



INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

TIPO DE BECA DOCTORAL

PERIODO 1er año

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: LUCENTINI

NOMBRES: CESAR GUSTAVO

Dirección Particular: Calle:

Localidad: LA PLATA CP: 1900

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

lucentinicgustavo@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Título del Proyecto de Beca

Moho de la hoja de tomate (*Cladosporium fulvum*) una enfermedad de cultivos bajo cubierta. Conocimientos básicos para el manejo y diagnóstico temprano de la enfermedad.

Postulante: Ing. Agr. Lucentini, Cesar Gustavo.

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

Codirector: Saparrat, Mario C.N. Profesor Adjunto Microbiología Agrícola Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP Investigador Adjunto CONICET

Lugar de Trabajo Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI)- UNLP-CICBA. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata Calle 60 y 119 La Plata 1900 Argentina.

Introducción al tema

La superficie cultivada con hortalizas en la Argentina es de 226.622 ha a campo y 29.613.011 m² bajo cobertura. Entre éstas se cultivan con tomate (*Solanum lycopersicum* Miller) a campo 14.389,4 y bajo cobertura 11.858.468 m² (40%). El tomate es el segundo cultivo hortícola en importancia después de la papa, se producen 750.000 tn/año en una superficie superior a las 98.000 ha, pero además es una actividad en crecimiento.

Entre los problemas fitosanitarios que aquejan al cultivo de tomate, las enfermedades fúngicas ocupan un lugar preponderante por la diversidad de agentes patógenos y su carácter endémico (Jones et al 2014). En los últimos años, el Moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*, sinónimo *Passalora fulva*) y la mancha gris de la hoja (*Stemphylium* spp.; Ronco et al., 2008) se encuentran entre las patologías más importantes del tomate cultivado bajo cubierta (Thomma et al., 2005; Ronco et al., 2008).

Cladosporium fulvum es un hongo biotrófico no obligado que pertenece a la familia *Mycosphaerellaceae* (Capnodiales) (Braun et al., 2003, Goodwin et al., 2001). Los conidióforos de

aproximadamente 200 μm de largo aparecen por los estomas, no son ramificados, tienen constricción en la base y son más anchos hacia el ápice. Los conidios son marrón oscuro a claro, tienen hasta tres septos y contienen un hilum engrosado. El hongo sobrevive como saprófito o como conidios (sobreviven hasta 1 año) o esclerocios, en los residuos del cultivo y/o en suelo.

Esta patología afecta fundamentalmente las hojas de las plantas de tomate, primero las más viejas y luego las jóvenes, es decir que afecta el aparato fotosintético de la planta. Los síntomas consisten en manchas amarillas en el haz; observándose en el envés la presencia de conidios del hongo de color pardo oliváceos (Blacard 1992; Thomma et al 2005). Ocasionalmente, los tallos, flores, pecíolos y raramente los frutos son afectados (Ellis 1971; Holliday & Mulder 1976; Curtis et al 1994; Fox 1997; Jones et al 1997, 2014; Ho et al 1999). El primer síntoma de la enfermedad es la aparición de una mancha clorótica en el haz de las hojas. En etapas más avanzadas, los conidióforos emergen por los estomas, lo que puede provocar la oclusión del estoma, generando así alteraciones en el intercambio gaseoso y con ello en la respiración de la planta (Butler & Jones 1949; Chupp & Sherf 1960). En ataques severos se produce el marchitamiento y muerte de las hojas, lo que genera una defoliación parcial de la planta que puede morir (Jones 1997; Wit et al 2002). El manejo de la patología es complejo, ya que si bien se conocen genes de resistencia, la mayoría de los cultivares son susceptibles al hongo. Las variedades resistentes son de uso limitado, debido a que el hongo muta fácilmente generando nuevas razas en un período de tiempo corto. El método de control consiste en la aplicación de fungicidas de contacto y sistémicos (MINIAGRI 2006).

Cladosporium fulvum posee un conjunto de factores de patogenicidad que determinan la capacidad patogénica del organismo. Estos son proteínas que se han aislado y caracterizado. Se han descrito cuatro extracelulares, ECP1, ECP2, ECP4 y ECP5 (Honee et al 1994; Esse et al 2006; Joosten et al 1994; Ackerveken et al 1993; Ackerveken et al 1992, Bolton et al 2008) que son producidas por todas las cepas del hongo. Además, se han encontrado y caracterizado cuatro péptidos de avirulencia, a los que se llamó Avr, que son raza específicos. Los genes *ecp1*, *ecp2*, *ecp4*, *ecp5*, *avr2*, *avr4*, *avr4E* y *avr9* han sido clonados, al igual que los correspondientes genes de resistencia *Cf* de las plantas (Jones et al 1994; Dixon et al 1996; Thomas et al 1997; Takken et al 1998). Se han generado líneas isogénicas de tomate a las que se les ha incorporado los genes de resistencia (*Cf*) que reconocen específicamente a las proteínas Avr (Stergiopoulos et al 2007a; Stergiopoulos et al 2007b; Wit et al 2002). Esta interacción de *C. fulvum* se ajusta a la hipótesis gen a gen (Flor 1971). Por lo tanto este es un sistema biológico de identificación de razas.

C. fulvum como otros hongos tiene micelio de color negro a pardo oscuro que se debe a la presencia de melanina. A pesar de que este hongo ha sido estudiado en profundidad no está claro el tipo de melanina que sintetiza (Collemare et al 2014). Estudios del genoma del hongo mostraron que este no contiene ningún gen del clado 1,8-DHN melanina PKS, lo que sugeriría que el hongo no produce melanina DHN (Langfelder et al., 2003). Sin embargo, este hongo podría sintetizar melanina a partir de tirosina por medio de la vía metabólica DOPA. Sin embargo, se encontró que una PKS relacionada a la síntesis de melanina DHN en *Aspergillus niger* es también responsable de la síntesis de varios nafto- γ -pironas (Chiang et al., 2011). De la misma manera la PKS 1 en *C. fulvum* podría ser responsable de la síntesis de elsinocromo y/o de melanina DHN. Es decir no está claro cuál es el tipo de melanina que produce el hongo. Es importante destacar que se han propuesto variados roles

biológicos para la melanina (Llorente et al 2012).

El grupo de trabajo del CIDEFI liderado por el Dr. Balatti ha realizado estudios de esta patología en el cinturón hortícola platense y se ha descrito en una cantidad relativamente baja de aislamientos la presencia de solo dos razas del hongo, la 0 y la 1 (Rollan et al., 2013) En estos trabajos también se describió que los diversos aislamientos si bien pertenecen a solo dos razas, presentan polimorfismos a nivel de los genes de avirulencia, lo que sugiere que las poblaciones están en un proceso de cambios genéticos que pueden llevar a la aparición de nuevas razas.

