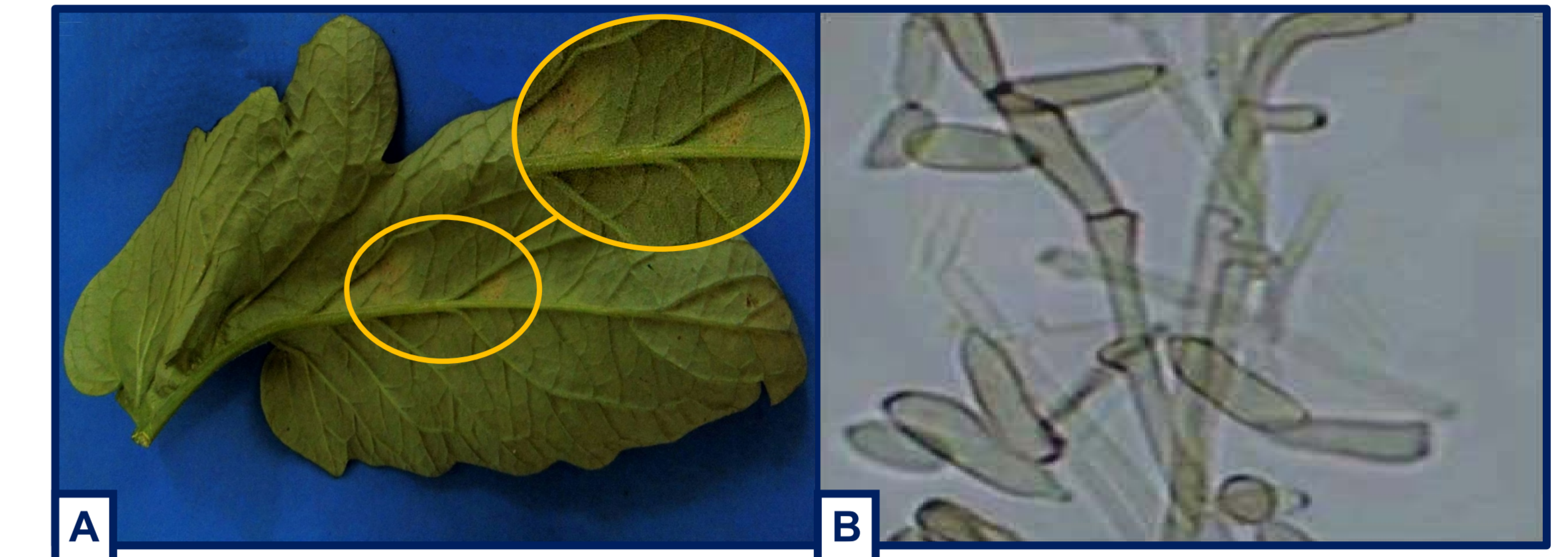


Cesar G. Lucentini <sup>1</sup>; María I. Troncozo <sup>2</sup>; Mario E. E. Franco <sup>1</sup>; Silvina M. Y Lopez <sup>1</sup>; Rocío Medina <sup>1</sup>; **Mario C. N. Saparrat** <sup>2,4,5,a</sup> y Pedro A. Balatti <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAYF), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, 1900, Argentina, <sup>2</sup> Cátedra de Microbiología Agrícola, FCAYF, UNLP, La Plata, 1900, Argentina., <sup>3</sup> Cátedra de Fitopatología vegetal, FCAYF, UNLP, La Plata, 1900, Argentina. <sup>4</sup> Instituto de Fisiología Vegetal UNLP-CONICET, La Plata, 1900, Argentina. <sup>5</sup> Instituto de Botánica Spegazzini, FCNyM, UNLP, La Plata, 1900, Argentina.  
<sup>a</sup> masaparrat@yahoo.com.ar; masaparrat@fcnym.unlp.edu.ar

