se obtuvieron los mayores valores de diámetro de la colonia para todos los aislados fueron PDA y ADS, difiriendo estadísticamente de Cz. Dox y AEM, respectivamente.

Tabla 4 Diámetro promedio de las colonias de los aislados de *P. fulva* en diferentes medios de cultivo

Aislados	Medios de cultivo				ES(±)
	PDA	ADS	Cz Dox	AEM	
6	2,7 ^A _{abc}	2,4 ^A _{ab}	1,3 ^B _a	1,7 ^B _{ab}	0,2
7	2,6 ^A _{bc}	2,1 ^{AB} _{bc}	1,3 ^C _a	1,5 ^{BC} _{ab}	0,1
8	2,5 ^A _{bc}	2,4 ^A _{ab}	1,3 ^B _a	1,6 ^B _{ab}	0,2
10	3,1 ^A _{ab}	2,8 ^A _a	1,2 ^C _a	2,1 ^B _a	0,2
06/6	3,4 ^A _a	2,9 ^A _a	1,0 ^B _a	1,4 ^B _{ab}	0,1
Quivicán	2,0 ^A _c	1,7 ^{AB} _c	1,2 ^B _a	1,3 ^B _b	0,1
22	2,9 ^A _{ab}	2,7 ^A _{ab}	1,2 ^B _a	1,4 ^B _{ab}	0,1
26	2,5 ^A _{bc}	2,1 ^{AB} _{bc}	1,2 ^C _a	1,6 ^{BC} _{ab}	0,1
ES(±)	0,19	0,12	N.S	0,15	

Medias con letras mayúsculas diferentes en el sentido de las filas y minúsculas en el sentido de las columnas difieren para $P < 0.05$ por la prueba de Duncan

PDA: Papa-Dextrosa-Agar **ADS:** Agar-Dextrosa de Saboraud **Cz Dox:** Czapek Dox
AEM: Agar-Extracto de malta **ES:** error estándar

Por otra parte, se encontró que no todos los medios influyeron de igual forma en el diámetro de la colonia de los aislados de *P. fulva*. El aislado 06/6 fue el que mayor valor de diámetro alcanzó en los medios de cultivo PDA y ADS con 3,4 y 2,9 mm sin diferir estadísticamente de los aislados 6, 10 y 22. El menor valor de diámetro de la colonia, para estos mismos medios de cultivo se obtuvo con el aislado Quivicán con 2,0 y 1,7 mm, respectivamente. El medio de cultivo AEM permitió una ligera diferenciación entre los aislados, sin embargo en Cz Dox, se mantuvo una homogeneidad entre ellos. Estos resultados son novedosos para esta especie.

Al evaluar el efecto sobre la esporulación, se determinó que todos los medios de cultivo probados permitieron obtener conidios de *P. fulva*. La mayor concentración de conidios se logró en el medio ADS el cual difirió estadísticamente de los medios PDA, Cz Dox y AEM. El aislado 10 fue el que logró el mayor valor de producción de conidios y el 22 el

menor en todos los medios de cultivo utilizados; resultados intermedios se obtuvieron con los restantes aislados (Tabla 5).

Tabla 5 Número de conidios promedio de aislados de *P. fulva* crecidos en diferentes medios de cultivo a los 14 días de incubación

Aislados	Medios de cultivo				ES(±)
	PDA	ADS	Cz Dox	AEM	
	(x 10 ⁵ conidios.mL ⁻¹)				
6	1,7 ^B _c	2,0 ^A _c	1,0 ^D _b	1,4 ^C _b	0,002
7	1,3 ^B _e	1,6 ^A _e	0,5 ^D _d	0,7 ^C _e	0,002
8	1,3 ^B _e	1,4 ^A _{ef}	0,4 ^D _{de}	0,9 ^C _d	0,003
10	2,3 ^B _a	2,5 ^A _a	1,3 ^D _a	1,6 ^C _a	0,002
06/6	1,5 ^B _d	1,8 ^A _d	0,6 ^D _c	1,1 ^C _c	0,002
Quivicán	1,9 ^B _b	2,2 ^A _b	1,0 ^D _b	1,5 ^C _b	0,003
22	1,1 ^B _f	1,3 ^A _f	0,3 ^D _e	0,6 ^C _e	0,003
26	1,2 ^B _e	1,4 ^A _{ef}	0,4 ^D _{de}	0,7 ^C _e	0,003
ES(±)	0,02	0,02	0,01	0,02	0,003

Medias con letras mayúsculas diferentes en el sentido de las filas y minúsculas en el sentido de las columnas difieren para $P < 0.05$ por la prueba de Duncan

PDA: Papa-Dextrosa-Agar **ADS:** Agar-Dextrosa de Saboraud **Cz Dox:** Czapek Dox
AEM: Agar-Extracto de malta **ES:** error estándar

Los resultados aquí mostrados concuerdan con lo expresado por Casadesus y otros. (1985) quienes informaron que no todos los hongos responden de igual forma a los factores nutricionales y que cada especie presenta exigencias muy particulares para el crecimiento y esporulación, ya que se ha generalizado que los sustratos pobres estimulan la formación de conidios, sin embargo en este trabajo el medio rico ADS mostró los mejores resultados (Tabla 5). La literatura científica consultada no informa sobre este particular en *P. fulva*.

Por otra parte, estos resultados presentan utilidad práctica, pues permiten disponer de varias opciones de sustratos procedentes de firmas comerciales para los trabajos de rutina en relación con el mantenimiento y conservación del cepario en el laboratorio; además de constituir una alternativa para la obtención de conidios *in vitro*, ya que permite emplear otro medio de cultivo sintético como el ADS y no solo el PDA y V-8 referidos en la literatura científica para estos fines (Higgins y Hollands, 1987; Oliver y otros., 2000).

2.3.3.2 Influencia de diferentes condiciones de iluminación en el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial

El análisis de varianza realizado con los valores de diámetro de la colonia y la producción de conidios no mostró significación para la interacción aislado-luz, sin embargo si hubo interacción en cuanto a la germinación conidial.

En la Tabla 6 se constatan los resultados del diámetro de la colonia y la producción de conidios en los tres regímenes de luminosidad probados. Los mayores valores para estas dos variables se obtuvieron en la condición de 24 horas oscuridad, la cual difirió del resto de las variantes.

Tabla 6 Diámetro de la colonia promedio y número de conidios de aislados de *P. fulva* crecidos en tres regímenes de luminosidad a los 14 días de incubación

Luminosidad	Diámetro de la colonia (mm)	Número de conidios ($\times 10^5$ conidios.mL ⁻¹)
24 horas luz	2,25 b	1,28 c
16 horas luz + 8 horas oscuridad	2,35 b	1,36 b
24 horas oscuridad	2,63 a	2,63 a
ES (\pm)	0,03	0,001

Medias con letras diferentes en el sentido de las columnas difieren para $P < 0.05$ por la prueba de Duncan

Cochrane, en 1958, citado por López (1999) ha informado que la luz estimula y favorece la expresión de las características culturales de los hongos fitopatógenos. Este hongo, *P. fulva*, a pesar de manifestar diferencias significativas en las condiciones de luminosidad ensayadas no muestra una influencia marcada en cuanto al crecimiento micelial, por lo que los diferentes regímenes de luminosidad (Tabla 6) no representan un requisito especial, contrariamente a lo que se observa con la esporulación, donde en la condición de oscuridad el hongo casi duplica los valores de los restantes tratamientos. Esto tiene importancia desde el punto de vista epifitológico y se debe tener en cuenta ya que es posible que en el horario nocturno este patógeno aumente considerablemente el fondo infeccioso, aspecto a considerar en el control de la enfermedad.

Al analizar los aislados, hubo diferencias estadísticas entre ellos con respecto al diámetro de la colonia y número de conidios (Tabla 7). Los aislados 06/6 y 10 alcanzaron los mayores valores para el diámetro de la colonia y el 10 y Quivicán para la producción de conidios.

Tabla 7 Valores de diámetro de la colonia promedio y número de conidios de diferentes aislados de *P. fulva*

Aislados	Diámetro de la colonia (mm)	Número de conidios (x 10⁵ conidios.mL⁻¹)
6	2,60 b	1,59 b
7	2,20 c	1,22 cd
8	2,23 c	1,16 d
10	2,73 ab	1,82 a
06/6	2,90 a	1,26 c
Quivicán	2,00 c	1,77 a
22	2,57 b	0,98 e
26	2,03 c	1,24 c
ES (±)	0,05	0,002

Medias con letras diferentes en el sentido de las columnas difieren para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan

Por otra parte, no se encontró correspondencia entre el crecimiento micelial y la esporulación de los aislados Quivicán, 22, y 06/6; que presentaron en algunos casos menor crecimiento micelial y mayor esporulación y viceversa. Estos resultados podrían indicar desde el punto de vista epifitológico, que aun cuando el área foliar afectada sea menor, el foco infeccioso pudiera ser significativo.

De igual modo, este resultado pudiera ser la respuesta a los altos porcentajes de intensidad de la enfermedad moho de las hojas que han sido observados por varios investigadores en las localidades de procedencia de dichos aislados (Bernal y otros., 2001; Castellanos y otros., 2005).

Respecto a la influencia de la humedad relativa en la germinación conidial (Anexo 2) se puede observar que los conidios de los distintos aislados de *P. fulva* germinaron a

humedades relativas a partir del 90 % combinados con los diferentes regímenes de luminosidad (combinaciones de 1 hasta 9); encontrándose diferencias estadísticas entre ellos.

Las condiciones de agua libre y 100 % de humedad relativa combinados con los regímenes de 24 horas oscuridad fueron los tratamientos (combinaciones 1 y 4) donde los diferentes aislados de *P. fulva* lograron los mayores valores de conidios germinados, sin diferencias entre ellos; sin embargo, se pudieron discriminar parcialmente en las restantes combinaciones.

Al combinar la humedad relativa de 80 % con los tres regímenes de luminosidad, no se observaron conidios germinados. Esto evidencia que la humedad relativa constituye una limitante para el desarrollo del hongo, como comparte Walker (1969) en observaciones de la enfermedad moho de las hojas en condiciones de producción, y que hasta cierto punto justifica la aparición limitada de la misma a campo abierto. Abundando en este aspecto, Walker (1969), Kerr and Bailey (1971) y Thomas *et al.* (1997) informaron que en las casas de cultivo para que ocurran infecciones de *P. fulva* se requieren períodos de fluctuaciones de alta humedad relativa entre el día y la noche (HR = 85-100 %) y altas densidades de plantas. Estas observaciones ratifican la importancia del factor humedad relativa en el desarrollo de la enfermedad moho de las hojas (Wit, 1977; Wit and Flach, 1979; Thomma *et al.*, 2005).

Estos resultados están en concordancia con los de Chupp y Sherf (1960), Mayea y otros. (1983), Jones *et al.* (1997) y Thomma *et al.* (2005), al informar que probablemente la humedad relativa sea el factor más importante en la germinación de los conidios, con un límite inferior de 90 %, logrando germinar hasta en agua libre; además señalan que este agente fitopatógeno se desarrolla a humedades relativas superiores al 85 %, aspectos con los cuales concuerdan los resultados del presente trabajo.

