

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Título: “Hongos causantes de la mancha gris de la hoja en *Lycopersicon esculentum* Mill., su variabilidad y el rol de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en la reducción de su incidencia”



Doctorando: Ing. Agr. José Vera Bahima

Director: Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat

2020



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por financiar mediante las becas obtenidas estos estudios de postgrado.

A la Universidad Nacional de La Plata, particularmente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF), y también a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM) por la posibilidad de haber tenido una educación pública y gratuita, por poder realizar esta investigación, en fin, por todo el apoyo recibido.

A mis directores, Mario C. N. Saparrat y a la Lía B. Ronco por haberme guiado y orientado en el desarrollo de esta tesis; por el entusiasmo, por la pasión en sus rubros y por el acompañamiento incasable hasta el final en la redacción de este trabajo.

A Angélica M. Arambarri por transmitirnos la pasión de los hongos y además por ayudarnos junto a Mario en el comienzo de este camino del doctorado en la la FCNyM.

A todos mis compañeros del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), a su director Pedro A. Balatti quien me abrió las puertas del Centro y especialmente a Mari, Ceci, Romi, Paulina e Ismael por su ayuda en el trabajo diario y por la amistad que me llevo.

A todos mis compañeros del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), a su director Juan José Guiamet quien me abrió las puertas del Instituto y especialmente a Ale mi hermana de la ciencia, a la Loren, al equipete misionero Cori, Anita, Flavi y Fer, Agus, Emi, Luján, Cata, Luci, a lo “viejitos”; Darío y Carlita y a la dupla Maurito-Santi, a todos por su ayuda en el trabajo diario y por la amistad que me llevo.

A mis compañeros de la cátedra de Sistemática Vegetal, especialmente a Néstor D. Bayón, quien me fomentó siempre a terminar esta tesis. Además, por transmitir con pasión la botánica, un camino que siempre seguiré.

A María Alejandra Migoya, por su colaboración con entusiasmo en la realización de la tapa de esta tesis.

A Lucía da Cruz Cabral, Andrea Patriarca y a Virginia E. Fernández Pinto pertenecientes al Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires por la colaboración en la determinación de los metabolitos secundarios.

A productores hortícolas, técnicos y colegas por la ayuda en las muestras obtenidas, especialmente a Sergio J. Camiletti por los consejos y el intercambio.

Al clan Ventura y afines, a todos. Especialmente a la Doc Viole, a la perseverancia de Ari, la genialidad de Mati, al capo Jei Pi, al paciente Tomi, al colega Flaco y a la suegrita Silvia por estar ahí.

A todos mis amigos, pilares que siempre están apoyándome y compartiendo cosas pese a los tiempos y distancias. A los del barrio; Mau, Yiyo y Facu (no tan del barrio ya), a los de la secundaria, a los de la facultad, a Jere, a Paulita, a Lili, a Pablito, a Juancito, a Juan Horacio, a los vecis; Nacho, Caro y Jose. A mis amigos emprendedores Lucho y Pablo, colegas, compañeros y de quien aprendo siempre, y por sobre todo por el gran desafío que tomamos.

A mi familia, Paqui y Dan, Eloy, Lore, Feli y Fausti por el apoyo y el amor desde siempre, en todo lo que uno hace.

A Clara, mi compañera, por su amor, por bancarme y ayudarme siempre y sobre todo los últimos no veraneos de escritura, aunque el último si y salió. A Cata y Lolo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>ABREVIATURAS</b> .....	15
<b>RESUMEN</b> .....	17
<b>ABSTRACT</b> .....	19
<b>CAPÍTULO 1.</b>	
<b>Introducción general</b> .....	21
1. El cultivo de tomate.....	22
1.2. Interacción Patógeno-Hospedante.....	24
1.3. Importancia económica de las enfermedades ocasionadas por <i>Stemphylium</i> . La “mancha gris de la hoja del tomate”.....	29
1.3.1. <i>Stemphylium</i> en otros hospedantes.....	29
1.3.2. <i>Stemphylium</i> en tomate.....	30
1.3.3. El patógeno.....	31
1.3.4. Sintomatología.....	32
1.3.5. Ciclo de la enfermedad.....	33
1.4. Manejo de la enfermedad.....	34
1.4.1. Resistencia genética.....	35
1.4.2. Control químico.....	36
1.4.3. Control biológico.....	37
1.4.4. Prácticas culturales.....	37
1.4.5. Alternativas en el manejo: Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).....	38
Hipótesis.....	41

Objetivo general.....	41
Objetivos específicos.....	41

## **CAPÍTULO 2.**

<b>Aislamiento y caracterización de hongos asociados a la “mancha gris de la hoja del tomate”.....</b>	<b>42</b>
--	-----------

2.1. INTRODUCCIÓN.....	43
------------------------	----

2.1.1. Identificación morfológica y molecular.....	43
--	----

2.1.2. Caracterización fisiológica.....	46
---	----

2.1.2.1. Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivos.....	46
--	----

2.1.2.2. Síntesis de metabolitos secundarios.....	46
---	----

2.1.2.3. Hongos y estrés hídrico.....	47
---------------------------------------	----

2.1.2.4. Ensayo con distintos cultivares de tomate.....	48
---	----

2.1.2.5. Rango de hospedantes.....	48
------------------------------------	----

2.1.2.6. Bioensayo en fruto.....	49
----------------------------------	----

2.1.3. Objetivos específicos.....	49
-----------------------------------	----

2.1.4. Hipótesis.....	49
-----------------------	----

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
--------------------------------	----

2.2.1. Material biológico.....	50
--------------------------------	----

2.2.2. Procesamiento del material vegetal y aislamiento de los hongos.....	50
--	----

2.2.3. Identificación morfológica y molecular.....	51
--	----

2.2.3.1. Identificación morfológica.....	51
--	----

2.2.3.2. Análisis molecular.....	51
----------------------------------	----

2.2.4. Caracterización fisiológica.....	53
---	----

2.2.4.1. Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivos.....	53
--	----

2.2.4.2. Síntesis de metabolitos secundarios.....	54
---	----

2.2.4.3. Hongos y estrés hídrico.....	55
---------------------------------------	----

2.2.4.4. Ensayo con distintos cultivares de tomate.....	56
---	----

2.2.4.5. Rango de hospedantes.....	57
------------------------------------	----

2.2.4.6. Bioensayo en fruto.....	57
----------------------------------	----

2.2.5. Análisis estadístico.....	58
----------------------------------	----

2.3. RESULTADOS.....	59
2.3.1. Aislamientos.....	59
2.3.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos en medio agarizado: crecimiento, pigmentación y morfometría del sistema conidial.....	61
2.3.3. Análisis molecular de aislamientos seleccionados utilizando ITS como marcador....	65
2.3.4. Caracterización fisiológica de aislamientos seleccionados.....	66
2.3.4.1. Análisis del efecto del medio de cultivo sobre el aislamiento CIDEFI 216....	66
2.3.4.2. Síntesis de metabolitos secundarios.....	70
2.3.4.3. Análisis del efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y la pigmentación del aislamiento CIDEFI 216.....	73
2.3.4.4. Análisis de la severidad foliar del aislamiento CIDEFI 216 frente a diferentes cultivares de tomate.....	80
2.3.4.5. Análisis del rango de hospedantes potenciales del aislamiento CIDEFI 216..	81
2.3.4.6. Bioensayo de la habilidad del aislamiento CIDEFI 216 para colonizar frutos de tomate.....	82
2.4. DISCUSIÓN.....	83
2.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	88

### **CAPÍTULO 3.**

#### **Aplicación del ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico S-metil-ester (BTH) para el control de enfermedades foliares de tomate.....**

3.1. INTRODUCCIÓN.....	89
3.1.1. Resistencia sistémica adquirida (RSA) en horticultura.....	89
3.1.2. Indicadores de RSA.....	92
3.1.2.1. Peroxidasas (POX; EC 1.11.1.7).....	92
3.1.2.2. Peroxidación de lípidos. Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (SRATB-TBARS, por su sigla en inglés).....	94
3.1.2.3. Fenoles totales.....	94
3.1.3. Objetivos específicos.....	95

3.1.4. Hipótesis.....	95
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	96
3.2.1. Aplicación del BTH en hojas desprendidas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216.....	96
3.2.2. Parámetros evaluados.....	97
3.2.2.1. Severidad.....	97
3.2.2.2. Actividad peroxidasa (POX, EC 1.11.1.7).....	97
3.2.2.3. Peroxidación de lípidos. Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (SRATB-TBARS, por su sigla en inglés).....	98
3.2.2.4. Índice de verdor (SPAD).....	98
3.2.2.5. Clorofila.....	98
3.2.2.6. Fenoles totales.....	99
3.2.3. Aplicación foliar del BTH en plantas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216 bajo condiciones controladas.....	100
3.2.3.1. Ensayo 1.....	100
3.2.3.2. Ensayo 2.....	101
3.2.3.3. Parámetros evaluados.....	101
3.2.4. Aplicación de BTH en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial.....	102
3.2.4.1. Ensayo 1.....	102
3.2.4.2. Ensayo 2.....	102
3.2.4.3. Parámetros evaluados.....	103
3.2.5. Análisis estadístico.....	103
3.3. RESULTADOS.....	104
3.3.1. Aplicación del BTH en hojas desprendidas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216.....	104
3.3.2. Aplicación foliar del BTH en plantas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216 bajo condiciones controladas.....	109
3.3.2.1. Ensayo 1.....	109
3.3.2.2. Ensayo 2.....	113

3.3.3. Aplicación de BTH en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial.....	116
3.3.3.1. Ensayo 1.....	116
3.3.3.2. Ensayo 2.....	121
3.4. DISCUSIÓN.....	123
3.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	130
<b>CAPÍTULO 4.</b>	
<b>Conclusiones Finales y Perspectivas.....</b>	<b>131</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Aislamientos fúngicos usados en este estudio.....	60
<b>Tabla 2.2.</b> Pigmentación de las colonias de los aislamientos en APG y del medio extracelular asociado.....	62
<b>Tabla 2.3.</b> Efecto del tipo de medio de cultivo agarizado sobre las colonias del aislamiento CIDEFI 216.....	67
<b>Tabla 2.4.</b> Características morfométricas de los conidios (n:50) diferenciados por el aislamiento CIDEFI 216 creciendo sobre los diferentes medios de cultivo analizados.....	69

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Modelo zig-zag. Los cambios en la amplitud de defensa de la planta contra el ataque de patógenos, como se indica mediante el modelo de zig-zag propuesto por Jones & Dangl 2006. Flechas azules gruesas indican la respuesta de la planta en presencia del patógeno.....	27
<b>Figura 1.2.</b> Sintomatología de la “mancha gris de la hoja” de tomate: Manchas típicas sobre la cara abaxial (a) y adaxial (b) de un foliolo; apariencia de plantas enfermas en estadios tempranos de desarrollo (c) y sus foliolos (d).....	34
<b>Figura 1.3.</b> Esquema Introducción. Cultivo de tomate con sintomatología de la “mancha gris de la hoja” provocada por hongos patógenos del género <i>Stemphylium</i> y la inducción de resistencia en plantas BTH en el manejo de la enfermedad.....	42
<b>Figura 2.1.</b> Modo de proliferación de los conidióforos y conidios en los géneros A) <i>Alternaria</i> , B) <i>Ulocladium</i> y C) <i>Stemphylium</i> (Simmons 1969).....	43
<b>Figura 2.2.</b> Clave dicotómica de especies patógenas de tomate, adaptada de Ellis (1971).....	44
<b>Figura 2.3.</b> Diagrama del ADNr la subunidad ribosomal pequeña, 18S (SSU), la subunidad ribosomal grande 28S(LSU) del ribosoma, la región 5.8S y las regiones ITS1 e ITS2.....	45
<b>Figura 2.4.</b> Cultivo del aislamiento de CIDEFI 216 sobre medio APG, su sistema conidial (A) Vista anverso del cultivo; (B) vista reverso del cultivo; (C) conidios, célula conidiógena y conidióforo; (D) conidios; tamaños diversos; (E) célula conidiógena apical bulbosa; (F) detalle de célula conidiógena y conidióforo; (G) conidio provisto de tres constricciones principales; (H) superficie del conidio verrugosa. Barra: 20 $\mu$ m.....	59
<b>Figura 2.5.</b> Crecimiento de los aislamientos a los 7 días, en el medio APG a 25°C y oscuridad. Las barras indican la media $\pm$ la desviación estándar. (* $p < 0,05$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	61
<b>Figura 2.6.</b> Colonias de los aislamientos CIDEFI desarrolladas sobre el medio APG después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad. Los fenotipos de los aislamientos CIDEFI 216, CIDEFI 210 y CIDEFI 201 se establecieron como representantes tipo de los 3 grupos establecidos en base a su pigmentación.....	62

<b>Figura 2.7.</b> Características morfométricas de los conidios. (A) Longitud y (B) ancho de los conidios (* $p < 0,05$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	64
<b>Figura 2.8.</b> (A) ADN genómico extraído de los aislamientos aplicado en un gel de agarosa 0,70 % p/v teñido con Bromuro de Etidio. (B) Fragmentos ITS amplificados de los aislamientos aplicado en un gel de agarosa al 1 % p/v, teñido con Bromuro de Etidio.....	65
<b>Figura 2.9.</b> Árbol filogenético de <i>Stemphylium</i> inferido a partir del análisis de las secuencias de la región del rDNA de los aislamientos y cepas de referencia comprendiendo el extremo 3' de la región ITS 1, ITS 2, la subunidad 5,8S y el extremo 5' de la subunidad 28S; utilizando el método Neighbor-joining.....	66
<b>Figura 2.10.</b> Efecto del tipo de medio de cultivo sobre el aislamiento CIDEFI 216 a los 7 días de incubación en oscuridad y a 25°C.....	67
<b>Figura 2.11.</b> Efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento del aislamiento CIDEFI 216 durante 7 días de incubación en oscuridad y a 25°C. (** $p < 0,01$ ; **** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente. Los asteriscos representan diferencias significativas entre V8 y el resto de los medios de cultivo).....	68
<b>Figura 2.12.</b> Características morfométricas de los conidios diferenciados por el aislamiento CIDEFI 216 cuando crecido sobre diferentes medios de cultivo. (A) Longitud y (B) ancho de los conidios. (** $p < 0,001$ ; **** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	70
<b>Figura 2.13.</b> Perfil modelo de metabolitos (cromatograma HPLC-MS), en este caso del aislamiento CIDEFI 214. (1) Stemphylina, (2) Alterporriol D, (3) Acido pirenocaetico A, (4) Stemphypirona, (5) Deoxyvidina, (6) Phomapirona D, (7) Infectopirona, (8) Alterporriol G, (9) Albrasitriol, (10) Macrosporina, (11) Phomapirona A, (12) Stemphol, (13) 7-Oxo-brefeldina, (14) Brefeldina A y (15) Brasicadiol.....	71
<b>Figura 2.14.</b> Estructura química de los metabolitos secundarios más comúnmente sintetizados por los aislamientos analizados.....	72
<b>Figura 2.15.</b> Perfil de producción porcentual de metabolitos secundarios por los aislamientos CIDEFI estudiados.....	72
<b>Figura 2.16.</b> Número de metabolitos secundarios sintetizados por aislamientos CIDEFI.....	73
<b>Figura 2.17.</b> Efecto del NaCl sobre el crecimiento de <i>Stemphylium</i> CIDEFI 216. (A) Vista general de los cultivos sobre medio APG (cuya $a_w$ es 0,999; control) y suplementado con diferentes concentraciones de NaCl alcanzando $a_w$ de 0,98; 0,95 y 0,93. (B) Efecto de la $a_w$ del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (**** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....	73
<b>Figura 2.18.</b> Efecto del Glicerol sobre el crecimiento de <i>Stemphylium</i> CIDEFI 216. (A) Vista general de los cultivos sobre medio APG (cuya $a_w$ es 0,999; control) y suplementado con diferentes concentraciones de Glicerol alcanzando $a_w$ de 0,98; 0,95 y 0,93. (B) Efecto porcentual de la $a_w$ del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (**** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....	74

<b>Figura 2.19.</b> Efecto del NaCl sobre el crecimiento de <i>Stemphylium</i> CIDEFI 216. Efecto porcentual de la $a_w$ del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (**** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....	75
<b>Figura 2.20.</b> Efecto del KCl sobre el crecimiento de <i>Stemphylium</i> CIDEFI 216. Efecto porcentual de la $a_w$ del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (**** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....	75
<b>Figura 2.21.</b> Efecto de un rango de $a_w$ en el medio APG generados a partir de la suplementación de NaCl (A) y glicerol (B) sobre el perfil espectrofotométrico UV-visible de una fracción FAA de los cromóforos del aislamiento CIDEFI 216.....	76
<b>Figura 2.22.</b> Efecto del NaCl en los componentes del color, a través de la composición del color electrónica sobre el crecimiento de colonias de <i>Stemphylium</i> (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes R (rojo), G (verde) y B (azul). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ; **** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	77
<b>Figura 2.23.</b> Efecto del Glicerol en los componentes del color, a través de la composición del color electrónica sobre el crecimiento de colonias de <i>Stemphylium</i> (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes R (rojo), G (verde) y B (azul). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ; **** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	78
<b>Figura 2.24.</b> Efecto del NaCl en los componentes del color, a través del método de impresión en color sobre el crecimiento de colonias de <i>Stemphylium</i> (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes C (cian), Y (amarillo) y M (magenta) y K (negro). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ; **** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	79
<b>Figura 2.25.</b> Efecto del Glicerol en los componentes del color, a través del método de impresión en color sobre el crecimiento de colonias de <i>Stemphylium</i> (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes C (cian), Y (amarillo) y M (magenta) y K (negro). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ; **** $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).....	80
<b>Figura 2.26.</b> (A) Evolución de la severidad del aislamiento CIDEFI 216 frente a diferentes cultivares de tomate (** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori. Cada fecha de evaluación fue comparada de forma independiente). (B) Vista de la hoja completa de los cultivares que resultaron más susceptibles y de plantas sin inoculación (testigo), y detalle del foliolo afectado a su derecha.....	81
<b>Figura 2.27.</b> Rango de hospedantes. (A) Se observa en vista general el pimiento y detalles de las hojas desarrollando la sintomatología típica. (B) Hojas de porotos sanas y mostrando síntomas luego de ser inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216....	82
<b>Figura 2.28.</b> Efecto de la inoculación del aislamiento CIDEFI 216 sobre frutos de tomate cv. Elpida acondicionados; (A) pulverización directa de una suspensión de conidios a una concentración $1 \times 10^4$ /mL; (B) aplicación de un disco de papel de filtro humedecido (5 mm de diámetro) e impregnado con la suspensión de conidios CIDEFI a una concentración de $1 \times 10^4$ /mL; (C) aplicación de un disco de cultivo agarizado sobre una herida generada en el fruto; (D) testigo sin inocular.....	82

**Figura 3.1.** Ciclo catalítico general de peroxidasas (Dunford 1999). El ciclo incluye la oxidación di-electrónica de la enzima peroxidasa (en estado de reposo, RS conteniendo Fe 3+) por una molécula de hidroperóxido (ROOH como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para generar un compuesto-enzima C-I (conteniendo un complejo entre Fe 4+- oxo y un radical catiónico de la porfirina). Este compuesto C-I es reducido mono-electrónicamente por dos moléculas de sustrato (S - como guaiacol-, el cual es oxidado en el proceso: Sox), generando secuencialmente un compuesto intermedio II (C-II; que contiene Fe4+=O después de la reducción de porfirina por un electrón), luego de lo cual la enzima vuelve al estado de reposo (estado férrico) para iniciar el ciclo (Ruiz-Dueñas & Martínez 2009)...93

**Figura 3.2.** (A) Ruta de formación de malondialdehído, (B) formación del cromóforo de TBA, tomado de Laguerre *et al.* (2007) ...94

**Figura 3.3.** Cálculo de clorofila a, b, y clorofila total, tomada de Inskeep & Bloom (1985).....99

**Figura 3.4. Severidad.** Expresada como número total de manchas por foliolo. Envés de foliolos de tomate cv. Elpida hacia arriba en placas de Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Fotografías representativas a los 11 dpa. **Testigo**, cajas de Petri con foliolos de tomate pulverizadas con agua destilada; **BTH**, cajas de Petri con foliolos de tomate con el inductor BTH; **CIDEFI 216**, cajas de Petri con foliolos de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y **BTH + CIDEFI 216**, cajas de Petri con foliolos de tomate con aplicación del inductor BTH y luego inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....105

**Figura 3.5. Actividad peroxidasa (POX).** Actividad peroxidasa expresada como % respecto al Testigo. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente). .....106

**Figura 3.6. TBARS.** Evaluación de la peroxidación de lípidos a través del contenido de sustancias que reaccionan con el ácido Tiobarbitúrico (TBARS), expresada como eq. MDA (n mol/ml). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....106

**Figura 3.7. SPAD.** Índice de verdor expresado como unidades SPAD (unidades arbitrarias). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....107

**Figura 3.8. Clorofila.** Se evaluó el contenido de clorofila a través de la extracción mediante N,N-Dimetilformamida (DMF) tras 48 hs de oscuridad, expresado en ug/cm<sup>2</sup>, distinguiendo el contenido de clorofila a y b. Envés de foliolos de tomate cv. Elpida hacia arriba en placas de Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Barra entera: clorofila b y Barra con líneas oblicuas: clorofila a.....108

**Figura 3.9. Severidad.** Plantas de tomate cv. Elpida. A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216; (CIDEFI 216), plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (BTH + CIDEFI 216), plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. Se analizaron 3 maneras distintas de medir severidad, expresada como el número de manchas totales por planta (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....110

**Figura 3.10. Parámetros de crecimiento.** Plantas de tomate cv. Elpida, cultivadas en un invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad, con 4 hojas expandidas se aplicó BTH a una concentración de 50 mg/l en forma de pulverización foliar. A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216 (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....111

**Figura 3.11. TBARS.** Se evaluó la peroxidación de lípidos a través del contenido de malondialdehído (MDA). Expresada como eq. MDA (n mol/ml). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. (Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....112

**Figura 3.12. Fenoles totales.** Los resultados fueron expresados en eq. de ácido gálico por 10 mg de muestra. A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216 (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....112

**Figura 3.13. Severidad.** (A) Testigo, plantas de tomate asperjadas con agua destilada; (B) BTH, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH; (C) CIDEFI 216, plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (D) (BTH + CIDEFI 216) plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....114

**Figura 3.14. TBARS.** Se evaluó la peroxidación de lípidos a través del contenido de malondialdehído (MDA). Expresada como eq. MDA (n mol/ml). (A) Testigo, plantas de tomate asperjadas con agua destilada; (B) BTH, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH; (C) CIDEFI 216, plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (D) (BTH + CIDEFI 216), plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....114

**Figura 3.15. Fenoles totales.** Los resultados fueron expresados en eq. de ácido gálico por 10 mg de muestra. (A) Testigo, plantas de tomate asperjadas con agua destilada; (B) BTH, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH; (C) CIDEFI 216, plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (D) (BTH + CIDEFI 216), plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).....115

**Figura 3.16. Severidad y Actividad Peroxidasa (POX) del Ensayo 1 Hoja 1-inferior- en la 1er fecha de muestreo,** a los 83 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (H1). (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....116

**Figura 3.17. Severidad, Actividad Peroxidasa (POX) y Fenoles del Ensayo 1 Hoja 1 -inferior- en la 2da fecha de muestreo,** a los 97 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (H1); (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo); (C) Fenoles. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....117

**Figura 3.18. Severidad y Actividad Peroxidasa (POX) del Ensayo 2 Hoja 2-superior- en la 1er fecha de muestreo,** a los 83 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato superior (H2). (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....118

**Figura 3.19. Severidad, Actividad Peroxidasa (POX) y Fenoles del Ensayo 1 Hoja 2 -superior- en la 2da fecha de muestreo,** a los 97 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato superior (H2); (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo); (C) Fenoles. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....119

**Figura 3.20. Rendimiento del Ensayo 1.** En invernáculo de producción comercial. Se contabilizó el número de frutos y el peso de los mismos, y considerando la densidad de 22.000 plantas/Ha es que estimo el rendimiento por Ha.....120

**Figura 3.21. Severidad del Ensayo 2. (A) Hoja 1-inferior en tres fechas de muestreo y (B) Hoja 2-superior en tres fechas de muestreo:** a los 92, 108 y 122 días post-aplicación inicial (dpa i) del BTH. En invernáculo de producción comercial. Para inducir RAS se realizaron 10 aplicaciones con BTH, en la combinación de 3 concentraciones (C1: 0.025; C2: 0.05 y C3: 0.075 g/l) y 2 frecuencias (7 y 15 días) y otro tratamiento fue Ácido Salicílico (AS) a 0.05 g/l. Con el Testigo son 8 tratamientos. De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (H1) y en el superior (H2). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).....121

**Figura 3.22. Rendimiento del Ensayo 2.** En invernáculo de producción comercial. Se contabilizó el número de frutos y el peso de los mismos, y considerando la densidad de 22.000 plantas/Ha es que estimo el rendimiento por Ha.....122

## ABREVIATURAS.

ANOVA	análisis de la varianza
ADN	ácido desoxirribonucleico
APG	medio de cultivo agar papa glucosado
ARN	ácido ribonucleico
AS	ácido salicílico
$a_w$	actividad agua, (del inglés, water activity)
BTH	ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico S-metil-ester
BTH + CIDEFI 216	tratamiento con inductor BTH y luego de un período definido de días, inoculación con el aislamiento CIDEFI 216
CHP	cinturón hortícola platense
CIDEFI 216	aislamiento seleccionado de <i>Stemphylium</i>
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
cv.	cultivar
dpa	días post-aplicación
dpa i	días post-aplicación inicial
ET	etileno
FAA	solución fijadora: formaldehído, alcohol y acético
g a. i./ha	gramos de ingrediente activo de un agroquímico/hectárea (del inglés, grams of active ingredient/ha)
IGS	espaciador intergénico (del inglés, Inter Genic Spacer)
ITS	espaciador transcrito interno (del inglés, Internal Transcribed Spacer)
MDA	malondialdehído
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
POX	peroxidasas. Actividad peroxidasa

PR	proteínas asociadas a la patogénesis
PVP	polivinilpirrolidona
RSA	resistencia sistémica adquirida
SPAD	índice de verdor
SRATB-TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (del inglés, Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
TBA	ácido tiobarbitúrico
V8	medio de cultivo agar 8 vegetales

## RESUMEN

En Argentina el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es el segundo cultivo hortícola en importancia después de la papa, ampliamente difundido en el Cinturón Hortícola Platense. Asimismo, esta especie vegetal representa un sistema modelo en el estudio de interacciones planta-microorganismo. La Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) es un mecanismo de defensa activo en las plantas que confiere protección inespecífica en tejidos distantes del sitio de la interacción (sitio localizado) contra un amplio espectro de microorganismos. Diferentes agentes químicos, algunos sintéticos análogos al ácido salicílico (AS), como el ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico S-metil ester (BTH), actúan como inductores de RSA. Actualmente entre los problemas sanitarios que afectan a los cultivos de tomate, se destacan los hongos asociados a manchas foliares, entre ellos representantes del género *Stemphylium* Wallr., siendo los agentes causales de la “mancha gris de la hoja de tomate”. Los síntomas típicos son manchas angulares-circulares de color pardo, ligeramente hundidas y con el centro grisáceo que puede desprenderse (autotomía), lo que constituye una característica diagnóstica. En este sentido es necesario identificar taxonómicamente los hongos del género *Stemphylium*, y establecer las diferencias morfológicas con hongos afines (*Alternaria* spp.), para realizar un manejo adecuado de la enfermedad. La relación entre estos hongos es ambigua y por ello aún se encuentra bajo análisis y discusión. Estas enfermedades se controlan con fungicidas, pero se desconoce el efecto de la RSA sobre las mismas, información que es clave para realizar un manejo sustentable de la enfermedad. La “mancha gris de la hoja del tomate” tiene una incidencia que está aumentando considerablemente, siendo cada vez más severa en latitudes más australes del país, puesto que el manejo de los fitopatógenos es frecuentemente dificultoso y además no hay disponibilidad de variedades resistentes de gran parte de los cultivares de tomate. Por lo que la inducción de RSA podría ser una alternativa conducente a lograr una agricultura sustentable.

De esta manera, el objetivo general de este trabajo fue profundizar el conocimiento de los hongos causantes de la “mancha gris de la hoja en tomate” y evaluar su control utilizando la aplicación de compuestos activadores de la RSA.

Se obtuvieron 49 aislamientos monospóricos pertenecientes al género *Stemphylium* a partir de muestras de hojas con síntomas de “mancha gris de la hoja de tomate”, colectadas de diversas variedades comerciales y procedentes de las provincias de Buenos Aires y Corrientes durante las campañas correspondientes al periodo 2010-2013, los que se conservaron en cultivos stock para los estudios posteriores; los cuales están depositados en el cepario del CIDEFI, FCAyF-UNLP.

Tres aislamientos se confirmaron pertenecientes al género *Stemphylium* utilizando el marcador molecular ITS (*Internal Transcribed Spacer*) y las características morfométricas de los conidios que coincidieron a las reportadas para *S. lycopersici*.