## Introducción

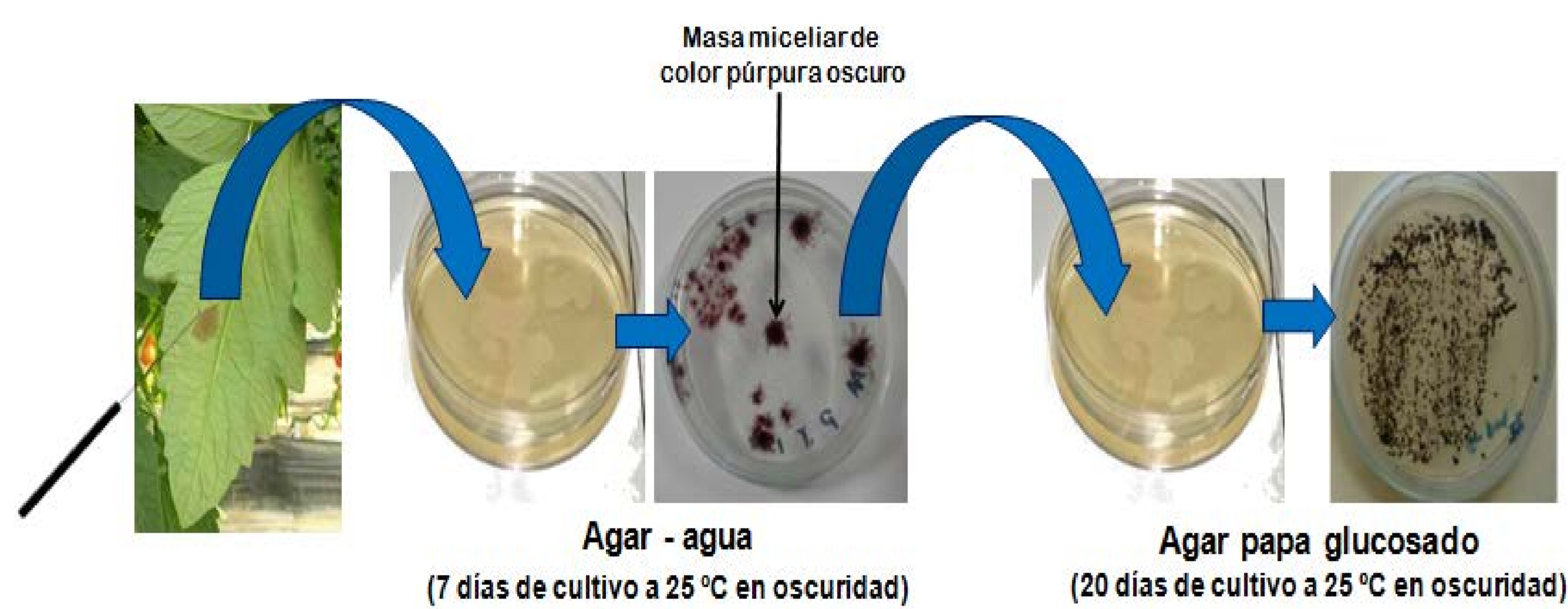
*Cladosporium fulvum* (Mycosphaerellaceae; Capnodiales) es el agente causante del “Moho de la hoja de tomate”, una de las patologías que con más frecuencia ataca el cultivo de tomate bajo cubierta en el cinturón hortícola platense (Argentina). En estudios previos se determinó que en las áreas de producción muestreadas de la Argentina sólo se encuentran dos razas del hongo, la raza “0” y la “2”, pero se encontraron polimorfismos a nivel de los genes *avr* que son los que determinan las razas. Esto la existencia de procesos evolutivos y/o la ocurrencia de cambios genéticos que podrían originar nuevas razas del hongo. Por ello el objetivo de este trabajo es conocer más profundamente la diversidad de las poblaciones del patógeno que se encuentran en las áreas de cultivos hortícolas.