Por otro lado, al analizar las combinaciones (4-6 de la Tabla 8) de los diferentes regímenes de luz con una humedad favorable (100 %) muestran que la luz influye en la germinación, pero no es determinante como la humedad relativa. Esto contradice lo planteado por

Elenkov y Jristova (1978) cuando señalaron que la germinación de los conidios de *P. fulva*, se establece sólo en condiciones de oscuridad.

Estudios sobre la interacción de los factores climáticos humedad relativa y luz sobre la germinación conidial de este agente fitopatógeno no han sido abordados, por lo que estos resultados dan una explicación más cercana a lo que ocurre en la naturaleza.

2.3.3.3 Influencia de la temperatura en el crecimiento micelial, esporulación y la germinación conidial

El análisis de varianza realizado con los datos de diámetro de las colonias arrojó diferencias significativas para los factores aislados y temperatura, no así para la interacción, por lo que se analiza cada factor por separado. En la Tabla 9 se muestran los resultados del ensayo. El crecimiento micelial de este agente fitopatógeno presentó una tendencia ascendente hasta la temperatura de 25 °C, donde alcanzó su mayor valor. En el caso de la temperatura de 30 °C no se observó crecimiento del hongo fitopatógeno, lo que podría considerarse su límite máximo aun en condiciones de alta humedad y oscuridad, aspecto probado posteriormente a este ensayo.

Tabla 9 Diámetro de la colonia promedio de *P. fulva* a diferentes temperaturas

Temperaturas (°C)	Diámetro de la colonia (mm)	
	Xo	Xt
15	1,38	1,31 c
20	2,03	1,54 b
25	2,49	1,68 a
30	0,00	0,61 d
ES (±)		0,002

Medias con letras diferentes en el sentido de las columnas difieren para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan

Xo: medias de los datos originales

Xt: media de los datos transformados

Por otra parte, al analizar el crecimiento micelial de los aislados se encontraron diferencias estadísticas entre ellos, registrándose los mayores valores para los aislados 06/6 y 10 respectivamente, los cuales no difirieron entre ellos, pero sí del resto de los aislados (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de diámetro de la colonia promedio de diferentes aislados de *P. fulva*

Aislados	Diámetro de la colonia (mm)	
	Xo	Xt
6	1,50	1,30 cd
7	1,32	1,24 de
8	1,27	1,22 e
10	1,73	1,37 ab
06/6	1,85	1,41 a
Quivicán	1,27	1,22 e
22	1,60	1,33 bc
26	1,23	1,20 e
ES (±)		0,003

Medias con letras diferentes en el sentido de las columnas difieren para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan

Xo: medias de los datos originales

Xt: media de los datos transformados

Los datos obtenidos en este estudio concuerdan con los notificados por Walker (1969) y Jones *et al.* (1997) quienes informaron que el desarrollo del micelio de este agente fitopatígeno en medio de cultivo tiene lugar en un intervalo óptimo de temperatura entre 20–25 °C; otros autores plantean que el óptimo de temperatura se encuentra entre 21–25 °C (Wit, 1977); 22-24 °C (Jones *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 2005); mientras Mayea otros. (1983) señalan que este óptimo es de 22 °C, aunque la enfermedad se puede presentar a temperaturas entre 10–34 °C.

El análisis de varianza para los resultados de esporulación muestra diferencias altamente significativas para los tratamientos, los factores por separado y la interacción. Como se observa en la Tabla 11, no todas las temperaturas influyen de igual forma sobre la esporulación de los aislados de *P. fulva*.

Tabla 11 Número de conidios promedio de aislados de *P. fulva* en diferentes temperaturas de incubación

Aislado	Temperaturas						ES(±)
	15 °C		20 °C		25 °C		
	(10 ⁵ conidios.mL ⁻¹)						
	X _o	X _t	X _o	X _t	X _o	X _t	
6	0,93	1,14 ^{C_b}	2,07	1,56 ^{A_b}	1,67	1,43 ^{B_b}	0,05
7	0,67	1,02 ^{C_d}	1,50	1,37 ^{A_d}	1,23	1,27 ^{B_c}	0,05
8	0,73	1,05 ^{C_{cd}}	1,43	1,34 ^{A_d}	1,17	1,24 ^{B_{cd}}	0,05
10	1,13	1,23 ^{C_a}	2,53	1,70 ^{A_a}	1,87	1,50 ^{B_a}	0,05
06/6	0,63	1,00 ^{C_d}	1,73	1,45 ^{A_c}	1,27	1,28 ^{B_c}	0,00
Quivicán	0,87	1,11 ^{C_{bc}}	2,13	1,58 ^{A_b}	1,77	1,46 ^{B_{ab}}	0,05
22	0,73	1,05 ^{C_{cd}}	1,27	1,28 ^{A_e}	1,03	1,19 ^{B_d}	0,00
26	0,87	1,11 ^{C_{bc}}	1,63	1,42 ^{A_c}	1,20	1,25 ^{B_c}	0,05
ES(±)		0,01		0,05		0,05	

Medias con letras mayúsculas diferentes en el sentido de las filas y minúsculas en el sentido de las columnas difieren para $P < 0,05$ por la prueba de Duncan

X_o: medias de los datos originales

X_t: media de los datos transformados

El mayor valor de número de conidios se obtuvo para todos los aislados a la temperatura de 20 °C, destacándose el aislado 10, los menores valores correspondieron a los aislados 7 y 06/6 a la temperatura de 15° C, que a su vez no presentaron diferencias estadísticas con el aislados 8 y 22. Valores intermedios se observaron para todos los aislados a la temperatura de 25 °C, a la que igualmente lograron diferenciarse. Para la temperatura de 30 °C, al no crecer el hongo no se evaluó la esporulación.

Diferentes temperaturas de incubación se han utilizado *in vitro* para la producción de conidios de *P. fulva*. Wit (1977) y Lindhout *et al.* (1989) utilizaron 22 °C y obtuvieron una concentración de 10⁶ conidios.mL⁻¹ en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar; mientras Higgins y Hollands (1987) a 25°C obtuvieron una concentración similar en medio de cultivo Agar V-8. Como se observa, en el intervalo de temperatura de 20 - 25°C, se encuentra la temperatura óptima para la esporulación de esta especie.

En cuanto a la germinación conidial el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos, factores y la interacción de estos.

Como se refleja en el Anexo 3, los conidios de los distintos aislados de *P. fulva* germinaron a humedades relativas superiores al 90 % combinado con las diferentes temperaturas ensayadas (combinaciones de 1 hasta 7), con excepción de las combinaciones de 100 y 90% de humedad relativa a 30 °C y 90 % de humedad relativa a 15 °C. En todos los casos se encontraron diferencias estadísticas entre combinaciones. La condición de agua libre combinada con la temperatura de 25 °C fue donde los aislados de *P. fulva* lograron los mayores valores de conidios germinados. Cuando los conidios de los diferentes aislados se colocaron en las condiciones de 80 % de humedad relativa combinada con las cuatro temperaturas, no se observaron conidios germinados, es decir esta humedad relativa es el límite para la germinación de conidios en las condiciones probadas.

Por otro lado, los aislados 6, 8, Quivicán, 06/6 y 22 alcanzaron los mayores valores de conidios germinados; lográndose diferenciar del resto en las diferentes condiciones, lo que muestra una interacción entre las combinaciones de humedad y temperatura con los aislados. La excepción es la combinación de agua libre y 25 °C donde la germinación de los conidios de los aislados no se diferencian.

Los resultados obtenidos en la tabla anterior indican que las mayores infecciones de *P. fulva* se deben esperar a temperatura de 25 °C y valores de humedad relativa superior al 90 % y en presencia de agua libre; para esta última condición también a 30 °C. Tales condiciones se presentan en las instalaciones de cultivo protegido en las horas nocturnas, donde existe un goteo por el material plástico utilizado como cobertor y además por la formación de gotas de agua sobre la superficie del tejido vegetal debido a las fluctuaciones de temperatura en concordancia con altas humedades; aspecto este de gran importancia desde el punto de vista epifitiológico.

En las casas de cultivo de Bulgaria se informaron infecciones de *P. fulva* a temperaturas entre 16-20 °C con humedades relativas superiores al 90 %. En este mismo sentido, Polack y Mitidieri (2002) informaron que las condiciones predisponentes para las infecciones por *P. fulva* en las casas de cultivo de Argentina fueron de temperaturas entre 22 °C y 24 °C y

humedad relativa superior al 90 %. En la literatura científica nacional consultada no se informan datos meteorológicos confiables relacionados con el desarrollo de la enfermedad en las instalaciones de cultivo protegido; no obstante el intervalo de temperatura obtenido en este trabajo para la germinación conidial fue superior al informado por estos y otros autores como Walker (1969), Elenkov y Jristova (1978) y Thomas *et al.* (1997). Este fenómeno posiblemente esté asociado a la ocurrencia de un proceso adaptativo del agente patógeno a las condiciones climáticas cubanas.

En las instalaciones de casas de cultivo en Cuba tales condiciones se presentan fundamentalmente en la época de invierno, donde se amplía el período óptimo para la germinación de los conidios y el desarrollo del hongo, por lo que debe lograrse una buena cobertura de aplicación con fungicidas protectantes sobre el follaje del tomate antes de este momento.

2.3.4 Variabilidad patogénica

2.3.4.1 Determinación de razas fisiológicas de *P. fulva*

La confirmación o no de razas fisiológicas en cualquier entidad biológica se fundamenta en las pruebas de patogenicidad sobre un grupo de variedades diferenciadoras.

En la Tabla 13 se muestran los resultados del estudio de determinación de razas. De modo general, todos los aislados ocasionaron síntomas y mostraron en mayor o menor grado su capacidad patogénica en las diferentes líneas diferenciadoras, lo cual ratifica la variabilidad patogénica de la especie.

Como puede observarse, en los aislados evaluados se detectó la presencia de cuatro razas fisiológicas (raza 0; 2; 4 y 2.4) afectando el cultivo del tomate en condiciones de cultivo protegido, resultado que no había sido informado antes en el país.

En este aspecto se encontró que la raza 0 fue la de mayor predominancia y distribución dentro del país. La composición racial de este hongo fitopatógeno en el país mostró que la raza 0 representa más del 77,78 % de los aislados. Al relacionar los mismos con su

procedencia se halló que todos provienen de diferentes cultivares y orígenes geográficos del país (Anexo 1).

La excepción es el reducido número de aislados identificados como raza 2 (aislados 6, 20 y 24) que tienen como origen a la región oriental y fueron aislados fundamentalmente a partir de los cultivares HA-3105 y HA-3108, uno de los más utilizados en cultivo protegido.

Tabla 13. Respuesta de líneas diferenciales de tomate frente a aislados de *P. fulva* a los 21 días de inoculación

Aislado	Líneas de tomate/ Genes de resistencia		
	<i>MoneyMaker</i> (Cf0)	<i>LA3043</i> (Cf2)	<i>LA3045</i> (Cf4)
19	S	R	R
31	S	R	R
28	S	R	R
33	S	R	R
13	S	R	R
18	S	R	R
25	S	R	R
26	S	R	R
38	S	R	R
40	S	R	R
39	S	R	R
30	S	R	R
06/4	S	R	R
32	S	R	R
2	S	R	R
5	S	R	R
9	S	R	R
16	S	R	R
17	S	R	R
11	S	R	R
8	S	R	R
4	S	R	R
23	S	R	R
06/3	S	R	R
12	S	R	R
14	S	R	R
15	S	R	R

3	S	R	R
R- 0	S	R	R
6	S	S	R
20	S	S	R
24	S	S	R
06/6	S	R	S
10	S	R	S
22	S	R	S
7	S	S	S
Quivicán	S	S	S

Por su parte, la raza con un mayor espectro de virulencia determinada en este estudio (raza 2.4) estuvo representada por los aislados 7 y Quivicán, provenientes a las provincias de Sancti Spíritus y La Habana, respectivamente. La detección de esta raza evidencia que el hongo patógeno presenta genes de virulencia que le permiten incrementar su capacidad patogénica sobre los principales cultivares de tomate que se siembran en el país bajo estas condiciones, aspecto a tenerse en cuenta, tanto en el programa de mejoramiento del cultivo, como en el manejo varietal.