Se obtuvo el perfil de metabolitos secundarios de los aislamientos CIDEFI estudiados, existiendo variabilidad en su capacidad para sintetizar un espectro diferencial de metabolitos específicos. Se registraron 23 compuestos, varios de los cuales aún no estaban registrados para *Stemphylium*, con la infectopirona como el metabolito más representado. El aislamiento CIDEFI 216 cuyo fenotipo varió según las condiciones de cultivo, incluyendo su respuesta al estrés hídrico, fue capaz de afectar diferencialmente distintos cultivares de tomate.

Este aislamiento reveló ser polífago, mostrando también sintomatología típica de manchas foliares de la enfermedad estudiada sobre otras especies vegetales como *Capsicum annum* L., *Cucumis sativus* L., *Cucurbita máxima* var. *zapallito* (Carrière) Millán, *Cucurbita pepo* L., *Eruca sativa* Mill., *Lactuca sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Solanum melongena* L. y *Zea mays* L.

Se evaluó el efecto del BTH frente a la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216 en tres sistemas de estudio: i, bajo condiciones *in-vitro* sobre hojas desprendidas de tomate; ii, en plantas de tomate cultivadas en macetas en invernáculo; y iii, en cultivo en invernáculos de producción comercial. Bajo ciertas condiciones de aplicación el BTH redujo la severidad del aislamiento CIDEFI 216, aunque su respuesta en planta no fue estable y causó cierto grado de fitotoxicidad. Aunque en invernáculos de producción comercial el BTH redujo la severidad de la enfermedad, provocada por infección natural de *Passalora fulva*, no se observaron alteraciones en los rendimientos del cultivo. Todos estos resultados sugieren que el BHT es un compuesto que tiene potencial en la inducción de protección del tomate frente a la “mancha gris de la hoja de tomate”. Sin embargo, parámetros como TBARS, fenoles totales y la actividad POX no resultaron ser indicadores fidedignos en la detección de RSA.

## ABSTRACT

In Argentina, the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is the second most important horticultural crop after the potato, widely spread in “Cinturón Hortícola Platense”. Also, this plant species represents a model system in the study of plant-microorganism interactions. Systemic Acquired Resistance (SAR) is an active defense mechanism in plants that confers nonspecific protection in tissues distant from the site of interaction (localized site) against a broad spectrum of microorganisms. Different chemical agents, some synthetic salicylic acid (SA) analogues, such as benzo- (1,2,3) -thiadiazol-7-carbothioic S-methyl ester (BTH), act as inducers of SAR. Currently, among problems of plant health that affect tomato production, fungi associated with leaf spots stand out, among them representatives of the genus *Stemphylium* Wallr., being the causal agents of the "gray spot of tomato leaf". Their typical symptoms are brownish angular-circular spots, slightly sunken and with a grayish center that can come off (autotomy), which is a diagnostic characteristic. In this sense, it is necessary to taxonomically identify fungi from the *Stemphylium* genus, and establish morphological differences with related fungi (*Alternaria* spp.), for perform right management of the disease. The relationship between these fungi is ambiguous and therefore is still under analysis and discussion. These diseases are controlled with fungicides, but the effect of SAR on them is unknown, information that is key to sustainable management of the disease. The “gray spot of the tomato leaf” has an incidence that is increasing considerably, becoming more severe in the southernmost latitudes of the country, since the management of phytopathogens is frequently difficult and also there is no availability of resistant varieties of great part of tomato cultivars, the ASR induction can be an alternative conducive to achieving sustainable agriculture.

In this way, the general objective of this work was to deepen the knowledge of the fungi that cause “gray leaf spot in tomato” and to evaluate their control using the application of SAR activating compounds.

Forty nine monosporic isolates belonging to the genus *Stemphylium* were obtained from leaf samples with symptoms of "gray spot of tomato leaf", which were collected from various commercial varieties from the provinces of Buenos Aires and Corrientes during the campaigns corresponding to the period 2010- 2013. These isolates were kept in stock cultures for subsequent studies; which are deposited in the culture collection “CIDEFI”, FCAyF-UNLP.

Three isolates were confirmed belonging to the genus *Stemphylium* using the molecular marker ITS (Internal Transcribed Spacer) and the morphometric characteristics of the conidia that coincided with those reported for *S. lycopersici*.

The profile of secondary metabolites of the isolates was obtained, with variability in their ability to synthesize a differential spectrum of specific metabolites. Twenty three compounds were registered, several of which were not yet registered for *Stemphylium*, with infectopyrone as the most represented metabolite.

The CIDEFI 216 isolate, whose phenotype varied according to culture conditions, including its response to water stress, was able to differentially affect the leaf material of different tomato cultivars. This isolate revealed to be polyphagous, also showing leaf spot symptoms on other plant species such as *Capsicum anum* L., *Cucumis sativus* L., *Cucurbita máxima* var. zapallito (Carrière) Millán, *Cucurbita pepo* L., *Eruca sativa* Mill., *Lactuca sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Solanum melongena* L. and *Zea mays* L.

The effect of BTH was evaluated through its application in three study systems: i, under *in-vitro* conditions on detached leaves against inoculation with CIDEFI 216 isolate; ii, in potted plants also exposed to the same fungus; and iii, in cultivation in commercially produced greenhouses. Under certain application conditions, BTH reduced the severity of CIDEFI 216 isolate, although its response in the plant was not stable and caused phytotoxicity. Although BTH reduced the severity of leaf diseases in commercial greenhouses, which corresponded to *Passalora fulva*, no alterations in crop yields were observed. All these results suggest that BHT is a molecule that has the potential to induce protection of the tomato against the "gray spot of the tomato leaf". However, parameters such as TBARS, total phenols, and POX activity were not useful in detecting ARS.

# Capítulo 1.

## Introducción general.



## 1. El cultivo de tomate

El género *Lycopersicon*, perteneciente a la familia *Solanaceae*, tiene su origen en América del Sur, puntualmente en la región andina desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile, y fue domesticado en México (Blancard *et al.* 2011). El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa un lugar importante entre las hortalizas a nivel mundial debido a su valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio (FAO-FAOSTAT, 2021) tomate es un fruto con adecuadas propiedades nutricionales, dadas por su contenido en vitamina C, potasio, fibra, y beta caroteno, como así también es precursor de la vitamina A, y como fuente de licopeno, cumpliendo un importante rol como alimento funcional en la prevención de enfermedades (Blancard *et al.* 2011).

La importancia de la horticultura en la Argentina se manifiesta en diversos aspectos: por su amplia distribución geográfica presente en todas las economías regionales, por la diversidad de cultivos que implica, por su contribución histórica al producto bruto (11.6% PBI Agrícola, utilizando apenas el 2% de la superficie agrícola), por su contribución a la alimentación de la población (132 kg/hab/año) y por estar sustentada en sistemas de producción caracterizados como PyMES, con la alta generación de empleo que implica, unas 350.000 personas en la etapa primaria de producción, sumado a los trabajadores ocupados en el resto de la cadena de valor: selección, empaque, comercialización, proveedores de insumos, asesores y transportistas (García & Hang 2007; García 2016; Fernández Lozano & Olaf Budde 2018; Leguizamon 2018). La superficie nacional dedicada a la horticultura se estima en 600.000 hectáreas que generan una producción cercana a las 10.500.000 toneladas. Esta cantidad está representada por las siguientes especies: la papa, el tomate, la cebolla, la batata, el zapallo, la zanahoria, la lechuga, el poroto y el ajo que contribuyen al 65% y la acelga, la mandioca, el zapallito, la sandía, el melón, el choclo, la berenjena y el pimiento que corresponden al 20%. El 93% de esta producción se destina al mercado interno y el 7% restante se exporta. La diversidad de hortalizas que produce Argentina, alcanza a más de 115 especies cultivadas en pequeñas y grandes extensiones (Balbi 2018; Leguizamon 2018).

Aunque el tomate se cultiva en casi todo el país, tiene una fuerte concentración en las provincias de Corrientes y Buenos Aires, representando aproximadamente el 90 % de la superficie nacional (Corvo Dolcet 2005). Actualmente el Cinturón Hortícola Platense (CHP), una zona históricamente dedicada a este tipo de cultivos, es el más importante del país (García 2015) con una superficie ocupada por invernaderos que alcanza las 3000 ha y contribuye con el 62% de la producción en la Provincia de Buenos Aires, equivalente a 30.580 tn/año (CNA 2008). Según el

censo hortícola de la provincia de Buenos Aires en el año 2005 en La Plata el 83 % de la producción de tomate se obtuvo en cultivo bajo cubierta (CPHF 2005).

En el CHP y en las regiones hortícolas de Corrientes la producción se realiza en invernáculo, tecnología que se adoptó en los 80'- 90', y que se integró al paquete tecnológico (semillas y agroquímicos) como sistema productivo predominante (CPHF 2005; García & Hang 2007; García 2015). La tecnología del cultivo bajo cubierta permitió maximizar los rendimientos, ampliar la época de producción y mejorar la calidad de la cosecha, propiciando el manejo adecuado de las adversidades abióticas y bióticas asociadas. Sin embargo, la construcción deficiente de los invernáculos entre otros aspectos, favoreció la aparición y creciente incidencia de enfermedades ocasionadas por diversos agentes fitopatógenos.

Es conocido que los cinturones hortícolas en particular suelen generar un escenario favorable para la producción y dispersión de inóculos y propágulos de diferentes enfermedades, con un mayor impacto en el caso de agentes polífagos como (*Alternaria spp.*; *Botrytis sp.*, *Stemphylium spp.*; entre otros), ya que pueden acceder a cultivos huéspedes diversos y así intensificar su dispersión e incidencia bajo condiciones climáticas favorables. El efecto del confinamiento con elevada temperatura y alta humedad relativa en un período de tiempo prolongado, características de los invernáculos del CHP, favorecen la proliferación y dispersión de agentes causantes de enfermedades y plagas. Para cubrir necesidades del mercado las especies hortícolas están siendo cultivadas en momentos del año en que no se registran las condiciones óptimas para su crecimiento y producción, originándose situaciones de estrés, sumados a problemas de dimensiones inadecuadas en los invernáculos y ventilación insuficiente (Mitidieri 2009). Por lo tanto los cultivos bajo invernadero en estas condiciones son susceptibles a problemas fitosanitarios (Polack 2008). No obstante, el impacto de este tipo de horticultura extremadamente intensiva es variable según el sistema de producción analizado (Blancard *et al.* 2011).

Todo lo mencionado anteriormente conduce a la necesidad de incrementar el uso de plaguicidas para el manejo de enfermedades y plagas, en la mayoría de los casos sin un debido diagnóstico ni monitoreo, utilizando productos de amplio espectro. Esta situación provoca problemáticas adicionales; en la salud de los trabajadores y la población, ambientales, contaminación, fenómenos de resistencia y la reducción de la abundancia y diversidad de enemigos naturales.

## 1.2. Interacción Patógeno-Hospedante.

Una estrategia prometedora de mejora de los rendimientos agrícolas con un menor impacto ambiental, involucrando la reducción en la aplicación de agroquímicos y la preservación de la biodiversidad, debería estar dirigida hacia una agricultura sustentable que también intente responder a la problemática y compleja situación social que condiciona además los efectos adversos del cambio climático (Sarandón 2002; Balmford *et al.* 2005; Peteira & Ondina 2011; Pittelkow *et al.* 2015; Altieri & Nicholls 2017). Actualmente a escala mundial, es dominante un modelo de producción de alimentos heredado de la Revolución Verde, lo que puede generar a la vez desbalances en el ambiente y así conducir a la proliferación de patógenos que provocan importantes pérdidas de rendimiento de los cultivos (Polack 2008; Andrade *et al.* 2017).

En la actualidad uno de los principales desafíos en la producción de alimentos es la implementación de sistemas tecnológicos sustentables (Toledo 2000; Sarandón 2014; Rizo-Mustelier *et al.* 2017; Castagnino *et al.* 2020). La agricultura sustentable surge de la búsqueda de estrategias para mantener y aumentar la productividad de los agroecosistemas, minimizando los efectos negativos sobre los recursos naturales (Sarandón 2002). Entre ellas, el manejo integrado de plagas y enfermedades constituye una herramienta prometedora que incluye aspectos culturales, biológicos y físico-químicos destinados al mantenimiento del estado sanitario de un agroecosistema (Polack & Mitidieri 2005).

Los hongos, junto a otros microorganismos, son componentes claves de los ecosistemas, incluyendo los agroecosistemas, en los que cumplen diversas funciones. Muchos de ellos son saprótrofos y así descomponen una amplia gama de sustratos orgánicos, siendo claves en la formación y fertilidad de los suelos. También hay otros hongos que pueden influenciar la estructura de la comunidad vegetal vía diferentes tipos de asociaciones incluyendo formas patógenas o simbioses. Algunas de estas interacciones son benéficas, como las micorrizas, donde los hongos promueven el crecimiento y desarrollo de diferentes procesos fisiológicos en las plantas.

Por otro lado, los hongos fitopatógenos alteran la biología de sus plantas hospedantes causando estrés y modificando sus características morfológicas, eco-fisiológicas u otras relacionadas al ciclo de vida de la planta, que conduce a enfermedad (Agrios 2005). Las plantas pueden presentar un aumento de la respiración celular, desintegración celular, división o agrandamiento celular anormal y disminución de componentes específicos como la clorofila, provocando marchitamiento, clorosis y necrosis (Agrios 2005).

Existe un amplio espectro de hongos fitopatógenos, los que se pueden caracterizar según el tipo de relación planta-hospedante, y el efecto que causan sobre el vegetal. Asimismo, algunos pueden colonizar sobre un amplio rango de hospedantes, o ser específicos ya sea en su ataque a determinadas estructuras u órganos del hospedante y/o bajo ciertos estados fenológicos del mismo (Agrios 2005). Mientras que algunos hongos fitopatógenos son biótrofos en respuesta a su total dependencia para crecer y completar su ciclo de vida asociado a sus hospedantes mediante hasutorios; otros, en cambio, son necrótrofos que crecen de forma subcutánea destruyendo las células epidérmicas al secretar metabolitos tóxicos y proteínas (Lo Presti *et al.* 2015).

El conocimiento de la interacción patógeno-planta, de los diversos patosistemas, sus características así como el estudio de las estrategias para su manejo resultan prioritarios para lograr sistemas productivos sustentables.

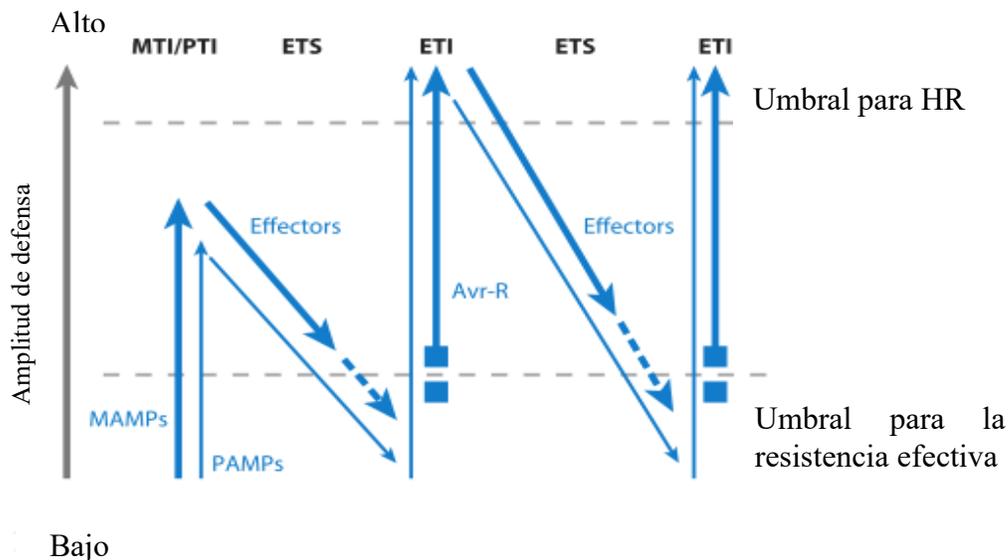
Las plantas se enfrentan a diversos patógenos a través de diferentes mecanismos combinados de defensa, pasivos o activos. Dentro de los primeros, se puede señalar; la cutícula, localización y cantidad de estomas, tipos de pelos, entre otros. Los componentes activos se refieren a los mecanismos que se activan en respuesta a un patógeno, incluyen la inmediata producción de especies reactivas del oxígeno (Resende *et al.* 2003; Benezzer-Benezzer *et al.* 2008), la lignificación y la deposición de suberina, la acumulación de metabolitos secundarios como fitoalexinas y la síntesis de péptidos y proteínas de defensa (Mittler *et al.* 2004; van Loon *et al.* 2006; Bueno Dias & Azevedo Rangel 2007), como las enzimas despolimerizantes  $\beta$ - 1,3-glucanasas y quitinasas (Camarena Gutierrez 2006; Camarena Gutierrez & de la Torre Almaráz 2007).

Los patógenos, a su vez, pueden sintetizar un paquete de herramientas y mecanismos que les posibilita evadir y/o suprimir las respuestas defensivas de la planta (Staskawicz 2002; Agrios 2005).

Existen diferentes modelos para comprender las bases moleculares de la interacción plantas-microorganismos y como podría desarrollarse el proceso de la enfermedad. El modelo de Flor en 1942 sentó las bases con su hipótesis “gen a gen”, el cual sostenía que un gen de resistencia dominante del hospedador (*R*) provoca un determinado fenotipo de resistencia ante la enfermedad en respuesta a un patógeno con un gen de avirulencia dominante (*Avr*). Como producto de esta interacción entre sus productos génicos se activan respuestas de defensa en el hospedador.

Actualmente, uno de los modelos más utilizados para explicar las interacciones patógeno-hospedador es el modelo “zig-zag” propuesto por Jones & Dangl (2006), el cual consta de cuatro fases (Figura 1.1.); a posteriori se han ampliado estos conceptos (Henry *et al.* 2012). En la fase 1, las plantas reconocen moléculas conservadas del patógeno, denominados patrones moleculares asociados al microbio o al patógeno (MAMPs o PAMPs, *microbial or pathogen-associated*

*molecular patterns*) mediante receptores de reconocimiento del patrón (PRRs, *pattern recognition receptors*), lo que conduce a una resistencia de amplio espectro, denominada inmunidad activada por MAMP/PAMP (MTI o PTI *MAMP-triggered immunity*). En la fase 2, los patógenos exitosos liberan moléculas (proteínas) denominadas efectores con la capacidad de manipular algún mecanismo de la planta en favor de la patogenicidad (inhiben parte de la respuesta inmune, afectan el tráfico vesicular, inhiben proteasas de la planta, entre otras) que les permiten superar la MTI, lo que resulta en la susceptibilidad desencadenada por efectores ETS (del inglés, *effector-triggered susceptibility*, efector de la susceptibilidad). En la fase 3, determinados efectores son reconocidos de manera específica por receptores intracelulares (proteínas R), los que conducen a la activación de la respuesta mediada por efectores (ETI, *effector-triggered immunity*). En la fase 4, el patógeno para evitar la ETI actúa eliminando o diversificando el gen efector reconocido, o adquiriendo determinantes antigénicos o efectores adicionales, que le permiten evadir la ETI. A su vez, en las plantas da lugar a nuevas especificidades de resistencia, que derivan en el accionar de los ETI nuevamente.



**Figura 1.1.** Modelo zig-zag. Los cambios en la amplitud de defensa de la planta contra el ataque de patógenos, como se indica mediante el modelo de zig-zag propuesto por Jones & Dangl 2006. Flechas azules gruesas indican la respuesta de la planta en presencia del patógeno.

Cuando las plantas interactúan con agentes causantes de enfermedades tales como hongos, bacterias o virus, los cuales son incompatibles con esos hospedantes, se produce una reacción en la planta denominada reacción de hipersensibilidad (RH) (Ward *et al.* 1991; Ryals *et al.* 1994; van Loon 1997; Hammerschmidt 2001; Da Rocha & Hammerschmidt 2005). La respuesta de

hipersensibilidad se define como una muerte rápida de células vegetales asociada con la restricción del crecimiento de patógenos (Sanzón Gómez & Zavaleta Mejía 2011). Esta reacción implica que se produzca un proceso denominado Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) (Chester 1933) que implica la producción por la planta una o varias señales móviles que permiten activar los mecanismos de resistencia en partes no infectadas y adicionalmente la planta aumenta su resistencia a infecciones que pueden ocurrir a posteriori, inclusive como resultado de la acción de otros patógenos (Sticher *et al.* 1997; Vlot *et al.* 2008; Klessig *et al.* 2018).

Existen varios indicadores de RSA: la inducción de varias proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Ward *et al.* 1991; van Loon *et al.* 1994; van Loon 1997), de las actividades enzimáticas, la elevación de fenoles y la existencia de la peroxidación de lípidos, entre otros (Király *et al.* 2007). Los compuestos fenólicos están involucrados en las respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos; la molécula que participa como señal; el ácido salicílico (AS) (Vlot *et al.* 2008, 2009; Park *et al.* 2009; Klessig *et al.* 2018); compuestos fenilpropanoides (Kuc 1995) como la lignina y polifenoles relacionados (Ruiz & Romero 2001). La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, que pueden desempeñar un papel importante en la absorción y la neutralización de los radicales libres, el bloqueo del oxígeno, o la disminución de la peroxidasa, limitando así el riesgo de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Ravi *et al.* 2012). Una enzima clave en la síntesis de lignina es la fenilalanina amonio liasa (PAL), precursora de la ruta de los fenilpropanoides en la síntesis de metabolitos secundarios que frecuentemente forman parte del aparato inmunológico de la planta (Jones & Dangl 2006). La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos, siendo los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, uno de los principales blancos de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres. Por este motivo, el daño de los mismos, producto de la acción de un patógeno puede servir como indicador del desarrollo de enfermedad (Ruiz & Romero 2001).

El estudio de la interacción en el patosistema *Stemphylium*-tomate puede contribuir a la comprensión de la resistencia de la planta y es el punto de partida para su aplicación práctica en el manejo de enfermedades. Asimismo, esta especie vegetal representa un sistema modelo en el estudio de interacciones planta-microorganismos, sea este último patógeno o simbiote (Arie *et al.* 2007).

De la misma manera que el resto de los cultivos, la producción de tomate es afectada por un conjunto de enfermedades y plagas. En términos generales, los virus, hongos y las bacterias suelen tener una alta incidencia en dicho cultivo (Jones *et al.* 1991; Ronco *et al.* 2008), siendo las

enfermedades de origen fúngico las más importantes considerando la diversidad y cantidad de patógenos involucrados, el carácter endémico de los mismos y las pérdidas económicas que estos producen.

El tomate está sujeto al ataque de innumerables plagas y enfermedades siendo susceptible a más de 200 enfermedades de diversa etiología (Agrios 2005; Blancard *et al.* 2011). Entre las enfermedades de origen biótico que afectan al cultivo de tomate se destacan:

a) Micosis: Mal de los almácigos o “damping-off” (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp.; *Phytophthora* spp.), Moho gris (*Botrytis cinerea*), Oidio (*Leveillula taurina* o *Erisiphe* spp.), Moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*), Fusariosis (*Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*), Tizón temprano (*P. infestans*), Tizón tardío (*Phytophthora capsici* y *P. nicotianae*), Podredumbre del tallo y de la raíz (*Phytophthora nicotianae*), Podredumbre húmeda del tallo (*Sclerotinia sclerotiorum*), Verticiliosis (*Verticilium dahliae*), Mancha gris de la hoja (*Stemphylium* spp.), Antracnosis (*Colletotrichum* spp.), Viruela (*Septoria lycopersici*); b) Bacteriosis: Cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), Mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*), Peca bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), Necrosis de médula (*Pseudomonas corrugada*, *P. mediterranea*, *P. viridiflava*), Marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*), Podredumbre blanda del tallo (*Pectobacterium corotovorum* subsp. *corotovorum*) y c) Virosis: Peste negra (*Tomato spotted wilt virus*), Mosaico (*Tomato mosaic virus*) y Virus de la cuchara (*Tomato yellow leaf curl virus*) (Fernández Valiela 1952; Blancard 1992; Colombo *et al.* 2001; Ronco *et al.* 2008; Mitidieri 2009; Blancard *et al.* 2011). Cabe aclarar que existen más enfermedades en cada categoría pero se priorizaron las más frecuentes.

Conocer y preservar la biodiversidad resulta prioritario, no sólo debido a la biodiversidad *per se*, sino también, al valor que ella tiene en el aprovechamiento razonable de los recursos y preservación de la calidad ambiental (Balmford *et al.* 2005; Sarandon & Flores 2014). Resulta relevante el conocimiento de los patógenos y de las bases fisiológicas, bioquímicas, moleculares y genéticas que rigen las interacciones con las plantas, lo cual puede contribuir a la obtención de una resistencia durable y a la disminución del uso de plaguicidas.

### 1.3. Importancia económica de las enfermedades ocasionadas por *Stemphylium*. La “mancha gris de la hoja del tomate”.

#### 1.3.1. *Stemphylium* en otros hospedantes.

Muchas especies de *Stemphylium* son patógenas de plantas, humanos y otros animales (Kumar 2007). También, se pueden comportar como saprotrofos y como endófitos asintomáticos (Liu *et al.* 2015). En humanos se ha reportado que puede causar reacciones alérgicas e infecciones pulmonares (Wu *et al.* 2004). *Stemphylium* spp. son patógenos de varios cultivos agrícolas a lo largo del mundo causando diversos grados de pérdidas (Polfliet 2002).

Sobre plantas, los síntomas que causan los representantes de *Stemphylium* spp. generalmente se reportan como: manchas y tizones foliares, atacando diversos cultivos en diferentes lugares del mundo (berenjena en Brasil, cebolla en India y en Australia, ajo en Australia, Sudáfrica, Turquía, Korea y España, esparrago en Grecia y Estados Unidos, trébol rojo en Estados Unidos y Canadá, alfalfa en Estados Unidos, espinaca en Estados Unidos, pera en Europa: Italia, España, Holanda, Portugal, Bélgica y Francia, algodón en Brasil, pimienta en Korea, Japón y Argentina, ornamentales como *Phlox* en Japón, entre otros) (Lacy 1982; Ponti *et al.* 1982; Cowling & Gilchrist 1982; Ellis & Ellis 1985; Johnson 1987; Gupta & Srivastava 1988; Villardel 1988; Aveling & Naude 1992; Montesinos & Vilardell 1992; Blancard 1992; Ponti & Laffi 1993; Montesinos *et al.* 1995; Berg & Leath 1996; Elana 1996; Takeuchi & Horie 1997; Mehta *et al.* 1998, 2000; Cho & Hun 1998; Basallote-Ureba *et al.* 1999; Suheri & Price 2000a, b; Koike & Henderson 2001; Cho *et al.* 2001; Llorente & Montesinos 2002; Polfliet 2002; Realise *et al.* 2002; Van Dijke 2002; Kim *et al.* 2004; Keisuke & Toyozo 2011; Nasehi *et al.* 2012a; Polat *et al.* 2012; Franco 2017; Brahamanage *et al.* 2018).

Es importante señalar que se siguen registrando novedades en distintos lugares del mundo de cultivos infectados por varias especies de *Stemphylium*, *S. solani* en pepino (Vakalounakis & Markakis 2013) y *S. vesicarium* en perejil en los Estados Unidos (Koike *et al.* 2013).

También, existe una constante actualización sobre temas taxonómicos en lo que se refiere a los representantes del género *Stemphylium*, ya que cuatro nuevas especies de *Stemphylium* fueron descritas en China en el 2003 y también existen permanentes actualizaciones en la nomenclatura (Zhang *et al.* 2003; Woudenberg *et al.* 2017).

### 1.3.2. *Stemphylium* en tomate.

La “mancha gris de la hoja del tomate” puede ser una de las más severas enfermedades cuando se plantan cultivares susceptibles y no se realiza un adecuado manejo fitosanitario. Las pérdidas debidas a esta enfermedad se deben a la reducción en el área de la hoja y el potencial de rendimiento (Kurozawa & Mussi 1995). En un trabajo pionero en lo referido al estado del complejo *Stemphylium* asociado a la hoja del tomate, muestran un mapa donde se observa la amplia distribución geográfica del hongo en los diversos países y en todos los continentes del mundo, específicamente en regiones tropicales y subtropicales (Rotem & Bashi 1977).

Epifitias causadas por *S. solani* en algodón fueron reportados en el estado de Paraná de Brasil durante 1994 y 1995, y causaron hasta el 100% de pérdidas de rendimiento en un cultivar local susceptible en India (Mehta *et al.* 1998). La “mancha gris de la hoja del tomate” fue observada en Korea en 1994 (Min *et al.* 1995). En 2011 en Malasia se registró una incidencia del 80 % de esta enfermedad en tomate (Nasehi *et al.* 2012b) seguido por una incidencia del 70 % en pimiento (Nasehi *et al.* 2012a). Desde hace un tiempo la “mancha gris de la hoja del tomate” está siendo controlada en Brasil debido al uso de cultivares resistentes y aplicaciones periódicas de fungicidas (Kurozawa *et al.* 1997; Lopes *et al.* 2003). Sin embargo, recientemente se verificaron epifitias severas en las principales regiones productoras de tomate de ese país. Esto se debe a la falta de interés de las empresas en incorporar el gen Sm, que le otorga resistencia contra el patógeno, como así también a una falta del correcto diagnóstico de la enfermedad, ya que suele confundirse con otras con sintomatología parecida (Reis & Boiteux 2006a, b) provocada por *Pseudomonas* spp. y *Alternaria* spp., organismos que con frecuencia acompañan a *Stemphylium* en los tejidos vegetales (Reis & Boiteux 2006a). La determinación del agente causal (bacterias y/o hongos) es clave para desarrollar las estrategias efectivas de manejo.