A. Signo de la enfermedad.  
B. Conidióforo y conidios de *C. fulvum*.

## Materiales y métodos

### a) Obtención del material biológico: aislamiento directo



### b) Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico de las cepas siguiendo el protocolo Wizard® Genomic DNA Purification kit. La cantidad y calidad del ADN genómico es estimado por electroforesis en gel de agarosa (0,7% p/v). La cantidad de ADN fue estimada por comparación con un marcador molecular control de concentración conocida (Genoma del fago Lambda digerido con Hind III - Promega Biotech) utilizando el analizador de imágenes GeneTools (SYNGENE). Posteriormente, el ADN se conservó en freezer a -20°C.

### c) Amplificación de genes *Avr*: PCR Multiplex

El ADN genómico extraído se utilizó de molde para realizar la PCR multiplex con los primers de los genes de avirulencia (*avr*). Sintéticamente la reacción se realizó en un volumen final de 15 µl en un termociclador (modelo Multigene™, Labnet International, Inc). El programa tenía un ciclo inicial a 94°C por 5', seguido de 40 ciclos con una etapa de desnaturalización a 94°C por 30", una fase de annealing de 1' a 58,4°C seguida de una fase de extensión de 1' a 72°C, y una fase de extensión final de 7' a 72°C. Las reacciones contuvieron 1 µl de ADN genómico (molde) de los cultivos monospóricos, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Inbio Highway), 0,20 mM de cada uno de los primers (correspondientes a *Avr2*, *Avr4*, *Avr4e* y *Avr9*), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)(Inbio Highway), 1 U de ADN polimerasa T-Plus (Inbio Highway) y 1X de buffer de reacción (Inbio Highway). Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% p/v (Figura 2).

## Resultados

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

Aislado	Cultivar	Localidad	Tipo de producción	Año
CIDEFI300	Elpida	Los Hornos <sup>1</sup>	Convencional bajo cubierta	2015
CIDEFI301	Elpida	Abasto <sup>1</sup>	Orgánico bajo cubierta	2015
CIDEFI305	Colibrí	Arana <sup>1</sup>	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI307	Elpida	Bella Vista <sup>2</sup>	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI309	Elpida	Arana <sup>1</sup>	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI318	Elpida	Etcheverry <sup>1</sup>	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI320	Keitor	Lavalle <sup>2</sup>	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI327	Banano	Abasto <sup>1</sup>	Orgánico bajo cubierta	2015
CIDEFI329	Banano	Abasto <sup>1</sup>	Orgánico bajo cubierta	2015
CIDEFI330	Elpida	Los Hornos <sup>1</sup>	Convencional bajo cubierta	2015
CIDEFI332	Elpida	Abasto <sup>1</sup>	Orgánico bajo cubierta	2015

Provincias de <sup>1</sup>Buenos Aires y <sup>2</sup>Corrientes

Tabla 2. Identificación de las razas de los aislados en base a la reacción en cadena de la polimerasa de los genes *avr*.

	<i>avr 2</i>	<i>avr 4</i>	<i>avr 4e</i>	<i>avr 9</i>	Raza
CIDEFI300	+	+	+	+	2
CIDEFI301	+	+	+	+	2
CIDEFI305				+	2
CIDEFI307	+	+	+		2
CIDEFI309	+	+	+		2
CIDEFI318	+	+	+	+	0
CIDEFI320	+	+	+		2
CIDEFI327	+	+	+		2
CIDEFI329	+	+	+	+	2
CIDEFI330	+	+	+		2
CIDEFI332	+	+	+	+	0