En la literatura internacional se informan diversos criterios para determinar las razas de *P. fulva*. Los mismos han estado fundamentados principalmente a partir de diferentes grados de esporulación del hongo patógeno sobre los cultivares diferenciadores (Laterrot y otros., 1985; Laterrot, 1986; Higgins y Hollands, 1987) sin llegar a cuantificarla, y sobre la base del desarrollo de la enfermedad (Lindhout et al., 1989).

A partir de todos estos criterios, se confeccionó una escala (Tabla 14) para facilitar la evaluación de la respuesta de genotipos de *Solanum lycopersicum* basada en la manifestación de los síntomas.

Tabla 14. Escala para la evaluación cualitativa del desarrollo de los síntomas en hojas de *S. lycopersicum* inoculadas con *P. fulva* en invernadero

Tipo de reacción	Estado	Categoría	Síntoma
Incompatible	1	Reacción inmune	
	2	Reacción hipersensible resistente sin esporulación por el envés	
Compatible	3	Reacción susceptible (esporulación por el envés)	

La misma consta de 3 estados (1-3) que abarcan desde la ausencia de síntomas (estado 1) hasta la aparición de esporulación en el tejido afectado (estado 3). Incluye los criterios actuales utilizados por investigadores especializados en *P. fulva* de la Universidad de Wageningen en Holanda, los cuales solo tienen en cuenta la capacidad del hongo patógeno de superar la resistencia conferida por las plantas portadoras de genes individuales de resistencia y de este modo provocar una interacción compatible sobre su hospedante (Thomma, 2006)¹.

La inoculación artificial con suspensiones conidiales de *P. fulva* es un método fácil, rápido y reproducible para determinar la expresión de la resistencia de genotipos de tomate a este agente patógeno. Su uso en los programas de mejoramiento pudiera reducir tiempo y trabajo. La escala de evaluación utilizada es fácil de aplicar y puede ser empleada por diferentes evaluadores, ya que predomina un estado de síntoma y estos se distribuyen uniformemente. El método pudiera también ser aplicado en otros estudios de interacción planta-patógeno.

¹ Dr. Bart Thomma. Investigador. Jefe del Laboratorio de Fitopatología Molecular. Universidad de Wageningen. The Netherlands. Comunicación Personal, 28 de Junio de 2006.

Las razas de *P. fulva* han sido caracterizadas continuamente desde la mitad de los años treinta del siglo XX (Bailey, 1950; Bailey y Kerr, 1964; Patrick *et al.*, 1971). A partir de 1969, en varios países continuaron estos estudios, como resultado de la aparición de nuevas razas del hongo patógeno capaces de superar la resistencia conferida por los genes *Cf* (Hubbeling, 1978; Laterrot y Clerjeau, 1979; Boukema, 1981; Laterrot *et al.*, 1985; Laterrot, 1986; Higgins y Hollands, 1987; Lindhout *et al.*, 1989).

La raza 2.4, capaz de superar la combinación de los genes *Cf2* y *Cf4* ha sido encontrada en numerosos países (Laterrot y Clerjeau, 1979). La observación de grupos complejos de genes de virulencia presentes en una raza, no motiva una disminución de su capacidad como patógeno dentro de la población. Esto ha sugerido el empleo de cultivares de tomate con más de un nuevo gen de resistencia, debido a la aparición de estas razas (Laterrot, 1981).

Los resultados encontrados en la composición racial de los aislados de *P. fulva* analizados demuestran la presencia de un proceso evolutivo en este hongo fitopatógeno en el país, fenómeno, que puede ser explicado a partir de las diferentes fuentes de variación genética que han sido informadas en la literatura internacional para la especie, tales como la alta proporción de mutaciones en los genes de avirulencia, elevado número de transposones activos (Westerink *et al.*, 2004), recombinación mitótica o la ocurrencia de un ciclo parasexual (Fierro y Martín, 1999). Este proceso evolutivo se evidencia, al igual que ha ocurrido en otros países, en los porcentajes de las diferentes razas en una población estudiada, en el presente caso el 77,78 % de los aislados pertenecen a la raza 0, el 8,33 % a las razas 2 y 4 y el 5,56 % a la raza 2.4. Es de esperar que al incorporarse progenitores resistentes a estas razas, en un futuro no lejano los porcentajes de estas últimas aumenten e inclusive puedan aparecer nuevas razas.

Al relacionar el crecimiento micelial con las razas, no se observa que exista una relación directa; aunque hay una ligera tendencia a que los aislados pertenecientes a las razas 2 y 4 muestren mayor crecimiento, aspecto que no ha sido evidenciado con anterioridad en la literatura consultada.

Las variaciones encontradas entre los diferentes aislados de *P. fulva* en relación con la confirmación de cuatro razas fisiológicas afectando el tomate en las condiciones de cultivo protegido hace necesario la optimización de los futuros planes de defensa del cultivo, los cuales deberán considerar tal variabilidad.

2.3.4.2 Evaluación de la respuesta de genotipos de *Solanum lycopersicum* a la inoculación artificial con *P. fulva*

En la Tabla 15 se reflejan los resultados de la respuesta de diferentes líneas y genotipos silvestres a las razas de *P. fulva*.

Tabla 15. Respuesta de diferentes líneas y genotipos silvestres de tomate frente a las razas de *P. fulva*

Aislado	Razas	Líneas/ Genotipos						
		1*	2	3	4	5	6	7
40	0	R	R	R	R	I	R	R
6	2	R	R	R	R	I	R	R
22	4	S	R	S	R	I	R	R
Quivicán	2.4	S	R	R	R	I	R	R

Leyenda *1: *Cf-Ecp1*; 2: *Cf-Ecp2*; 3: *Cf-Ecp4*; 4: *Cf-Ecp5*; 5: *S. peruvianum*; 6: *S. esculentum* var *cerasiforme*; 7: *S. pimpinellifolium*

Los resultados muestran que la raza 4 fue capaz de superar la resistencia de las plantas que portaban los genes *Cf-Ecp1* y *Cf-Ecp4* y lograr esporular sobre ellas, mientras que la raza más virulenta (raza 2.4) solo logró superar la resistencia conferida por aquellas plantas que portaban el gen *Cf-Ecp1*. Es posible que el aislado 22 identificado como raza 4 tenga mucha mayor virulencia que otros, y esto le permita vencer a la expresión del gen de resistencia *Cf-Ecp4*.

En el caso de las líneas de tomate que portaban los genes de resistencia *Cf-Ecp2* y *Cf-Ecp5*, así como en dos de los genotipos silvestres estudiados (*S. pimpinellifolium* y *S. esculentum* var. *cerasiforme*) se observó respuesta resistente, a diferencia de *S. peruvianum*, que mostró respuesta inmune a la inoculación con todas las razas del agente patógeno analizadas (Figura 6).



A

B

C

Figura 6 Síntomas de los genotipos silvestres de tomate inoculados con la raza 2.4 de *P. fulva* (*S. peruvianum* (A), *S. pimpinellifolium* (B), *S. esculentum* var. *cerasiforme* (C))

La obtención de variedades resistentes contra el hongo patógeno *P. fulva* en tomate tiene una larga historia en Europa (Kerr *et al.*, 1971; Kanwar *et al.*, 1980). La introducción consecutiva de genes de resistencia *Cf* en los cultivares de tomate desde principios de 1940 impuso una enorme presión de selección sobre *P. fulva*, lo cual generó razas con un espectro de virulencia complejo, algunas de las cuales pudieron superar los cinco genes de resistencia *Cf* que han sido identificados hasta el presente.

A partir de ese momento y hasta la actualidad se continúan llevando a cabo estudios intensivos para encontrar nuevos genes *Cf* en especies silvestres de *Solanum*, que le confieran una resistencia más duradera a los cultivares comerciales de tomate. En las líneas que portan genes de resistencia *Cf-Ecp*, se estima que mantendrán una resistencia más perdurable a *P. fulva* (Kruijt, 2004). Sin embargo, las razas de *P. fulva* determinadas en el presente trabajo son capaces de vencer dichos genes y superar la resistencia del hospedante. Este fenómeno pudiera explicarse a partir del surgimiento de combinaciones de razas específicas del hongo desde algunos linajes clonales por la acumulación consecutiva de mutaciones en los diferentes genes *Avr* (Joosten and Wit, 1999; Westerink *et al.*, 2004); aspecto que pudiera encontrarse presente en razas detectadas en Cuba.

Los resultados encontrados no coinciden con los informados por Leski (1969), Kerr *et al.* (1971) y Boukema (1981), los cuales plantean que *S. pimpinellifolium* y *S. peruvianum*

mostraron reacción de susceptibilidad en ensayos realizados en invernaderos. Estos autores no dan detalles sobre el particular como la raza con la que inocularon y los condiciones del experimento.

En la actualidad se conocen más de 1000 genes en las ocho especies de tomate silvestre que agrupa el género *Solanum*, de éstos, solo 50 han sido utilizados en el mejoramiento genético (Warnock, 1991), indicando de esta forma la rica fuente de resistencia que aún queda sin explorar dentro del género.

Los resultados del presente trabajo constituyen una valiosa herramienta de trabajo para los mejoradores en el tomate, pues brinda información sobre tres genotipos silvestres de tomate con fuente de resistencia a *P. fulva*, resaltando sobre todo *S. peruvianum* por su respuesta inmune frente a las razas probadas.

Al analizar los resultados correspondientes a la respuesta de los híbridos cubanos de tomate frente a las 4 razas de *P. fulvum* estudiadas, se pudo notificar que todos manifestaron reacción de susceptibilidad (Tabla 16); se observó una esporulación abundante de las diferentes razas sobre los mismos, indicando que ninguno de estos genotipos portan genes de resistencia a este agente fitopatógeno (Figura 7). Esto indica que para obtener material resistente a este agente fitopatógeno se debe utilizar otros progenitores con genes de resistencia.

Tabla 16 Respuesta de diferentes híbridos de tomate cubanos ante las razas de *P. fulva*

Aislado	Raza	Híbridos			
		LTM -12	LTM-32	LTM-48	LTM-60
40	0	S	S	S	S
6	2	S	S	S	S
22	4	S	S	S	S
Quivicán	2.4	S	S	S	S



LTM 60



LTM 32

Figura 7. Síntomas ocasionados por la raza 2.4 de *P. fulva* sobre híbridos cubanos de tomate

En la literatura nacional consultada no se encontraron resultados acerca de la evaluación de cultivares cubanos frente a este hongo fitopatógeno, la información precedente es escasa y se refiere principalmente a híbridos de importación.