Considerando todo lo expuesto es claro que es clave analizar un mayor número de aislamientos del agente causal del moho de la hoja del tomate con el fin de conocer en detalle la constitución de la población del patógeno en lo que hace a razas. El conocimiento de las razas existentes permitirá definir los genes de resistencia que deben contener los genomas de los híbridos de tomate cultivados.

En base a lo expuesto y con el objetivo general de desarrollar herramientas para el manejo del moho de la hoja del tomate, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Incrementar el número de aislamientos de *Cladosporium fulvum* de la colección del CIDEFI con el fin de analizar las poblacionales del patógeno en diversos sitios de cultivo.
- 2- Realizar un análisis morfo-fisiológico y molecular de la diversidad del agente causal.
- 3- Identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas y la capacidad de éstas para sintetizar melaninas.

Metodología y actividades:

Se procederá a realizar aislamientos a partir de diversos sitios de producción de tomate ubicados en los dos cinturones hortícolas más relevantes de la provincia de Buenos Aires: Mar del Plata y La Plata. Además se trabajará con los aislamientos disponibles en el Cepario del CIDEFI, obtenidos a partir de hojas provenientes de lotes de tomate con síntomas de la enfermedad (Rollán et al. 2013, Medina et al. 2015).

Identificación molecular de los hongos y sus razas:

Se procederá a identificar los aislamientos en base a las características morfo-fisiológicas y moleculares.

En lo que hace a las características morfológicas se analizará la capacidad de crecimiento y producción de inóculo en diversas condiciones (Fermoselle et al. 2007, Chaskes et al. 2008). Los aislamientos se cultivaran en medio basal agar-extracto de papa-glucosa (APG), en donde se analizará la morfología de sus colonias, su velocidad de crecimiento y esporulación, muestras de micelio, células conidiógenas y conidios. Todos se observarán en el microscopio óptico de campo claro y de epi-fluorescencia, incluyendo cuando sea necesario, colorantes o reactivos específicos (Frederick et al., 1999).

Se analizará también la respuesta de los aislamientos a un amplio espectro de fungicidas con diferentes modos de acción, incluyendo estrobilurinas, ftalonitrilos y triazoles siguiendo la metodología reportada por Elliot (1995) y Martínez et al. (2007).

La evaluación de la habilidad patogénica de los aislamientos se realizará tal cual lo descripto por Rollan et al. (2013).

La determinación de la producción de melanina se realizará en cultivos líquidos en Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del medio extracto de papa-glucosa pH 5,6 (PG). El hongo se cultivará bajo diferentes tensiones de oxígeno, regímenes de radiación UV-visible y temperatura. Se analizará también el efecto de la adición al medio de cultivo de ácido ascórbico, CuSO₄, L-DOPA, etanol, FeSO₄, guaiacol, H₂O₂, NaCl, α -naftol, sacarosa, tirosina sobre el crecimiento, la pigmentación y/o melanización de los cultivos (Babitskaya et al. 2000, Crowe & Olsson 2001, Kishore et al. 2005, Saparrat et al. 2009, Bárcena et al 2015).

La extracción, caracterización y cuantificación de melaninas se llevará a cabo según la metodología descripta por Gadd (1982). La purificación de las melaninas se realizará siguiendo el método de Suryanarayanan et al. (2004). Por otro lado, la caracterización de las mismas se hará analizando los espectros UV-visible, FTIR y resonancia magnética nuclear, así como evaluando su respuesta frente a diferentes solventes y reactivos (agentes oxidantes y metales pesados, Frederick et al., 1999).

Los nuevos aislamientos se identificarán con las secuencias del ITS, Transcritos Internos del ADN ribosomal (ITS: Internal Transcribe Spacer). Además se procederá a amplificar y secuenciar los genes que codifican las proteínas Avrs y los genes que codifican las proteínas Ecp (Medina et al 2015).

La variabilidad de las razas de *Cladosporium fulvum* se realizará con determinaciones espectroscópicas de FTIR asociada a técnicas estadísticas de compresión de datos (Análisis de Componentes Principales, PCA). Para ello se procederá a cultivar en medio líquido los diferentes aislamientos de *Cladosporium fulvum* (Saparrat et al., 2010).

Facilidades Disponibles

Se dispone de 80 m² de laboratorios equipados con cámara de flujo laminar, heladeras, freezer -70 °C y -20 °C, cámara de cultivo con control de temperatura, agitador orbital con control de temperatura y de velocidad, autoclaves, balanzas analítica y granataria, bombas de vacío, estufas de secado, material de vidrio, lupa y microscopios, pH-metro, espectrofotómetro UV-Visible, centrífuga de mesa, microcentrífuga, baños termostatizados, pipetas automáticas, drogas y reactivos, computadoras conectadas a red, termocicladoras, cubas de electroforesis vertical, cubas de electroforesis horizontal, fuentes de poder de 300 v, de 600 v y de 3000 v, equipo de fotodocumentación Polaroid, transiluminador de UV, equipo de análisis de imágenes Ingenius con software. El estado de conservación de todo el equipamiento es bueno. La colaboración con el INIFTA (Fac. Cs. Exactas, UNLP) permitirá la disponibilidad de un equipo de FTIR (Fac. Cs. Exactas, UNLP). Este plan de beca tiene vinculación con el Proyecto PICT 2012-2760 desarrollado bajo la dirección del Dr. Pedro Balatti.

Referencias:

Ackerveken, G. F. J. M. van de; Kan, J. A. L. van; Joosten, M. H. A. J.; Muisers, J. M.; Verbakel, H. M y 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.