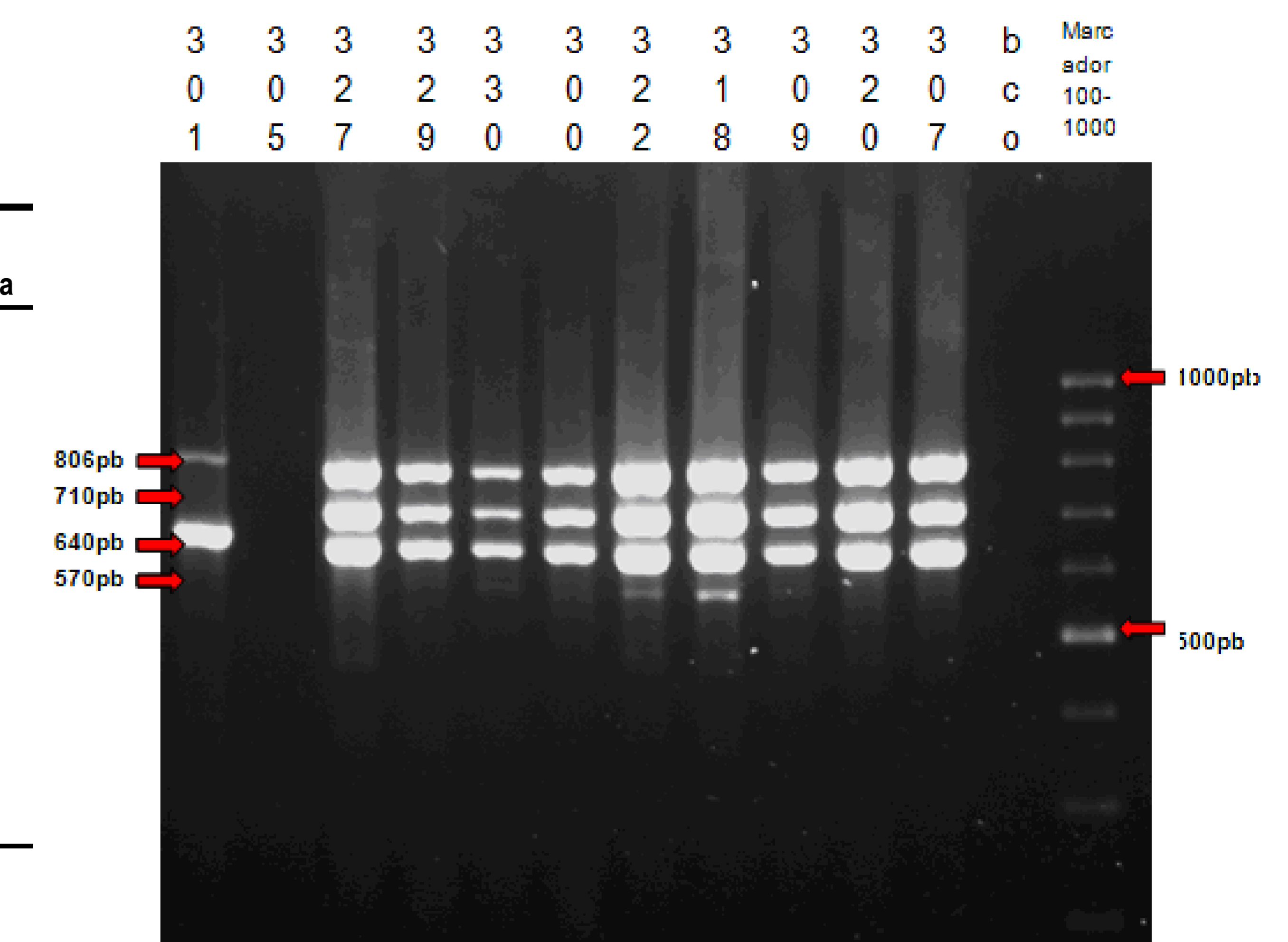


Figura 2. PCR multiplex de los genes *avr2*, *avr4*, *avr4e* y *avr9* (570pb, 640pb, 806pb y 710pb, respectivamente) de los nuevos aislados y los aislados control de las cepas de la Colección del CIDEFI.

## Conclusión

La amplificación de los genes de avirulencia confirma que los aislados son *Cladosporium fulvum* y además que 9 aislados son representantes de la raza 2 y los otros dos de la raza 0. Si bien estos datos confirman resultados anteriores, aún resta estudiar los niveles de polimorfismos que presentan estos aislados a nivel de los *avr*. Por otro lado es evidente que la raza 2 prevalece en las poblaciones de *Cladosporium fulvum*.