Los resultados encontrados en este trabajo constituyen los primeros en esta temática en el país y sientan las bases metodológicas para el desarrollo del programa de mejoramiento genético del cultivo del tomate frente a este importante agente patógeno en condiciones de cultivo protegido, el cual deberá contemplar la variabilidad patogénica de *P. fulva* observada en las condiciones subtropicales.

2.3.5 Determinación de genes de avirulencia y genes que codifican para las proteínas extracelulares en los aislados de *P. fulva*

2.3.5.1 Amplificación de los genes *Avr* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la Figura 8 se muestra el agrupamiento obtenido a partir de las amplificaciones de los fragmentos de los genes de avirulencia *Avr2*, *Avr4* y *Avr4E* de los aislados de *P. fulva*. Al realizar un corte de hasta un 70% al dendrograma se observa la formación de dos grupos. Este agrupamiento mostró un 97,2 % de buena clasificación según el análisis discriminante.

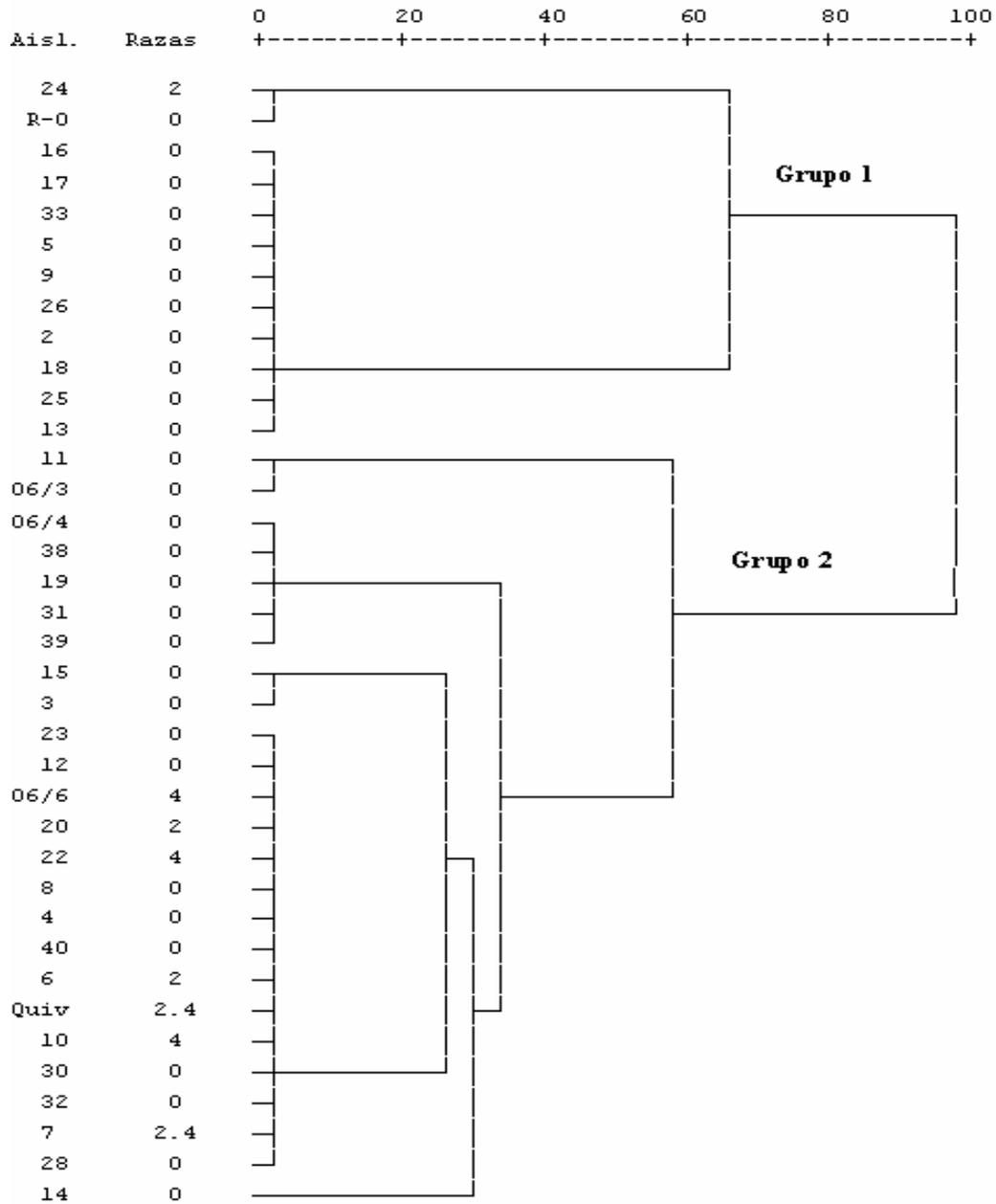


Figura 8. Dendrograma obtenido a partir de la amplificación de los genes de avirulencia (*Avr*) de los aislados de *P. fulva*

De manera general, se encontró una alta variabilidad en la amplificación de los mismos, tanto entre grupos como dentro de un mismo grupo (Tabla 17). En el grupo I se observó 16,6 % de amplificación para el gen *Avr2*, mientras que el grupo II agrupó la mayoría de los aislados de *P. fulva* analizados y mostró los porcentajes más altos de amplificación de

estos factores de avirulencia, un 72% para *Avr2* y más de un 80 % para los genes de avirulencia *Avr4* y *Avr4E*.

Tabla 17 Características de cada grupo formado como resultado del análisis de conglomerados entre 37 aislados de *P. fulva*

Amplificación de genes de avirulencia (<i>Avrs</i>)	RESULTADO DEL CONGLOMERADO	
	I (12)*	II (25)*
<i>Avr2</i>	16,6**	72**
<i>Avr4</i>	0	96
<i>Avr4E</i>	0	84
<i>Avr9</i>	0	0

* indica el número de aislados en cada grupo

** representa el % de los aislados (por columna) dentro del grupo

En este mismo aspecto, se encontró correspondencia entre la amplificación de estos genes y la variabilidad patogénica observada para el hongo fitopatógeno *P. fulva*, ya que los aislados 6, 20, 06/6, 10, 22, 7 y Quivicán, designados como razas 2, 4 y 2.4, respectivamente, lograron amplificar para la totalidad de los genes *Avrs*, a diferencia del aislado 24, determinado como raza 2 que no amplificó para *Avr4* y *Avr4E* al igual que los restantes aislados (raza 0) de ese grupo. Podría ser ésta la causa para que este aislado se ubique en el grupo I. El resto de los aislados (grupo II) determinados como raza 0, amplifican indistintamente para estos genes de avirulencia.

Además, se encontró que ninguno de los aislados estudiados amplificó para el gen de avirulencia *Avr9*, lo que sugiere que éste se encuentra ausente del genoma del hongo patógeno; aspecto que coincide con resultados obtenidos por Rep (2005), el cual ha encontrado cepas naturales deficientes de *Avr4E* y *Avr9*. Esto demuestra que la ausencia de la proteína funcional *Avr9* no afecta la virulencia de *P. fulva* y por tanto, al parecer existen otros genes capaces de provocar la infección.

En la literatura internacional se informa que los genes *Avr* no son requeridos para la patogenicidad de *P. fulva* sobre tomate (Rep, 2005), sin embargo los resultados encontrados indican que la misma depende de un grupo de factores de virulencia que le son

indispensables y que en combinación le permiten al hongo ser más virulento en este hospedante.

2.3.5.1.1 Análisis de las secuencias de los genes *Avr2* y *Avr4* de diferentes aislados cubanos de *P. fulva*

En las Figuras 9 y 10 se muestran los alineamientos de las secuencias de nucleótidos para los genes de avirulencia *Avr2* y *Avr4* de ocho aislados de *P. fulva*. Como se observa, en el caso del gen de avirulencia *Avr2* no se encontraron variaciones en las secuencias de nucleótidos de los aislados analizados al compararlo con el informado en la base de datos del NCBI.

```

      *      100      *      120      *      140      *      160      *
Avr2   : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-1 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-2 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-3 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-4 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-5 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-6 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-7 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
Avr2-8 : GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA : 170
      GAGGGGAGGAACGTGTGAGAATGTCAGGGTAATCACCTTTGCTGTTTTGGTCTTTCGGTTGATGAATGTCAGCTGTGGCATCA

      180      *      200      *      220      *      240      *
Avr2   : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-1 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-2 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-3 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-4 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-5 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-6 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-7 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
Avr2-8 : GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT : 255
      GAACGGGGATTGCGCGAACGATTTTGGATGGAGACAGTGTGAGAAGAGTATGCTAAGCGATGGGATCAATAGGTACTIONCGCTTGT

      260      *      280      *      300      *
Avr2   : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-1 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-2 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-3 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-4 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-5 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-6 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-7 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
Avr2-8 : ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC : 313
      ACCCAGATCTGCCTCAATTCTTCTATGTCCGAGGCATCGAGGCCACATGTGTTCAACC

```

Figura 9 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen de avirulencia *Avr2* de aislados de *P. fulva*

Leyenda: *Avr2* (NCBI); *Avr2-1*: Aislado 6 (raza 2); *Avr2-2*: Aislado 20 (raza 2); *Avr2-3*: Aislado Quivicán (raza 2.4); *Avr2-4*: Aislado 7 (raza 2.4); *Avr2-5*: Aislado 3 (raza 0); *Avr2-6*: Aislado 10 (raza 4); *Avr2-7*: Aislado 22 (raza 4); *Avr2-8*: Aislado 06/6 (raza 4).

De manera contraria, en el gen de avirulencia *Avr4*, se observó una alta proporción de mutaciones.