- Ackerveken, G. F. J. M. van de; Kan, J. A. L. van; Wit, P. J. G. M. de (1992): Molecular analysis of the avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant Journal* 2 (3): 359-366.
- Babitskaya, V. G.; Shcherba, V. V.; Filimonova, T. V.; Grigorchuk, E. A. 2000. Melanin pigments from the fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carbonarius*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 36: 128-133.
- Bárcena, A.; Petroselli, G.; Velasquez, S. M.; Estévez, J. M.; Erra-Balsells, R.; Balatti, P. A.; Saparrat, M. C. N. 2015. Response of the fungus *Pseudocercospora griseola* f. *mesoamericana* to Tricyclazole. *Mycological Progress* (aceptado) DOI 10.1007/s11557-015-1102-7.
- Blancard, D. 1992. Enfermedades del tomate. Observar, identificar y luchar. INRA. Ed. Mundi-Prensa, 212 p.
- Bolton. M. D; Esse, H. P. van, Vossen, J. H; Jonge, Ronnie de, Stergiopoulos, I, Stulemeije, I. J. E; Berg, G. C. M van den, Borrás-Hidalgo, O; Dekker, H. L; Koster, C. G de; Wit, P. J. G. M de; Joosten, M. H. A. J y Thomma, B. P. H. J. 2008: The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* 69(1), 119–136
- Braun, U; Crous, P.W; Dugan, F; Groenewald, J.Z y Hoog, G.S. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. Nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. Str^o. *Mycol. Progress* 2: 3-18.
- Butler, E. J y Jones, S.G. 1949: Tomato leaf mould, *Cladosporium fulvum* Cooke. Macmillan, London, pp. 123.
- Chaskes, S.; Frases, S.; Cammer, M.; Gerfen, G. & Casadevall, A. 2008. Growth and Pigment Production on D-Tryptophan Medium by *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 255-264.
- Chiang Y.M., Meyer K.M., Praseuth M., Baker S.E., Bruno K.S et al., 2011. Characterization of a polyketide synthase in a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanine and naphthopyrone *Fungal Genet. Biol.* 48: 230-437.
- Chupp, C y Sherf, A.F. 1960: Vegetable disease and their control. Pp. 541-545.
- Collemare J., Griffiths S., Iida Y., Jashni M.K., Battaglia E., Cox R.J., de Wit P.J.G.M. 2014. Secondary metabolism and biotrophic lifestyles in the Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum*. *PLOS* Vol 9, e85877.
- Crowe, J. D. & Olsson, S. 2001. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2088-2094.
- Curtis, M. D; Gore, J y Oliver, R.P. 1994: The phylogeny of the tomato leaf mold fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Current Genetic* 25: 318-322.
- Dixon, M. S; Ones, D; Keddie, J; Thomas, C; Harrison, K y 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.
- Elliott, M. L. 1995. Effect of melanin biosynthesis inhibiting compounds on *Gaeumannomyces* species. *Mycologia* 87: 370-374.
- Ellis, M. B. 1971: Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew

- Esse, H. P. van, Thomma, B. P. H. J.; Klosostwe, J. W, van't y Wit, P. J. G. M de. 2006.:Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplasto. *Journal of Experimental Botany* 57 (3): 599-608.
- Fermoselle, G.; Saparrat, M.; Balatti, P. 2007. Diversidad genética y morfológica de aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola*. Libro de Resúmenes del "XI Congreso Argentino de Microbiología". *Revista Argentina de Microbiología* 39 (Suplemento 1): 54
- Flor, H. H. 1971:Current status of the gene – for – gene concept. *Annu.Rev.Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fox, R. T. V.1997: Fungal goes in your garden. 36. *Leaf Moulds. Mycologist* 11:88.
- Frederick, B. A.; Caesar-TonThat, T. C.; Wheeler, M. H.; Sheehan, K. B.; Edens, W. A. & Henson, J. M. 1999. Isolation and characterisation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycol. Res.* 103: 99–110.
- Gadd, G. M. 1982. Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi*. *Transaction of the British Mycological Society* 78: 115-122.
- Goodwin, S.B.; Dunkle, L.D., Zismann, V.L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648–658.
- Ho, M. H. M; Castañeda, R. F. R; Dugan, F. M y Jong, S. C. 1999: *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and expanded Key. *Mycotaxon* 72: 115-157
- Holliday, P y Mulder, J. L. 1976. C.M.I Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 48. *Fulvia fulva*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Honee, G; Van den Ackerveken I, G. F. M; Van den Broek, H. W. J; Cozojnsen, T. J; Joosten, M. H. A.J; Koomangersmann, M; Vercoort, J; Vogelsang, R; Vossen, P; Wubben, J. P y Wit, P. J. G. M de. 1994: Molecular characterization of the interaction between the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and tomato. *Euphytica* 79 : 2 1 9-225,1994
- Jones, D. A; Thommas, C. M; Hammond-Kosak, K. E; Balint- Kurti, P. J y Jones, J. D. G. 1994: Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 226: 789-790.
- Jones, J. B; Zitter, T. A.; Momol, T. M. and Miller, S. A. 2014: *Compendium of tomato diseases and pests*. Second Edition. APS Press, USA, 168p.
- Joosten, M. H. A. J; Cozijnsen, T. J y Wit, P. J. G. M.de.1994: Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367, 384 - 386 .
- Kishore, K. H.; Sanjit, K.; Sunil M.; Reddy C. R. & Murty, U. S. 2005. Comparative chemical characterization of pigmented and less pigmented cell walls of *Alternaria tenuissima*. *Current Microbiol.* 51: 399-401.
- Langfelder K., Streibel M., Jahn B.Haase G., BrakhageA.A. 2003 Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi.*Fungal Genet. Biol.* 38, 143-158
- Llorente, C.; Bárcena, A.; Vera Bahima, J.; Saparrat, M. C. N. (autor correspondiente); Arambarri, A. M.; Rozas, M. F.; Mirífico, M. V.; Balatti, P. A. 2012. *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 produces the 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin-like compound and carries a putative pks gene. *Mycopathologia* 174: 397-408.

- Martinez, L. R.; Ntiamoah, P.; Gácsér, A.; Casadevall, A. & Nosanchuk, J. D. 2007. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 4396-4400.
- Medina, R.; López, S.M.Y.; Franco, M.E.; Rollán, C.; Ronco, L.; Saparrat, M.C.N.; De Wit, P.J.G.M.; Balatti, P.A. 2015. A survey on occurrence of *Cladosporium fulvum* identifies race 0 and race 2 in Tomato growing areas of Argentina. *Plant Disease* (Manuscript ID PDIS-12-14-1270-RE.R2, aceptado).
- MINIAGRI 2006: Estrategia fitosanitaria para la campaña de frío 2006-2007. CNSV, La Habana, 3p.
- Rollán, C.; Medina, R.; López, S.; Protto, V.; Vera Bahima, J.; Saparrat, M.; Ronco, L.; Balatti, P. 2013. Identification of Races 0 and 2 of *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*) on Tomato in the Cinturón Hortícola de La Plata, Argentina. *Plant Disease* 97 (7): 992. *Disease Notes* (<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0987-PDN>).
- Ronco, L., Rollán, C., Larrán, S., Mónaco, C., Dal Bó, E. 2008. Manual para el Reconocimiento de Enfermedades: TOMATE Y PIMIENTO – Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires. Ed. Universidad Nacional de La Plata, 56 pp. ISBN 978-950-34-0489-8.
- Saparrat, M.; Femoselle, G.; Stenglein, S.; Aulicino, M.; Balatti, P. 2009. *Pseudocercospora griseola* causing angular leaf spot on *Phaseolus vulgaris* produces 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin. *Mycopathologia* (DOI 10.1007/s11046-009-9194-8) 168(1): 41-47.
- Saparrat, M.C.N.; Estevez J.M.; Troncozo M.I.; Arambarri, A.; Balatti, P. 2010. In-vitro depolymerization of *Scutia buxifolia* leaf-litter by a dominant Ascomycota Ciliophorella sp. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64: 262-266.
- Stergiopoulos, I; Groenewald, M; Staats, M; Lindhout, P; Crous, P. W y Wit, P. J. G. M. de. 2007b: Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology* 44 415–429
- Stergiopoulos, I; De Kock, M. J. D; Lindhout, P y Wit, P. J. G. M. de. 2007a.: Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *MPMI* Vol. 20, No. 10, pp. 1271–1283. The American Phytopathological Society.
- Suryanarayanan, T. S.; Ravishankar, J. P.; Venkatesan, G. & Murali, T. S. 2004. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycol. Res.* 108: 974-978.
- Takken, F. L. W; Schipper, D; Nijkamp, H. J. J y 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.
- Thomas, C. M; Jones, D. A; Parniske, M; Harrison, K; Balint-Kurti, P. J; Hatzixanthis, K y Jones, J. D. G. 1997: Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequence that determine recognitional specificity in Cf-4 and Cf-9. *The Plant Cell*, Vol. 9, 2209-2224. American Society of Plant Physiologists.
- Thomma B.P.H.J., Van Esse P.H., Crous P.W., De Wit P.J.G.M. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*) a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycophaeerellaceae. *Plant Molecular Pathology* 6, 379-393.