En la provincia de Corrientes, Argentina, esta enfermedad fúngica adquirió relevancia por la determinación en el 2001 de la “mancha gris de la hoja del tomate” en plantas chicas de vivero, cuyos agentes fueron *S. solani* y *S. floridanum* (actualmente *S. lycopersici*) (Colombo 2002). No obstante, *S. floridanum* fue reportado en 1987 en Corrientes, como la primer cita de esta enfermedad (Colombo *et al.* 2001).

Como se ha indicado, la “mancha gris de la hoja del tomate” es una enfermedad cuyo agente causal es *Stemphylium* spp. Actualmente, esta patología es una de las más destructivas en aquellas zonas del mundo donde se utilizan cultivares susceptibles en áreas de cultivo con condiciones de temperaturas templadas a cálidas y alta humedad relativa (Jones *et al.* 1991). Es oportuno

mencionar que estas condiciones se reproducen en los invernáculos, sistema predominante del cinturón hortícola del gran La Plata y en Corrientes, favoreciendo así el desarrollo de la enfermedad. Es importante destacar que esta patología ha reaparecido en varias zonas de importancia hortícola (está mencionada para Buenos Aires, Corrientes (Franco *et al.* 2017a), Mendoza y Salta (Franco *et al.* 2017a, b) durante las últimas campañas (Ronco, L. y Camilletti, S. Comunicación personal). Además, su incidencia se ha incrementado en los últimos años, y su distribución se está ampliando a zonas templadas, como consecuencia posible del calentamiento global como sucede con otras enfermedades (Das *et al.* 2014).

### 1.3.3. El patógeno.

*Stemphylium* es un taxón establecido en 1833 (Wallroth 1883) que incluye especies saprótrofas y patogénicas (polífagas) de plantas (Kirk *et al.* 2004). Taxonómicamente, se ubica dentro del Reino *Fungi*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Pezizomycotina*, Clase *Dothideomycetes*, Orden *Pleosporales* y Familia *Pleosporaceae*. Son hongos dematiáceos que producen conidios muriformes que proliferan de manera percurrente (Simmons 1969, 1985, 1989, 2001).

Estudios moleculares han sido usados en el tratado de la taxonomía de *Stemphylium*, los resultados filogenéticos y la relación entre las especies y los aislamientos evaluados sostienen que es un grupo de origen monofilético (Câmara *et al.* 2002; Inderbitzin *et al.* 2009; Franco 2017; Franco *et al.* 2017b). Asimismo, es importante avanzar hacia un estudio polifásico del género *Stemphylium*, conocer el perfil de metabolitos secundarios y su rol en el proceso de patogénesis (Barash *et al.* 1975; Barash 1982; Andersen *et al.* 1995; Debbab *et al.* 2012).

La “mancha gris de la hoja de tomate”, causada por *Stemphylium solani* Weber, fue reportada por primera vez en Florida, Estados Unidos (Weber 1930). Otra especie causa la misma enfermedad en tomate y fue reportada como *S. floridanum*; aunque actualmente el nombre correcto es *S. lycopersici* (Enjoji) Yamamoto (Ellis & Gibson 1975). Ambas desarrollan la misma sintomatología en las plantas de tomate (Hannon & Weber 1955) y a su vez también son patógenos en pimiento (Weber 1930; Hannon & Weber 1955). Entre las especies del género *Stemphylium* que han sido reportadas como agentes causales de la “mancha gris de la hoja de tomate” podemos encontrar a *S. solani* (Weber 1930), *S. lycopersici* (Hannon & Weber 1955; Ellis & Gibson 1975) y *S. botryosum* (Rotem *et al.* 1966) y *S. vesicarium* (Blancard *et al.* 2011).

De manera general se puede afirmar que los representantes de *Stemphylium* crecen rápido, presentan colonias de color blanco, rosado, amarillo, gris, marrón o negro, con características de las

colonias aterciopeladas o afieltradas. El modo de proliferación de los conidióforos es percurrente y con la célula conidiógena apical con forma de copa, son de color marrón claro a marrón oscuro, acrógenos, obtusos o agudos en los extremos, oblongos, elipsoidales a subesféricos; de superficie lisa, verrugosa o equinulada. De aspecto muriforme, con septos transversales, verticales u oblicuos, usualmente con constricciones en uno o más de sus septos y con una cicatriz en la base (Wiltshire 1938; Groves & Skolko 1944; Moreau & Moreau 1947; Simmons 1969, 1985, 1989, 2001; Simmons *et al.* 2004; Obregon 2018).

Todas las especies citadas de *Stemphylium* que enferman tomate provocan los mismos síntomas en los diferentes estados fenológicos del cultivo de tomate, siendo mayor la presencia en el estadio de fructificación (Jones *et al.* 1991).

#### **1.3.4. Sintomatología.**

Los síntomas se observan en hojas, peciolo y tallos. Los síntomas más característicos de la enfermedad se visualizan en los folíolos de las hojas de la parte baja de la planta y se distribuyen sin respetar un patrón. Se manifiestan a través de pequeñas manchas ligeramente angulares (aunque también pueden ser circulares), algo deprimidas, de 2-10 mm de diámetro, inicialmente pardas, marrón claro a marrón oscuro, grisáceas, siendo el centro de las manchas de color más claro (gris), que puede desprenderse del tejido circundante (autotomía) y presentar a veces un halo amarillento (Rotem & Bashi 1977; Blancard *et al.* 2011; Domingues 2012; Obregón 2014; Obregon 2018).

Ocasionalmente, en infecciones severas las lesiones en las hojas coalescen necrosando grandes áreas del tejido foliar, así se vuelven pardas y caen (Jones *et al.* 1991). Esto puede provocar un fuerte daño por insolación en frutos además de reducir la capacidad fotosintética y pérdida de rendimiento (Cerkauskas 2005). Algunas veces, síntomas similares a los recientemente descritos se pueden observar en peciolo y tallos, las lesiones son alargadas y aparecen cuando la presión de inóculo aumenta, aunque no existen reportes de síntomas en frutos de plantas cultivadas (Jones *et al.* 1991).

Las manchas aparecen tanto en hojas jóvenes como viejas de las plantas (Cerkauskas 2005). Algunos autores sostienen que la enfermedad progresa de las hojas basales hacia la parte apical de la planta (Rotem & Bashi 1977; Obregón 2014). Se ha observado que puede ser a la inversa, que afectan principalmente las hojas nuevas de plantas adultas (Lopes *et al.* 2003).

La sintomatología de la “mancha gris de la hoja del tomate” provocada por *Stemphylium* presenta ciertas similitudes con la que provoca *Pseudomonas* spp. y *Alternaria* spp., organismos

que con frecuencia acompañan a *Stemphylium* en los tejidos vegetales (Reis & Boiteux 2006a). La determinación del agente causal (bacterias y/o hongos) es clave para desarrollar las estrategias efectivas de manejo.



**Figura 1.2.** Sintomatología de la “mancha gris de la hoja” de tomate: Manchas típicas sobre la cara adaxial (a) y abaxial (b) de un foliolo; apariencia de plantas enfermas en estadios tempranos de desarrollo (c) y sus foliolos (d).

### 1.3.5. Ciclo de la enfermedad.

La enfermedad puede comenzar desde que las plantas son muy pequeñas, sea en plantineras (denominación referida a viveros hortícolas) o en el trasplante de plantines al cultivo de tomate, por eso es frecuente observar la mancha gris de la hoja en los cotiledones (Obregon 2018).

Las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad son temperaturas entre 23-28 °C y alta humedad relativa, con una presencia de una película de agua en la hoja (incluso rocío) para que los conidios del hongo germinen. La producción de conidios es favorecida por períodos alternados de humedad y sequía en las hojas (de Miranda 2009).

Los conidios son dispersados por las corrientes de aire, por la lluvia y agua de riego y son capaces de penetrar en el hospedante directamente por medio de la epidermis o indirectamente a través de los estomas, después de la formación de apresorios (Borges *et al.* 1976; Aveling & Naude

1992; Suheri & Price 2000a), siendo este el modo de penetración más común (Cowling & Gilchrist 1982; Suheri & Price 2000a). En la infección el hongo forma una vesícula en la cámara subestomática de las hojas, luego las hifas se ramifican y colonizan el tejido. En estudios con cultivares resistentes y susceptibles, se descubrió que los últimos forman papilas a nivel de la pared celular en el mesófilo de la hoja, posteriormente el hongo lo invade y produce los síntomas después de un período de incubación de 2 ó 3 días en condiciones controladas y hasta 4 ó 5 días a campo (Bentes & Matsuoka 2005). Una vez establecido el micelio se forman conidióforos y conidios en la cara abaxial de la hoja. Posteriormente se origina el inóculo secundario y los conidios del hongo son diseminados por el viento y la lluvia o el agua de riego fundamentalmente (Jones *et al.* 1991; Obregon 2018).

Algunas especies, como *S. botryosum*, pueden desarrollar peritecios que favorecen la perpetuación del hongo por fuera del hospedante (Simmons 1969). En lo que respecta a la supervivencia, el hongo sobrevive por medio de conidios y dado su carácter saprótrofo se perpetúa en el suelo, en rastrojo de cultivo u otro material en descomposición, en diversas malezas o en cultivos alternativos de la familia *Solanaceae*, o en otras especies dado su carácter polífago (Jones *et al.* 1991; Cerkauskas 2005; Kumar 2007; de Miranda 2009; Domingues 2012; Obregon 2018).

#### **1.4. Manejo de la enfermedad.**

En la horticultura argentina el uso de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades es el método más utilizado y uno de los principales problemas de contaminación química desde el punto de vista socio-ambiental, afectando los recursos naturales, la salud de los trabajadores rurales y potencialmente la de los consumidores.

La agroecología puede proveer el conocimiento y la metodología para desarrollar una agricultura que sea, por un lado, ambientalmente adecuada, altamente productiva, socialmente equitativa y económicamente viable. Para realizar una agricultura sustentable se puede intervenir de diferentes maneras, siendo una de ellas el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIP y MIE) (Sarandon & Flores 2014; Altieri & Nicholls 2017). Este se define como un sistema que reúne de manera compatible todas las técnicas posibles para mantener a las plagas y agentes causantes de enfermedades debajo de los niveles que produzcan daño económico al cultivo. Se incluyen técnicas tales como el monitoreo, la utilización de plantas resistentes, el control cultural y el control biológico (Sarandón 2002). Los objetivos de un manejo integrado de enfermedades son: 1) eliminar o reducir el inóculo inicial del patógeno; 2) reducir la efectividad del inóculo; 3) aumentar la

resistencia del hospedero; 4) atrasar el establecimiento de la enfermedad, y 5) evitar la aceleración de los ciclos secundarios de la enfermedad (Agrios 2005).

El manejo convencional de plagas y enfermedades en la mayoría de los establecimientos hortícolas del país se reduce al control químico. Las aplicaciones de agroquímicos se hacen a partir de experiencias de la práctica cotidiana en la actividad, muchas veces no suficientemente fundamentadas, de manera preventiva e incurriéndose en un calendario establecido para el cultivo. Hay coincidencia entre técnicos y productores que los cultivos más afectados por las plagas y enfermedades son los que se encuentran bajo invernaderos y particularmente de la familia de las *Solanaceae* (tomate, pimiento y berenjena). Las consecuencias adversas del empleo generalizado de estos agroquímicos sobre el ecosistema agrícola representa uno de los problemas más importantes desde el punto de vista socio-ambiental y económico en la horticultura (Cieza 2004).

Existen antecedentes sobre un manejo integrado del hongo fitopatógeno, *Stemphylium* spp, que incluye la resistencia genética, el control químico, las prácticas culturales y otras alternativas en el manejo; tales como RSA.

#### **1.4.1. Resistencia genética.**

La generación de cultivares e híbridos de tomate permitió incrementar los rendimientos, una mejor calidad de la fruta y uniformidad del producto. Este proceso trae consecuencias, lo que se conoce como erosión genética o sea la pérdida de genes, muchos de los cuales otorgan rusticidad y resistencia (Warnock 1990). Para ello, se buscan genes en diversas especies de la familia *Solanaceae*, como fuente de resistencia frente a enfermedades (Domingues 2012). El uso de cultivares resistentes es una de las mejores medidas para controlar la “mancha gris de la hoja de tomate” (Mizubuti & Brommonshenkel 1996; Cerkauskas 2005; Kurozawa & Pavan 2005; de Miranda 2009).

Como sostiene Behare *et al.* (1991) la resistencia de las plantas a *Stemphylium* spp. fue descubierta hace mucho tiempo y actualmente aún se usa, es cuantitativa y está determinada por un único gen dominante, Sm. La característica monogénica y dominante de este gen facilita el comportamiento de híbridos F1 contra la resistencia de la enfermedad. En tal sentido, la resistencia a *Stemphylium* spp. de los cultivares mejorados es conferida por el gen localizado en el mismo cromosoma en que están situados los genes I e I-2 que confieren resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Por este motivo, frecuentemente las variedades resistentes a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* son también resistentes a *Stemphylium* spp., pudiendo ser una de las causas por las

cuales no existen mayores estudios para el patógeno en estudio en esta tesis (Domingues 2012). La generación de cultivares comerciales de tomate resistentes a *Stemphylium* data de la década del 1950 el gen Sm viene siendo utilizado en genotipos de tomate sin que haya ocurrido quiebre de la resistencia (Scott 1998). La durabilidad del gen Sm puede estar siendo favorecida por la aplicación de fungicidas recomendados para otras enfermedades del tomate que pueden estar también controlando, potenciales variantes virulentas de las especies de *Stemphylium* spp. (Kurozawa & Mussi 1995). La búsqueda de nuevas fuentes de resistencia a la “mancha gris de la hoja en tomate” es interesante para los programas de mejoramiento genético (Kurozawa & Mussi 1995).

#### **1.4.2. Control químico.**

La intervención química es muy importante para el control de esta patología (Obregon 2018), como así también para otros hongos que inciden en la parte aérea de los cultivos de tomate (Mello & Azevedo 2000). El uso de fungicidas viene siendo moderadamente eficaz en la reducción de las pérdidas económicas derivadas del ataque de *Stemphylium* spp. en diversos cultivos.

Varios fungicidas como clorotalonil, mancozeb, procimidona, tebuconazole e iprodione son mencionados como eficientes en el control de *Stemphylium* en varios hospedantes (Basallote-Ureba *et al.* 1999). En otros trabajos recomiendan la utilización de fungicidas protectores, tales como cúpricos, mancozeb y clorotalonil para el control de esta enfermedad (Kurozawa *et al.* 1997; Meyer & Hausbeck 2000). También, son recomendados los siguientes principios activos: el zineb, el maneb y el mancozeb; la azoxistrobina; el clorotalonil; benalaxil y difenoconazole (Polack & Mitidieri 2005).

Los fungicidas tebuconazol y procimidona son eficientes en el control de *Stemphylium* en ajo (Basallote-Ureba *et al.* 1999). Zheng *et al.* (2010), evaluando el efecto *in vivo* de fungicidas en el control de *Stemphylium* en ajo, observaron que los fungicidas flusilazol (50 g.ha<sup>-1</sup>) y mancozeb (350 g.ha<sup>-1</sup>) fueron eficientes en la reducción de la severidad de la enfermedad.

Con el propósito de disminuir los efectos negativos en la utilización de agroquímicos y aumentar la producción y calidad de los alimentos se están buscando nuevas medidas de protección de plantas contra las enfermedades (Bettioli *et al.* 1998, 2009). Son considerados productos alternativos tanto a los de origen químico, biológico, orgánico y/o naturales que posean características de baja toxicidad, baja o ninguna agresividad al hombre y la naturaleza, simplicidad en cuanto al manejo y aplicación, eficiencia en el combate a los insectos y microorganismos nocivos, alta disponibilidad para su adquisición y no favorecer la selección de individuos resistentes

(Penteado 1998). Entre los productos que podemos mencionar según estos criterios están los extractos de determinadas plantas bioactivas, presentes en el extracto bruto de sus aceites esenciales (Schwan-Estrada *et al.* 2000; Domingues *et al.* 2009). De acuerdo con Fernandes *et al.* (2008) la utilización de productos biológicos o naturales conocidos como defensivos, y puede ser clasificados en dos tipos: por un lado los fertiprotectores y por otro, los protectores. Los fertiprotectores son productos que proporcionan nutrientes a las plantas, influenciando positivamente el proceso metabólico de las mismas, y contribuyendo al control de los patógenos. Están incluidos biofertilizantes líquidos, caldos, orina de animales, entre otros. Los protectores son productos que actúan directamente en el control de fitopatógenos, como los agentes de biocontrol, los extractos vegetales, los feromónicos entre otros.

### **1.4.3. Control biológico**

Son escasos los antecedentes a nivel mundial sobre trabajos en relación al control biológico de *Stemphylium* en tomate (Montesinos *et al.* 1996; Obradovic *et al.* 2004; Hussein *et al.* 2007; Saksirirat *et al.* 2009); como así también en el desarrollo de productos comerciales en el mercado. Es de esperar que en el futuro el desarrollo de estas investigaciones avance y se pueda contar con esta herramienta.

### **1.4.4. Prácticas culturales.**

Según Cerkauskas (2005); Obregon (2018) una serie de recomendaciones son necesarias para lograr un manejo integrado de esta patología, tales como: 1) monitorear cuidadosamente las plantas para detectar los primeros síntomas; 2) evitar el sombreado; 3) eliminar las plantas enfermas y sacar los tomates “espontáneos”; 4) eliminar los restos de cultivos de tomate enfermos, o realizar aradas profundas para enterrar material para reducir los niveles de esporas disponibles. Lopes *et al.* (2005) sostiene que es clave evitar riegos frecuentes, sobre todo por aspersión y utilizar semilla sana en los cultivos para evitar el desarrollo de la enfermedad.

De Miranda (2009) recomienda entre las prácticas culturales la rotación de cultivos con plantas no susceptibles a la enfermedad (diferentes a *Solanaceae*), la erradicación de los hospedantes alternativos entre los que primordialmente se consideran las “malezas” de la familia *Solanaceae* y la realización de fertilizaciones tendientes a aumentar el vigor de plantas, así como el manejo de las condiciones ambientales del canopeo a través de una densidad adecuada de plantas, la

práctica del deshoje, que aseguren el movimiento de aire y ventilación para disipar más fácilmente la humedad y temperatura. Si bien existe la posibilidad de utilizar la solarización para reducir la fuente de inóculo, no abundan las experiencias en el tema en relación a esta patología.

Es interesante mencionar que Bettioli (2006) sostiene la necesidad del uso de películas plásticas con capacidad de absorber luz ultravioleta para reducir la incidencia de enfermedades causadas por hongos de plantas cultivadas en invernadero, tales como el tomate. Filtros que limitan el pasaje de las longitudes de onda menores a 390 nm han sido eficientes en el control del “moho gris” (*Botrytis cinerea*) del tomate y de la “mancha de la hoja” (*Stemphylium botryosum*) en espárrago, entre otros.

#### **1.4.5. Alternativas en el manejo: Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).**

El conocimiento acerca de la respuesta inmune de las plantas ha crecido muchísimo en los últimos 30 años (Klessig *et al.* 2018). Los sistemas de resistencia inducida en las plantas son complejos, siendo parcialmente dilucidados en varios sistemas “modelo”.

Actualmente se sabe que el AS cumple un importante rol dentro de una red de señalización compleja que organiza las respuestas inmunes de las plantas; también actúan el ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), otras hormonas y algunos efectores patógenos. Las vías de defensa mediadas por AS, AJ, y ET pueden interactuar de manera antagónica, sinérgica o compensatoria. Esta complejidad probablemente ayuda a adaptar las respuestas de defensa para maximizar su efectividad contra diversos patógenos (Klessig *et al.* 2018).

Desde hace tiempo en la literatura se sostiene que los procesos se diferencian en base a la naturaleza del elicitador (inductor) y además, si bien comparten algunos componentes de las cadenas de transcripción de señales, cada una de ellas tiene caminos regulatorios o enzimáticos únicos (Sticher *et al.* 1997; van Loon 1997; Vallad & Goodman 2004). Tradicionalmente se reconocieron dos vías metabólicas de resistencia inducida en plantas (Harman *et al.* 2004). En una de las vías, denominada RSA la síntesis de PR es generalmente el resultado de un ataque por microorganismos patógenos y en la otra, denominada Resistencia Sistémica Inducida (RSI) es el resultado causado por insectos herbívoros o por ciertos microorganismos. Generalmente la RSA inducida por patógenos está mediada por el AS, producido por la planta, como una molécula de señalización; mientras que la vía inducida por daños producidos por herbivoría (RSI) se basan en AJ. Estas moléculas de señalización y sus análogos, inducen respuestas similares cuando se aplican exógenamente. Los AS y AJ inducidos por estas vías se caracterizan por la producción de una

cascada de PR, que generan una serie de compuestos antifúngicos como pueden ser quitinasas y glucanasas, enzimas oxidativas, tales como peroxidases, oxidasas de polifenol y lipoxigenasas. Además, se pueden acumular compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas (fitoalexinas) (Harman *et al.* 2004).

Sin embargo, estas líneas no están tan claras y/o separadas sino que dependen de los patosistemas estudiados, existiendo *feedback* y *crosstalk* entre dichas rutas (Durrant & Dong 2004; Klessig *et al.* 2018).

Existen métodos alternativos para el manejo de enfermedades entre los que se encuentra el uso de la RSA de las plantas, cuya activación se realiza con inductores específicos análogos al AS. La RSA es un mecanismo de defensa de las plantas que se dispara como resultado de la interacción entre patógenos o productos similares al AS y la planta. Producto de estas interacciones locales se inducen mecanismos de defensa en toda la planta, que resiste de esta manera al ataque de patógenos fúngicos, bacterianos y/o virus (Kessmann *et al.* 1994).

Diversos investigadores en distintos sitios han demostrado que existe una diversidad de compuestos que actúan como inductores de RSA. Se ha reportado la capacidad del “compost” (Patiño 2002), abono orgánico, como agente elicitor de la RSA, aunque muestran efectos promisorios aún no han sido estudiados en profundidad. Por otro lado, se utilizan compuestos químicos sintéticos análogos estructural y funcionalmente al AS, como el ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico S-metil ester (BTH) (Kessmann *et al.* 1994; Durrant & Dong 2004). Esta reportado que el AS genera cierta fitotoxicidad en las plantas por lo que hay que evaluar correctamente el uso de este inductor o análogos (Klessig *et al.* 2018).

Se ha demostrado que la RSA forma parte de los mecanismos de defensa de la mayoría de las plantas y además que se produce en respuesta a un amplio espectro de patógenos que incluyen virus, bacterias, oomicetes y hongos (Kuc 1982), aunque parece ser más efectiva sobre hongos, menos efectiva sobre bacterias, y menos aún sobre virus (Kuc 2001), traducándose en un efecto de larga duración, desde horas y días (Madamanchi, R & Kuc 1991; Godard *et al.* 1999) e inclusive se ha comprobado su persistencia durante el ciclo productivo del trigo (Gorlach *et al.* 1996).

Actualmente la “mancha gris de la hoja en tomate” se maneja casi exclusivamente con fungicidas, lo que se debe en parte al desconocimiento de la eficiencia de métodos alternativos de control, como la RSA, que permitiría realizar un manejo sustentable del cultivo, con implicancias directas sobre el producto y el ambiente (Joosten & De Wit 1989; Reis & Boiteux 2006c). Si bien existen experiencias acerca del uso de la RSA en condiciones de cultivo de tomate en el manejo de diversas patologías (Anfoka 2000; Abbasi *et al.* 2002; Baysal *et al.* 2003a, 2005; Araujo *et al.* 2005;

Pradhanang *et al.* 2005), no se han realizado estudios equivalentes destinados al manejo de la mancha gris de la hoja. Es interesante señalar a través de numerosos reportes, la existencia de una gran multiplicidad de tipos de inductores utilizados, así como también la gran cantidad de experiencias desarrolladas en innumerables patosistemas, aunque la mayoría de ellos sólo a instancias de condiciones controladas de laboratorio.

La inducción de resistencia en plantas de tomate contra representantes del género *Stemphylium* es un área que merece ser estudiada. Puesto que el manejo de los fitopatógenos es frecuentemente dificultoso y además no hay disponibilidad de variedades resistentes de gran parte de los cultivares más difundidos, la inducción de RSA es una alternativa conducente a lograr una agricultura sustentable, reduciendo la incidencia y la severidad de las enfermedades.



**Figura 1.3.** Esquema Introducción. Cultivo de tomate con sintomatología de la “mancha gris de la hoja” provocada por hongos patógenos del género *Stemphylium* y la inducción de resistencia en plantas BTH en el manejo de la enfermedad.

## **Hipótesis**

La “mancha gris de la hoja” en *L. esculentum* es provocada por un conjunto de agentes etiológicos fúngicos.

La activación de mecanismos de RSA es una herramienta efectiva en el control de enfermedades foliares en tomate.

## **Objetivo general.**

Profundizar el conocimiento de los hongos causantes de la “mancha gris de la hoja” en *L. esculentum* Mill. y evaluar su control utilizando mecanismos de resistencia de la planta.

## **Objetivos específicos**

Aislar e identificar los hongos asociados a la “mancha gris de la hoja de tomate”.

Caracterizar los aislamientos fúngicos en base a características morfológicas, moleculares y fisiológicas.

Evaluar al BTH como agente activador de RSA en tomate y su rol en el control de *Stemphylium* y otros patógenos foliares de tomate.

Identificar los indicadores de RSA que revelen con mayor sensibilidad la activación de los mecanismos de resistencia.

## **Capítulo 2.**

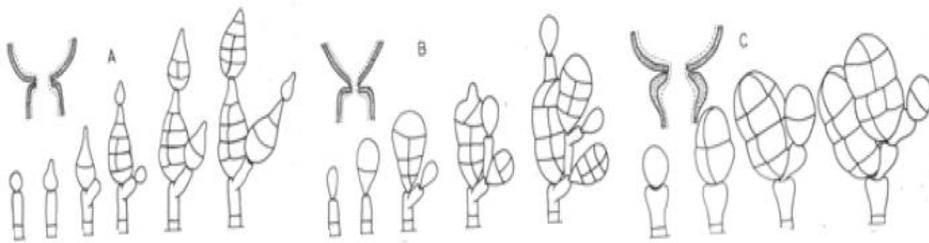
Aislamiento y caracterización de hongos asociados a la  
“mancha gris de la hoja del tomate”.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

### 2.1.1. Identificación morfológica y molecular

La taxonomía en microbiología, aún más que otras disciplinas biológicas, debe lograr abordar los estudios de caracterización de microorganismos de manera integral, con diversos parámetros: morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, ecológicos, genéticos y moleculares (Misra *et al.* 2012).

Desde el punto de vista morfológico, el género *Stemphylium* (Hyphomycete), comparte con los géneros *Alternaria* y *Ulocladium* la característica general de producir dictiosporas en conidióforos bien diferenciados (Ulloa & Hanlin 2006; Woudenberg *et al.* 2017). Sin embargo, es posible diferenciarlos según el modo de proliferación de los conidióforos, para el caso de *Stemphylium*; percurrente y con la célula conidiógena apical con forma de copa (Figura 2.1) (Simmons 1969).



**Figura 2.1.** Modo de proliferación de los conidióforos y conidios en los géneros A) *Alternaria*, B) *Ulocladium* y C) *Stemphylium* (Simmons 1969).

El género *Pleospora* tiene como especie tipo a *Pleospora herbarum* (Pers.) Rabenh. ex Ces. & De Not, ubicado dentro de *Ascomycota* y la familia *Pleosporaceae*; se caracteriza por producir de seis a ocho ascosporas pigmentadas, muriformes, en ascos bitunicados inmersos en seudoparáfisis y encerrados en seudotecios negros (Ulloa & Hanlin 2006). Las ascosporas, originadas como células únicas, llegan a la madurez morfológica por el alargamiento, por la producción de septos y por el desarrollo de pigmentación (Simmons 1969; da Silva 2011). Al momento de referirse a este hongo, el uso del nombre *Stemphylium* sobre *Pleospora* es recomendado (Rossman *et al.* 2015).

Antes de la aparición del análisis molecular la diferenciación taxonómica de las especies dentro del género *Stemphylium* era determinada principalmente por características morfológicas como la forma del conidio, tamaño, relación largo:ancho, color, septación y ornamentación. Otros

caracteres morfológicos utilizados en la definición de especies han incluido largo del conidióforo y diámetro de la célula apical terminal del conidióforo (Weber 1930; Simmons 1969, 1985, 2001; Ellis 1971; da Silva 2011).