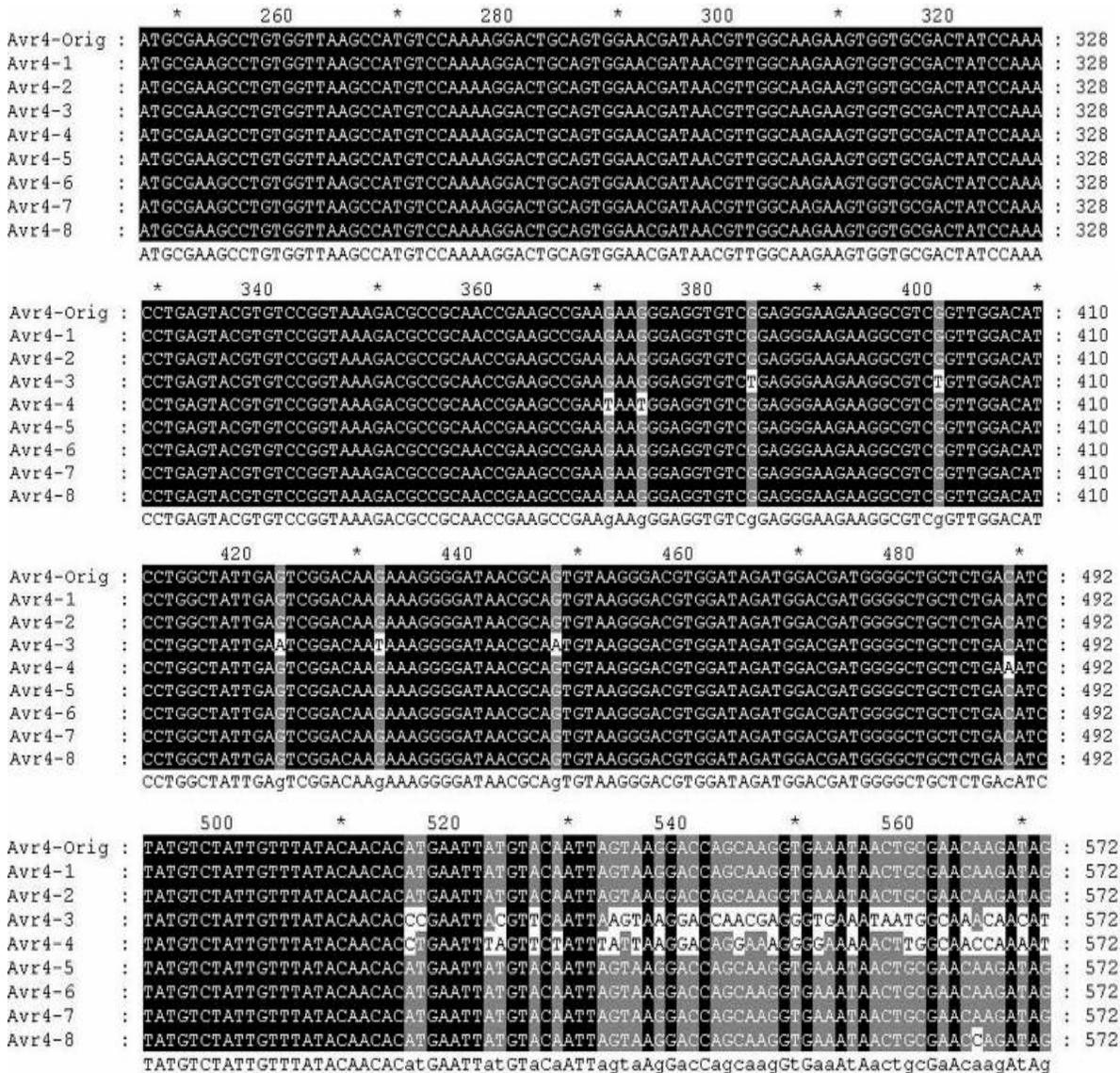


Figura 10 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen de avirulencia *Avr4* de aislados de *P. fulva*

Leyenda: *Avr4-Orig* (NCBI); *Avr4-1*: Aislado 6 (raza 2); *Avr4-2*: Aislado 20 (raza 2); *Avr4-3*: Aislado Quivicán (raza 2.4); *Avr4-4*: Aislado 7 (raza 2.4); *Avr4-5*: Aislado 3 (raza 0); *Avr4-6*: Aislado 10 (raza 4); *Avr4-7*: Aislado 22 (raza 4); *Avr4-8*: Aislado 06/6 (raza 4).

Al parecer la presencia del gen *Avr2* en los aislados cubanos analizados no está relacionada con la variabilidad patogénica observada en los mismos. Este resultado indica que este gen no se debería utilizar para buscar alta variabilidad en el hongo patógeno, dada la conservación de su secuencia en los aislados de las diferentes razas analizadas. Kock (2004) ha informado previamente sobre la conservación en las secuencias del gen *Avr2* en un gran número de aislados, sin notificar la constitución racial de los mismos; a pesar de que en estudios de un grupo menor de aislados encontró mutaciones puntuales.

Al analizar las variaciones detectadas en las secuencias del gen *Avr4*, se halló que estas estuvieron asociadas fundamentalmente a sustituciones de nucleótidos (Tabla 18).

Tabla 18 Mutaciones presentes en el gen de avirulencia *Avr4* en aislados de *P. fulva*

Gen	Aislado	Raza	Mutación		Origen
			Tipo	Número	
<i>Avr4</i>	Quivicán	2.4	G x T	4	La Habana
			T x G	1	
			C x A	3	
			A x C	4	
			A x T	5	
			T x A	3	
			G x A	4	
			A x G	2	
			C x G	2	
	7	2.4	G x T	5	S. Spíritus
			T x G	2	
			C x A	4	
			A x C	5	
			A x T	4	
			T x A	2	
			G x A	7	
			A x G	3	
			C x G	1	
	06/6	4	A x C	1	C. de Ávila
	10	4	No	-	C. Habana
22	4	No	-	Cienfuegos	
6	2	No	-	Granma	
20	2	No	-	S. de Cuba	
3	0	No	-	V. Clara	

En los aislados Quivicán y 7 (raza 2.4), pertenecientes a las provincias de La Habana y Sancti Spíritus, se detectó el mayor número de mutaciones con 36 y 28, respectivamente. En estos aislados, la mayor sustitución de nucleótidos se encontró en las últimas 57 bases (de la 515 hasta la 572) (Figura 10).

Las sustituciones de nucleótidos de mayor frecuencia estuvieron asociadas a los cambios A x T para el aislado Quivicán, y G x T, A x C y G x A para el aislado 7. Es posible que estas variaciones sean la causa de la alta virulencia de estos aislados. La comparación con otros resultados publicados con este fin no es posible ya que los métodos y los fragmentos empleados del gen de avirulencia (*Avr4*) son distintos.

No obstante, se ha informado similar tendencia en el polimorfismo para el gen *Avr4* al analizar 44 y 81 cepas de *P. fulva*, respectivamente, procedentes de diferentes regiones geográficas del mundo (Kock, 2004; Stergiopoulos et al., 2007 a, b). Estos autores informan que los cambios de avirulencia a virulencia observados en sus cepas estuvieron asociados con eliminaciones, mutaciones puntuales o la inserción de elementos semejantes a transposones en los genes *Avr*.

Por otra parte, la secuenciación del gen *Avr4* permitirá el diseño y empleo de cebadores específicos para la detección de los aislados más virulentos (Quivicán y 7), pertenecientes a la raza 2.4 determinada en el país, aspecto novedoso para el diagnóstico molecular de este fitopatógeno.

En el caso del aislado 06/6 (raza 4), perteneciente a la provincia de Ciego de Ávila, se reveló una mutación puntual (A x C) en la base número 566 que diferenció este aislado del 10 y el 22, determinados como la misma raza.

Es importante tener en cuenta lo informado por Joosten *et al.* (1997) quienes comunicaron que la simple detección de mutaciones puntuales en el gen *Avr4* es capaz de crear alelos virulentos en este fitopatógeno.

El resto de los aislados determinados como razas 2 y 0 no mostraron variaciones en sus secuencias para el gen *Avr4*, evidenciando de esta forma su conservación para ambos genes (*Avr4* y *Avr2*).

2.3.5.2 Amplificación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecp*) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la amplificación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecps*) se encontró variabilidad entre los aislados.

Como puede apreciarse en la Figura 11, al realizar un corte de hasta un 70 % al dendrograma se observa la formación de dos grupos. Este agrupamiento mostró un 100 % de buena clasificación según el análisis discriminante.

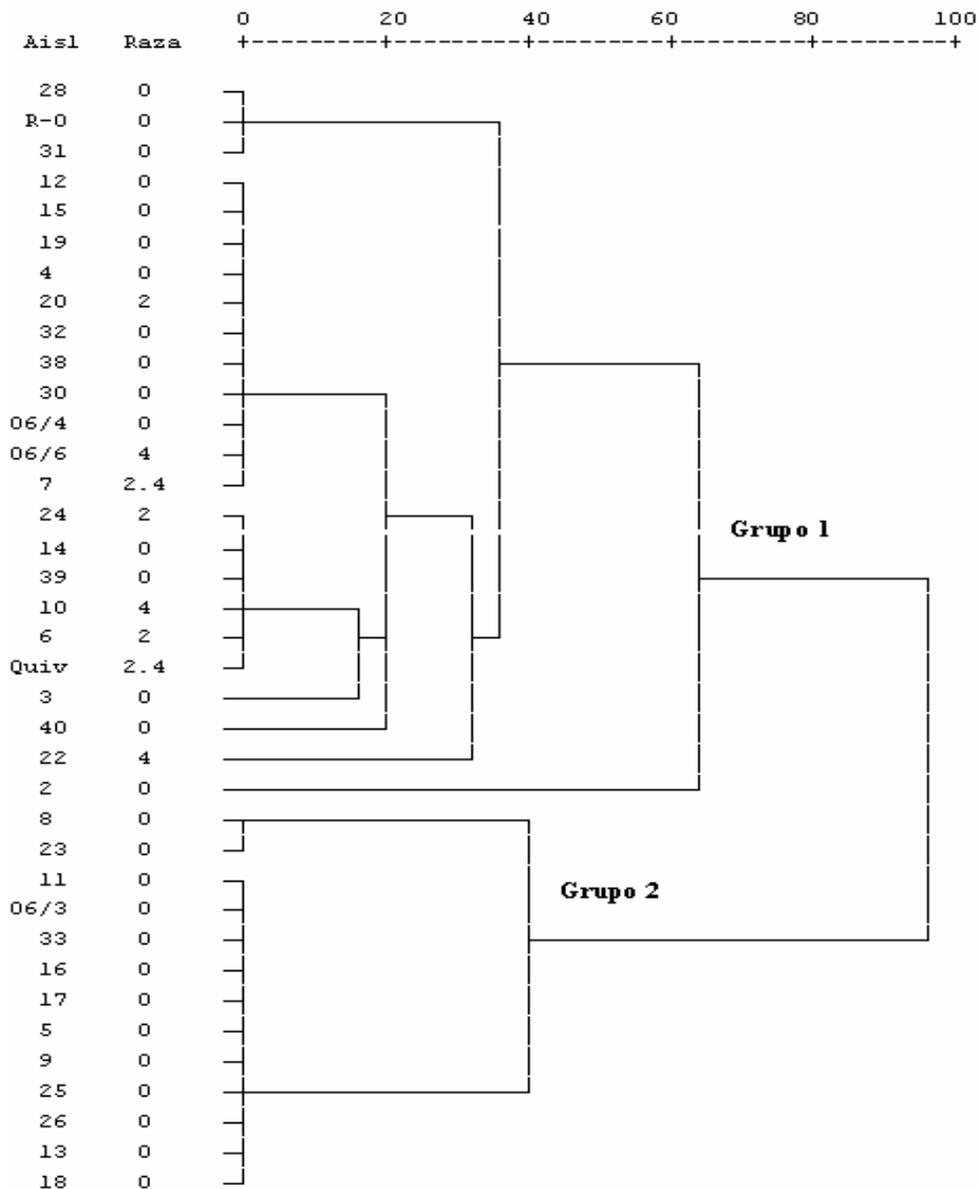


Figura 11 Dendrograma obtenido a partir de la amplificación de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecps*) en los aislados de *P. fulva*

La Tabla 19 refleja cómo en el grupo I, representado por más del 50 % de los aislados, es donde se observan los mayores porcentajes de amplificaciones para la mayoría de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecp*), sobresaliendo *Ecp2* con un 95,8%. En este mismo grupo el porcentaje más bajo de amplificación se encontró para el gen que codifica para la proteína extracelular *Ecp1*. Los aislados representados en el grupo I fueron los más virulentos al invadir los tejidos y esporular eficientemente sobre los

genotipos de tomate evaluados, a diferencia de aquellos ubicados en el grupo II que solo amplificaron para *Ecp1* (100 %) y *Ecp5* (15,4 %) y mostraron una menor virulencia.

La virulencia de las razas 2, 4, y 2.4 ubicadas en el grupo I está más relacionada con la presencia de la proteína *Ecp2* (100 %) que con la *Ecp1*.