Wit, P.J.G.M.de; Brandwagt, B. F; Burg, H. A; van den; Cai, X; Hoorn, R. A. L. van der; de Jong, C. F; Klooster, J. van't; Kock, M. J. D. de; Kruijt, ; Lindhout, W. H; Luderer, R; Takken. F. L. W; Westerink, N; Vervoot, J. J. M; Joosten, M. H. A. J. 2002: The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. Anton. Leeuw. Int. J.G 81: 409-412.

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) fitopatología cladosporiosis control

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DOCTORAL 1º AÑO (ex ESTUDIO 1º AÑO): *Fecha inicio:* 27/03/2016

BECA DOCTORAL 2º AÑO (ex ESTUDIO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

BECA DOCTORAL 3º AÑO (ex PERFECCIONAMIENTO 1º AÑO): *Fecha inicio:*

BECA DOCTORAL 4º AÑO (ex PERFECCIONAMIENTO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: CIDEFI (CENTRO DE INVESTIGACION DE FITOPATOLOGIA)CIC-FCAyF-UNLP

Facultad: CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES-UNLP

Departamento: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Cátedra: FITOPATOLIA-MICROBIOLOGIA

Otros:

Dirección: Calle: 60 Y 119 N°: S/N

Localidad: LA PLATA CP: 1900 Tel: 221-4236 int423

5. CARGO UNIVERSITARIO (si existe, especificar categoría, dedicación, condición de ordinario, regular o interino):

6. CARGOS EN OTRAS INSTITUCIONES:

Profesor Provicional en la Tecnicatura Superior de Produccion Agricola Ganadera (TSPAG) en el ISFDyT n°43 de Lobos,Pcia BsAs CH. 5hs semanal

7. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: BALATTI, PEDRO ALBERTO

Dirección Particular: Calle:

Localidad: M B Gonet CP: 1867 Tel:

Dirección electrónica: pbalatti@gmail.com

8. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Cladosporium fulvum es un hongo biotrófico no obligado, agente causal del Moho de las hojas del tomate y se encuentran entre las patologías más importantes del cultivo bajo cubierta.

Empleando la técnica de aislamiento directo se obtuvieron un total de 15 aislamientos que fueron purificados e incorporados al cepario del CIDEFI. Se selecciono una cepa para evaluar el crecimiento en placa con medio agar papa glucosado. Se obtuvo una tasa de crecimiento de 1,73x10⁻⁵mm²/dia.

Se cuantifico el ADN total de varias de las cepas, se evaluo la necesidad de utilizar ARNasa y de ajustar el método para cada una de las cepas, se obtuvo cantidad apenas suficiente de 6 aislados.

Para identificar el tipo de melanina que sintetiza *Cladosporium fulvum* se selecciono una cepa y se evaluó, mediante suplementación de inhibidores de melaninas, que la melanina que produce es de síntesis DHN.

9. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Estado de avance del plan de trabajo en base a los objetivos propuestos.

1. Incrementar el número de aislamientos de *Cladosporium fulvum* de la colección del CIDEFI con el fin de analizar las poblacionales del patógeno en diversos sitios de cultivo.

Con el fin de ampliar el número de aislados de *Cladosporium fulvum* a partir de hojas de tomate enfermas con el moho de la hoja del tomate pero que además presentaban el signo de la enfermedad se repicó a una placa con medio agar agua en el cual las esporas de *Cladosporium fulvum* germinaron y diferenciaron una masa miceliar de color púrpura oscuro en aproximadamente 7 días de incubación a 25° C en oscuridad. Luego de este tiempo los aislados se repicaron a medio agar-extracto de papa-glucosa (APG), procedimiento que se repitió hasta la obtención de cultivos puros. Posteriormente, a partir de una colonia de estos cultivos se obtuvieron los cultivos monospóricos, que se incorporaron al cepario del CIDEFI y con los que se iniciaron los estudios de este plan de trabajo. De esta manera se obtuvieron un total de 15 aislados, los que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Sitio de aislamiento y tipo de producción de tomate de donde se obtuvieron los aislados de *Cladosporium fulvum* (CIDEFI)

Aislado	Cultivar	Localidad	Tipo de producción
CIDEFI300	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI301	Elpida	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI305	Colibrí	Arana	Convencional bajo cubierta
CIDEFI307	Elpida	Corrientes	Convencional bajo cubierta
CIDEFI308	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI309	Elpida	Arana	Convencional bajo cubierta
CIDEFI318	Elpida	Etcheverry	Convencional bajo cubierta
CIDEFI320	keitor	Corrientes	Convencional bajo cubierta
CIDEFI325	Elpida	Gorina	Convencional bajo cubierta
CIDEFI326	Pantano	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI327	Banano	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI329	Banano	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI330	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI331	Elpida	Mar del Plata	Convencional bajo cubierta
CIDEFI332	Elpida	Abasto	Orgánico bajo cubierta

Los aislamientos analizados crecieron lentamente, aún en condiciones óptimas de incubación, estableciendo que el desarrollo de una colonia con dimensiones de 0,5 cm de diámetro demanda un período de al menos 20 días de incubación.