Sin embargo, estas características han sido insuficientes en la correcta identificación de las especies ya que se pudo verificar superposición de los valores entre diferentes especies, incluso puede ser variable aún en una misma especie. Las características morfológicas de los conidios y las colonias están sujetas a variaciones de condiciones de crecimiento de los cultivos; tales como luz, temperatura, medio de cultivo, entre otras (Neergaard 1945; Joly 1964; Leach & Aragaki 1970; Câmara *et al.* 2002; Hosen *et al.* 2009; Chowdhury *et al.* 2015; Subash & Saraswati 2016). Al contrario que los caracteres morfológicos observables, el análisis de secuencias del ácido desoxirribonucleico (ADN), no está sujeto a modificaciones de condiciones de cultivo, ni a clasificaciones empíricas del ser humano (Pei *et al.*, 2010; Woudenberg *et al.*, 2017).

La diferenciación de las cuatro especies del género *Stemphylium* citadas como patógenas de tomate, basándose en caracteres morfológicos del conidio, se puede observar (Figura 2.2) en la clave dicotómica adaptada de Ellis (1971).

1. Conidios con ápice redondeado

2. Conidios constrictos principalmente en el septo transversal medio

*S. botryosum*

2'. Conidios constrictos generalmente en los tres septos transversales mayores

*S. vesicarium*

1'. Conidios con ápice cónico

3. Conidios constrictos en el septo transversal medio, relación largo:ancho no mayor a 2:1

*S. solani*

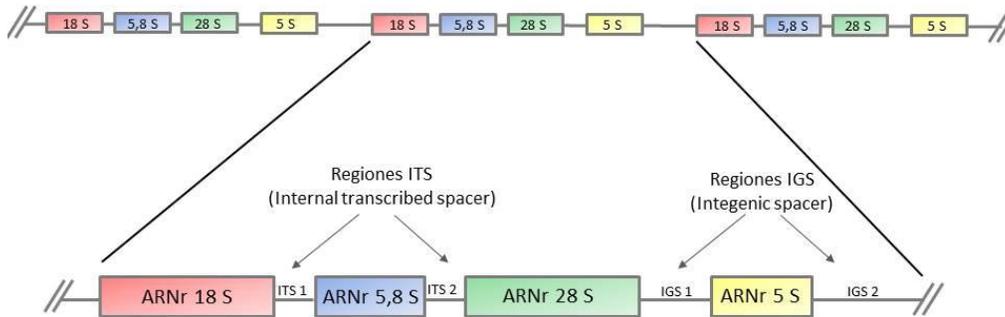
3'. Conidios constrictos en los tres septos transversales mayores, relación largo:ancho 3:1 o mayor

*S. lycopersici*

**Figura 2.2.** Clave dicotómica de especies patógenas de tomate, adaptada de (Ellis 1971).

Estas cuatro especies se mantienen como tales aún en los trabajos más recientes (Woudenberg *et al.* 2017), donde se sinonimizan algunas especies del género en estudio.

En hongos filamentosos y levaduras, el rADN está organizado de manera secuencial como unidades que se repiten una detrás de la otra. Cada una de las mismas incluye tres genes de rARN, el que codifica para el 18S rARN, el gen para el 5.8S rARN y el gen para el 28S rARN (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Diagrama del ADNr la subunidad ribosomal pequeña, 18S (SSU), la subunidad ribosomal grande 28S (LSU) del ribosoma, la región 5.8S y las regiones ITS1 e ITS2.

Como se muestra en la Figura 2.3 la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) contiene dos regiones no codificadoras (ITS1 e ITS2) variables dentro de cada repetición de DNAr; y se localizan entre las regiones altamente conservadas de los genes, ARNr 18S (SSU-18S), región 5.8S y los genes que codifican para ARNr de la subunidad grande del ribosoma 28S (LSU). Además, este esquema del rADN se encuentra separado por un espaciador intergénico IGS (*Inter Genic Spacer*). El gen más pequeño, el 5S rARN puede estar o no incluido en la unidad de rADN. Las zonas no codificantes del rADN nuclear (ITS1, ITS2 e IGS) son las más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas (White *et al.* 1990; Stocco 2013). Existen numerosos trabajos que utilizan los ITS para determinar especies del género *Stemphylium* (Cámara *et al.* 2002; Inderbitzin *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Pei *et al.* 2010; Wu *et al.* 2010; Woudenberg *et al.* 2017). Los ITS han sido de gran utilidad para la sistemática molecular a nivel de especies, e incluso en categorías infra-específicas. Actualmente se combinan el uso de la taxonomía clásica con las nuevas técnicas

moleculares, tanto para profundizar el estudio en clasificaciones artificiales, como para incorporar nuevas especies y razas u otras categorías infra-específicas.

## **2.1.2. Caracterización fisiológica.**

### **2.1.2.1. Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivos.**

En nuestro país no se tiene suficiente información sobre la biología de este patógeno. Se buscó en este ensayo seleccionar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento, esporulación y conservación de este hongo, y así poder realizar estudios posteriores sobre la biología y epidemiología con los aislamientos obtenidos y seleccionados.

De esta manera, este ensayo tuvo como objetivo, evaluar el crecimiento y la esporulación del aislamiento de *Stemphylium* CIDEFI 216 en diferentes medios de cultivo, a condiciones de luz y temperatura establecidas.

Para realizar ensayos en plantas de tomate en condiciones controladas, se debe disponer de medios de cultivo donde el hongo, sometido a condiciones de luz y temperatura definidas, crezca adecuadamente y produzca abundante cantidad de conidios, que permitan a posteriori obtener resultados satisfactorios en cuanto a inoculación se refiere.

A menudo se han empleado medios de cultivo rutinarios tales como APG para el cultivo de *Stemphylium* spp., aunque se comprobó que la velocidad de crecimiento y la esporulación es superior en otros medios con extractos naturales, como los que poseen cebada, lenteja y tomate (Rotem *et al.* 1966; Hosen *et al.* 2009; Hosen 2011). La optimización de medios de cultivo y la búsqueda de alternativas más eficientes, resulta imprescindible para disminuir el tiempo de duración de los ensayos y los riesgos de contaminación de los experimentos. También es preciso considerar que, a medida que se realizan sucesivos cultivos de un aislamiento este pierde virulencia, por lo que resulta necesario contar con un medio natural, donde este rasgo se afecte lo menos posible.

### **2.1.2.2. Síntesis de metabolitos secundarios.**

Los hongos correspondientes a diferentes grupos ecofisiológicos como fitopatógenos y saprótrofos, sintetizan una variedad de metabolitos secundarios, que abarcan desde pigmentos, otros con características beneficiosas (Debbab *et al.* 2012) hasta sustancias tóxicas: antibióticos, fitotoxinas o micotoxinas (Moss 1996), y ellos son distintos en su estructura, biosíntesis, capacidad

de toxicidad. Las micotoxinas pueden causar diversos problemas en el ser humano y los animales (Kendrick 1992), algunas pueden incluso ser trasladadas a lo largo de la cadena de producción, y finalmente quedar asociadas a alimentos con los que nunca estuvieron en contacto con hongos contaminantes (Moss 1996). Entre los principales géneros reconocidos de producción de micotoxinas están: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*.

El género *Stemphylium* produce metabolitos secundarios desde compuestos antibióticos, anticancerígenos (Debbab *et al.* 2012) hasta fitotóxicos en distintas especies vegetales (Barash *et al.* 1975; Barash 1982). Un perfil de metabolitos secundarios consiste en todos los diferentes compuestos que un hongo puede producir en un sustrato determinado y proporciona información útil en la caracterización de una determinada categoría taxonómica. Si bien se sabe que *Stemphylium* produce diversos metabolitos secundarios, los estudios disponibles en la bibliografía en general son limitados.

### **2.1.2.3. Hongos y estrés hídrico.**

Un factor importante del medio ambiente, con efectos importantes en la actividad fúngica, es la disponibilidad de agua. El potencial de agua es una medida de la cantidad de energía que se requiere para extraer el agua de un sustrato (Tijerina-Ramírez *et al.* 2014).

En ecosistemas terrestres, la disponibilidad de agua puede expresarse por el total de potencial agua, una medida de la fracción del contenido total de agua que está disponible para el crecimiento microbiano. El potencial agua es la suma de tres factores: (i) potencial osmótico o soluto, debido a la presencia de iones u otros solutos (ii) el potencial mátrico debido directamente a las fuerzas requeridas para remover el agua unida a una matriz (p.e., suelo), y (iii) el potencial de turgencia de las células microbianas, equilibrando su estado interno con las condiciones ambientales externas. El crecimiento del hongo en los rastrojos de los cultivos está determinado en parte por el potencial soluto, mientras que el crecimiento en el suelo estaría determinado por el potencial mátrico, excepto en los suelos salinos (Jurado *et al.* 2008).

El potencial hídrico se ha demostrado que tienen efectos significativos sobre fitopatógenos tales como *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* (Hao *et al.* 2003), *Macrophomina phaseolina* (Tijerina-Ramírez *et al.* 2014), *Rhizotocnia solani* (Ritchie *et al.* 2006), *Fusarium graminearum* (Ramirez *et al.* 2004). Sin embargo, aún no se conoce la respuesta de *Stemphylium*, y en interacción con tomate, a diversos potenciales osmóticos.

Como se mencionó, las características morfológicas en la identificación de microorganismos, en particular *Stemphylium* spp. varían según el ambiente circundante, por lo que modificaciones en el potencial osmótico (o actividad agua,  $a_w$ ) de las condiciones de cultivo originarían cambios que dificultan la correcta identificación del patógeno en estudio. Asimismo, el estrés osmótico altera el crecimiento de microorganismos, lo que podría incidir en la síntesis de pigmentos en *Stemphylium* spp. (Cervantes-García *et al.* 2003). Resulta importante comprender las bases eco-fisiológicas de los microorganismos para el establecimiento y la supervivencia como podría ser en los rastros de los cultivos, y el rol en la infección en el subsiguiente ciclo de cultivo.

#### **2.1.2.4. Ensayo con distintos cultivares de tomate.**

Dada la importancia actual y potencial de esta enfermedad, se hace énfasis en la elección del cultivar a implantar, ya que la herramienta de manejo más efectiva es el empleo de cultivares resistentes. Sin embargo, en varios lugares del mundo donde se cultiva ampliamente el tomate, como Brasil (Reis & Boiteux 2006c; Domingues 2012) y en el caso de la Argentina, los principales materiales cultivados no tienen incorporado el gen de resistencia (consulta catálogo de Enza Zadem®, tomate Elpida). En este contexto resulta sumamente útil para el medio hortícola conocer cómo se comportan los diferentes cultivares de tomate.

#### **2.1.2.5. Rango de hospedantes.**

En ausencia de cultivares resistentes, entre otras medidas recomendadas para el manejo de la enfermedad en estudio, existe la rotación de cultivos. Sin embargo, el tomate no es la única especie hospedante de estas especies fúngicas, es patógeno de varias plantas silvestres o cultivadas; entre ellas, el pimiento (*Capsicum annuum* L.), la berenjena (*Solanum melongena* L.) o el algodón (*Gossypium hirsutum* L.). El ensayo de establecer el rango de hospedantes consiste en inocular plantas de diversas familias botánicas bajo condiciones controladas, y determinar la posible existencia de especificidad en la relación patógeno-hospedero (Reis & Boiteux 2006a; Köhl *et al.* 2009).

#### **2.1.2.6. Bioensayo en fruto**

Según varios autores, las distintas especies del género *Stemphylium* no afectan los frutos de tomate (Rotem & Bashi 1977; Jones *et al.* 1992; Blancard *et al.* 2011). Sin embargo, sería interesante indagar si tienen la capacidad de enfermar frutos en condiciones controladas.

#### **2.1.3. Objetivos específicos**

Aislar e identificar los hongos asociados a la “mancha gris de la hoja de tomate”.

Caracterizar los aislamientos fúngicos en base a características morfológicas, moleculares y fisiológicas.

#### **2.1.4. Hipótesis**

La “mancha gris de la hoja” en tomate es provocada por un conjunto de agentes etiológicos fúngicos.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **2.2.1. Recolección de muestras de material vegetal.**

Se colectó durante los años 2010/2011, 2011/2012 y 2012/2013 material enfermo de plantas de tomate con síntomas de “mancha gris de la hoja”. Diversos establecimientos ubicados en zonas de importancia hortícola del país como La Plata (Provincia de Buenos Aires) y Lavalle, Bella Vista y Santa Lucía (Provincia de Corrientes), se seleccionaron como sitios de muestreo (Tabla 2.1).

### **2.2.2. Procesamiento del material vegetal y aislamiento de los hongos.**

Inicialmente a las muestras colectadas se les realizó un lavado continuo con agua corriente para eliminar partículas y restos de materia orgánica; luego, pequeñas secciones ( $3 \times 3$  mm) de hojas con manchas, fueron desinfectadas superficialmente 1'30'' (minuto y medio) en alcohol 70 % y luego inmersas 1'30'' (minuto y medio) en hipoclorito de sodio y posteriormente fueron lavadas en agua destilada estéril. Inmediatamente fueron sembradas en medios Agar Papa Agua (APA), APG al 2 % y Agar 8 vegetales (AV8), con el agregado de cloranfenicol y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante una semana (Câmara *et al.* 2002). Luego se seleccionaron colonias individuales, que se desarrollaron a partir de una unidad (espora), y se repicaron axenicamente a nuevas placas de cultivo. Los aislamientos monospóricos obtenidos a partir del material analizado se conservaron en viales con aceite mineral estéril y/o con agua destilada estéril, en tubos picos de flauta a 4°C y en la técnica de papel en freezer a -20°C, conformando los cultivos stock para los estudios posteriores (Buell & Weston 1947; López Lastra *et al.* 2002). Para la técnica de papel de filtro, se colocaron tiras de papel de filtro estériles de 1 cm de ancho dentro de cajas de Petri con APG donde se encontraba creciendo el hongo. Se incubó durante 7 días. Una vez que el hongo colonizó el papel de filtro, se retiró y se dejó secar a temperatura ambiente durante 7 días. Las tiras fueron conservadas dentro de sobres de papel de strassa de  $7 \times 13$  cm, protegidas con papel de aluminio, en el freezer a -20°C (Stocco 2013).

Los aislamientos se depositaron en el cepario del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

### **2.2.3. Identificación morfológica y molecular.**

#### **2.2.3.1. Identificación morfológica.**

En la determinación del patógeno se realizaron estudios culturales, morfológicos y biométricos mediante observaciones microscópicas, mediciones micrométricas y uso de claves. Se realizó una caracterización referida al desarrollo de las colonias de cada aislamiento. Asimismo, se analizaron las características de los conidios, incluyendo rasgos cualitativos y dimensiones, diferenciados por los aislamientos en cultivo sobre APG.

En este trabajo se utilizaron 49 aislamientos monospóricos que están depositados en la colección del CIDEFI (Tabla 2.1). Las colonias se caracterizaron considerando el crecimiento y pigmentación de las mismas, como así también los pigmentos que difundieron o no al medio. El crecimiento se determinó por triplicado, tomando dos medidas del diámetro perpendiculares entre sí (diámetro polar y ecuatorial) por placa hasta el tiempo final de 7 días. En el centro de las cajas de Petri de 9 cm de diámetro se sembró un círculo de 0,8 mm de APG cubierto de micelio, procedente de cultivos de 7 días. Se incubaron en estufas a 25°C, en oscuridad, durante una semana (Irwin *et al.* 1986; Kim *et al.* 2004; Orozco-Santos *et al.* 2004; Köhl *et al.* 2009).

Cuando el ensayo de crecimiento llegó a su tiempo final, fueron evaluados con un microscopio 50 conidios por aislamiento luego de realizar preparaciones microscópicas, y las observaciones se registraron con una cámara digital NIKON D40. Se consideraron las dimensiones de los conidios (largo-ancho, relación largo-ancho), el número de septos transversales y la forma del ápice. En base a las características observadas se realizó la identificación morfológica de los conidios (Simmons 1969, 1985, 1989, 2001; Ellis 1971).

#### **2.2.3.2. Análisis molecular.**

La extracción y cuantificación del ADN genómico fúngico se realizó utilizando sólo tres aislamientos considerados como modelos de estudio en base a su compartamiento diferencial en cultivo *in vitro* (esporulación), un alto grado de virulencia y/o su fuente de procedencia de acuerdo a (Franco *et al.* 2017a; Medina *et al.* 2021a): CIDEFI 210, CIDEFI 212 y CIDEFI 216, siguiendo el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), (Doyle 1991), modificado por (Bornet & Branchard 2001). Se tomaron de cada aislamiento 300 mg de micelio (peso húmedo), y se molieron en morteros individuales con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Luego, se le

incorporaron 800 µl de buffer CTAB suplementado con 200 µl de CTAB 10X, 1 µl de β-mercaptoetanol y 1% Polivinilpolipirrolidona (PVPP). La suspensión de micelio y buffer se pasó a un tubo Eppendorf de 2 mL y se incubó en un baño térmico a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionó un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (12:1), se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 10.000 g. El sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf de 2 mL en donde se procedió a precipitar el ADN. Para esto se agregó un volumen de isopropanol y 10% del volumen de acetato de sodio 3M. La mezcla se mantuvo a -18°C durante 12 horas. La suspensión se centrifugó a 10.000 g para generar un pellet de ADN que se lavó tres veces con etanol 70%, que luego se secó. El ADN se resuspendió en 150 µl de buffer TE, al que se le adicionaron 1-2 µl de ARNasa (10 µg.µl<sup>-1</sup>), luego de lo cual se incubó a 37°C por espacio de 2 horas. El ADN nuevamente se trató con fenol cloroformo y se precipitó como se describió anteriormente. La solución de ADN final se mantuvo en freezer a -20°C.

Para evaluar la calidad y cantidad del ADN obtenido, las muestras se sembraron en un gel de agarosa al 0,7 % teñido con Bromuro de etidio (0,2 mg/mL) junto con el marcador de peso molecular Lambda Hind III (Promega Biotech) y fueron visualizadas en un transiluminador de UV (Sambrook *et al.* 1989). El rendimiento de ADN fue estimado por comparación entre la intensidad de las bandas generadas por las muestras y las del marcador utilizado. Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes SYNGENE y el software GENETOOLS.

Para la amplificación de los genes conservados ITS se realizó la identificación molecular amplificando por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento del rADN comprendido entre el extremo 3' del ITS 1, ITS 2, la subunidad 5,8S y el extremo 5' de la subunidad 28S, empleando los cebadores ITS1 e ITS4 reportados por White *et al.* (1990).

El programa utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; 33 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 45 segundos a 56°C y 1 minuto a 72°C y por último una elongación de 5 minutos a 72 °C (Curtis *et al.* 1994; Goodwin *et al.* 2001). La mezcla de reacción consistió en buffer de reacción 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25°C; 1% Triton X-100 -sin magnesio-); 1,5 mM cloruro de magnesio; 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP); 0,3 µM de cada primer; 1 unidad de T- Plus ADN polimerasa (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN) y 50 ng de ADN molde por reacción, en un volumen final de 15 µl (Franco 2014). El producto de PCR se purificó y secuenció utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 en la reacción de secuenciación cíclica con el Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit en Macrogen Inc. Seúl, Korea.

Las secuencias se compararon con la base de datos “Nucleotide collection nr/nt” del NCBI utilizando el software MegaBlast. Además, se realizó un análisis filogenético de las secuencias de los aislamientos y las secuencias homólogas de hongos del complejo *Stemphylium* y de otros morfológicamente afines como *Alternaria* y *Ulocladium*, obtenidas de la base de datos del GenBank. Como grupo externo (outgroup) se utilizó la secuencia del ITS de *Bipolaris australis* y representantes del género *Setosphaeria*. Las secuencias fueron alineadas mediante CLUSTAL W, versión 1.83. El análisis se realizó utilizando el software Bioedit Sequence Alignment Editor (BioEdit versión 7.0.0). Las longitudes de las secuencias alineadas quedaron establecidas por la distancia entre los cebadores utilizados para la amplificación de dicha secuencia. El árbol filogenético de Neighbor- Joining (NJ) fue construido utilizando el programa MEGA (versión 5.01). Para cuantificar el grado de apoyo de los clusters en los árboles de NJ se utilizó la medida de “bootstrap”.

#### **2.2.4. Caracterización fisiológica.**

Con el aislamiento seleccionado CIDEFI 216, en base a su compartamiento diferencial en cultivo *in vitro* (esporulación), un alto grado de virulencia y que se conoce el genoma del aislamiento (Franco *et al.* 2015), el cual fue obtenido de tomate cv. Elpida (campaña 2010) procedente de Bella Vista, se realizó una caracterización que incluye otros aspectos, para generar mayor información y ser aprovechada en futuros planes de manejo de la enfermedad en estudio. La caracterización fisiológica estuvo vinculada a diversos aspectos: crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivos, síntesis de metabolitos secundarios (aquí se incluyeron los siguientes 20 aislamientos, debido a su compartamiento diferencial en cultivo *in vitro* (esporulación), su grado de virulencia y/o fuente de procedencia de acuerdo a (Franco *et al.* 2017a; Medina *et al.* 2021a): CIDEFI 201, CIDEFI 203, CIDEFI 206, CIDEFI 207, CIDEFI 208, CIDEFI 210, CIDEFI 211, CIDEFI 213, CIDEFI 214, CIDEFI 215, CIDEFI 216, CIDEFI 221, CIDEFI 224, CIDEFI 225, CIDEFI 226, CIDEFI 227, CIDEFI 228, CIDEFI 229, CIDEFI 230 y CIDEFI 231), respuesta al estrés hídrico, ensayos con distintos cultivares de tomate, rango de hospedantes y ensayo en frutos de tomate en condiciones controladas.

##### **2.2.4.1. Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivos.**

Se determinaron las características morfométricas de los conidios (largo, ancho, relación largo/ancho, constricciones transversales y presencia en el ápice del conidio de punta o no) y de las

colonias del aislamiento CIDEFI 216 que desarrollaron para cada uno de los sustratos seleccionados.

Los distintos medios de cultivos sólidos; APG, medio extracto de Tomate, medio extracto de Cebada, medio extracto de Lenteja, medio extracto de Garbanzo y medio extracto de Malta se confeccionaron de la siguiente manera, para la preparación de 1 litro; 200 g de cada ingrediente que da nombre al medio de cultivo (p.e. 200 g de cebada para el medio extracto Cebada), 20 g de glucosa y 20 g de agar (Hosen *et al.* 2009). Todos los medios fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 1,5 atm, y posteriormente se extendieron en placas de Petri de 9 cm de diámetro. El crecimiento se determinó por triplicado, tomando dos medidas del diámetro perpendiculares entre sí (diámetro polar y ecuatorial) por placa durante 7 días. En el centro de cada placa, se depositó un disco de 0,7 cm de diámetro tomado de la parte en crecimiento activo (periferia) de una colonia de CIDEFI 216 desarrollada en APG como placa madre. Las cajas de Petri con los medios de cultivo sólido se mantuvieron a 25°C en oscuridad (Shahin & Shepard 1978). Se evaluaron 7 tratamientos con tres repeticiones, considerando una caja de Petri como unidad experimental.

Para la determinación de la esporulación se prepararon en tubos cónicos Falcon de 50 mL, una suspensión proveniente de una placa de cada uno de los medios de cultivo evaluados. Se tomaron alícuotas de 100 ul, y se realizó el conteo de conidios mediante la cámara de Neubauer.

#### **2.2.4.2. Síntesis de metabolitos secundarios.**

Se utilizó la selección de 20 aislamientos -señalados en el apartado 2.2.4- para llevar adelante esta identificación, los cuales fueron sembrados en tres puntos sobre placas DRYES e incubados durante 14 días a 25°C en oscuridad. La extracción fue realizada a micro-escala, se tomaron tres discos desde el centro de cada colonia y los nueve discos se colocaron en un vial de 4 mL. Posteriormente se añadió 1 mL de acetato de etilo que contenía ácido fórmico al 1% (vol/vol) a cada vial y los discos fueron sonicados durante 30 minutos. El extracto se transfirió a un vial limpio de 2 mL, se evaporó a sequedad en una atmósfera N<sub>2</sub> y se redisolvió en 400 µL de metanol. El extracto de metanol se filtró a través de un filtro de 0,45 µm en un vial limpio de 2 mL y se mantuvo a -18°C antes del análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Andersen *et al.* 2005). Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) con detector de matriz de diodos (DAD) un espectrómetro de masas (MS) de alta resolución maxis 3G QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una fuente

ESI y conectado a un sistema Ultimate 3000 UHPLC (Dionex, Sunnyvale, EE. UU.) equipado con una columna Kinetex de 2,6  $\mu\text{m}$  C18, 100mm  $\times$  2.1mm (Phenomenex, Torrance, CA). De acuerdo con (Klitgaard *et al.* 2014) se usó un gradiente lineal de agua-acetonitrilo en solución de ácido fórmico 20 mM. El gradiente se inició con una concentración de acetonitrilo de 10% (vol/vol), la cual se incrementó hasta el 100% en 10 min, mantenido durante 3 minutos antes de regresar a las condiciones iniciales. La MS se realizó en condiciones ESI+ y ESI- en el intervalo de análisis m/z 100-1000, con una precisión de masa  $<1,5$  ppm. Los espectros UV/VIS fueron adquiridos utilizando longitudes de onda entre 200 y 700 nm. El procesamiento de los datos se realizó utilizando los programas DataAnalysis 4.0 y TargetAnalysis 1.2 (Bruker Daltonics) por la aproximación de eliminación de replicados (Klitgaard *et al.* 2014). Este método utiliza datos de la masa precisa y los patrones isotópicos de posibles compuestos, permitiendo procesar miles de datos en corto tiempo. Para este estudio, se utilizaron datos de 251 compuestos publicados en la bibliografía para *Stemphylium*, *Alternaria* y otros géneros relacionados para identificar compuestos, basados en la masa precisa (desviación  $<1,5$  ppm) y el patrón isotópico (ajuste isotópico  $<50$ ) (Klitgaard *et al.* 2014).

#### **2.2.4.3. Hongos y estrés hídrico.**

Con respecto a las características fisiológicas, se evaluó el efecto de distintos solutos sobre el crecimiento y pigmentación *in vitro* de este patógeno (Vera Bahima *et al.* 2011). Para evaluar la respuesta al estrés osmótico del aislamiento CIDEFI 216, se cultivó en medio APG suplementando el mismo con glicerol (osmólito no iónico) y NaCl (osmólito iónico) generando potenciales agua expresados como actividad agua, comprendidos en el rango; 0,999 (control) a 0,93, para cada soluto mencionado. Se siguió la metodología de Jurado *et al.* (2008) para hacer un paralelismo entre la actividad del agua y los potenciales generados, según el tipo de soluto y concentración.

Inicialmente durante un primer ensayo, se utilizaron las siguientes  $a_w$ : Control; 0,98; 0,95 y 0,93 para lo cual se agregaron en 100 mL de agua destilada: 0 g, 3,52 g; 8,79 g y 12,3 g de NaCl (rango del 0-12 %) y 0 g; 9,25 g; 23,12 g; 32,36 g de Glicerol (glicerina bidestilada al 99,5%) (rango del 0-32 %). Posteriormente, se realizó un segundo ensayo, donde se extendió el rango de  $a_w$  ensayadas, empleando los siguientes 0,9; 0,85 y 0,8; con el agregado en 100 mL de agua destilada de 17,57 g; 26,35 g y 35,13 g de NaCl respectivamente. Esto no se hizo para el caso de Glicerol ya que no era factible de llevar adelante la técnica. También, se ensayó utilizando un segundo osmolito iónico, el KCl con  $a_w$  de Control; 0,98; 0,95; 0,93; 0,9; 0,85 y 0,8 para lo cual se agregaron en 100

mL de agua destilada: 0 g; 3,73 g; 8,02 g; 10,88 g; 15,17 g; 22,32 g y 29,47 g de sal (rango del 0-30 %) (Jurado *et al.* 2008; Astoreca *et al.* 2009; Alam *et al.* 2010).

El crecimiento se evaluó diariamente por el incremento de tamaño de las colonias hasta los 7 días. En el último día se determinó la pigmentación de las colonias, definida por los componentes del color a través de dos metodologías; a) la composición del color electrónica: R (rojo), G (verde) y B (azul) y b) método de impresión en color, CYMK (cian, amarillo, magenta y negro) (Dorado *et al.* 1999). Para cada  $a_w$ , en cada placa de Petri y considerando el crecimiento del patógeno de manera concéntrica desde el centro, se establecieron tres zonas en las cuales se determinaron los colores anteriormente mencionados. Las zonas establecidas fueron: externa, media e interna, en cada una de ellas se tomaron 4 valores. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento (potencial).

Finalmente, se utilizó un espectrofotómetro para determinar los máximos de absorbancia y determinar los cromóforos solubles en FAA (formaldehído, alcohol y acético). En el 7 día del ensayo se fijaron los tejidos del hongo de cada muestra con 10 mL de FAA, luego se centrifugó durante 10 minutos a 14.8 rpm, y se realizaron las determinaciones en espectrofotómetro Shimadzu UV. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento (potencial).