Tabla 19 Características de cada grupo formado como resultado del análisis de conglomerados entre 37 aislados de *P. fulva*

Expresión de los genes que codifican para las proteínas extracelulares (<i>Ecps</i>)	RESULTADO DEL CONGLOMERADO	
	I (24)*	II (13)*
<i>Ecp1</i>	61,5**	100**
<i>Ecp2</i>	95,8	0
<i>Ecp4</i>	83,3	0
<i>Ecp5</i>	87,5	15,4

* indica el número de aislados en cada grupo

** representa el % de los aislados (por columna) dentro del grupo

Todos los aislados determinados como razas 2, 4 y 2.4 amplificaron para todos los genes que codifican para las proteínas extracelulares, excepto el aislado 20 (raza 2) para la *Ecp1* y el 22 (raza 4) para la *Ecp1* y *Ecp5*. Esto es la base para nuevas investigaciones donde se pueda esclarecer la no amplificación de todas las *Ecp* por estos aislados.

Estos resultados coinciden con diferentes autores, al plantear que ambos genes (*Ecp 1* y *Ecp 2*) son importantes factores de virulencia de *P. fulva* (Joosten and Wit, 1999; Kruijt, 2004; Kock, 2004; Rep, 2005). Se plantea que el gen que codifica para la proteína *Ecp1* juega un papel importante en la invasión del hongo en el tejido a diferencia de la *Ecp2* que lo tiene en la esporulación. Ackerveken *et al.* (1993), Laugé *et al.* (1998 a, 2000) y Thomma y col. (2006), plantean que los genes que codifican para las proteínas extracelulares son secretados por todas las cepas de *P. fulva*. Sin embargo, los resultados de caracterización realizados en el presente trabajo, coinciden con los informados en la primera teoría y se ven confirmados por los estudios de patogenicidad realizados.

Al analizar los resultados de los genes *Avrs* (Figura 8), como los genes que codifican para las proteínas *Ecps* (Figura 11) para los aislados determinados como raza 0, se detectan subdivisiones dentro de la raza, aspecto no informado anteriormente. Este hallazgo

constituye un aspecto novedoso, el cual está sustentado por los análisis genéticos realizados.

En la literatura internacional son escasos los trabajos de caracterización de *P. fulva* donde se combinen aspectos culturales, patogénicos y moleculares por lo que los conocimientos generados de estas investigaciones han conllevado a análisis parciales de la variabilidad del mismo.

Los resultados obtenidos en los estudios de la caracterización de *P. fulva* repercutirán positivamente en el cultivo del tomate bajo condiciones de cultivo protegido, así como en las nuevas medidas de control, y sentarán las bases metodológicas para asistir a los futuros programas de mejoramiento genético.

CONCLUSIONES

1. Los aislados de *P. fulva*, confirmados patogénica y molecularmente, mantienen características culturales homogéneas que no permiten ser relacionadas con la variabilidad patogénica.
2. Las temperaturas superiores a 25 °C y humedades relativas inferiores al 80 % son limitantes para el crecimiento del hongo patógeno. La germinación conidial ocurre a temperatura de 25 °C y en humedades relativas superiores al 90 %; con excepción en presencia de agua libre a 30 °C.
3. Las diferencias notadas en el crecimiento y esporulación de los aislados de *P. fulva* en los diferentes medios de cultivo y condiciones estudiados no guardó relación con las razas determinadas.
4. Se elaboró una escala de evaluación, a partir de la sintomatología causada por los aislados de *P. fulva* en las condiciones de Cuba, que permitió la diferenciación de cuatro razas fisiológicas (0, 2, 4, 2.4) determinadas y distribuidas aleatoriamente en el país.
5. Los genotipos silvestres *S. pimpinellifolium*, *S. esculentum* var. *cerasiforme* y *S. peruvianum*, mostraron resistencia e inmunidad, respectivamente; mientras que los híbridos cubanos *LTM-12*, *LTM-32*, *LTM-48* y *LTM-60* mostraron susceptibilidad a las cuatro razas de *P. fulva*.
6. La variabilidad genética de los aislados de *P. fulva* expresada mediante los genes de avirulencia (*Avr*) mostró que las razas 2, 4 y 2.4 presentan los genes *Avr2*, *Avr4* y *Avr4E* y genes que codifican para las proteínas extracelulares *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4* y *Ecp5*; con excepción del aislado 24 (raza 2) *Avr4*, 20 (raza 2) *Ecp1* y el 22 (raza 4) *Ecp1* y *Ecp5*.

7. Las diferencias detectadas en los genes de avirulencia (*Avr*) y genes que codifican para las proteínas extracelulares (*Ecp*) en los aislados determinados como raza 0 evidencian subdivisiones dentro de la misma.

BIBLIOGRAFIA

1. **Ackerveken, G. F. J. M. van de**; Kan, J. A. L. van; Joosten, M. H. A. J.; Muisers, J. M.; Verbakel, H. M. and Wit, P. J. G. M. de (1993): Characterization of two putative Pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 6: 210-215.
2. **Ackerveken, G. F. J. M. van den**; Kan, J. A. L. van and Wit, P. J. G. M. de (1992): Molecular analysis of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene- for-gene hypothesis. *Plant Journal* 2(3): 359-366.
3. **Almandoz, Julia.** (2001): Evaluación de nuevos fungicidas de origen químico y biológico para el control del tizón temprano, causado por *Alternaria solani* Sorauer, en el cultivo del tomate. Tesis en opción al grado académico de Master en Protección de Plantas. Universidad Agraria de La Habana, 86 p.
4. **Altschul, S. F.**; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J. H.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI – BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
5. **Arnold, G. R. W.** (1986): Beitrag zur kenntnis der pilzflora Kubas. V. Die gattung *Cercospora*, Fres. (Deuteromycotina, Hyphomycetes). *Feddes Repertorium* 100: 639-650.
6. **Arocha, Yaima.**; Peralta, Esther Lilia and Jones, P. (2004): Validation of a molecular diagnostic system for phytoplasmas associated with sugarcane yellow leaf síndrome (YLS) in Cuba and its comparison with a YLS field diagnostic method. *Protección vegetal* 19(1):19-25.
7. **Arx, J. von** (1983): *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.* 86, p. 47-48.
8. **Bailey, D. L.** (1950): Studies in racial trends and constancy in *Cladosporium fulvum* Cooke. *Can. J. Res. C* 28: 535-565.

9. **Bailey, D. L.** and Kerr, E. A. (1964): *Cladosporium fulvum* race 10 and resistance to it in tomato. *Can. J. Bot.* 42: 1556-1558.
10. **Berbee, M. L.** and Taylor, J. W. (1992): *Mol. Biol. Evol* 9:278-284.
11. **Bernal, Blanca.**; Rivero, L., Fernández, E. y Pérez, Wendolyn. (2001): Manejo de plagas en híbridos de tomate bajo condiciones de cultivo protegido. *Fitosanidad* 5(1): 57-61.
12. **Blancard, D.** (1992): Enfermedades del tomate. Observar, Identificar, y Luchar. INRA. Ed. Mundi-Prensa, 212p.
13. **Bond, T. E. T.** (1938): Infection experiments with *Cladosporium fulvum* Cooke and related species. *Ann. Appl. Biol.* 25: 277-307.
14. **Bonito, R. di**; Elliot, M. L. and Desjardin, E. A. (1995): Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2809-2810.
15. **Boukema, I. W.** (1981): Races of *Cladosporium fulvum* Cooke (*Fulvia fulva*) and genes for resistance in the tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) *Proceedings of the meeting of the Eucarpia Tomato Working Group*, Avignon, 18-21 May. p. 287-292.
16. **Braun, U.**; Crous, P. W.; Dugan, F.; Groenewald, J. Z. and de Hoog, G. S. (2003): Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. Nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. Str. *Mycol. Progress* 2: 3-18.
17. **Bridge, P. D.** and Arora, D. K. (1998): *Interpretation of PCR Methods for Species Definition. Applications of PCR in Mycology.* Edited by P.D. Bridge, D.K Arora, G.A Reddy and R. P. Elander. CAB International, Wallingford, Oxford, p.63-84.
18. **Burg, H. A.** van den; Westerink, N.; Fracoijs, K. J.; Roth, R.; Woestenenk, E.; Boeren, S.; Wit, P. J. G. M. de; Joosten, M. H. A. J. and Vervoort, J. (2003): Natural disulfide bond-disrupted mutants of *Avr4* of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent *Cf-4* mediated

resistance, but retain their chitin binding ability. *J. Biol. Chem.* 278: 27340-27345.

19. **Busto, A. del** y Rivas, E. (2004): Incidencia de plagas fungosas en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en las casas de cultivo de la Empresa de Cítricos” Capitán Tomas”, de Pinar del Río. Tesis de Maestría, UNAH, La Habana, 75p.
20. **Butler, E. J.** and Jones, S. G. (1949): *Tomato leaf mould, Cladosporium fulvum Cooke*. London: Macmillan 123 p.
21. **CABI.** (2004). CABInternational Crop Protection Compendium (CD-R). Londres. Ed. Wallingford. UK: www.cabicompendium.org/cpc.
22. **Cardoza, Hortensia.**; Casanova, A.; Rey, R. y Aranguren, D. (2006): La Plasticultura en la agricultura actual: Diez años de cultivo protegido en Cuba. Evento 35 Aniversario del Instituto de Investigaciones Hortícolas” Liliana Dimitrova”, La Habana, CD-R, ISBN: 959-7111-39-X
23. **Casadesus, L.**; Rojas, T.; Erizuela, A. y Sánchez, A (1985): *Micología*. Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Dpto de Microbiología y Virología, 692p.
24. **Castañeda, R. R. F.** (2001): Identificación de Hifomicetes causantes de enfermedades comunes en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INIFAT, Ciudad de la Habana, 107p.
25. **Castellanos, L.** (2000): Nocividad, epidemiología y manejo del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor) en el cultivo de la papa. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las Villas, Cuba 118p.
26. **Castellanos, L.**, Stefanova, Marusia., Villa, Pilar., Irimia, Arais., González, Mercedes. y Lorenzo, Maria E. (2005): Ensayos con el producto biológico Glutucid para el control de *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* en el tomate en casas de cultivo protegido. *Fitosanidad* 9(2): 39-43.

27. **Chen, W.** (1992): Restriction fragment length polymorphism in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. *Phytopathology* 82: 1467-1472.
28. **Chen, W.**; Hoy, J. W and Schneider, R. W. (1992): Species-specific polymorphism in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Experimental Mycology* 16: 22-34.
29. **Chupp, C** and Sherf, A. F. (1960): *Vegetable disease and their control* Constable and company, London, p. 541-545.
30. **Ciferri, R.** (1952): A few critical Italian fungi. *Atti* 10: 237-247.
31. **Cooke, M. C.** (1883): New American fungi. *Grevillea* 12: 32.
32. **Correa-Victoria, F.J.** y Zeigler, R. S. (1993): Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot" breeding site in eastern Colombia. *Plant Disease* 77:1029-1035.
33. **Crous, P. W.**; Aptroot, A.; Kang, J.; Braun, U. and Wingfield, M. J. (2000): The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Stud. Mycol.* 45: 107- 121.
34. **Crous, P. W.** and Braun, U. (2003): *Mycosphaerella* and its anamorphs. 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. *CBS Biodiv. Ser.* 1, p. 1-571.
35. **Crous, P. W.**; Kang, J. C. and Braun, U. (2001): A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081-1101.
36. **Curtis, M. D.**; Gore, J. and Oliver, R. P. (1994): The phylogeny of the tomato leaf mold fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by análisis of rDNA sequences. *Current Genetic* 25: 318-322.
37. **Day, P. R.** (1957): Mutation to virulence in *Cladosporium fulvum*. *Nature* 179: 1141.
38. **Díaz, Maricela.** (2000): Escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba: Caracterización, diversidad y diagnóstico de su agente causal *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA, La Habana, 78p.