Esto condujo a un trabajo de purificación de las cepas que demandó más tiempo del esperado para obtener cultivos monospóricos.

Con el fin de evaluar la tasa de crecimiento se trabajó con el aislado CIDEFI 322, la que se expresó como el área que se incrementó una colonia en un periodo de 24 hs (mm²/día);

Para esto el hongo se repicó en medio basal APG realizándose las determinaciones de área a los 15, 30 y 60 días. En cada uno de los muestreos se tomó una foto (Figura 1) y se determinó el área de crecimiento con el programa APS asses 2.0. La tasa de crecimiento diario se determinó realizando un análisis de regresión (Figura 2).

Figura 1. Crecimiento de la cepa CIDEFI 322 a los 15, 30 y 60 días de cultivo.

Figura 2. Tasa de crecimiento (mm²/día) de la cepa CIDEFI 322.

2. Análisis morfo-fisiológico y molecular de la diversidad de *Cladosporium fulvum*.

Se extrajo ADN a partir de varios cultivos de los aislados monospóricos hasta obtener aproximadamente 300 mg del hongo. Así se procedió a extraer el material genético de 11 aislados a de los cuales se obtuvieron cantidades variables de ADN genómico (Tabla 2). En la figura 3 se muestra una corrida electroforética del ADN genómico obtenido con la metodología empleada. Es posible observar que la eficiencia de extracción varió para los diversos aislados como las 300, 301, 309, 318, y 326.

Figura 3 Cuantificación de ADN total extraído de las cepas.

Tabla n° 2. Cuantificación del ADN extraído en base a la intensidad de la banda tal como visto en la Figura 1.

Calles							
aislado	301	305	326	329	300	330	Marcador
cantidad (ng/ul)	40	3,36	25	3,71	4,25	3,7	lamda hingIII
aislado	308	318	309	320	309	320	
cantidad (ng/ul)	8,5	16,5	1	0	6	3,78	

El ADN genómico extraído se utilizó de molde para realizar la reacción de multiplex con los primers de los genes avr (Medina et al, 2015). Sintéticamente la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 15 µl con un termociclador programado, el primer ciclo de desnaturalización fue a 94°C por 5', luego 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30'', una fase de annealing de 1' a 58,4°C, una de extensión de 1' a 72°C y a esto se le adicionó un ciclo de extensión final de 7' a 72°C. Las reacciones contaron con 1 µl de ADN genómico (ADN molde) de los cultivos monospóricos, MgCl₂ 1,5 mM, 0,20 mM de cada uno de los primers (correspondientes a Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 U de ADN polimerasa T-Plus y 1X de buffer de reacción. El producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en agarosa ultrapura al 1,5% (Figura 4).

Figura 4. PCR multiplex de los avrs con las cepas de la Coleccion del CIDEFI y el marcador 1000-100.

En la Figura 4, se observa que cuando el ADN genómico provino de los aislados 300, 307, 309, 318, 320, 322, 327, 329 y 330 amplificaron solo tres bandas de ADN de 806, 710 y 640 pb. Estas bandas corresponden a los genes de avirulencia avr4E, avr9 y avr4 respectivamente (Medina et al., 2015). Si bien este análisis es preliminar, la amplificación de los genes de avirulencia permite afirmar que los aislados pertenecen a *Cladosporium fulvum* y que si bien se debe reconfirmar, estos aparentemente corresponderían a las razas 0, amplificando las 4 bandas, o a la raza 2 cuando a excepción de la banda (570pb) para el Avr 2 el resto fuera amplificado. Esto es compatible con los datos previos de nuestro grupo de trabajo donde ambas razas ya fue descrita para los cinturones hortícolas de La Plata y Mar del Plata.

3. Identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas y la capacidad de éstas para sintetizar melaninas.

Se seleccionó la cepa CIDEFI 300 para identificar el tipo de melanina que sintetiza. Con este fin el aislado se cultivó en el medio de cultivo APG como medio de base y en la presencia de distintas concentraciones de inhibidores de la síntesis de melaninas (Tabla 2): el triciclazol (5-metil-1,2,4-triazolo[3,4-b] benzotiazol), el ácido cójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) y la sulcotriona (2-(2-cloro-4-metilbenzil)-ciclohexano-1,3-diona) que son inhibidores específicos de la vía síntesis de la melanina-DHN, melaninas DOPA y piomelaninas respectivamente. Entre los resultados obtenidos, y relativo a los cultivos control (colonias de tonalidad gris) se identificó que el triciclazol a 50 ppm interfirió en la pigmentación de los cultivos del aislado CIDEFI 300, detectándose la difusión de metabolitos de color anaranjado en el medio extracelular en relación a la colonia diferenciada de color pardo (Figura 5). Pruebas preliminares por espectrometría de masas UV-MALDI de los extractos de acetato de etilo de las colonias y del medio extracelular de tanto los cultivos de 21 días de incubación en presencia de triciclazol 50 ppm así como cultivos control detectaron solo en los cultivos con el inhibidor una señal de $m/z = 206,52$, compatible con el compuesto anaranjado flaviolina (2,5,7-trihidroxi-1,4-naftoquinona, masa exacta 206,02, (Figura 6) , el cual es un producto de oxidación del 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN), un intermediario de la síntesis de melanina-DHN (actividad realizada en colaboración con el CIHIDECAR-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón II, 3 Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina). Asimismo, los cultivos desarrollados en presencia de ácido cójico y sulcotriona a todas las concentraciones analizadas no mostraron diferencias en comparación a los cultivos control. La adición de agentes inductores de la melanización como tirosina tampoco mostró diferencias.

Figura 5. Microscopia de la colonia del aislado CIDEFI 300 sin triciclazoles (a) y con triciclazole (b) con pigmentacion del medio (Flavoninas)

Figura 6. Estructura química de a) Triciclazole, inhibidor de la síntesis de melanina DHN y b) flavonina, producto derivado de la inhibición de la melanina del aislado CIDEFI 300 de *Cladosporium fulvum* por el Triciclazole.

Tabla 2. Aspecto y crecimiento de las colonias de *Cladosporium fulvum* CIDEFI 300 que desarrollaron en presencia de los diversos inhibidores de melaninas

Tratamiento	Observación crecimiento a los 21 días de inoculado.	Pigmentación
Acido kojico+tirosina	+(*)	Negro en el envase verde en superficie
Tirosina	+	Negro en el envase verde en superficie
Triciclazole	-(**)	
Sulcotriona+tirosina	+	Negro en el envase verde en superficie
Sulcotriona	+	Negro en el envase verde en superficie
Control	+	Negro en el envase verde en superficie
Dopa	+	Negro en el envase verde en superficie
Acido kojico	+	Negro en el envase verde en superficie

(*) + creció

(**) – no creció

Referencias:

Medina, R.; López, S.M.Y.; Franco, M.E.; Rollán, C.; Ronco, L.; Saparrat, M.C.N.; De Wit, P.J.G.M.; Balatti, P.A. 2015. A survey on occurrence of *Cladosporium fulvum* identifies race 0 and race 2 in Tomato growing areas of Argentina. *Plant Disease* (Manuscript ID PDIS-12-14-1270-RE.R2, aceptado).

10. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

10.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada ya que no será tomada en consideración. A cada trabajo asignarle un número e indicar el nombre de los autores, en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, lugar donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde. En cada trabajo que el becario presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación. Asimismo, en cada caso deberá indicar si el trabajo se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

10.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que aparecen en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el becario deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

10.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que ha sido enviado. Adjuntar copia de los manuscritos.*

10.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

10.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

10.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

11.2 DIVULGACIÓN

11.3 OTROS

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

13. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc, y si se realizó algún entrenamiento.*

Curso-Taller avanzado sobre Buenas Practicas de laboratorios (OCDE), en el periodo del 31 de Agosto al 1 de Septiembre. Carga horaria 16 hs. Asistencia.

XIII curso de Microscopia Electronica de Transmisión y Barrido: tecnicas básicas para el procesamiento de especimenes biológicos, en el periodo comprendido del 8 al 11 de Noviembre del 2016, carga horaria de 30hs. aprobado

Gestion y metodologías para laboratorios de suelos y aguas con fines agropecuarios y forestales- modulo II, en el periodo comprendido desde el 21 al 26 de Noviembre 2016, carga horaria de 40hs. aprobado con 8 (ocho).

14. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Integrante del Proyecto Moho de la hoja del tomate y mancha gris: Bases moleculares de las interacciones patogeno hospedantes y el manejo de las patologias. Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (2012) FONCYT Código Proyecto PICT-2012-2760 Duracion 22/11/2013 a 22/05/2017 Monto \$320.000

15. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

16. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Como profesor provicional dicte las clases en turno nocturno, total de 5 hs semanales, clases explicativas y desarrollo de practicas de la mitad de las clases de interpretacion de los contenidos brindados durante la teoria.

17. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

Colaboracion en la caracterizacion molecular de hongos ligninolíticos correspondientes al trabajo de tesis doctoral de Monica Murace

18. DESCRIPCION DEL AVANCE EN LA CARRERA DE DOCTORADO.

Debe indicarse los logros alcanzados en la carrera de Doctorado en relación a los requisitos particulares de la misma (cursos, seminarios, trabajos de campo, etc), así como el porcentaje estimado de avance en la tesis.

Presente proyecto de tesis doctoral, aun no me han dado las devoluciones de los evaluadores, hice dos cursos de posgrado con un total de 90 hs considero aproximadamente un 20% de avance del doctorado.

19. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Deberán indicarse claramente las acciones a desarrollar.*

Titulo del proyecto de tesis presentado en la carrera del Doctorado en ciencias agrarias y forestales de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, "Los Polimorfismos en los avr de Cladosporium fulvum afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis con la resistencia sistémica inducida y adquirida"

Con el objetivo general de desarrollar herramientas para el manejo del moho de la hoja del tomate. Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Incrementar el número de aislamientos de *C. fulvum* con el fin de aumentar la colección del CIDEFI
- 2) Realizar un análisis morfo-fisiológico y molecular de los aislados de *C. fulvum*.
- 3) Identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas
- 4) Evaluar la capacidad de los aislados para sintetizar melaninas.
- 5) Identificar el tipo de melanina producida por *C. fulvum* y el rol biológico de la misma.
- 6) Evaluar si la inducción de SAR o de ISR en las plantas de tomate aumenta la sanidad del cultivo.

Metodología y actividades:

- 1) Incrementar el número de aislamientos de *C. fulvum* con el fin de aumentar la colección del CIDEFI.(objetivo cumplido)

Se obtuvieron los aislamientos a partir de muestras de plantas pertenecientes a los principales cinturones hortícolas de la provincia de Buenos Aires ubicados en los cinturones hortícolas: Mar del Plata y La Plata. obteniendo un total de 15 aislamientos los cuales fueron ingresados al cepario de CIDEFI. La técnica utilizada fue el aislamiento directo del patógeno de la hoja a placa de petri, el aislado del hongo consiste en repicar del signo de la enfermedad a una placa con medio diferencial de agar agua donde *Cladosporium fulvum* adquiere color púrpuro y sus acompañantes color verde y de ahí luego de una semana cultivados a 25 °C se repican a medio agar-extracto de papa-glucosa (APG), para luego a partir de una colonia obtener cultivos puros de monospóricos (Rollán et al, 2013).,que se conservaran en vaselina a 4°C. El material biológico se resume en la siguiente tabla

cepas de *Cladosporium fulvum* conservadas en vaselina a 5°C (CIDEFI)

n°CEPARIO	Cultivar	Localidad	Tipo de producción
CIDEFI300	ELPIDA	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI301	Elpida	Abasto	orgánico bajo cubierta
CIDEFI305	Colibrí	Arana	Convencional bajo cubierta
CIDEFI307	ELPIDA	Corrientes	Convencional bajo cubierta
CIDEFI308	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI309	Elpida	Arana	convencional bajo cubierta
CIDEFI318	Elpida	Etcheverry	convencional bajo cubierta
CIDEFI320	keitor	Corrientes	Convencional bajo cubierta
CIDEFI325	Elpida	Gorina	convencional bajo cubierta
CIDEFI326	pantano	Abasto	organico bajo cubierta
CIDEFI327	banano	Abasto	organico bajo cubierta
CIDEFI329	banano	Abasto	organico bajo cubierta
CIDEFI330	ELPIDA	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI331	elpida	mar del plata	Convencional bajo cubierta
CIDEFI332	ELPIDA	Abasto	Organico bajo cubierta

- 2) Realizar un análisis morfo-fisiológico y molecular de los aislados de *C. fulvum*.
Caracterización morfológica.

Se realizarán observaciones microscópicas de micro cultivos de cada aislamiento (Crous et al 2007a, 2007b, 2007c; Dugan et al 2008). La técnica se basa en colocar en placas de Petri estériles un porta objetos y sobre éste una gota de APG (medio de cultivo: Agar-Papa-Glucosa, 20:20:200). Se inocularán los bordes y luego se coloca luego el cubreobjetos. A fin de minimizar la deshidratación del agar, se pone dentro de la placa un algodón húmedo. Se

incuba 7 días a 25 °C en oscuridad. Al cabo de este periodo, se procede a realizar las observaciones microscópicas sin retirar el cubreobjetos.