#### **2.2.4.4. Ensayo con distintos cultivares de tomate.**

Se determinó la reacción varietal en 6 cultivares comerciales de tomate, frente a la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216. Entre los materiales de tomate susceptibles se evaluaron: Torry y Elpida; entre los materiales tolerantes; Tyerno y TL 42524, y como resistentes: Keitor y Sivinar (Syngenta).

Luego de 30 días de realizado el almácigo con los distintos cultivares de tomate se realizó el trasplante a su envase definitivo. Las plantas al ser inoculadas tenían 4 hojas expandidas, se cultivaron en invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad (90 %). Para la preparación del inóculo se siguió la metodología utilizada por Esmailzadeh *et al.* (2008), se cultivó con el aislamiento CIDEFI 216 placas de Petri de 9 cm de diámetro; luego, se incubaron en estufa a 25°C, en oscuridad, durante una semana y se removió con agua destilada estéril la superficie de las colonias para obtener los conidios; finalmente se filtraron y se ajustó el inóculo a una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios/ml. Con esta suspensión de conidios, se inocularon las plantas de tomate mediante la aspersion con la concentración ajustada, luego de lo cual los mismos fueron envueltos con bolsas plásticas transparentes (cámara húmeda), las cuales fueron retiradas a los dos días. Las plantass se mantuvieron a temperatura ambiente, de alrededor de 25 °C, durante 14

días. Como control se utilizaron plantas de cada variedad asperjadas con agua estéril (Kim *et al.* 2004; de Miranda 2009; de Miranda *et al.* 2010).

Se trabajó con un n: 10 plantas por tratamiento. La evaluación de la severidad se realizó 5, 7 y 9 días post inoculación del patógeno, expresado como el número totales de manchas por planta.

#### **2.2.4.5. Rango de hospedantes.**

Para investigar el rango de hospedantes de *Stemphylium*, se preparó y pulverizó con una suspensión de conidios del aislamiento CIDEFI 216 como se describió en el apartado anterior, diversas especies pertenecientes a distintas familias de importancia hortícola, tales como *Solanaceae*: “berenjena” (*Solanum melongena* L.) y “morrón” (*Capsicum annuum* L.), *Cucurbitaceae*: “zapallo” (*Cucurbita pepo* L.), “zapallito redondo” (*Cucurbita máxima* var. *zapallito* (Carrière) Millán) y “pepino” (*Cucumis sativus* L.), *Poaceae*: “maíz dulce” (*Zea mays* L.), *Fabaceae*: “poroto” (*Phaseolus vulgaris* L.), *Asteraceae*: “lechuga” (*Lactuca sativa* L.) y finalmente *Brassicaceae*: “rúcula” (*Eruca sativa* Mill.). Todas pertenecientes a Ecoproductos y Arie Sonneveledt SRL semillas (Koike & Henderson 2001; Kim *et al.* 2004; Zheng *et al.* 2009).

Luego de 20-30 días de realizado el almácigo con las distintas especies seleccionadas se realizó el trasplante a su envase definitivo. Las plantas por lo general al ser inoculadas tenían al menos 4 hojas expandidas y las condiciones de cultivo fueron en invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad (90 %). Plantas de tomate cv. Elpida fueron inoculadas como control positivo y plantas de las distintas especies fueron tratadas con agua como control. Los materiales usados en este experimento fueron seleccionados porque diversas especies del complejo *Stemphylium sensu-lato* fueron reportadas como patógenas en diversas publicaciones (Koike & Henderson 2001; Reis & Boiteux 2006a; Zheng *et al.* 2009; Woudenberg *et al.* 2017), o están estrechamente relacionadas con el tomate. La evaluación de la sintomatología típica de la enfermedad se realizó 15 días postinoculación. Se trabajó con un n: 10 plantas por tratamiento. Este experimento se desarrolló en dos oportunidades.

#### **2.2.4.6. Bioensayo en fruto.**

Se realizaron bioensayos en fruto de tomate cv. Elpida acondicionados (limpios, desinfectados con alcohol etílico y secos) a los cuales se inoculó el aislamiento CIDEFI 216. Se

evaluaron distintas técnicas de inoculación, los tratamientos consistieron en: a) discos de micelio, con herida herida, b) pulverización, c) discos de papel y d) testigo (Vera Bahima *et al.* 2009).

En los tratamientos a) la técnica consistió en colocar un disco de micelio de 0,7 cm sobre heridas previamente realizadas en la epidermis del fruto. En el tratamiento b), la pulverización se realizó sobre todo el fruto con una concentración  $1 \times 10^4$  conidios/mL. Finalmente, para el caso c), un disco de papel de filtro (5 mm de diámetro) embebido en la suspensión del aislamiento CIDEFI 216 ajustada a una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios/mL, se aplicó sobre el fruto. Como control positivo se consideró al fruto sólo con el patógeno, mientras que en el control negativo se aplicó únicamente agua eséril. Luego de un período de incubación en cámara húmeda de 48 horas, los frutos se almacenaron en cámara climatizada a 20° C durante 7 días. Se siguió la metodología empleada en (Dal Bello *et al.* 2011) para la evaluación de la enfermedad.

Se trabajó con un n: 15 frutos por tratamiento. Este experimento se desarrolló en dos oportunidades.

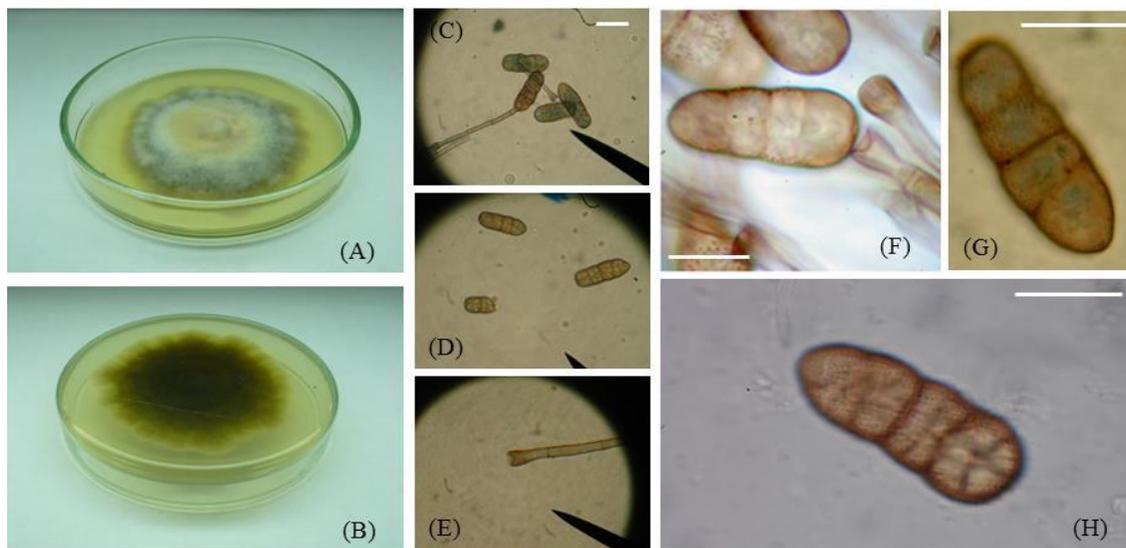
#### **2.2.5. Análisis estadístico**

El diseño experimental fue enteramente al azar con las características particulares que se especifican en cada uno de los ensayos mencionados previamente. La comparación de medias con los datos correspondientes se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y se compararon las medias utilizando el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GrapPad Prism 7.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Aislamientos.

A partir de muestras de tomate de diversas variedades y de varias localidades de la provincia de Buenos Aires y de la Provincia de Corrientes de las campañas correspondientes al periodo 2010-2013 se obtuvieron un total de 49 aislamientos (Tabla 2.1). Entre estos, 3 aislamientos no revelaron habilidad para esporular bajo las condiciones de cultivo analizadas. No obstante, el resto se caracterizó sobre la base de las características morfométricas de sus conidios, y correspondieron a representantes del complejo *Stemphylium sensu-lato* (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Cultivo del aislamiento CIDEFI 216 sobre medio APG, su sistema conidial. (A) Vista anverso del cultivo; (B) vista reverso del cultivo; (C) conidios, célula conidiógena y conidióforo; (D) conidios; tamaños diversos; (E) célula conidiógena apical bulbosa; (F) detalle de célula conidiógena y conidióforo; (G) conidio provisto de tres constricciones principales; (H) superficie del conidio verrugosa. Barra: 20 µm.

**Tabla 2.1.** Aislamientos fúngicos usados en este estudio.

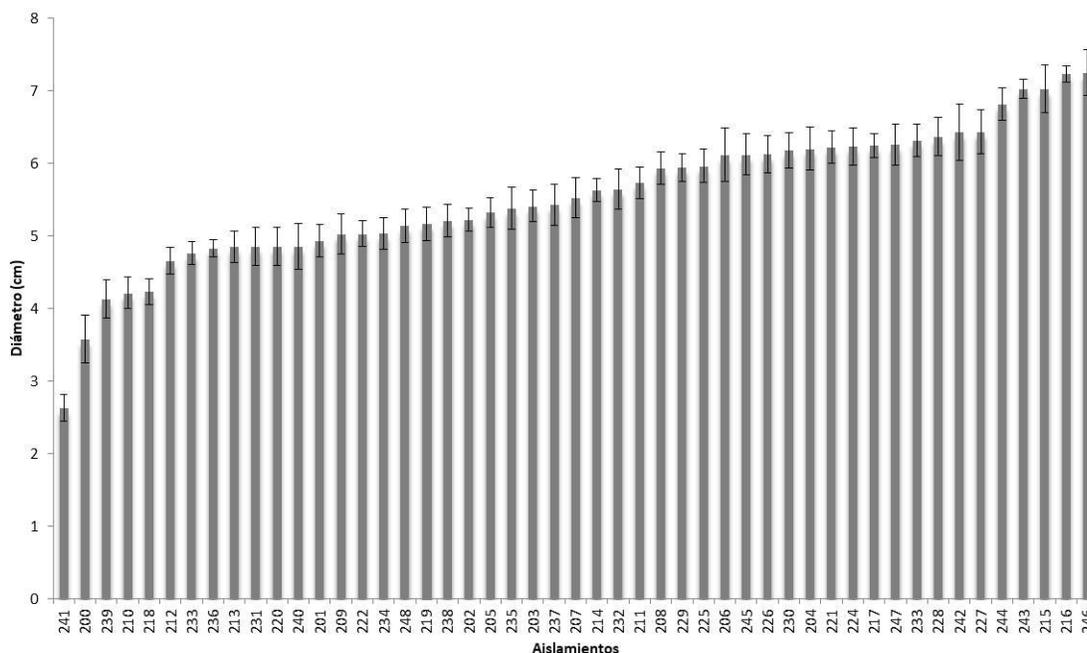
<b>Aislamiento</b>	<b>Localidad</b>	<b>Variedad</b>
CIDEFI 200	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 201	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 202	Lavalle	Elpida
CIDEFI 203	Lavalle	Elpida
CIDEFI 204	Lavalle	Elpida
CIDEFI 205	Santa Lucía	Elpida
vCIDEFI 206	Lavalle	Torry
CIDEFI 207	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 208	Lavalle	Elpida
CIDEFI 210	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 211	Lavalle	Elpida
CIDEFI 212	La Plata	Elpida
CIDEFI 213	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 214	Lavalle	Elpida
CIDEFI 215	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 216	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 217	Lavalle	Torry
CIDEFI 218	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 219	Lavalle	Torry
CIDEFI 221	La Plata	Elpida
CIDEFI 222	La Plata	Elpida
CIDEFI 223	La Plata	Elpida
CIDEFI 224	La Plata	Elpida
CIDEFI 225	La Plata	Platense
CIDEFI 226	La Plata	Platense
CIDEFI 227	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 228	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 229	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 232	La Plata	Elpida
CIDEFI 230	La Plata	Elpida
CIDEFI 231	La Plata	Elpida
CIDEFI 233	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 234	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 235	Santa Lucía	Elpida
CIDEFI 209	Lavalle	Elpida
CIDEFI 220	Lavalle	Elpida
CIDEFI 248	Lavalle	Elpida
CIDEFI 236	Lavalle	Elpida
CIDEFI 237	Lavalle	Elpida
CIDEFI 238	Lavalle	Elpida

CIDEFI 239	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 240	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 241	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 242	Lavalle	Torry
CIDEFI 243	Lavalle	Torry
CIDEFI 244	Lavalle	Torry
CIDEFI 245	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 246	Bella Vista	Elpida
CIDEFI 247	Bella Vista	Elpida

### 2.3.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos en medio agarizado: crecimiento, pigmentación y morfometría del sistema conidial.

Los aislamientos presentaron las características reportadas para el género *Stemphylium* siguiendo las siguientes obras de referencia (Ellis 1971) y (Simmons 1969, 1985, 1989, 2001).

Se analizó el diámetro de las colonias y su pigmentación a los 7 días (Figura 2.5). Aunque todos los hongos crecieron sobre el medio APG, el aislamiento CIDEFI 241 reveló el menor crecimiento (diámetro de 2,6 cm) y el aislamiento CIDEFI 246 mostró el máximo (diámetro de 7,2 cm).



**Figura 2.5.** Crecimiento de los aislamientos a los 7 días, en el medio APG a 25°C y oscuridad. Las barras indican la media  $\pm$  la desviación estándar. (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).

Analizando la pigmentación de los aislamientos en el medio APG, se detectaron 3 patrones principales (Figura 2.6 y Tabla 2.2):

- 1) *Grupo I*: colonias con una coloración gris con parches blancos y rosados asociada a una coloración del medio marrón verdoso o rojizo (47 % de los aislamientos).
- 2) *Grupo II*: colonias de color amarillo claro con parches blancos y rosados sobre un medio de coloración amarillo-rojizo en el centro de la placa (26,5 % de los aislamientos).
- 3) *Grupo III*: colonias blancas y grisáceas, sin coloración diferencial del medio respecto al medio no inoculado (26,5 % de los aislamientos).



**Figura 2.6.** Colonias de los aislamientos CIDEFI desarrolladas sobre el medio APG después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad. Los fenotipos de los aislamientos CIDEFI 216, CIDEFI 210 y CIDEFI 201 se establecieron como representantes tipo de los 3 grupos establecidos en base a su pigmentación, de izquierda a derecha: Grupo I, II y III respectivamente.

**Tabla 2.2.** Pigmentación de las colonias de los aislamientos en APG y del medio extracelular asociado.

<b>Aislamiento</b>	<b>Pigmentación de la colonia</b>	<b>Coloración del medio extracelular</b>	<b>Grupo</b>
CIDEFI 202	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 204	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 205	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 206	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 208	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 209	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 214	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 216	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 219	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 220	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 223	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 226	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 228	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 229	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 230	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 231	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I

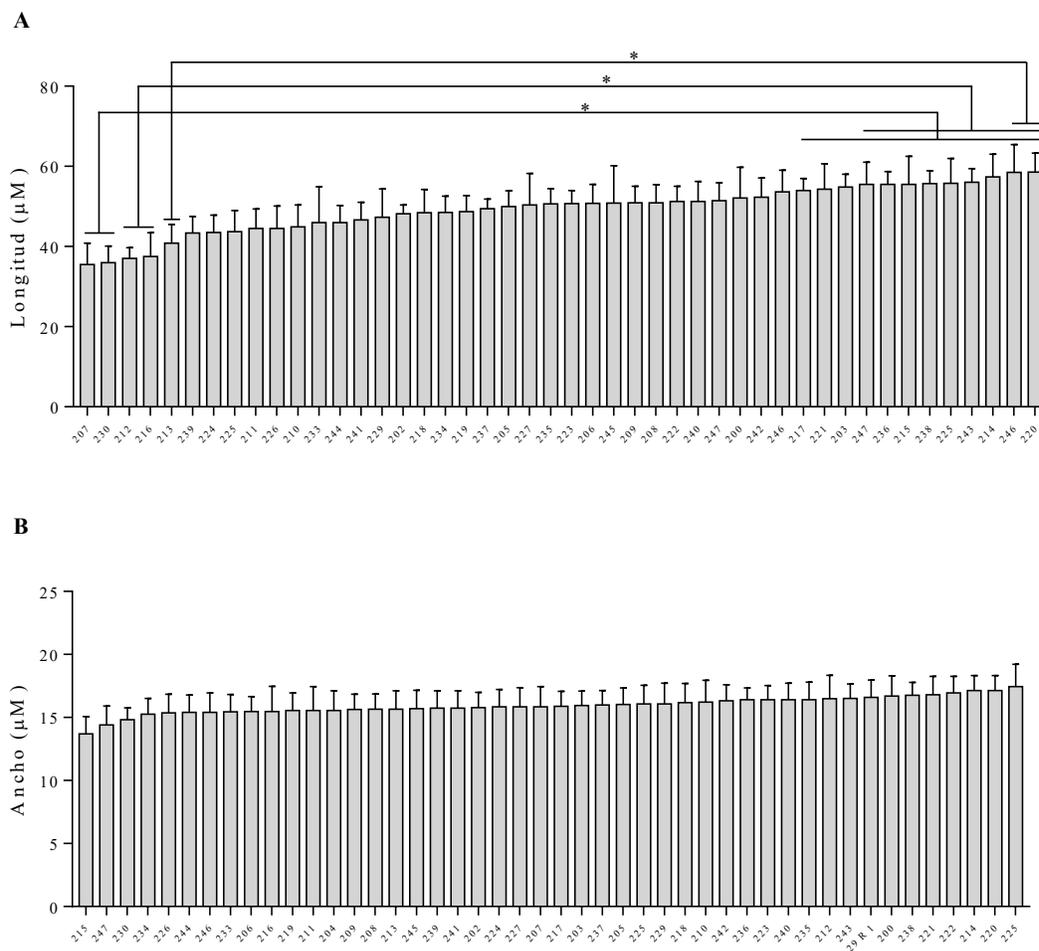
CIDEFI 232	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 234	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 235	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 242	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 246	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 247	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 248	Grisáceo con parches	Marrón verdoso-rojizo	I
CIDEFI 200	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 207	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 210	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 211	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 212	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 215	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 222	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 225	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 227	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 233	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 236	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 238	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 245	Amarillento con parches	Amarillento, rojo al centro	II
CIDEFI 201	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 203	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 213	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 217	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 218	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 221	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 224	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 237	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 239	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 240	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 241	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 243	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III
CIDEFI 244	Blancuzco y grisáceo	Similar al medio sin inocular	III

Adicionalmente, cuando esporularon, los aislamientos se caracterizaron en base a la morfometría de su sistema conidial. Todos los que esporularon diferenciaron conidióforos dematiáceos y percurrentes, con una célula conidiógena apical bulbosa típica en forma de copa (6,9-8,6  $\mu\text{m}$  de ancho, datos no mostrados), de color pardo intenso y conidios acrógenos, muriformes, oblongos, generalmente puntiagudo o con ápice ligeramente redondeado, una base fuertemente redondeada y notables cicatrices basales, solitarios, de color pardo oscuro hacia anaranjado y provistos de tres constricciones principales y pared generalmente rugosa o lisa (Figura

2.4). Las dimensiones de los conidios variaron en el siguiente rango: 24-72  $\mu\text{m}$   $\times$  12-19,2  $\mu\text{m}$  y la relación largo-ancho comprendida entre los siguientes valores: 2,24 - 4,06.

En la Figura 2.7 se observan las características morfométricas de los conidios (n=50), longitud y ancho de los mismos. En cuanto al ancho de los conidios no se observaron diferencias significativas entre los diferentes aislamientos. En lo que respecta a la longitud de los conidios existen 3 grupos que se diferencian estadísticamente entre sí; en el primero, los aislamientos CIDEFI 207 y CIDEFI 230 se diferencian de los aislamientos CIDEFI: (217, 221, 203, 248, 236, 215, 238, 225, 243, 214, 246, 220) ( $p < 0,05$ ). Existe un segundo grupo donde los aislamientos CIDEFI 212 y 216 se diferencian de los aislamientos CIDEFI: (248, 236, 215, 238, 225, 243, 214, 246, 220) ( $p < 0,05$ ). Finalmente, el aislamiento CIDEFI 213 se diferencia de dos aislamientos: CIDEFI 246 y 220 ( $p < 0,05$ ).

En lo que respecta a la longitud de los conidios existen 3 grupos que se diferencian estadísticamente entre sí como se observa en la Figura 2.7.

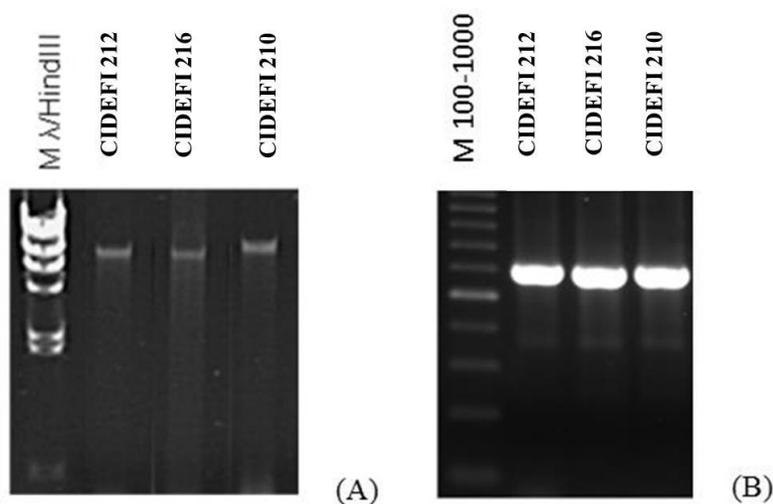


**Figura 2.7.** Características morfométricas de los conidios. (A) Longitud y B) ancho de los conidios (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).

En base a los resultados descriptos y considerando la bibliografía de referencia señalada, por las características morfométricas de los conidios analizados (número de constricciones, longitud y relación largo-ancho) los aislamientos estudiados coinciden con la especie *S. lycopersici*.

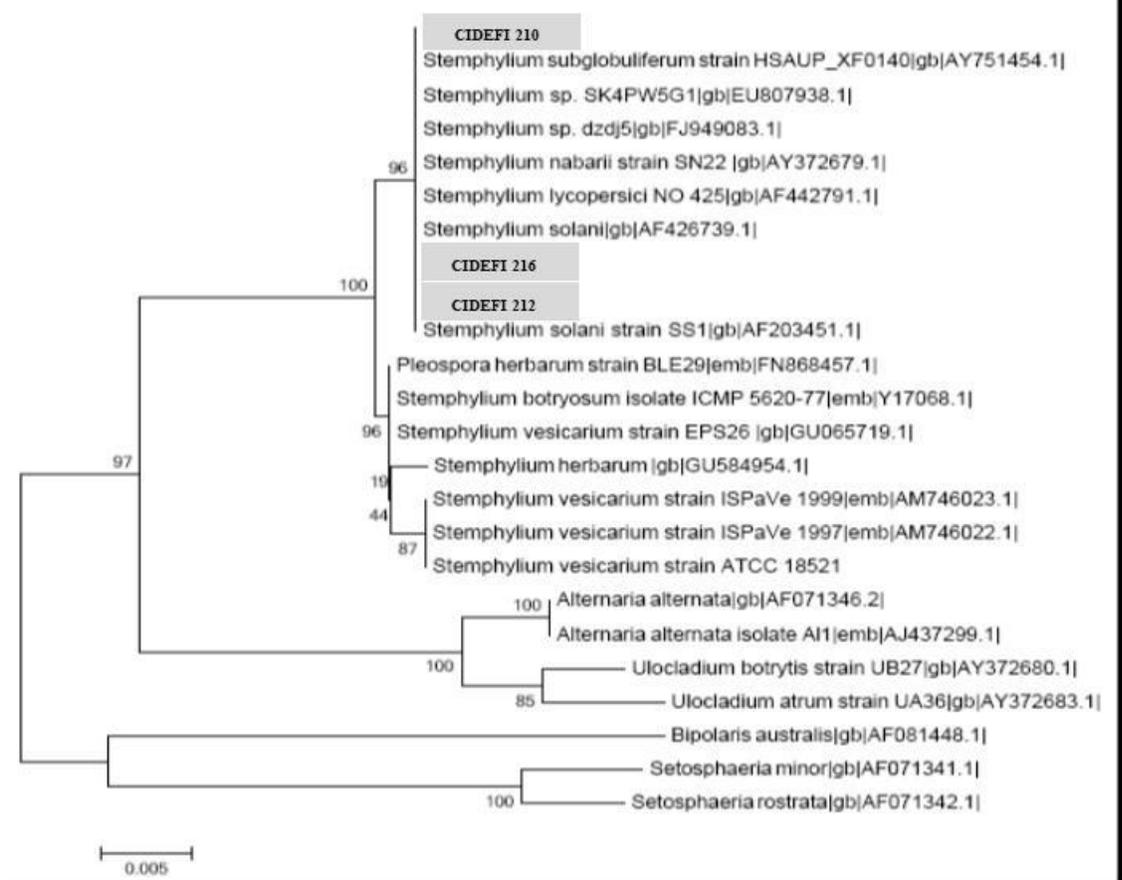
### 2.3.3. Análisis molecular de aislamientos seleccionados utilizando ITS como marcador.

Se realizó la extracción y cuantificación del ADN de los aislamientos CIDEFI 210, 212 y 216 (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** (A) ADN genómico extraído de los aislamientos aplicado en un gel de agarosa 0,70 % p/v teñido con Bromuro de Etidio. (B) Fragmentos ITS amplificados de los aislamientos aplicado en un gel de agarosa al 1 % p/v, teñido con Bromuro de Etidio.

Se logró amplificar el ITS de los 3 aislamientos por PCR empleando el ADN genómico de cada uno de ellos como molde y los cebadores ITS1 e ITS4 (Figura 2.8). En todos los casos se obtuvo un amplicón de aproximadamente 570 pb que se secuenció y se analizó utilizando la herramienta Blast (NCBI) y que mostró un 100 % de homología entre los 3 aislamientos analizados y con varios representantes del género *Stemphylium*, incluyendo a *S. lycopersici* (AF442791.1).



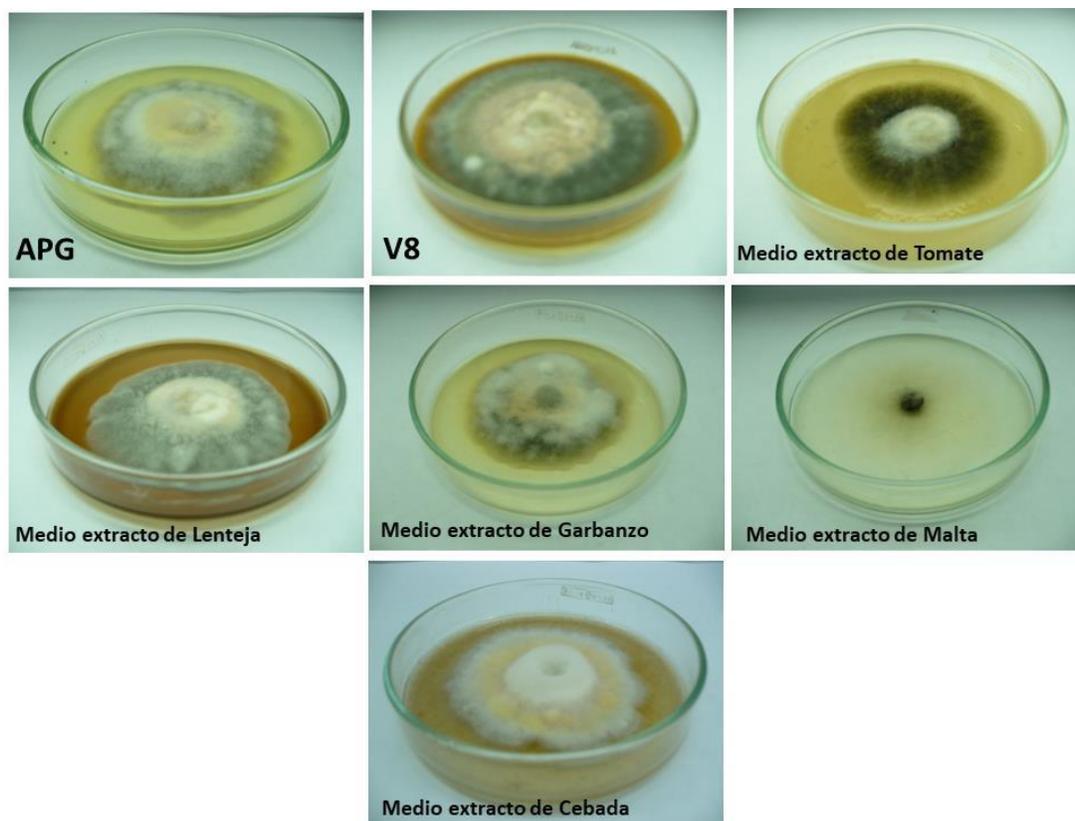
**Figura 2.9.** Árbol filogenético de *Stemphylium* inferido a partir del análisis de las secuencias de la región del rDNA de los aislamientos y cepas de referencia comprendiendo el extremo 3' de la región ITS 1, ITS 2, la subunidad 5,8S y el extremo 5' de la subunidad 28S; utilizando el método Neighbor-joining.