39. **Dixon, M. S.;** Hatzixanthis, K.; Jones, D. A.; Harrison, K. and Jones, J. D. G. (1998): The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10: 1915-1925.
40. **Dixon, M. S;** Ones, D.; Keddie, J.; Thomas, C.; Harrison, K. and Jones, J. D. G. (1996): The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises 2 functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Plant Cell* 84: 451-459.
41. **Edel, V.** (1998): *Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. Applications of PCR in Mycology.* Edited by P. D. Bridge, D. K Arora, G. A Reddy and R. P. Elander. CAB International. Wallingford, Oxford, p. 1-20.
42. **Eibel, P.;** Wolf, G. A and Koch, E. (2005): Detection of *Tilletia carie*, causal agent of common bunt of wheat, by ELISA and PCR. *J. Phytopathology* 153: 297-306.
43. **Elenkov, E y** Jristova, E. (1978): *Enfermedades e insectos dañinos en hortalizas.* Edición Jristo G. Danov- Plovdiv. 330p.
44. **Ellis, M. B.** (1971): *Dematiaceous Hyphomycetes.* Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608p.
45. **Ellis, M. B.** (1976): *More Dematiaceous Hyphomycetes.* Commonwealth Mycological Institute, Kew, 507p.
46. **Esse, H. P. van.;** Thomma, B. P. H. J.; Klososter, J.W. van't and Wit, P. J. G. M. de (2006): Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast. *Journal of Experimental Botany* 57(3):599-608.
47. **Farr, D. F.;** Bills, G. F.; Chamuris, G. P and Rossman, A. Y. (1995): *Fungi on Plants and plants products in the United States,* APS Press, St. Paul, Second Edition, 1252p.
48. **Fey, D.;** Oldfield, R. J. and Bridger, R. C. (1979): *A colour atlas of pathogenic fungi.* Edit.: Barry, G. Wolfe Medical Publication Ltd., London. p.168.
49. **Fierro, F.** and Martin, J. F. (1999): Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 25: 1-17.

50. **Flor, H. H.** (1942): Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-69.
51. **Flor, H. H.** (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annu.Rev.Phytopathol.* 9:275-96.
52. **Fox, R. T. V.** (1997): Fungal goes in your garden. 36. Leaf Moulds. *Mycologist* 11: 88.
53. **Gamborg, O. L.**; Miller, R.A.; Ojima, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 148-151.
54. **Gómez, Olimpia**; Casanova, A.; Laterrot, H. y Anais, G. (2000): *Mejora Genética y Manejo del Cultivo del Tomate para la Producción en el Caribe*. IIHLD. La Habana, 159p.
55. **Goodwin, S. B.** and Zismann, V. L. (2001): Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648-658.
56. **Higgins, V. J** and Hollands, J. (1987): Prevalent races of *Cladosporium fulvum* in southern Ontario and their benomyl sensitivity. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9:32-35.
57. **Ho, M. H. M.**; Castañeda, R. F. R.; Dugan, F. M. and Jong, S. C. (1999): *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and expanded Key. *Mycotaxon* 72:115-157
58. **Holliday, P.** and Mulder, J. L. (1976): C. M. I Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 48. *Fulvia fulva*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
59. **Hooven, H. W. van de**, Burg, H. A. van den, Vossen, P. J. M. J., Boeren, S., Wit, P. J. G. M. de and Vervoort, J. (2001): Disulfide bond structure of the *Avr9* elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a cystine knot. *Biochemistry* 40: 3458-3466.
60. **Hubbeling, N.** (1978): Breakdown of resistance of the *Cf5* gene in tomato by another new race of *Fulvia fulva*. *Med. Fac. Landb. wet. Rijksuniv. Gent*, 43: 891-894.

61. **Iglesia, Aleika.** (2005): Raquitismo de los retoños de la cana de azúcar (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*): perfeccionamiento del diagnóstico y la evaluación de la resistencia varietal. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA, La Habana, 104p.
62. **Jones, D. A.**; Dickinson, M.; Balint-Kurti, P.; Dixon, M.; and Jones, J. (1993): Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interaction*. 6: 348-357.
63. **Jones, D. A.**; Thomas, C. M.; Hammond-Kosak, K. E.; Balint -Kurti, P. J. and Jones, J. D. G. (1994): Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-790.
64. **Jones, J. B.**; Jones, J. P.; Stall, R. E. y Zitter, T. A. (1997): *Compendium of tomato diseases*. APS Press, USA, 73p.
65. **Joosten, M. H. A. J.**; Cozijnsen, A. J. and Wit, P. J. G. M. de (1994): *Nature* (Lond). 367: 384-387.
66. **Joosten, M. H. A. J.** and Wit, P. J. G. M. de (1989): Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn *Fulvia fulva*) as 1.3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiol*. 89: 945-951.
67. **Joosten, M. H. A. J.** and Wit, P. J. G. M. de (1999): The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annu.Rev.Phytopathol*. 37: 335-367.
68. **Joosten, M. H. A. J.**; Verbakel, H. M.; Nettekoven, M. E.; Leeuwen, J. van.; Vossen, R. T. M. van der and Wit, P. J. G. M. de (1995): The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 46: 45-59.
69. **Joosten, M. H. A. J.**; Vogelsang, R.; Cozijnsen, T. J.; Verberne, M. C. and Wit, P. J. G. M. de (1997): The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents *Cf-4*

mediated resistance by producing unstable *Avr4* elicitors. *Plant Cell* 9: 367-379.

70. **Kan, J. A. L. van**; Ackerveken, G. F. J. M. van den and Wit, P. J. G. M. de (1991): Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *Avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 52-59.
71. **Kanwar, J. S.**; Kerr, E. A. and Harney, P. M. (1980): Linkage of *Cf-1* to *Cf-11* genes for resistance for resistance to tomato leaf mold *Cladosporium fulvum* Cke. *Rep. Tomato Genet Coop.* 30: 20-21
72. **Kerr, E. A.**; Patrick, Z. A. and Bailey, D. L. (1971): Resistance in tomato species to new races of leaf mold (*Cladosporium fulvum* Cke.). *Hortic. Res.* 11: 84-92.
73. **Kirk, P. M.** (1986 a): CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 841. *Cladosporium alli-cepae*. *Mycopathologia* 94:175 – 176.
74. **Kirk, P. M.** (1986 b): CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 842. *Cladosporium alli-cepae*. *Mycopathologia* 94:173 – 174.
75. **Kock, M. J. D. de** (2004): Recognition of *Cladosporium fulvum* Ecp2 elicitor in tomato and non-host plants. Thesis Wageningen University, The Netherlands, 150p (ISBN: 90-8504-082-5)
76. **Kock, M. J. D.**, Brandwagt, B. F., Bonnema, G., Wit, P. J. G. M. de and Lindhout, P. (2005): The tomato Orion locus comprises a unique class of *Hcr9* genes. *Molecular Breeding* 15: 409-422.
77. **Kooman-Gersmann, M.**, Vogelsang, R., Hoogendijk, E. C. M. and Wit, P. J. G. M. de (1997): Assignment of amino acid residues of the *Avr9* peptide of *Cladosporium fulvum* that determine elicitor activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 821-829.
78. **Kruijt, M.** (2004): Molecular evolution of *Cladosporium fulvum* disease resistance genes in wild tomato. Thesis Wageningen University, The Netherlands, 136p (ISBN: 90-8504-081-7)

79. **Kruijt, M.**, Kock, M. J. D. G. de and Wit, P. J. G. M. de (2005): Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Mol. Plant Pathol.* 6, p.85-97.
80. **Laterrot, H.** (1981): Premier bilan de l'étude de l'efficacité envers *Cladosporium fulvum* de 24 nouvelles origines résistantes de tomate. *Escarpia Tomato Meeting*, Avignon: 293-298.
81. **Laterrot, H.** (1986): Race 2.5.9 a new race of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) and sources of resistance in tomato. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 92: 305-307.
82. **Laterrot, H.** and Clerjeau, M. (1979): Détermination des pathotypes de *Fulvia fulva* (= *Cladosporium fulvum*) présents sur tomate dans les serres françaises. *Annls Amél. Pl.* 29: 447-462.
83. **Laterrot, H.**; Gertagh, M.; Ester, A.; Stamova, L. (1985): Race 2.5, a new race of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 91: 45-47.
84. **Laugé, R.**, Dmitriev, A. P., Joosten, M. H. A. J. and Wit, P. J. G. M. de (1998 a): Additional resistance gene(s) against *Cladosporium fulvum* present on the Cf-9 introgression segment are associated with strong PR protein accumulation. *Mol Plant-Microbe Interact.* 11: 301-308.
85. **Laugé, R.**, Goodwin, P. H., Wit, P. J. G. M. de and Joosten, M. H. A. J (2000): Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant J.* 23: 735-745.
86. **Laugé, R.**; Joosten, M. H. A. J.; Ackerveken, G. F. J. M. van den; Broek, H. W. J. van den and Wit, P. J. G. M. de (1997): The in planta-produced extracellular proteins *Ecp1* and *Ecp2* of *Cladosporium fulvum* are virulence factors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 725-734.
87. **Laugé, R.**; Joosten, M. H. A. J.; Haanstra, J. P. W.; Goodwin, P. H.; Lindhout, P. and Wit, P. J. G. M. de (1998 b): Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9014-9018.

88. **Lazarovits, G.** and Higgins, V. J. (1976a): Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Can. J. Bot.* 54: 224-234.
89. **Lazarovits, G.** and Higgins, V. J. (1976b): Ultrastructure of susceptible resistant and immune-reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.* 54: 235-249.
90. **Lee, S. B.** and Taylor, J. W. (1992): Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9: 636-653.
91. **Lenne, J. M.** (2002): Glossary of plant pathological terms. CAB International. Plant pathologist's Pocketbook (eds. Waller, J. M, Lenne, J. M, Waller, S. J). pp. 470-486.
92. **Leski, B.** (1969): *Solanum pennelli* Correll as a new host plant for the genus *Cladosporium fulvum* Cooke. *Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences* 17: 181-185.
93. **Leung, H.**, Nelson, Rebeca J., and Leach, J. E. (1993): Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: *Advances in Plant Pathology*. Academic Press, p. 157-205.
94. **Levesque, C. A.**; Vrain, C. T. and deBoer, S. H. (1994): Development of a species-specific probe for *Pythium ultimum* using amplified ribosomal DNA. *Phytopathology* 84: 874-878.
95. **Li, K. N.**; Rouse, D. I. and German, T. L. (1994): PCR primer that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 60(12): 4324-4331.
96. **Lindhout, P.**; Korta, W.; Cislik, M.; Vos, I and Gerlagh, T. (1989): Further identification of races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato originating from the Netherlands, France and Poland. *Neth. J. Pl. Path.* 95: 143-148.