Caracterización molecular (Crous et al 2007a, 2007b, 2007c; Zalar et al 2007; Schubert et al 2009; Schubert et al 2007; Bensch et al 2010; Carbone & Kohn 1999).

Se procederá a realizar la amplificación de las siguientes secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El extremo 3' de la subunidad 18S, el ITS 1, la subunidad 5, 8S, el ITS 2, y el extremo 5' de la subunidad 28S (White et al 1990; Curtis et al 2004; Crous et al 2007; Crous et al 2006a; Crous et al 2006b).

El gen de la β - tubulina (Tartar et al 2002; Tigano et al 2006; Boucias et al 2006). Este es un gen de copia única, utilizado comúnmente para diagnóstico de hongos filamentosos. La secuencia de aminoácidos de la β - tubulina puede tener poca variación entre hongos de especies relacionadas genéticamente pero en la posición del tercer codón y los intrones aparecen tasas relativamente altas de sustituciones de nucleótidos.

Genes *avr* (*avr2*, *avr4*, *avr4e*, *avr9*) tanto de los aislamientos como a partir de ADN extraído de material vegetal.

3) Identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas.

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares de la interacción *C. fulvum*-tomate se han incorporado al cultivar de tomate Money Maker (MM) los genes de resistencia Cf2, Cf4, Cf5 y Cf9 (Boukema, 1981). El disponer de estas líneas isogénicas, que resultan de retrocruzamientos sucesivos, permitirá el estudio de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de reconocimiento del hongo patógeno por su hospedante (Joosten & Wit, 1999).

4) Evaluar la capacidad de los aislados para sintetizar melaninas.

Extracción y caracterización de pigmentos

Los pigmentos oscuros de *C. fulvum* serán extraídos de placas inoculadas con los distintos aislamientos cultivados durante 10 días en medio APG a 25 °C (Saparrat et al, 2009; Gadd, 1982; Suryanarayanan et al 2004; Bashyal et al, 2010). La biomasa del hongo colectada de cada aislado, se estandarizará, se lavará por triplicado con agua, luego se adicionará 5 ml de agua destilada. Se centrifugado a 5000 g por 5 min. y el pellet obtenido será lavado con 5 ml de agua destilada. Para la extracción del pigmento, el pellet es resuspendido en 5 ml de 1M NaOH, esta suspensión se llevará a 121 °C por 20 min. La suspensión nuevamente se centrifugará a 5,000 g por 5 min. y el sobrenadante será colectado. El extracto alcalino del pigmento será modificado a pH 2 agregando HCl concentrado con el fin que precipite las melaninas.

La caracterización de las melaninas se realizará de acuerdo a lo descrito por Selvakumar et al, 2008, que incluye la actividad peroxidasa, determinación de polifenol, Fourier Transform Infrared (FTIR) y Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy analysis. La caracterización de estos pigmentos se hará con el fin de ver si las condiciones ambientales pueden afectar la síntesis y con ello su rol biológico. (Frederick et al., 1999).

5) Identificar el tipo de melanina producida por *C. fulvum*.(objetivo cumplido)

Se analizó el efecto de adicionar un inhibidor de la síntesis de la melanina en 1, 10 y 100 ppm al medio basal APG. El tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazolo[3,4-b] benzothiazole,); y ácido kojico (5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone,); son inhibidores específicos de la vía síntesis DHN y melaninas DOPA respectivamente. Las placas fueron inoculadas con una suspensión de conidios de la cepa CIDEFI300 y cultivadas en oscuridad a 25 ± 2 °C por 7 días, el mínimo de replicas por tratamiento fue de tres. este ensayo nos informó que la melanina sintetizada era de síntesis DHN.

6) Evaluar si la inducción en tomate de alguno de los mecanismos que constituyen el sistema inmune de la planta genera plantas sanas en el cultivo.

Se evaluará la capacidad para activar los mecanismos que componen el sistema inmunológico de la planta., esto es la síntesis de defensinas, la activación de resistencia sistémica adquirida o de la resistencia sistémica inducida.

Para tal fin se procederá a inducir en las plantas una semana luego del trasplante y una nueva inducción a los 20 días de la última, donde se harán mediciones destructivas y no destructivas.

El efecto de los tratamientos sobre el crecimiento y la sanidad de la planta se evaluarán determinado de la altura de la planta, el de peso seco aéreo, el conteo de las clorofilas totales y el área foliar. Las determinaciones se realizarán a los 30 días posteriores a la última aplicación. Las muestras se descalzarán en número de 3 plantas de cada uno de los bloques que componen cada tratamiento.

Pruebas no destructivas en el cultivo

A los 4, 7, 10 días posteriores a la aplicación de los productos, se realizarán las determinaciones enzimáticas (PAL, POX y Lox) y químicas (ácido salicílico), determinación de clorofilas totales y contenido de proteínas totales.

Muestra: Para estas determinaciones se tomarán muestras de hoja de 12 gramos de cada bloque de manera tal que dentro de cada bloque se puedan realizar dos replicas técnicas de cada determinación que en conjunto darán los resultados de cada réplica biológica (bloque). Las muestras se conservarán a -80°C luego de la recolección hasta el momento de su análisis.

Técnicas para determinaciones no destructivas:

Determinación de clorofilas totales (Hansmann et al, 1973):

Se trituran 2 g de muestra, que se resuspende en un volumen de 5-10 ml de acetona-agua al 90% (v/v) para extraer los pigmentos. Luego el extracto se deja reposar en oscuridad a 4 °C durante 24 h. Se centrifuga a 2700 g por 5 minutos.

Se medirá la densidad óptica (DO) del sobrenadante a 665, 645 y 630 nm; el blanco es el solvente sin la adición de la muestra; La cuantificación se realizará con la ecuación propuesta por Strickland y Parsons (1968):

$$Ca \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (11,6 \text{ DO}_{665 \text{ nm}} - 1,31 \text{ DO}_{645 \text{ nm}} - 0,14 \text{ DO}_{630 \text{ nm}}) \cdot v \cdot 1^{-1} \cdot V^{-1}$$

$$Cb \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (20,7 \text{ DO}_{645 \text{ nm}} - 4,34 \text{ DO}_{665 \text{ nm}} - 4,42 \text{ DO}_{630 \text{ nm}}) \cdot v \cdot 1^{-1} \cdot V^{-1}$$

$$Cc \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (55,0 \text{ DO}_{630 \text{ nm}} - 4,64 \text{ DO}_{665 \text{ nm}} - 16,3 \text{ DO}_{645 \text{ nm}}) \cdot v \cdot 1^{-1} \cdot V^{-1}$$

Donde Ca, Cb y Cc son las concentraciones de clorofila a, b y c respectivamente.

v: volumen de acetona en ml; 1: longitud de la cubeta en cm; V: volumen de filtrado en litro.