El árbol filogenético (Figura 2.9), construido utilizando la secuencia del ITS, mostró que los 3 aislamientos CIDEFI analizados se ubicaron en clados correspondientes al género *Stemphylium* que quedó segregado de las secuencias correspondientes a representantes de los géneros *Alternaria* y *Ulocladium*. Dentro del género *Stemphylium* se observó que los aislamientos CIDEFI 210, CIDEFI 212 y CIDEFI 216 se ubicaron asociados a un clado que incluyó también secuencias correspondientes a *S. lycopersici*, *S. nabarii*, *S. solani* y *S. subglobuliferum*.

### 2.3.4. Caracterización fisiológica de aislamientos seleccionados.

#### 2.3.4.1. Análisis del efecto del medio de cultivo sobre el aislamiento CIDEFI 216.

Aunque el aislamiento CIDEFI 216 fue capaz de crecer sobre los diferentes medios analizados, algunas diferencias fenotípicas fueron detectadas (Figura 2.10 y Tabla 2.3).



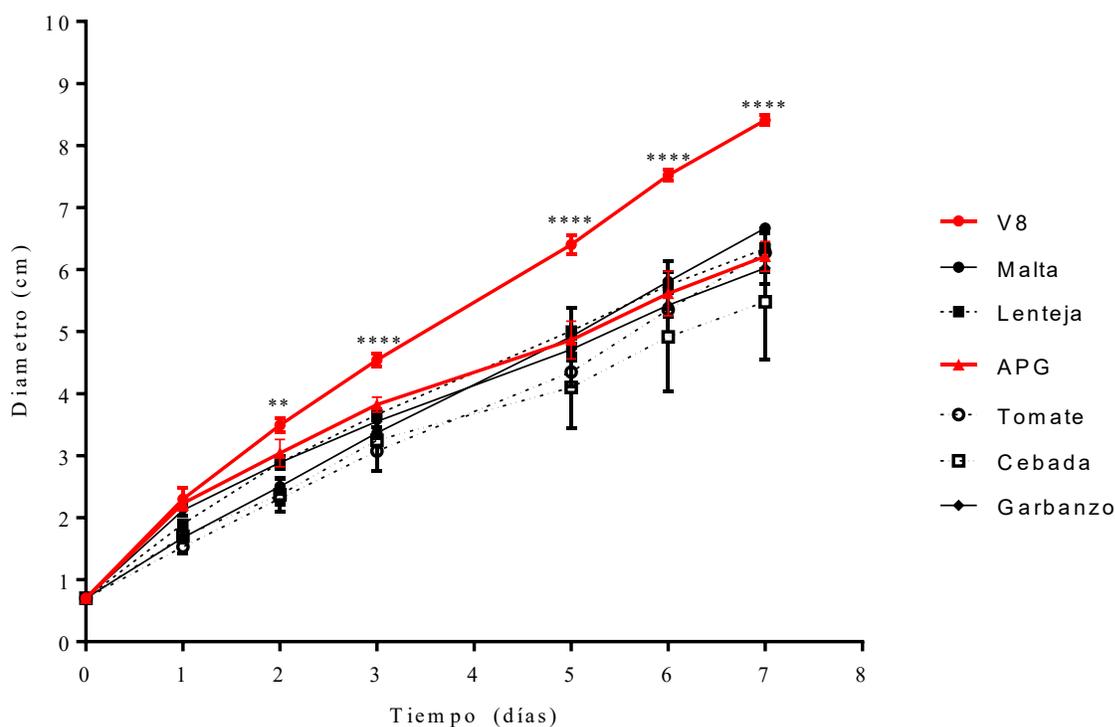
**Figura 2.10.** Efecto del tipo de medio de cultivo sobre el aislamiento CIDEFI 216 a los 7 días de incubación en oscuridad y a 25°C.

**Tabla 2.3.** Efecto del tipo de medio de cultivo agarizado sobre las colonias del aislamiento CIDEFI 216.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Características de las colonias diferenciadas</b>	<b>Grupo<sup>1</sup></b>
<b>Medio extracto de Cebada</b>	Aterciopelada de color amarillo muy claro con el borde más pálido casi blanco. Los bordes irregulares.	GI
<b>Medio extracto de Lenteja</b>	Aterciopelada, con parches blanquecinos. Coloración blanco en el centro y un gran anillo gris en la periferia.	GI, coloración del medio muy rojiza
<b>Medio extracto de Garbanzo</b>	Afieltrada con una coloración blanca-rosada-grisacea, no identificándose una zonificación clara, con bordes notablemente irregulares	GI, con poca coloración del medio
<b>APG</b>	Aterciopelada, de color gris claro y oscuro, zonas marrones, con parches rosados y blancos. Con bordes irregulares	GI, menor coloración en el medio

<b>V8</b>	Aterciopelada, con dos zonas delimitadas gris oscuro en la parte externa y rosada en la central, con parches blancos. Con bordes regulares	GI
<b>Medio extracto de Tomate</b>	Existe una zona extensa gris oscura-negro, con una región central casi blanco. Borde regular	GIII
<b>Medio extracto de Malta</b>	Existen zonas incoloras desde el disco inicial ubicado en el centro de la placa.	GIII, decoloración del medio

<sup>1</sup>El Grupo (I, II o III) hace referencia a lo establecido en el apartado 2.3.2.



**Figura 2.11.** Efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento del aislamiento CIDEFI 216 durante 7 días de incubación en oscuridad y a 25°C. (\*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente. Los asteriscos representan diferencias significativas entre V8 y el resto de los medios de cultivo).

La Figura 2.11 muestra que el menor crecimiento se obtuvo con el medio suplementado con extracto de cebada (5,48 cm) y extracto de garbanzo (6,03 cm). El mayor crecimiento se obtuvo con el medio V8, diferenciándose estadísticamente del resto de los utilizados en este ensayo desde el día 2 (p<0,01) y desde el día 3 en adelante la diferencia es aún mayor (p<0,0001). Entre un 20-35 %

menos crecieron los distintos medios de cultivo en relación al V8. El medio extracto malta tuvo un buen crecimiento, pero como se observó modificando notablemente las características generales del hongo y su pigmentación. El medio de APG tuvo un buen crecimiento, pudiendo ser utilizado para su conservación durante largos períodos de tiempo, además de ser menos costoso que otros sustratos evaluados y de utilizarse comúnmente como un medio de rutina para el trabajo en el laboratorio.

También se analizaron las características morfométricas de los conidios diferenciados sobre cada medio. Aunque en la mayoría de los medios testeados se recuperaron conidios, el micelio sobre el medio extracto de malta no diferenció conidios en el tiempo analizado (Tabla 2.4)

**Tabla 2.4.** Características morfométricas de los conidios (n:50) diferenciados por el aislamiento CIDEFI 216 creciendo sobre los diferentes medios de cultivo analizados.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Relación (l)/(a)</b>	<b>Constricciones transversales</b>
<b>Medio extracto de Cebada</b>	2,88 ± 0,41	2,62 ± 0,62
<b>Medio extracto de Lenteja</b>	2,90 ± 0,58	2,68 ± 0,51
<b>Medio extracto de Garbanzo</b>	2,63 ± 0,50	2,58 ± 0,50
<b>APG</b>	2,67 ± 0,59	2,56 ± 0,53
<b>V8</b>	2,59 ± 0,47	2,62 ± 0,53
<b>Medio extracto de Tomate</b>	3,38 ± 0,58	2,84 ± 0,46

<sup>a</sup> Valor medio

<sup>b</sup> Desvío estándar

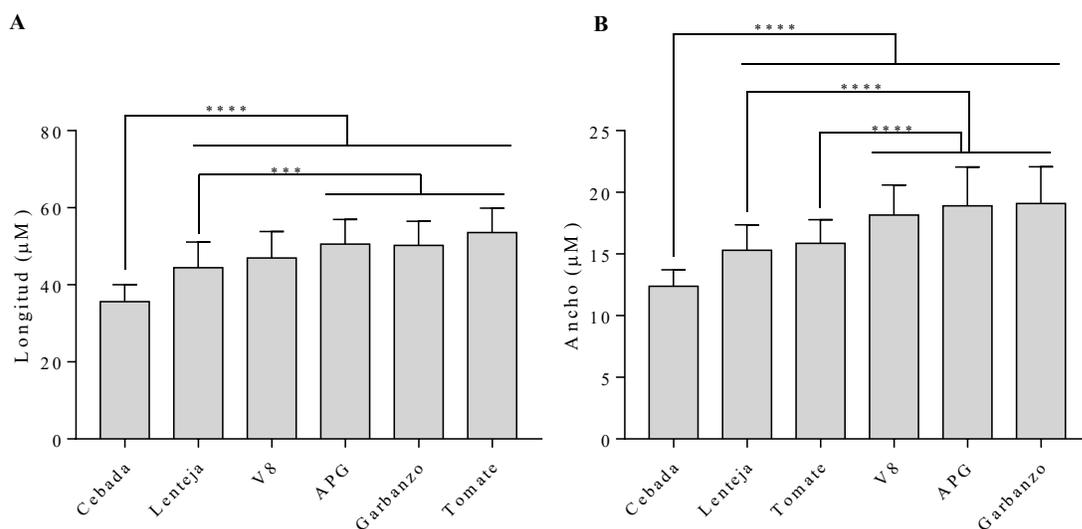
(l) Largo del conidio

(a) Ancho del conidio

Relación (l)/(a): Relación largo/ancho del conidio

En la Figura 2.12 se observa como la longitud de los conidios es diferente estadísticamente cuando el hongo fue cultivado en el medio de cultivo extracto de Cebada donde presenta los valores más bajos en relación al medio extracto de Lenteja, V8, APG, medio extracto de Garbanzo y medio extracto de Tomate, con reducciones respecto a estos que van desde el 24 al 50% ( $p < 0,0001$ ). También, cuando se cultivó el hongo en el medio de cultivo extracto de Lenteja fue distinto comparado con el cultivo en APG, extracto de Garbanzo y extracto de Tomate con reducciones

respecto a estos del 13 al 20 % ( $p < 0,001$ ). En relación al ancho de los conidios, en el medio de cultivo a base de extracto de Cebada también el hongo mostró conidios diferenciados, los cuales presentaron el valor más bajo siendo estadísticamente diferentes de aquellos recuperados de los cultivos sobre el resto de los sustratos, con reducciones del 24 al 54 % ( $p < 0,0001$ ). Cuando el hongo creció en los medios a base de un extracto de Lenteja y Tomate, se diferenció en relación a cuando creció en V8, APG y en medio extracto de Garbanzo ( $p < 0,0001$ ).



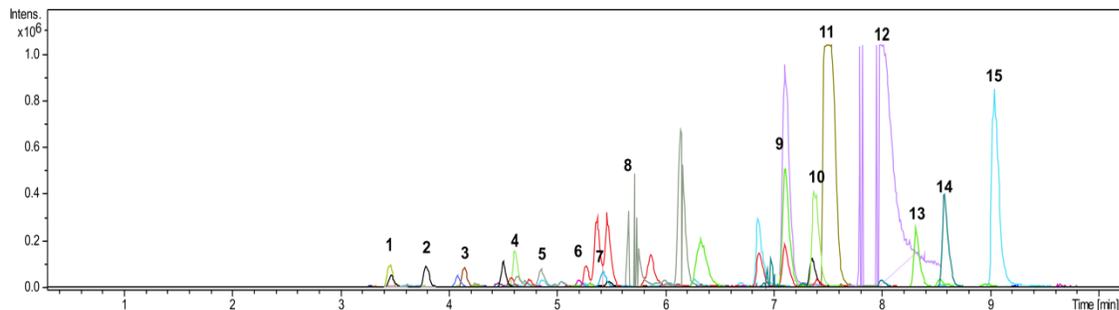
**Figura 2.12.** Características morfométricas de los conidios diferenciados por el aislamiento CIDEFI 216 cuando crecieron sobre diferentes medios de cultivo. (A) Longitud y (B) ancho de los conidios. (\*\*\*) $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).

En el caso de los conidios que se diferenciaron en el medio a base de extracto de Cebada, estos presentaron dimensiones menores con relación a los límites reportados en la bibliografía. En el medio a base de extracto de Tomate, los conidios diferenciados alcanzaron una relación largo/ancho de 3,38, siendo inferior a 3 en los conidios recuperados de los otros medios analizados.

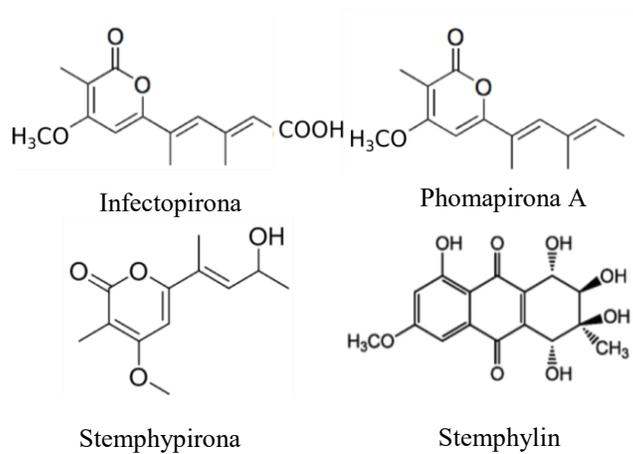
#### 2.3.4.2. Síntesis de metabolitos secundarios.

Se analizó el perfil metabólico de 20 aislamientos cuando éstos se cultivaron en el medio DRYES (en el Anexo está el perfil de todos los aislamientos). El espectro de metabolitos sintetizados por los hongos consistió en una serie de 15-20 picos principales que incluyeron tanto

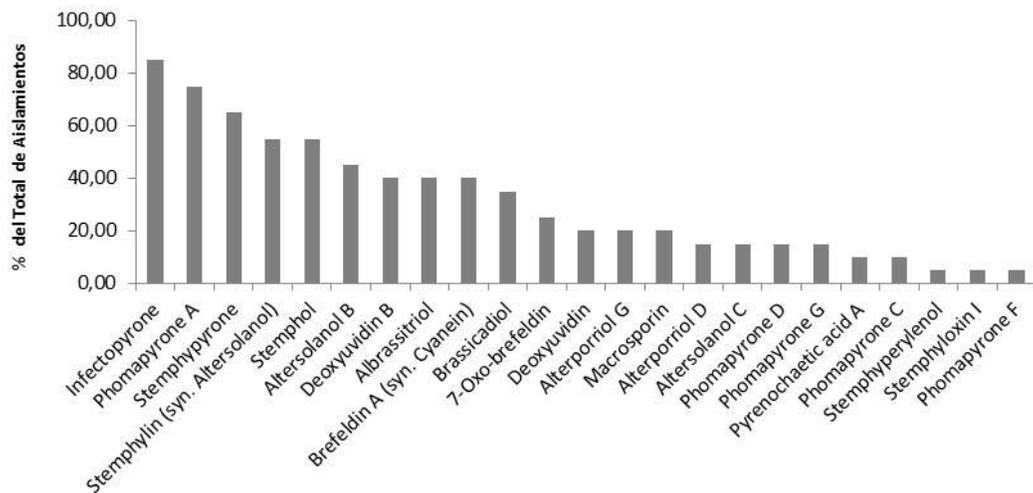
compuestos conocidos como unos aún sin resolución (Figura 2.13). Aunque los perfiles variaron entre los aislamientos, se detectaron 23 picos principales que se identificaron por comparación con estándares y compuestos disponibles en bases de datos (Figura 2.14). La estructura química de los principales metabolitos sintetizados por los aislamientos se presenta en la Figura 2.14. Infectopirona fue el metabolito sintetizado por el mayor número de aislamientos (85%), seguido de la Phomapirona-A, que fue producida por el 75% de los aislamientos, y por stempirona (65%), stemfilina (sinónimo: altersolanol A) y stemphol (55%). Diferentes altersolanoles, alterporrioles y otras phomapironas también fueron sintetizados por varios aislamientos (Figura 2.15). El 100% de los aislamientos fue capaz de sintetizar alguno de los metabolitos estudiados y en la mayoría de los casos varios de ellos de forma simultánea. El 50% de los aislamientos produjo entre 1 y 5 de los metabolitos estudiados, el 35 % entre 6 y 10 y el 15 % de los aislamientos produjo simultáneamente entre 11 y 15 de los metabolitos analizados. Los aislamientos CIDEFI 214 y CIDEFI 216 son los que produjeron la mayor cantidad de metabolitos; ambos 15, seguidos de CIDEFI 221 y CIDEFI 227 con 12 y 10 respectivamente (Figura 2.16).



**Figura 2.13.** Perfil modelo de metabolitos (cromatograma HPLC-MS), en este caso del aislamiento CIDEFI 214. (1) Stemphylina, (2) Alterporriol D, (3) Acido pirenocaetico A, (4) Stemphypirona, (5) Deoxyuvidina, (6) Phomapirona D, (7) Infectopirona, (8) Alterporriol G, (9) Albrasitriol, (10) Macrosporina, (11) Phomapirona A, (12) Stemphol, (13) 7-Oxo-brefeldina, (14) Brefeldina A y (15) Brasicadiol.



**Figura 2.14.** Estructura química de los metabolitos secundarios más comúnmente sintetizados por los aislamientos analizados.



**Figura 2.15.** Perfil de producción porcentual de metabolitos secundarios por los aislamientos CIDEFI estudiados.

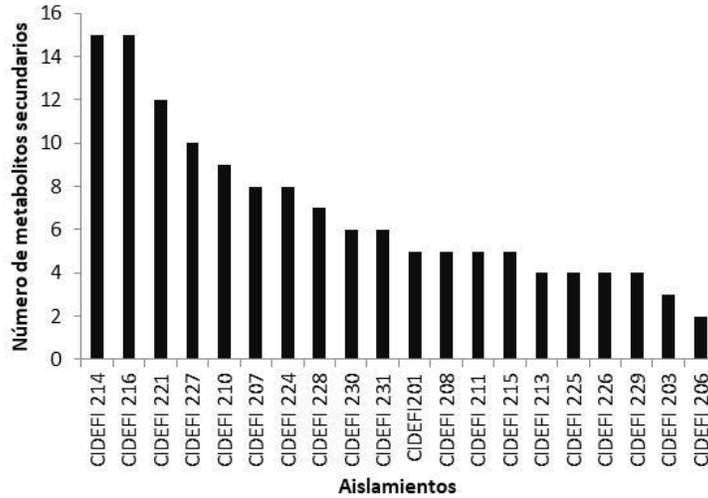


Figura 2.16. Número de metabolitos secundarios sintetizados por aislamientos CIDEFI.

### 2.3.4.3. Análisis del efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y la pigmentación del aislamiento CIDEFI 216.

Como se observa en la Figura 2.17 a  $a_w$  menor hay un menor crecimiento. Se evidenció un orden desde actividad  $a_w$  (Control, 0,98) hacia el menor (0,93) acorde con la mayor concentración de NaCl en el medio de cultivo.

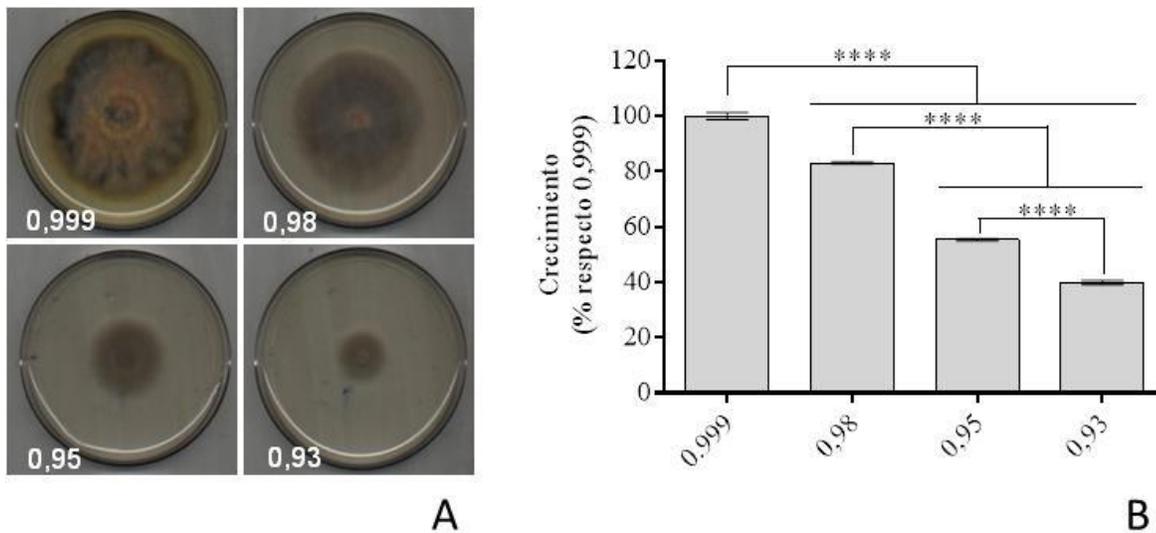
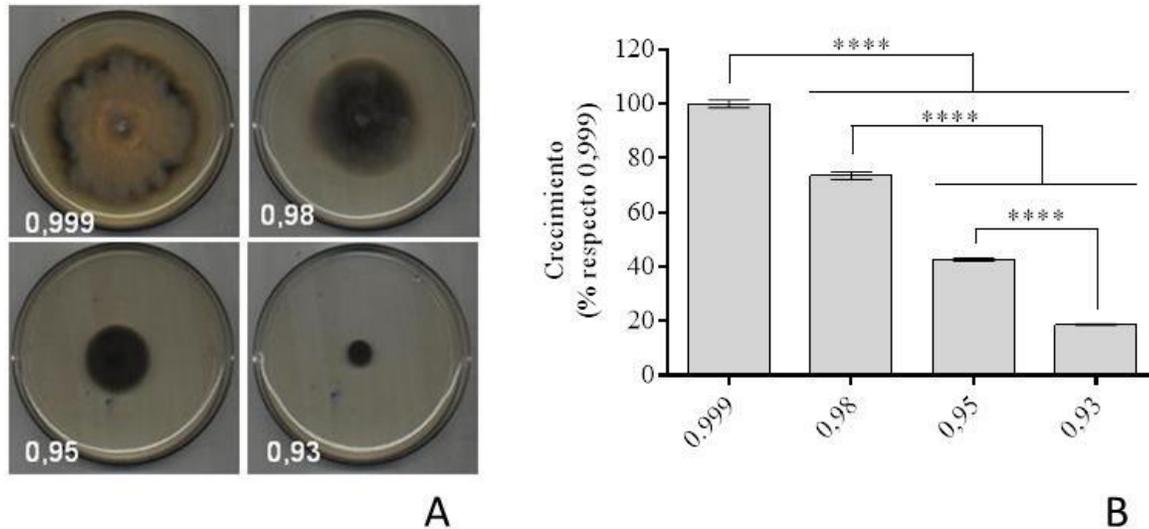


Figura 2.17. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de *Stemphylium* CIDEFI 216. (A) Vista general de los cultivos sobre medio APG (cuya  $a_w$  es 0,999; control) y suplementado con diferentes concentraciones de NaCl alcanzando  $a_w$  de 0,98; 0,95 y 0,93. (B) Efecto

de la  $a_w$  del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).

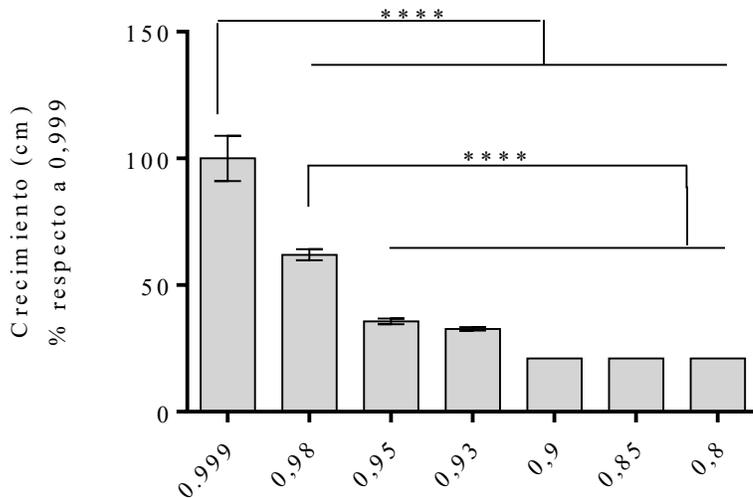
Se observaron diferencias significativas en todas las  $a_w$  evaluados, el mayor porcentaje de reducción se obtuvo con una  $a_w$  de 0,93; el cual fue de una baja de 40 % respecto al control ( $p < 0,0001$ ) (Figura 2.17.B). Cuando al medio APG (control) se suplementó con glicerol (osmólito no iónico) se obtuvieron resultados similares (Figura 2.18) al uso de NaCl.



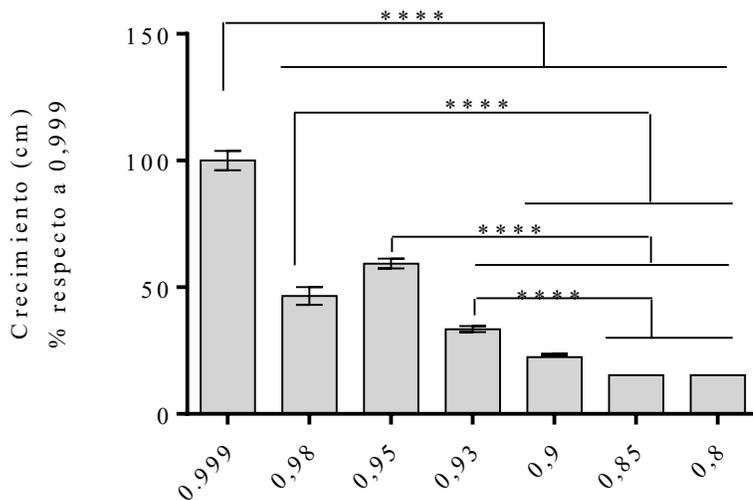
**Figura 2.18.** Efecto del Glicerol sobre el crecimiento de *Stemphylium* CIDEFI 216. (A) Vista general de los cultivos sobre medio APG (cuya  $a_w$  agua es 0,999; control) y suplementado con diferentes concentraciones de Glicerol alcanzando una  $a_w$  0,98; 0,95 y 0,93. (B) Efecto porcentual de la  $a_w$  del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).

En la Figura 2.18 se observaron diferencias significativas en todas las  $a_w$  evaluadas. Comparando respecto al NaCl el mayor porcentaje de reducción que se obtuvo con una  $a_w$  de 0,93 fue más drástico, el cual fue de una baja más notoria, cercano al 20 % respecto al control ( $p < 0,0001$ ) (Figura 2.18.B).

Puesto que el hongo crecía a un  $a_w$  de 0,93 cuando se evaluó NaCl, se ensayó un rango mayor de  $a_w$ , incluyendo los siguientes valores; 0,93; 0,9; 0,85 y 0,8. No obstante, por debajo de 0,93 no se detectó crecimiento del aislamiento CIDEFI 216. Cuando se evaluó el soluto KCl, los resultados obtenidos fueron similares a los alcanzados cuando se utilizó NaCl, con una reducción en la  $a_w$  de 0,93 en el crecimiento en torno al 34 %. En este caso, el aislamiento CIDEFI 216 continuó creciendo a 0,90 de  $a_w$ , aunque recién al tercer día del ensayo, con una reducción del 22 % respecto al testigo (Figura 2.19 y 2.20).

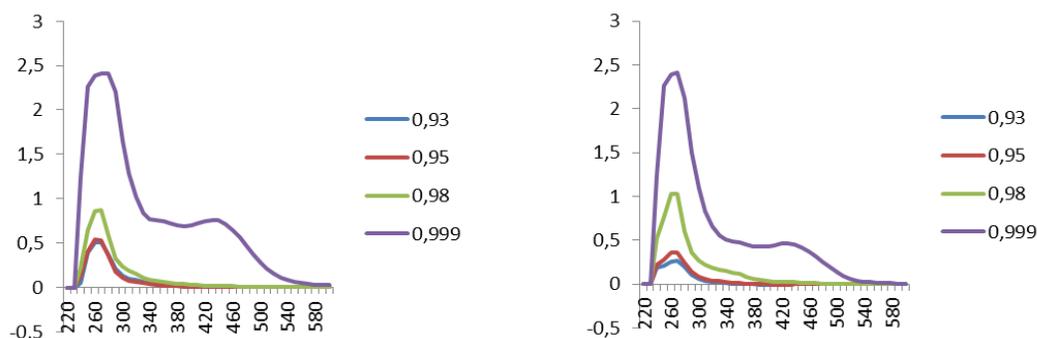


**Figura 2.19.** Efecto del NaCl sobre el crecimiento de *Stemphylium* CIDEFI 216. Efecto porcentual de la  $a_w$  del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).



**Figura 2.20.** Efecto del KCl sobre el crecimiento de *Stemphylium* CIDEFI 216. Efecto porcentual de la  $a_w$  del medio de cultivo respecto al crecimiento sobre medio APG, después de 7 días de incubación a 25 ° C y en oscuridad (\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).