97. **Lobuglio, K. F.**; Pitt, J. I. and Taylor, J. W. (1993): Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia* 85: 592-604.
98. **López, María Ofelia.** (1999): Contribución al estudio y diagnóstico de la micobiota patógena de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. Resumen de tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INISAV, 31p.
99. **Luderer, R.**, Kock, M. J. D. de, Dees, R. H. L., Wit, P. J. G. M. de and Joosten, M. H. A. J. (2002): Functional analysis of cysteine residues of *Ecp* elicitor proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant Pathology* 3: 91-95.
100. **Makemson** (1918): The leaf mould of tomatoes caused by *Cladosporium fulvum*. *Michigan Acad Sci. Ann. Rept.* 20: 309-348.
101. **Marrero, T. A.** (2003): Principales plagas y enfermedades de las hortalizas en cultivo protegido. Bases del Manejo Integrado de Plagas. Conferencia del 2^{do} Curso Internacional de Cultivo Protegido. IIHLD, La Habana, CD-R.
102. **Martínez, Yamila.**; Fonseca, D.; Quiñónez, M.; Peralta, E. L. (2001): Evaluación de parámetros analíticos para la detección de geminivirus que afectan el cultivo del tomate. *Protección vegetal* 16(1):55-61.
103. **Mayea, S.**; Herrera, L. y Andreu, C. M. (1983): *Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba*. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, p.234-235.
104. **McDonald, B. A** y Linde, C. (2002): Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.
105. **MINAGRI** (2006): Estrategia fitosanitaria para la campaña de frío 2006-2007. CNSV, La Habana, 3p.
106. **Moller, E. M.**; Bahnweg, G.; Sandermann, H. and Geiger, H. H. (1992): A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from

filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20(22):6115-6116.

107. **Mysore, K. S.** and Ryu, C. M. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 9: 97-104
108. **Nielsen, P. S.**; Clark, A.J.; Oliver, R. P.; Huber, M. and Spanu, P. D. (2001): *HCF-6*, a novel class II hydrophobin from *Cladosporium fulvum*. *Microbiol. Res.* 156: 59-63.
109. **Novo, R.** (1983): *Microbiología agrícola: Ejercicios prácticos*. ISCAH, p. 92-95
110. **Oliver, R. P.** (1992): A model system for the study of plant-fungal interactions: tomato leaf mold caused by *Cladosporium fulvum*. In: Verma DPSE (ed), *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, CRC Press, Boca Raton, Florida 97-106.
111. Oliver, R. P.; Henricot, B. y Segers, G. (2000): *Cladosporium fulvum*, cause of leaf mould of tomato. In: *Fungal pathology* (Kronstad, J. W., ed.), 65-91: Kluwer Academic Publishers.
112. Patrick, Z. A., Kerr, E. A and Bailey, D. L. (1971): Two races of *Cladosporium fulvum* new to Ontario and further studies of Cfl resistance in tomato cultivars. *Can. J. Bot.* 49: 189-193.
113. **Peteira, Belkis.**; Pérez, S y Fraga, Y. (1999): A modified DNA extraction minipreparation protocol for RAPDs análisis of genetic variability in *Alternaria solani*. *Protección vegetal* 14(2):121-124.
114. **Polack, L. A.** y Mitidieri, M. S. (2002): *Producción de tomate diferenciado: Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades*. Ed. INTA, Buenos Aires, Argentina, 18 p.
115. **Quiñónez, Madelaine.**; Fonseca, D y Martínez, Y. (2004): Comparación de métodos de hibridación de ácidos nucleicos para el diagnóstico del virus del encrescamiento amarillo del tomate (TYLCV) en Cuba. *Protección vegetal* 19 (1):26-32.

116. **Rep, M.** (2005): Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters* 253: 19-27.
117. **Rivas, M. E.** (1981): Biología, Epifitología y lucha contra *Stemphylium solani* Weber en tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Tesis presentada para optar por el grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. ISCAH. La Habana, 87p.
118. **Rivera, G.** (1995): Introducción a la Fitopatología. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar. Universidad Nacional de Heredia, Costa Rica. Serie Recursos Naturales y Desarrollo. No 3, 163p.
119. **Scholtens-Toma, I. M. J.;** Wit, G. J. M. de and Wit, P. J. G. M. de (1989): Characterization of elicitor activities of apoplástico fluids isolated from tomato lines infected with new races of *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Plant Pathology*. Vol.95, Supplement 1:161-168.
120. **Segers, G. C.;** Hamada, W.; Oliver, R. P. and Spanu, P. D. (1999): Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 644-652.
121. **Shen, G.;** Wang, Y. C.; Zhang, W. L and Zheng, X. B. (2005): Development of a PCR assay for the molecular detection of *Phytophthora boehmeriae* in infected cotton. *J. Phytopathology* 153: 291-296.
122. **Sivanesan, A.** (1984): *The Bitunicat Ascomycetes and their anamorphs*. J. Cramer, Vaduz, 701p.
123. **Soltis, D. E** and Soltis, P. S. (1999): Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing* (Soltis, D. E., Soltis, P. S. and Doyle, J. J., eds.). Chapman & Hall, pp. 1-41.
124. **Spanu, P.** (1997): *HCf-1*, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*, *Gene* 193: 89-96.
125. **Spanu, P.** (1998): Deletion of *HCf-1*, a hydrophobin gene of *Cladosporium fulvum*, does not affect Pathogenicity in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52: 323-334

126. **Sreenivasaprasad, S.**; Sharada, K.; Brown, A. E and Mills, P. R (1996): PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45: 650-655.
127. **Stergiopoulos, I.**; Kock, M. J. D. de; Lindhout, P. and Wit, P. J. G. M. de (2007a): Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 20:1271-1283.
128. **Stergiopoulos, I.**; Groenewald, M.; Staats, M.; Lindhout, P.; Crous, P. W and Wit, P. J. G. M. de (2007 b): Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 415-429.
129. **Takken, F. L. W.**, Schipper, D., Nijkamp, H. J. J. and Hille, J. (1998): Identification of Ds-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *The Plant Journal* 14: 401-411.
130. **Thomas, C. M.**, Jones, D. A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P. J., Hatzixanthis, K. and Jones, J.D.G. (1997): Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *The Plant Cell* 9: 2209-2224.
131. **Thomma, B. P. H. J.**; Bolton, M. D.; Clergeot, P. H and Wit, P. J. G. M. de (2006): Nitrogen controls in planta expression of *Cladosporium fulvum Avr9* but no other effector genes. *Molecular Plant Pathology* 7(2):125-130.
132. **Thomma, B. P. H. J.**; Esse, H. P. van; Crous, P. W.; and Wit, P. J. G. M. de (2005): *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a Highly specialized plant pathogen as model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Molecular Plant Pathology* 6(4): 379-393.
133. **Urtiaga, R.** (1986): Índice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba. Barquimisisimeto, Nuevo Siglo, 202p.

134. **Vervoort, J.**; Hooven, H. W. van den; Berg, A.; Vossen, P. J. M. J.; Vogelsang, R.; Joosten, M. H. A. J. and Wit, P. J. G. M. de (1997): The race-specific elicitor *Avr9* of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: a cystine knot protein. *FEBS Lett.*404: 153-158.
135. **Vida, J. B.**; Zambolim, L.; Tessmann, D. J.; Brandao Filho, J. U. T.; Verzignassi, J. R. y Caixeta, J. R. (2004). Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia Brasileira* 29: 355-372.
136. **Walker, J. C.** (1969): *Enfermedades de las hortalizas*. Ed. Revolucionaria, p. 557-560.
137. **Waller, J. M.** (2002): Standard and measurements. In: *Plant Pathologist Pocketbook*. CAB International, p. 446-53.
138. **Warnock, S. J.** (1991): Natural habitats of *Lycopersicon* species. *Hortic. Sci.* 26: 466-471.
139. **Westerink, N.**; Brandwagt, B. F.; Wit, P. J. G. M. de and Joosten, M. H. A. J. (2004): *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the *Cf-4* locus (*Hcr9-4E*) by secretion of a stable *Avr4E* isoform. *Molecular Microbiology* 54: 533-545.
140. **Westerink, N.**; Joosten, M. H. A. J.; and Wit, P. J. G. M. de (2002): Fungal (a) virulence factors at the crossroad of disease susceptibility and resistance. In: *Fungal Disease Resistance in Plant Biochemistry, Molecular Biology, and Genetic Engineering* (Eds. Z.K. Punja and W.Y. Luck) Haworth press, Burnaby, Canada.
141. **White, T. J.**; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J and White, T.J (eds) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, p.315-322.
142. **Whiteford, J. R.**, Lacroix, H. N. J. and Spanu, P. D. (2004): Stage-specific cellular localisation of two hydrophobins during plant infection by the pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genet. Biol.* 41: 624-634.

143. **Whiteford, J. R.** and Spanu, P. D. (2001): The hydrophobins *HCf-1* of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal Genet. Biol.* 32:159-168.
144. **Whiteford, J. R.** and Spanu, P. D. (2002): Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Mol. Plant Pathol.* 3: 391-400.
145. **Wit, P. J. G. M. de** (1977): Light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Neth. J. Plant Pathol.* 83: 109-122.
146. **Wit, P. J. G. M. de** (1992): Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 391-418.
147. **Wit, P. J. G. M. de** (2000): The *Cladosporium fulvum* - tomato interaction. A model system to study gene-for-gene relationships. A Slusarenko, R.S.S. Fraser, and L.C. van Loon (eds): *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. p. 53-75
148. **Wit, P. J. G. M. de.**; Brandwagt, B.F.; Burg, H.A. van den; Cai, X.; Hoorn, R. A. L. van der; de Jong, C. F.; Klooster, J. van't; Kock, M. J. D. de; Kruijt, M.; Lindhout, W. H.; Luderer, R.; Takken, F. L. W.; Westerink, N.; Vervoort, J. J. M.; Joosten, M. H. A. J. (2002): The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Anton. Leeuw. Int.J.G* 81: 409-412.
149. **Wit, P. J. G. M. de** and Flach, W. (1979): Differential accumulation of phytoalexins in tomato leaves but not in fruits after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Plant Pathol.* 15: 257-267.
150. **Wit, P. J. G. M. de** and Kodde, E. (1981): Further characterization and cultivar-specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates and cell-walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.* 18: 297-314.
151. **Wit, P. J. G. M. de** and Spikman, G. (1982): Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in inter-cellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 1-11.

152. **Wit, P. J. G. M. de** and Meer, F. E. van der (1986): Accumulation of the pathogenesis-related tomato leaf protein P14 as an early indicator of incompatibility in the interaction between *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28: 203-214.
153. **Wösten, H. A. B.** (2001): Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 625-646.
154. **Wubben, J. P.**, Eijkelboom, C. A. and Wit, P. J. G. M. de (1993): Accumulation of pathogenesis-related proteins in the epidermis of tomato leaves infected by *Cladosporium fulvum*. *Neth. J. Plant Pathol.* 99: 231-239.
155. **Wubben, J. P.**, Joosten, M. H. A. J., Kan, J. A. L. van and Wit, P. J. G. M. de (1992): Subcellular-localization of plant chitinases and β -1,3-glucanases in *Cladosporium fulvum* (syn *Fulvia fulva*)-infected tomato leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 23-32.