Extractos enzimáticos y determinación de enzimas: (Fenilalanina amonio liasa (PAL), Guaiacol peroxidasa (POX), Lipoxigenasa (LOX))

Los extractos enzimáticos para cada una de las enzimas descriptas se obtendrán según se describe a continuación:

Extractos enzimáticos.

Fenilalanina amonio liasa (PAL): Un gramo de material vegetal se homogeneizará en morteros pre-enfriados con buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.8 (m/v; 1:1). Se centrifuga a 8000 g por 30 min a 4 °C y la actividad enzimática se determinará en el sobrenadante.

Guaiacol peroxidada (POX): un gramo de material vegetal congelado, se tritura en mortero y se homogeniza con 3 ml de buffer fosfato de potasio 10 mM, pH 6. Se filtra y se centrifuga a 13000 g por 15 min a 4°C y la actividad enzimática se determinará en el sobrenadante.

Lipoxigenasa (LOX): El extracto enzimático se obtiene como se describe anteriormente utilizando buffer fosfato sódico 0,2 M, pH 6.5. Luego de centrifugar a 9000 g por 20 min a 4 °C, la actividad enzimática se determinará en el sobrenadante.

El contenido de proteínas totales del extracto se determinará de acuerdo al procedimiento estándar descripto por Bradford (1976), usando BSA (Albúmina Sérica Bovina sigla en ingles) como patrón. La curva de calibración se realiza con BSA en un rango de concentración de 50-1000 µg/ml (rango lineal). Preparación del reactivo Bradford (5X): Se disuelven 100 mg de Azul Comassie G-250 en 50 ml de etanol 96%, se añaden 100 ml de H3PO4 y agua destilada hasta 200 ml y después se filtra. Para determinar la concentración de proteína, a 100 µl del extracto enzimático se le añaden 5 ml del reactivo

de Bradford (1X) y se mide A595 nm. El blanco se mide sobre 100 μ l del buffer de extracción enzimática al cual se le añaden 5 ml del reactivo de Bradford (1X).

Determinaciones enzimáticas:

Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

La actividad PAL se determinará de acuerdo a lo descripto por de Lisker et al. (1983). La mezcla de reacción contendrá 1 ml de extracto enzimático, 0,5 ml de L-fenilalanina 50 mM y 0,4 ml de buffer Tris-HCl 25 mM (pH 8.8).

Luego de una incubación de 2 h a 40 °C, la actividad enzimática se detendrá por adición de 0,06 ml de HCl 5 M y se determinará la absorbancia a 290 nm. Se determinará midiendo la producción de ácido trans-cinámico a partir de L-fenilalanina por espectrofotometría. Se realizará una curva patrón con ácido Trans-cinámico

Actividad Guaiacol Peroxidasa - POX

La actividad POX será determinada según lo descripto por Hammerschmidt et al. (1982). La mezcla de reacción (3 ml) consistirá en guaiacol 0,25% (v/v) en buffer fosfato de potasio 10 mM (pH 6.0) conteniendo H₂O₂ 10 mM. A la mezcla de reacción se le agregará 0,1 ml del extracto enzimático crudo y se determinará la absorbancia a 470 nm cada 1 minuto. Una unidad de actividad enzimática POX (UA) será expresada como la variación de 1U de absorbancia por mg de proteína soluble por minuto (UA mg P⁻¹ min⁻¹ - μ ° tetraguaicol= 26600 M⁻¹ cm⁻¹)

Actividad lipoxigenasa – LOX

La actividad lipoxigenasa será estimada de acuerdo al método de Borthakur et al. (1987). Consistirá en la determinación espectrofotométrica de la aparición del conjugado diana hidroperóxido a 234 nm de longitud de onda. La mezcla contendrá 2,7 ml de buffer fosfato sódico 0,2 M (pH 6.5), 0,3 ml de ácido linoleico 10 mM en Tween 20 y a esto se le adicionará 0,05 ml del extracto enzimático.

Alícuotas de 1 ml se transfieren a frascos de vidrio conteniendo NaOH 0.1 N a intervalos de 0.5 – 1 – 1.5 – 2 y 2.5 minutos, en la que el NaOH detiene la reacción. El exceso de ácido linoleico reacciona con el Na clarificando la solución. La formación de hidroperóxidos se determinará midiendo la absorbancia a 234 nm.

La unidad enzimática se define como el aumento de A_{234nm}/min/mg de proteína bajo las condiciones de ensayo. (μ ° 24500 M⁻¹ cm⁻¹)

Ácido salicílico (Warrier et al. 2013)

El ácido salicílico (SA) forma complejos con sales férricas cuya concentración es estimada midiendo en el espectrofotómetro la absorbancia a 540 nm.

Un gramo de material vegetal se congelará con nitrógeno líquido, se triturará, y se fraccionará en 10-1000 mg de los cuales se extraerá el SA con 1 ml de agua. Se centrifuga a 10000 g por 10 min. El sobrenadante se conserva en hielo. 100 μ l del sobrenadante se mezclan con cloruro férrico 0,1% preparado en el momento. El volumen de la mezcla de reacción se ajusta a 3 ml y la formación del complejo violeta se determinará por absorbancia a 540 nm. Se preparará una solución stock de SA con 100 mg de SA disueltos en 100 ml de agua. Esta solución contendrá 1000 ppm (μ g/ml) y se trabajará con una dilución 1/10 de la misma. A partir de la solución de trabajo se construye la curva patrón con concentraciones conocidas de SA.

Facilidades Disponibles

Se dispone de 80 m² de laboratorios equipados con cámara de flujo laminar, heladeras, freezer -70 °C y -20 °C, cámara de cultivo con control de temperatura, agitador orbital con control de temperatura y de velocidad, autoclaves, balanzas analítica y granataria, bombas de vacío, estufas de secado, material de vidrio, lupa y microscopios, pH-metro, espectrofotómetro UV-Visible, centrifuga de mesa, microcentrifuga, baños termostatzados, pipetas automáticas, drogas y reactivos, computadoras conectadas a red, termocicladoras, cubas de electroforesis vertical, cubas de electroforesis horizontal, fuentes de poder de 300 v, de 600 v y de 3000 v, equipo de foto documentación Polaroid, transiluminador de UV, equipo de análisis de imágenes Ingenius con software. El estado de conservación de todo el equipamiento es bueno. La colaboración con el INIFTA (Fac. Cs. Exactas, UNLP) permitirá la disponibilidad de un equipo de FTIR (Fac. Cs. Exactas, UNLP). Este plan tiene vinculación con el Proyecto PICT 2012-2760

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.