También se evaluó el efecto del NaCl y del glicerol suplementado al medio de cultivo sobre la pigmentación superficial de los cultivos y los cromóforos solubles en FAA. Aunque para los dos tipos de solutos utilizados se observaron espectros similares de los cromóforos solubles en FAA, ellos variaron en su perfil de acuerdo a la concentración de soluto utilizada (Figura 2.21).

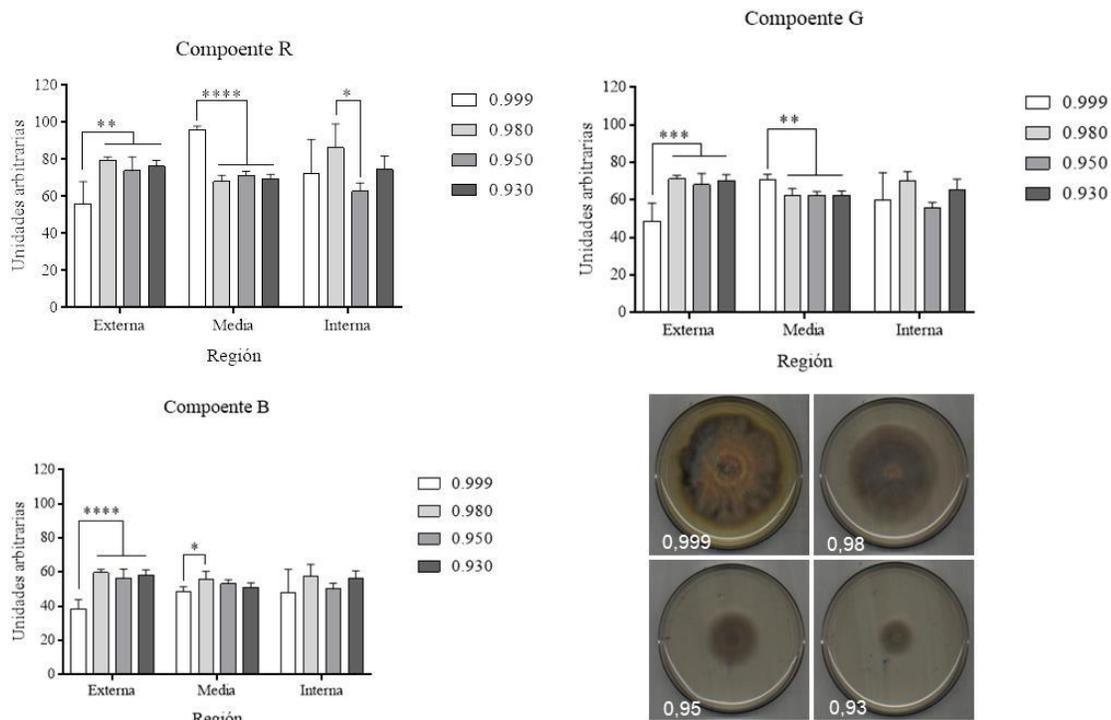


**Figura 2.21.** Efecto de un rango de  $a_w$  en el medio APG generados a partir de la suplementación de NaCl (A) y glicerol (B) sobre el perfil espectrofotométrico UV-visible de una fracción FAA de los cromóforos del aislamiento CIDEFI 216.

Se observó que el incremento de sal genera un perfil diferente. En todos los casos se observó un máximo de absorbancia alrededor de los 260-270 nm, el cual se mantiene en ese rango con el agregado de los diferentes solutos. Por otro lado, el tratamiento control presentó otro pico (notablemente menor que el anterior) de absorbancia a 440 nm el cual disminuye a medida que se aumenta la concentración de los solutos.

Se determinó también la pigmentación de las colonias sobre la base de los componentes del color a través de las dos metodologías a) composición del color electrónica: R (rojo), G (verde) y B (azul) y b) método de impresión en color, CYMK (cian, amarillo, magenta y negro).

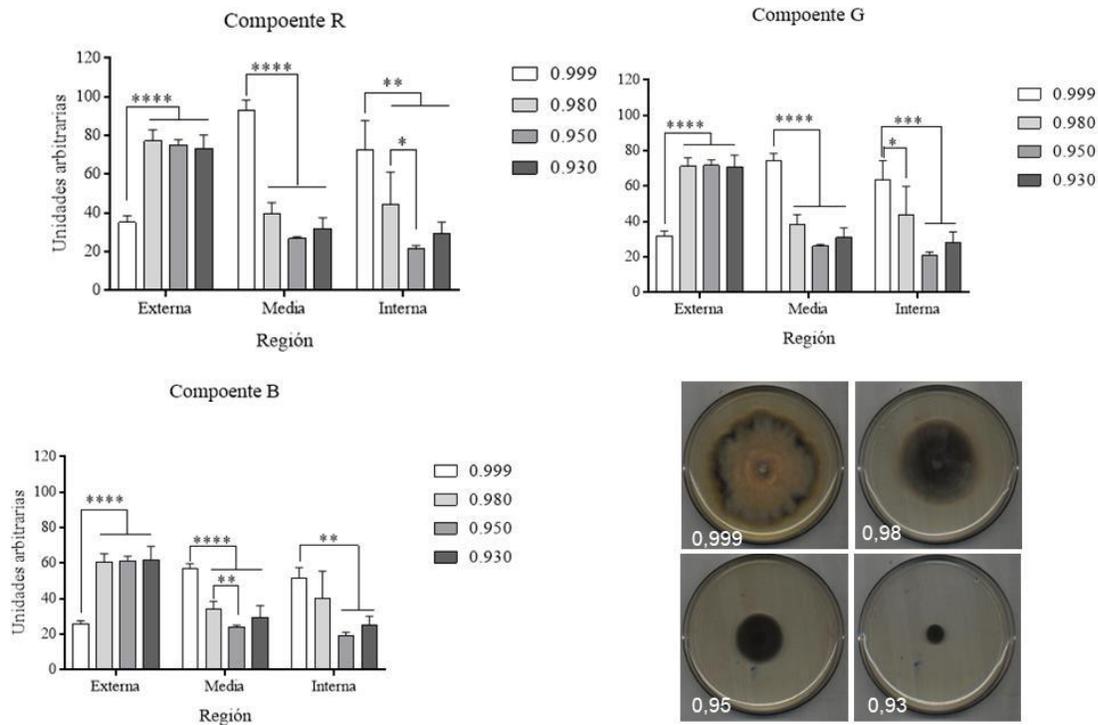
La coloración superficial roja de las colonias fue reducida por ambos osmólitos, en el caso del NaCl tal comportamiento se observa únicamente en la zona media (Figura 2.22), mientras que en el caso del Glicerol se da notoriamente en la zona media e interna.



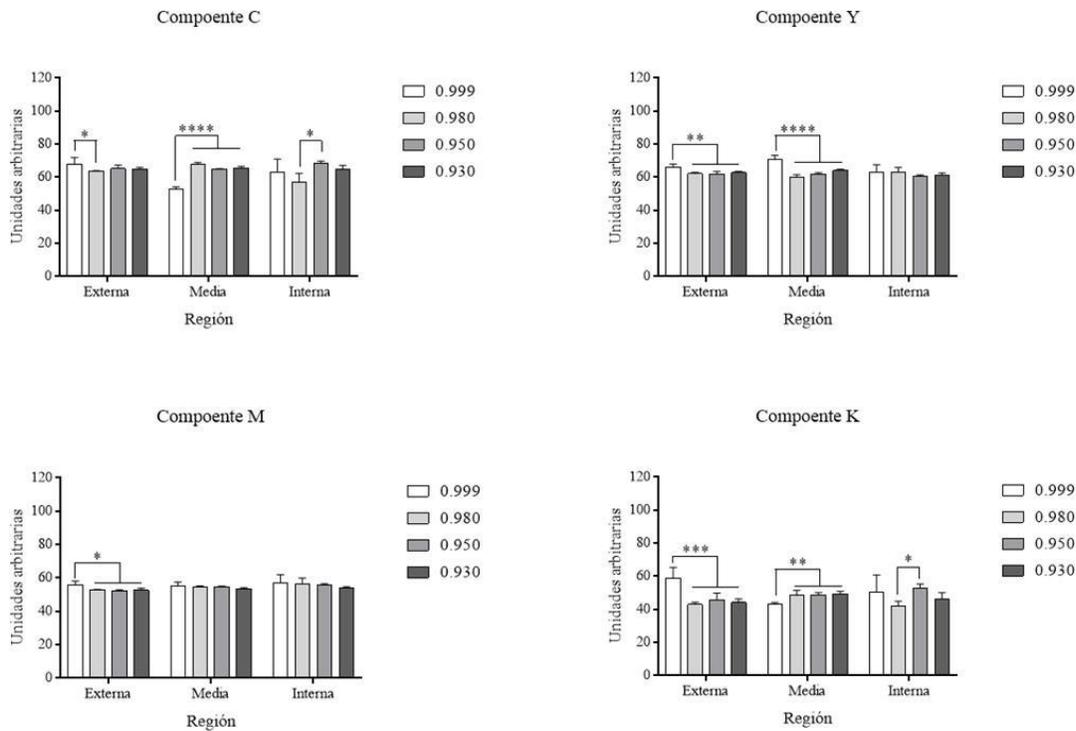
**Figura 2.22.** Efecto del NaCl en los componentes del color, a través de la composición del color electrónica sobre el crecimiento de colonias de *Stemphylium* (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes R (rojo), G (verde) y B (azul). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).

El componente G y B en la zona externa aumenta respecto al Testigo, para todos los tratamientos ( $p < 0,0001$ ).

En el caso del Glicerol la zona externa de la colonia presentaba un halo de color gris oscuro, que en las  $a_w$  menores es remplazado por otro de color rojizo. Mientras que para los colores G disminuye respecto al Testigo en la zona media e interna y en el caso de G no son tan notoria las diferencias (Figura 2.23).

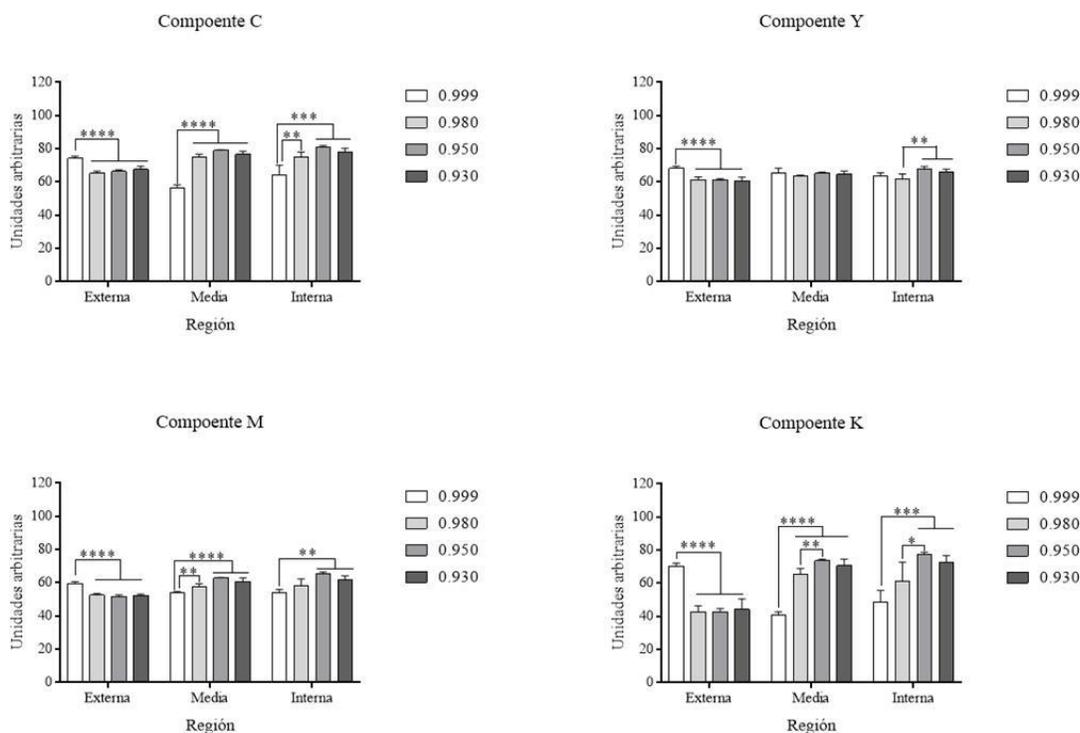


**Figura 2.23.** Efecto del Glicerol en los componentes del color, a través de la composición del color electrónica sobre el crecimiento de colonias de *Stemphylium* (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes R (rojo), G (verde) y B (azul). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).



**Figura 2.24.** Efecto del NaCl en los componentes del color, a través del método de impresión en color sobre el crecimiento de colonias de *Stemphylium* (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes C (cian), Y (amarillo) y M (magenta) y K (negro). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).

En los tratamientos el componente K del color aumentó con el glicerol para las zonas (M) media e (I) interna y se mantuvo estable con el NaCl, los otros componentes si bien mostraron diferencias significativas, se mantuvieron relativamente estables sin mostrar diferencias en la expresión biológica de las colonias del hongo (Figura 2.24 y Figura 2.25).



**Figura 2.25.** Efecto del Glicerol en los componentes del color, a través del método de impresión en color sobre el crecimiento de colonias de *Stemphylium* (CIDEFI 216) en medio basal (control; 0,999) y en medio suplementado con diferentes concentraciones después de 7 días de incubación. Componentes C (cian), Y (amarillo) y M (magenta) y K (negro). Sector E (externo), M (medio) e I (interno). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori).

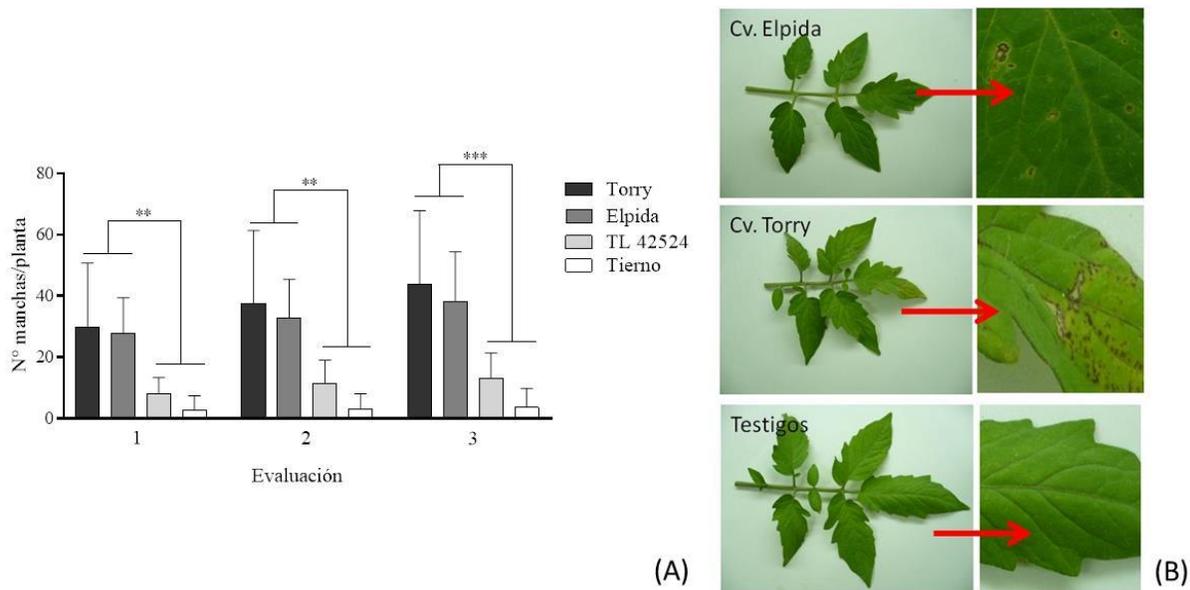
Se observó como el estrés osmótico alteró el crecimiento y la síntesis de pigmentos en el aislamiento CIDEFI 216 de *Stemphylium*, observando el efecto de cada soluto (NaCl y Glicerol), en los distintos componentes evaluados.

#### 2.3.4.4. Análisis de la severidad foliar causada por el aislamiento CIDEFI 216 frente a diferentes cultivares de tomate.

En la evaluación de la severidad de la “mancha gris de la hoja de tomate” con los 6 cultivares comerciales utilizados se observaron diferencias en el comportamiento de los mismos frente al aislamiento CIDEFI 216. Se observó que los cultivares podrían agruparse en tres grupos, en primer lugar los cultivares Torry y Elpida fueron los más susceptibles, los que presentaron un mayor número de manchas totales en las plantas. Por otro lado, un segundo grupo de cultivares: Tierno y TL 42524 mostraron menos susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, ya que presentaron un menor número de manchas totales en las plantas. Finalmente, el último grupo,

compuesto por los cultivares Sivinar y Keitor, se comportaron como resistentes, presentando solo un nivel basal de sintomatología no registrado (Figura 2.26).

En la primer fecha de evaluación el cultivar TL 42524 tuvo un porcentaje de reducción del 72 % ( $p<0,01$ ) comparándolo con Torry y 70 % ( $p<0,01$ ) en relación a Elpida. Mientras que con Tierno las diferencias fueron mayores aún, 91% ( $p<0,01$ ) en relación a Torry y Elpida. En la segunda y tercera evaluación ocurrió exactamente el mismo patrón, con porcentajes de reducción de la enfermedad muy similares.



**Figura 2.26.** (A) Evolución de la severidad del aislamiento CIDEFI 216 frente a diferentes cultivares de tomate (\*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; ANOVA de un factor y Test de Tukey a posteriori. Cada fecha de evaluación fue comparada de forma independiente). (B) Vista de la hoja completa de los cultivares que resultaron más susceptibles y de plantas sin inoculación (testigo), y detalle del foliolo afectado a su derecha.

### 2.3.4.5. Análisis del rango de hospedantes potenciales del aislamiento CIDEFI 216.

Todas las especies inoculadas han desarrollado la sintomatología típica de la “mancha gris de la hoja” coincidiendo con la descripción anteriormente mencionada: el desarrollo de pequeñas manchas ligeramente angulares (y circulares), algo deprimidas, de 2-10 mm de diámetro, inicialmente pardas, marrón claro a marrón oscuro, grisáceas, siendo el centro de las manchas de color más claro (gris), el cual no logró desprenderse del tejido circundante (autotomía) y presentó en algunas oportunidades un halo amarillento (Figura 2.27).



**Figura 2.27.** Rango de hospedantes. (A) Se observa en vista general el pimiento y detalles de las hojas desarrollando la sintomatología típica. (B) Hojas de porotos sanas y mostrando síntomas luego de ser inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216.

#### 2.3.4.6. Bioensayo de la habilidad del aislamiento CIDEFI 216 para colonizar frutos de tomate.

Aunque se realizaron diferentes inoculaciones del aislamiento CIDEFI 216 sobre frutos de tomate cv. Elpida, previamente acondicionados, solo en los tratamientos disco de papel y discos de micelio se observó la colonización miceliar del fruto, no observándose cuando se aplicó una pulverización directa de conidios (Fig. 2.28).



**Figura 2.28.** Efecto de la inoculación del aislamiento CIDEFI 216 sobre frutos de tomate cv. Elpida acondicionados; (A) pulverización directa de una suspensión de conidios a una concentración  $1 \times 10^4$ /mL (B) aplicación de un disco de papel de filtro humedecido (5 mm de diámetro) e impregnado con la suspensión de conidios CIDEFI a una concentración de  $1 \times 10^4$ /mL; (C) aplicación de un disco de cultivo agarizado sobre una herida generada en el fruto; (D) testigo sin inocular.

## 2.4. DISCUSIÓN

El presente trabajo conforma una de las primeras estimaciones de la diversidad presente en las poblaciones de *Stemphylium* como patógenos del cultivo de tomate en Argentina, implicando una base de colección de aislamientos para realizar futuros estudios de caracterización más completos de las poblaciones existentes del hongo.

Se pudo constatar que el progreso de la enfermedad se dio en ambos sentidos (desde las hojas superiores a las más inferiores) predominando el progreso de la enfermedad en sentido ascendente, desde la parte inferior de la planta coincidiendo con varios reportes (Rotem & Bashi 1977; Obregón 2014).

Los aislamientos presentaron las características indicadas para el género *Stemphylium*. Existió una gran variabilidad en las características de las colonias y del sistema conidial del conjunto de los aislamientos, lo que también ya ha sido reportado en distintos trabajos (Wang *et al.* 2009; Pei *et al.* 2010). En lo referido a las colonias coincidieron con las características descritas; el color presentó una gran variabilidad desde el gris, blanco y amarillo con parches blancos y rosados o sin ellos, con coloración del medio o sin producirlo (Wiltshire 1938). El crecimiento de los diferentes aislamientos también fue muy variable acorde con la bibliografía (Mehta 2001; Câmara *et al.* 2002; Hosen *et al.* 2009; Pei *et al.* 2010). Por su parte las características del sistema conidial son acordes con lo planteado por los autores de referencia en la temática (Weber 1930; Simmons 1969; Ellis 1971; Simmons 1985, 1989, 2001), destacando los conidióforos dematiáceos y percurrentes, con una célula conidiógena apical bulbosa típica en forma de copa y conidios muriformes con ápice cónico y constrictos en los tres septos transversos mayores, relación largo:ancho 3:1 o mayor (Ulloa & Hanlin 2006; Woudenberg *et al.* 2017).

Considerando la numerosa bibliografía en la que se menciona el uso de ITS para determinar especies del género *Stemphylium* (Câmara *et al.* 2002; Inderbitzin *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Pei *et al.* 2010; Wu *et al.* 2010; Woudenberg *et al.* 2017) es que se incluyó en el presente trabajo, quedando para un futuro completar la caracterización molecular con una secuencia de *gpd* (Gliceraldehído 3-fostato Deshidrogenasa) (Franco *et al.* 2017c; Franco 2019). En el árbol filogenético se observó una clara delimitación de los representantes pertenecientes al género *Stemphylium*, que incluyó a los aislamientos CIDEFI 210, CIDEFI 212 y CIDEFI 216, separado de los géneros *Alternaria* y *Ulocladium*.

Sin embargo, aunque por las características descritas pudimos identificar a los aislamientos como *Stemphylium sp.*, es necesario marcar la gran variabilidad que existe en lo que refiere a la caracterización morfológica, en general debido a la propia variación genética como así también a ligeras modificaciones en las condiciones de cultivo; temperatura, luz, valores intrínsecos del medio de cultivo como pH, entre otras (Mehta 2001; Câmara *et al.* 2002; Kim *et al.* 2004; Hosen *et al.* 2009). Es necesario profundizar en este tipo de estudios y obtener mayor información en estos aspectos para poder establecer relaciones filogenéticas entre especies así como posibles patotipos (Sofi *et al.* 2013).

El aislamiento CIDEFI 216 pudo crecer satisfactoriamente en los diferentes sustratos evaluados. En los medios de extracto de Tomate y extracto de Malta varía notablemente la pigmentación, en los que menor crecimiento tuvo fue con los medios de extracto de Cebada y extracto de Garbanzo; mientras que el mayor crecimiento se obtuvo con el medio V8. En el medio de APG tuvo un buen crecimiento, y con las ventajas que tiene de ser utilizado habitualmente como un medio de rutina para el trabajo en el laboratorio. En estudios con *S. botryosum* utilizando los medios V8 y APG observaron similares coloraciones en las colonias del hongo (Rotem *et al.* 1966). En el medio de cultivo a base de malta tuvo un buen crecimiento, pero modificando notablemente las características generales del hongo y su pigmentación. En ensayos realizados con *S. botryosum* encontraron resultados similares en los cambios de coloración de las colonias y un mejor crecimiento en medio de cultivo a base de Lenteja (Hosen 2011). A pesar de que hubo ligeras modificaciones, se mantienen las características morfométricas de *S. lycopersici* en los distintos medios de cultivo analizados.

En lo referido al análisis del perfil de metabolitos secundarios de *Stemphylium* Andersen *et al.* (1995) realizaron un primer intento de caracterizar el perfil de metabolitos secundarios de las especies del género mediante HPLC y cromatografía en capa fina. Trabajaron con *S. botryosum*, *S. herbarum*, *S. alfalfae*, *S. majusculum*, *S. sarciniforme*, *S. vesicarum*; detectando cinco metabolitos principales; stemphylin, stemphyloxin II, stemphyperyleneol y stemphol. Las técnicas analíticas modernas, seguidas de un análisis automatizado de los datos, permiten la selección rápida de extractos y la identificación de picos cromatográficos correspondientes a compuestos conocidos. Este enfoque se ha aplicado para determinar el perfil de metabolitos de *Stemphylium* de los aislamientos CIDEFI obtenidos de hojas de tomate. La estandarización de las condiciones de cultivo permite la comparación con otras obras, el medio DRYES se ha utilizado anteriormente como medio de cultivo para el estudio de *Stemphylium* así como para *Alternaria* y géneros relacionados (Andersen *et al.* 2005, 2015). Se informó sobre la producción de infectopirona por *S.*

*eturmiunum* y que también se puede acumular en tomates mohosos (Andersen & Frisvad 2004). En el presente trabajo, y en concordancia con los trabajos de (Medina *et al.* 2021a, b) este compuesto fue producido por 17 de los 20 aislamientos analizados. Los otros compuestos principales encontrados se mencionan previamente en la literatura, producidos por diferentes especies de *Stemphylium* (Barash *et al.* 1975; Andersen *et al.* 1995; Debbab *et al.* 2009). Se observó la capacidad de producir phomapyrone A por 15 de 20 aislamientos, y otras phomapyrones (C, D, F y G) en una proporción menor. Estos metabolitos, producidos por *Phoma* y *Alternaria* no se han aislado de *Stemphylium* hasta ahora (Pedras & Chumala 2005).

Curiosamente, otros metabolitos que se sabe que son producidos por *S. lycopersici*, como la macrosporina y la estempiloxina I fueron biosintetizados por un bajo número de aislamientos en el presente trabajo. Compuestos como la desoxuvidina, la desoxuvidina B, el albrassitriol, la cianina, el brassicadiol, la 7-oxo-brefeldina y el ácido pirenocético A se han aislado de otros géneros de hongos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*) pero no de *Stemphylium* hasta ahora (Andersen *et al.* 2015). La toxicidad de muchos de estos metabolitos en animales y humanos aún se desconoce, y se han realizado algunos estudios en líneas celulares o microorganismos. La mayoría de estos compuestos presentan fitotoxicidad conocida y se sospecha que están involucrados en el mecanismo de la enfermedad, ya que muchos reproducen los síntomas causados por el microorganismo patógeno cuando se aplican en hojas y frutos de varias plantas (Barash *et al.* 1975; Breiman & Barash 1976; Barash 1982; Trigos *et al.* 2011).

El estrés osmótico altera el crecimiento de los microorganismos (Cervantes-García *et al.* 2003), incidiendo en la síntesis de pigmentos. Como se mencionó, las características morfológicas en la identificación de microorganismos, en particular *Stemphylium* spp. varían según el ambiente circundante, por lo que modificaciones en el potencial osmótico de las condiciones de cultivo originaron cambios en las características de las colonias del hongo.

El incremento de sal generó un perfil diferente, se observó un máximo de absorbancia alrededor de los 260-270 nm, el cual se mantiene en ese rango con el agregado de los diferentes solutos, aunque disminuye el pico de absorbancia, indicando que el hongo deja de sintetizar una sustancia de color amarillo. Es decir que, en ausencia o muy baja cantidad de sal, el aislamiento produce una sustancia que absorbe en la región amarilla, y que esta no se produce a altas concentraciones de sal. En cambio, en otro estudio se determinó un cambio de picos de absorbancia con el agregado de sal (NaCl al 6,8,10 y 12%), de la región naranja (410 nm) a la región roja (440 nm) (Babitha *et al.* 2007). Los factores ecofisiológicos afectan el crecimiento de los microorganismos y de los hongos en particular (Astoreca *et al.* 2009), se han reportado situaciones

de estrés con diversos potenciales agua como señala la siguiente revisión (Duran *et al.* 2010) que afectan los parámetros de medios de cultivo, por ejemplo se vio afectado el crecimiento en *Fusarium* mediante el agregado de NaCl, KCl y sacarosa (Lira-Méndez *et al.* 2006). En el presente trabajo, cuando se compara el glicerol respecto al NaCl, el mayor porcentaje de reducción se obtuvo con una  $a_w$  de 0,93 siendo más drástico para el soluto no ionico que para la sal. Los solutos presentes en el medio de cultivo atrapan moléculas de agua y no los dejarán disponibles para el hongo(Lira-Méndez *et al.* 2006), entonces los hongos tienen que gastar energía para obtener moléculas de agua del medio y así equilibrar el potencial hídrico del citoplasma respecto al ambiente circundante, por lo que se ve afectada la tasa de crecimiento de las colonias en condiciones *in vitro* (Jennings &(o actividad agua,) de Burkef 1990).

Considerando el NaCl las  $a_w$  menores a 0,9 no permitieron que crezca nunca el aislamiento CIDEFI 216, cuando se evaluó el soluto KCl los resultados fueron similares, aunque permitió crecer con  $a_w$  menores a dicho valor. Cuando se utilizaron  $a_w$  similares ninguno de los 20 hongos estudiados pudieron crecer en el medio de cultivo suplementado con NaCl (Gleason *et al.* 2006). En el caso del Glicerol, también a medida que aumentó la concentración de soluto disminuyó el crecimiento de manera similar a lo reportado (Giorni *et al.* 2008; Aguirre *et al.* 2009; Alam *et al.* 2010), este efecto que fue más intenso que con NaCl podría estar potenciado por la capacidad de los hongos de sintetizar *de novo* glicerol en respuesta al estrés osmótico y el desvío de carbono asimilable para la regulación osmótica en detrimento al crecimiento de la biomasa del hongo (Tijerina-Ramírez *et al.* 2014; Martínez-Villarreal *et al.* 2016). No obstante, no hay datos si las especies de *Stemphylium* han sido reportados que sinteticen glicerol bajo condiciones de estrés. En general los componentes del color (Dorado *et al.* 1999) se mantuvieron relativamente estables, exceptuando el color R rojo de las colonias que fue reducido por ambos osmólitos, en el caso del NaCl dicho comportamiento se observa únicamente en la zona media mientras que en Glicerol se da notoriamente en la zona media e interna. Por su parte el componente K del color aumentó con glicerol y se mantiene estable con NaCl. De esta forma se puede observar cómo se modifica la síntesis de pigmentos en el aislamiento CIDEFI 216 de *Stemphylium*.

En los ensayo de severidad de los 6 cultivares comerciales utilizados se observaron diferencias en el comportamiento de los mismos frente al aislamiento CIDEFI 216. Cultivares más susceptibles, los que presentaron un mayor número de manchas totales en las plantas; otros que mostraron un comportamiento tolerante, y finalmente, otros que se comportaron como resistentes, presentando un nivel de enfermedad casi nulo. Es importante poder incorporar nuevas fuentes de resistencia al patógeno, para los cultivares ampliamente difundidos que no la presenten, como así

también porque podrían aparecer nuevas razas, por lo que estudios como los realizados en Brasil (Reis & Boiteux 2006c; Domingues 2012) de evaluación e incorporación de materiales son necesarios en nuestro país.

En lo referido a los ensayos sobre rango de hospedantes, el aislamiento evaluado de CIDEFI 216 ocasionó la sintomatología típica de la “mancha gris de la hoja”, coincidiendo con la descripción anteriormente mencionada (Domingues 2012), en todas las especies botánicas evaluadas: berenjena, morrón, zapallo, zapallito redondo, pepino, maíz dulce, poroto, lechuga y rúcula. En contraposición con estos resultados, se inocularon con *S. botryosum* más de 15 especies botánicas y solamente el haba desarrolló la enfermedad (Koike & Henderson 2001). En el caso de estudios llevados adelante en distintos materiales emparentados con el tomate, se encontraron diferencias en la susceptibilidad y resistencia de los mismos (Reis & Boiteux 2006a; de Miranda *et al.* 2010).

Cuando se realizaron los muestreos de material de tomate durante esta tesis nunca se observó desarrollo de la enfermedad en los frutos (Jones *et al.* 1992; Blancard *et al.* 2011), sin embargo, en ensayos de frutos de tomate en condiciones controladas cuando fueron inoculados se observó que desarrolló el micelio del hongo, exceptuando en el tratamiento por pulverización. Por otra parte, una cuestión interesante para determinar, a pesar de no presentar síntomas visibles de la enfermedad en el campo, es si en los frutos hay contenidos de micotoxinas nocivas para el consumo humano posterior de los frutos.

## 2.5. CONCLUSIONES PARCIALES

Se aislaron 49 hongos monospóricos asociados a la “mancha gris de la hoja” de *L. esculentum* que corresponden al género *Stemphylium*.

Se logró caracterizar a los aislamientos fúngicos en base a características morfológicas, marcadores moleculares y aspectos fisiológicos.

El sistema conidial presentó conidióforos con proliferación percurrente, dematiáceos con una célula conidiógena apical bulbosa típica en forma de copa y conidios muriformes con ápice cónico y constrictos en los tres septos transversos mayores, relación largo:ancho 3:1. Por estas características morfométricas los aislamientos estudiados coinciden con la especie *S. lycopersici*.

Como marcador molecular se utilizó la secuencia del ITS para confirmar la asignación de 3 aislamientos CIDEFI pertenecientes al género *Stemphylium*.

Se registraron por primera vez para *Stemphylium* los siguientes los metabolitos secundarios: desoxuvidina, el albrassitriol, sala cianina, el brassicadiol, la 7-oxo-brefeldina y el ácido pirenocético A.

Considerando el NaCl, KCl y el Glicerol suplementado al medio del cultivo, a medida que aumentó la concentración de soluto disminuyó el crecimiento del hongo.

Las características de las colonias del aislamiento CIDEFI 216 se modificaron de acuerdo al medio de cultivo utilizado, el mayor crecimiento de la colonia se dio en medio V8. En el medio con extracto Malta el hongo no logro producir conidios.

El aislamiento CIDEFI 216 ocasionó la sintomatología típica del hongo sobre cultivares de tomate y en otros cultivos hortícolas.

## Capítulo 3.

Aplicación del BTH para el control de enfermedades foliares de tomate.

---

---

### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. Resistencia sistémica adquirida (RSA) en horticultura.

Existen numerosas publicaciones vinculadas a diversos patosistemas, del efecto de diferentes inductores sobre cultivos hortícolas y tratamiento postcosecha de los productos (Terry 2004; Da Rocha & Hammerschmidt 2005).

En este trabajo se analizaron aquellas que utilizan el ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico S-metil-ester (BTH) como inductor elegido; debido a su reconocida eficacia en diversos cultivos a escala global y su escasa experimentación en el ámbito local. Existen antecedentes en el CHP de trabajos con diversos inductores en diferentes cultivos hortícolas (del Pino 2010; Guerrero 2016; Persico 2016; Ruscitti 2016; Bernardo *et al.* 2017, 2018; Arango *et al.* 2019)

En coliflor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) mediante aplicaciones con BTH lograron reducir hasta en un 90 % la incidencia y severidad del Oomycete *Hyaloperonospora parasitica* causante del *downy mildew* (Godard *et al.* 1999; Ziadi *et al.* 2001). Dann *et al.* (1996) utilizaron BTH para inducir RSA en poroto (*Phaseolus vulgaris*) y encontraron que se redujo la incidencia y la severidad de la enfermedad provocada por *Uromyces appendiculatus*. Dann & Deverall (2000) estudiaron el comportamiento de plantas de arveja (*Pisum sativum*) a las que se les aplicó BTH y encontraron una reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por *Uromyces viciae-fabae* en las plantas tratadas con BTH. Smith-Becker *et al.* (2003) trataron plantines de melón (*Cucumis melo*) en invernadero y a campo con BTH en dosis de 50 y 100 mg.L<sup>-1</sup>, disminuyendo la severidad de *Colletotrichum* y el virus del mosaico del pepino (CMV). La dosis de 100 mg.L<sup>-1</sup> de BTH generó a campo un cultivo más sano y con frutos de mayor tamaño y calidad, mientras que en los plantines cultivados en el invernáculo con la dosis baja se observó síntomas de fitotoxicidad en los cotiledones. En especies hortícolas de hoja la inducción a la RSA podría ser aún más significativa, ya que este mecanismo puede reducir las eventuales lesiones en las hojas directamente, siendo estos órganos cosechados (hojas) el producto comercial. Leskovar & Kolenda (2002) estudiaron el efecto de la aplicación de BTH para controlar la roya blanca de la espinaca (*Spinacea oleracea* L.), cuyo agente causal es *Albugo occidentalis*, y observaron una reducción de la severidad del 30 % con respecto al tratamiento control. Tally *et al.* (1999) encontraron que el BTH controló en lechuga (*Lactuca sativa*) al patógeno *Bremia lactucae*.

En cuanto al tomate se han llevado adelante numerosos trabajos evaluando como inductor al BTH en relación a patologías de distinto origen; viral, bacteriano, fúngico, entre otras fuentes

etiológicas de fitopatológicas. Anfoka (2000) utilizó BTH en tomate para inducir RSA frente al *Cucumber Mosaic Virus* (CMV); el producto fue aplicado como *drench* (vía pulverización, aplicación dirigida al cuello de la planta) a una concentración de 0,1 mM, obteniendo en promedio una reducción en la incidencia del 80 % y en la severidad a los 21 días post inoculación una reducción del casi 60 %. En un caso similar Csinos *et al.* (2001) trabajaron con *Tomato Spotted Wilt Virus* y encontraron en condiciones controladas y en tres ensayos a campo resultados positivos con el uso del BTH, que variaron en 4 localidades. En otros ensayos con los siguientes virus; el *Tobacco Mosaic Tobamovirus* (TMV) y el *Tomato Mosaic Tobamovirus* (ToMV), se obtuvieron reducciones del 62% y el 73% respectivamente en plantas indicadores de *Nicotiana glutinosa* (Madhusudhan *et al.* 2008). En ensayos a campo y condiciones controladas con *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) donde se evaluaron diversos tratamientos que incluyeron al BTH, se pudo observar el efecto positivo del mismo en el control de la enfermedad (Momol *et al.* 2004).

En cuanto a la efectividad frente a enfermedades provocadas por bacterias, Baysal *et al.* (2003b) utilizaron plantines de tomate en invernáculos inoculados con *Clavibacter michiganensis* agente causal del “cancro bacteriano”, y previa aplicación del inductor BTH, como resultado el índice de control de la enfermedad se redujo en más de un 70 %. Anith *et al.* (2004) encontraron que aplicaciones con BTH en tomate para controlar a *Ralstonia solanacearum*, disminuyeron la incidencia un 20% aproximadamente respecto a los Testigos. Se obtuvieron niveles menores de protección (20 al 30 %), en tomate cultivados en invernaderos frente al marchitamiento bacteriano ocasionado por *R. solanacearum* (Araujo *et al.* 2005; Pradhanang *et al.* 2005). Aplicaciones con el inductor BTH permitieron obtener mayores rendimientos (Pradhanang *et al.* 2005). Considerando a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en tomate, Abbasi *et al.* (2002) encontraron que el BTH redujo la severidad de la enfermedad en valores cercanos al 50 % en frutos cosechados. En relación al mismo patosistema Buonauro *et al.* (2002) observaron, tanto en condiciones controladas como a campo, buenos resultados con la utilización del BTH (300µM), en condiciones controladas encontraron valores de eficacia del orden del 50-90% dependiendo de la hoja evaluada, 4ta y 7ta respectivamente. Mientras que en condiciones de cultivo a campo de tomate obtuvieron buenos resultados en los distintos tratamientos utilizados, con diferentes dosis de BTH (del 30-90 %) y combinado con productos a base de cobre (Rossi & Patteri 2009). En estudios a campo de tomate con aplicaciones de BTH se logró reducir al patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Obradovic *et al.* 2004, 2005). En un estudio muy amplio Louws *et al.* (2001), plantearon una red de ensayos a campo en Estados Unidos, para evaluar el efecto del inductor BTH contra la enfermedad causada por *Xanthomonas anoxopodis* pv. *vesicatoria*, y concluyeron que fue efectivo

frente a esta bacteria mientras que el rendimiento no fue afectado. Analizando *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* observaron que el BTH redujo considerablemente las zonas de clorosis y necrosis en plantas de tabaco, tanto en condiciones controladas como a campo (Cole 1999).

En cuanto al efecto del BTH en el control frente a patologías causadas por representantes de Oomycota (Straminipilia), Matheron & Porchas (2002) encontraron que en algunos ensayos se controló eficazmente la patología causada por *Phytophthora capsici*, mientras que en otros la aplicación de BTH no generó ninguna protección. En rúcula (*Eruca sativa*) del Pino (2010) encontró que frente a la enfermedad *downy mildew* (*Hyaloperonospora parasitica*), el factor clave y determinante de la eficiencia del BTH para reducir la severidad fue realizar aplicaciones tempranas lo que provocó niveles de protección adicionales de un 15 %.

En lo que refiere a estudios de RSA en patosistemas que involucren hongos, Malolepsza (2006) realizó ensayos con tomates inoculados con *Botrytis cinerea* y tratados con BTH, y sólo el 27% de la superficie de las hojas estaba afectada, mientras que en el control tenía el 60% afectada. En el trabajo de Amini (2009) el BTH redujo en un 54% la severidad de plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En otro estudio con el mismo patógeno encontraron que la aplicación del BTH difirió la aparición de síntomas en plantas de tomate, como así también el número de lesiones en la raíz en más de un 70 % (Benhamou & Bélanger 1998). En ensayos a campo de tomate Töfoli & Domingues (2005) evaluaron el efecto del BTH sobre la severidad de la enfermedad causada por *Alternaria solani* y encontraron que controló dicha patología.

Considerando que la RSA involucra un incremento del contenido endógeno en tejidos vegetales del AS, y puesto que ha sido evaluado la aplicación exógena para aplicar protección en contra de varios tipos de estreses bióticos (Fan *et al.* 2009; Rangel Sánchez *et al.* 2010; Sanchez Rojo 2010; Galviz-Fajardo *et al.* 2020; Maia Junior *et al.* 2020) y abióticos, tales como altas y bajas temperaturas, salinidad o metales pesados en una multiplicidad de patosistemas (Gunes *et al.*, 2007; Chávez-Suarez *et al.*, 2012; Bernardo 2016).

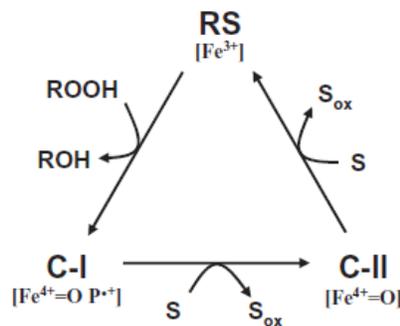
### **3.1.2. Indicadores de RSA.**

Es importante establecer relaciones entre determinados parámetros evaluados que revelen ser indicadores de la activación de los mecanismos de defensa en las plantas.

### 3.1.2.1. Peroxidasas (POX; EC 1.11.1.7).

Las peroxidasas son un complejo grupo de hemoproteínas que catalizan la oxidación-reducción de varios sustratos orgánicos e inorgánicos que utilizan peróxido. Existen distintas clases de peroxidasas; las de la Clase III: son glicoproteínas monoméricas con dos iones calcio estructurales y cuatro puentes disulfuro conservados. La mayoría están altamente glicosiladas. Dependiendo del tejido vegetal en el que se producen son muy variadas y específicas. Pueden participar en la morfogénesis (crecimiento, elongación y división celular), en la biosíntesis de la pared celular (lignificación, suberización), en la biosíntesis de ET, oxidación de compuestos tóxicos, en el catabolismo del ácido 3-indolacético, detoxificación de  $H_2O_2$  y otras especies reactivas al oxígeno, y adaptación a situaciones de stress biótico-abiótico (Ruiz Dueñas 1998; Quiroga *et al.* 2000; del Pino 2010).

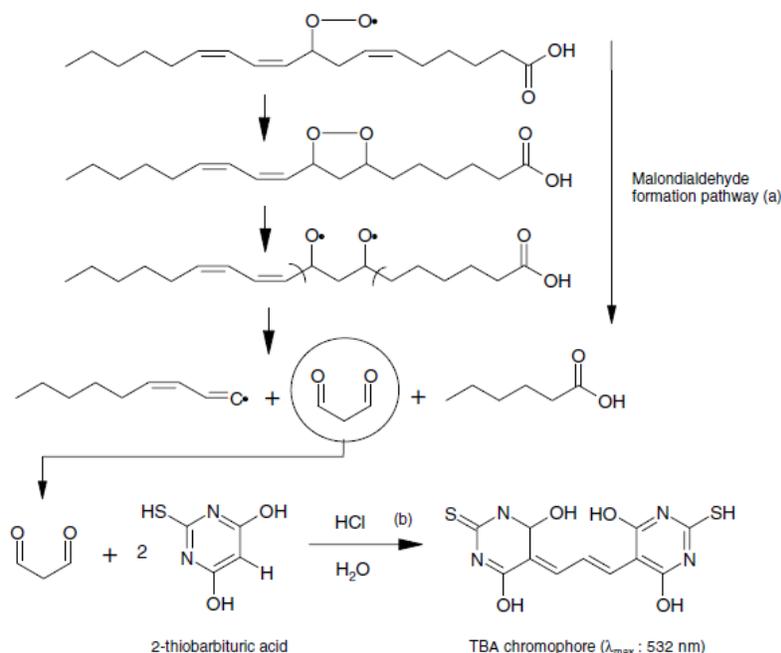
Si se considera el punto isoelectrónico, se subdividen en formas aniónicas y neutras (asociadas principalmente a la pared celular) y otras catiónicas (ubicadas en las vacuolas) (Gómez-Vásquez *et al.* 2004). La guaiacol-peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.7) es una enzima oxidoreductasa que es secretada al apoplasto y a la vacuola. Cataliza una reacción en la que sustrae un átomo de  $H_2$  de una molécula de guaiacol para cedérsela a una molécula de peróxido produciendo tetraguaiacol y  $O_2$  y  $H_2O$  (Figura 3.1) (Ruiz-Dueñas & Martínez 2009; Núñez Sánchez 2012). Tiene implicancias en procesos claves como la reducción de compuestos aromáticos, síntesis de lignina, metabolismo de auxinas y protección frente a patógenos. Está asociada a las funciones de la PR-8 (Edreva 2005; del Pino 2010).



**Figura 3.1.** Ciclo catalítico general de peroxidasas (Dunford 1999). El ciclo incluye la oxidación di-electrónica de la enzima peroxidasa (en estado de reposo, RS conteniendo  $Fe^{3+}$ ) por una molécula de hidropéroxido (ROOH como  $H_2O_2$ ) para generar un compuesto-enzima C-I (conteniendo un complejo entre  $Fe^{4+}$ -oxo y un radical cationico de la porfirina). Este compuesto C-I es reducido mono-electrónicamente por dos moléculas de sustrato (S - como guaiacol-, el cual es oxidado en el proceso:  $S_{ox}$ ), generando secuencialmente un compuesto intermedio II (C-II; que contiene  $Fe^{4+}=O$  después de la reducción de porfirina por un electrón), luego de lo cual la enzima vuelve al estado de reposo (estado férrico) para iniciar el ciclo (Ruiz-Dueñas & Martínez 2009).

**3.1.2.2. Peroxidación de lípidos. Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (SRATB-TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances, por su sigla en inglés).**

La peroxidación lipídica en las plantas es una característica importante de la muerte celular durante las interacciones de las plantas con patógenos. Con frecuencia, se utiliza al malondialdehído (MDA) como un marcador de daño oxidativo de lípidos y su concentración varía dependiendo el tipo de estrés al que se sometan las células. Esta reacción es ampliamente utilizada como un índice de peroxidación lipídica, lo que se busca evaluar es la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con productos de peroxidación de ácidos grasos poli no-saturados generando un cromóforo rojo (Figura 3.2). Este compuesto posee un máximo de absorción a 532 nm y puede ser determinado espectrofotométricamente. El principal producto de peroxidación capaz de reaccionar con el TBA es el MDA aunque no es el único, pudiendo ser otros dialdehídos (Laguerre *et al.* 2007).



**Figura 3.2.** (A) Ruta de formación de malondialdehído, y (B) formación del cromóforo de TBA, tomado de (Laguerre *et al.* 2007).

**3.1.2.3. Fenoles totales.**

Son un grupo de compuestos del metabolismo secundario de los vegetales, su síntesis y acumulación, están condicionados por el estado de desarrollo de la planta o de los órganos, tejidos y células. Estos procesos son controlados por factores de tipo endógeno relacionados con los procesos

dependientes del desarrollo y/o por factores externos tales como temperatura, luz o ataques de agentes bióticos o abióticos (Ringuelet & Viña 2013). Dentro de la variedad de funciones que tienen los fenoles en las plantas, aquí se destaca cuando forman parte de los denominados mecanismos químicos de defensa contra herbívoros y microorganismos patógenos (Ruiz & Romero 2001; Lattanzio *et al.* 2006).

En situaciones de estrés se produce una acumulación de compuestos fenólicos (Ruiz & Romero 2001) y dado el carácter antioxidante de éstos (Dixon & Paiva 1995), se ha sugerido que los fenoles desempeñan un papel celular clave en estas circunstancias en la protección frente a la peroxidación lipídica, proceso que causa efectos de rotura de membranas y pérdida de compartimentalización y funcionalidad de las células (Rice-Evans *et al.* 1997).

### **3.1.3. Objetivos específicos**

Evaluar al BTH como agente activador de RSA en tomate y su rol en el control de *Stemphylium* y otros patógenos foliares de tomate.

Identificar los indicadores de RSA que revelen con mayor sensibilidad la activación de los mecanismos de resistencia.

### **3.1.4. Hipótesis**

La activación de mecanismos de RSA es una herramienta efectiva en el control de enfermedades foliares en tomate.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.-

### 3.2.1. Aplicación del BTH en hojas desprendidas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216.

En primera instancia se llevó adelante un ensayo preliminar, para determinar la mejor forma de realizar la inoculación del aislamiento CIDEFI 216 en un sistema *in vitro*, para de esta manera analizar cual tiene una mayor capacidad para reproducir los síntomas de la enfermedad. Se evaluaron distintos métodos de inoculación de hojas desprendidas de tomate y también folíolos. Se evaluaron dos métodos de inoculación: el primero, con discos de 0,8 mm de APG cubierto de micelio, obtenidos de cajas de Petri de 9 cm de diámetro sembradas procedente de cultivos de 7 días, incubadas en estufas a 25°C, en oscuridad, durante una semana (Irwin *et al.* 1986; Kim *et al.* 2004; Orozco-Santos *et al.* 2004; Köhl *et al.* 2009; Sakr 2018). El segundo método, fue una pulverización de suspensión de conidios, con una concentración del inóculo de  $1 \times 10^4$  conidios/mL (Kim *et al.* 2004; de Miranda 2009; de Miranda *et al.* 2010). Asimismo, se probó de ubicar las hojas con su cara abaxial hacia arriba de la placa o hacia abajo, considerando que las hojas de tomate son anfiestomáticas (estomas en ambas caras) con una distribución homogénea en las dos caras, pero con un predominio en la superficie abaxial (Flores & Espinoza 1977).

Una vez definido el método de inoculación (descrito en el apartado 2.2.4.4.) para realizar los ensayos a los fines de cumplir con el objetivo planteado, se obtuvieron hojas de tomate cv. Elpida cultivadas en un invernadero en condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad (90 %). Se cosechó la 4ta hoja completamente expandida, con un buen estado nutricional y sin daños aparentes ni de plagas y/o enfermedades. En el flujo laminar, las hojas se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2% durante 1,30 min, se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y secaron en papel secante esterilizado. Las hojas se colocaron con el envés hacia arriba en placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían un disco de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril (Bañuelos-Balandrán & Mayek-Pérez 2008; Imathiu *et al.* 2008; Opoku *et al.* 2011). En el envés de los folíolos se realizó una pulverización de suspensión de conidios con el aislamiento CIDEFI 216, a una distancia de 10 cm respecto al tejido vegetal. Para su preparación se siguió lo descrito en el apartado del *Capítulo 2: 2.2.4.4. Ensayo con distintos cultivares de tomate*. La unidad experimental consistió en un folíolo de una hoja de tomate en una caja de Petri.

Como inductor de RSA se evaluó el BTH cuya denominación comercial es BION® 500WG, Syngenta. Se utilizó a una concentración de 50 mg/l. Los tratamientos realizados fueron: 1) folíolos

de tomate pulverizadas con agua destilada (Testigo), 2) foliolos de tomate con aplicación del inductor BTH (BTH), 3) oliolos de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216, y 4) foliolos de tomate con aplicación del inductor BTH y luego de un período definido de días, inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 (BTH + CIDEFI 216).

Se trabajó con foliolos de tomate, se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. Se tomaron muestras del tejido vegetal de “nuevos” foliolos en cada evaluación realizada. A los 3 días post-aplicación (dpa) se realizó la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216. Se efectuaron 3 evaluaciones de los parámetros estudiados: a los 7 dpa, 9 dpa y 11 dpa.

### **3.2.2. Parámetros evaluados.**

#### **3.2.2.1. Severidad**

Se determinó contando el número de manchas totales por foliolo de tomate.

#### **3.2.2.2. Actividad peroxidasa (POX, EC 1.11.1.7).**

Se procedió a obtener extractos de proteína crudos según Baysal *et al.* (2003b). Se homogeneizó la muestra en el volumen de buffer necesario para alcanzar una concentración de 0,2 g de tejido fresco por 1 mL de buffer. La muestra de los diferentes tratamientos se trituró en mortero frío, se adicionó nitrógeno líquido y se homogeneizó en el buffer de extracción;  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  50 mM (pH 7,0) conteniendo 1 mM NaCl, 1 % PVP, 1 mM EDTA y 10 mM mercaptoetanol. El homogeneizado se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4 ° C. El sobrenadante (extracto crudo) se fraccionó y conservó a -80 ° C. Según Cvikrová *et al.* (2006) se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato guaiacol 5 mM y  $H_2O_2$  al 0,1 mM en acetato de sodio 0,1 M (pH 5,5). La cinética de formación del producto de reacción (tetraguaiacol, 470 nm:  $26600 M^{-1}.cm^{-1}$ ) se estimó a través del incremento de absorbancia a 470 nm de la mezcla de reacción incubada a 25 °C durante 2 minutos. Se realizaron reacciones control sin  $H_2O_2$  (Saparrat *et al.* 2002). La actividad peroxidasa se informó cómo % respecto al Testigo, el cual se consideró= 100%. Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Peroxidasa (\% respecto al testigo): } \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Promedio Abs testigo}} \times 100$$

### **3.2.2.3. Peroxidación de lípidos. Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (SRATB-TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances, por su sigla en inglés).**

Se evaluó la peroxidación de lípidos a través del contenido de MDA, mediante la técnica descrita por (Hodges *et al.* 1999). Se partió de una relación de 0,15 g material vegetal molido/1,5 mL TCA (ácido tricloroacético) al 0,1 %. Se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g. Se tomó 0,5 mL de la muestra y se le agregó 1 mL de la solución: 20% TCA, 0,5 % TBA y 0,01% butil hidroxitolueno (BHT), finalmente se homogenizó. En paralelo, se preparó un tubo de blanco, en el que no se añadió material vegetal, pero si el reactivo de tiobarbitúrico. Seguidamente, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 95°C. Pasado este período, los tubos se introdujeron en hielo para enfriarlos y luego se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos. Finalmente, se transfirió sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 mL evitando disturbar el precipitado. Se determinó la absorbancia a tres longitudes de onda: 440 nm, 535 nm y 600 nm. Los resultados fueron expresados en eq. MDA (n mol/mL) (Hodges *et al.* 1999).

### **3.2.2.4. Índice de verdor (SPAD.)**

Se estimó de forma no destructiva el contenido de clorofila mediante un Spad (Minolta) que estima la concentración de clorofila total. Se expresan los datos como unidades de SPAD (Unidades arbitrarias).

### **3.2.2.5. Clorofila.**

Se utilizó un método destructivo para determinar el contenido de clorofila, se colocó un disco de área conocida en 1 ml de N,N-Dimetilformamida (DMF) en un tubo Eppendorf durante un periodo de 48 hs en oscuridad, luego se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu a longitudes de onda de 664,5 y 647 nm en simultáneo para discriminar entre clorofila a y clorofila b (Inskeep & Bloom 1985). Para calcular clorofila total, a y b se utilizó la fórmula de la Figura 3.3. Referido al área del disco quedó expresado en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

DMF
Clorofila b = $20.70 A_{647} - 4.62A_{664.5}$
Clorofila a = $12.70 A_{664.5} - 2.79A_{647}$
Total Clorofila = $17.90_{A647} + 8.08_{A664.5}$

$A_{647}$  = Absorbancia a 647 nm  
 $A_{664.5}$  = Aborbancia a 664.5 nm

**Figura 3.3.** Cálculo de clorofila a, b, y clorofila total, tomada de Inskeep & Bloom (1985).

### 3.2.2.6. Fenoles totales.

El contenido de compuestos fenólicos totales fue medido por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi 1965), con ligeras modificaciones. Dado que los compuestos fenólicos son de naturaleza polar, para extraerlos se utilizó metanol al 80 % en relación 1 g de material verde cada 10 ml de solvente. Se utilizó arena para favorecer la extracción, la cual fue previamente lavada con metanol en Erlenmeyer de plástico y secada a estufa en placa de vidrio.

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0,02 % de ácido gálico en metanol al 80 % v/v) de la cual se tomaron volúmenes de 3,75; 2,5 y 1,25 mL y se completó el volumen de cada uno hasta llegar a 5 mL con metanol 80%. Para lograr una mayor extracción se realizó un baño durante 1 hs a 75°C. Luego se centrifugó a 4° C 30 minutos a 13000 g. Con el sobrenadante, a cada 100 ul de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 diluido en agua), luego se agregó 1100 ul de H<sub>2</sub>O destilada. Posteriormente se adicionaron 1500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en 0.1 N NaOH. Luego de una incubación durante 1 hora a 25° C, la absorbancia fue medida a 760 nm en espectrofotómetro Shimadzu. La concentración de fenoles totales fue calculada usando una curva de calibración con ácido gálico. Los resultados fueron expresados en eq. de ácido gálico por cada 10 mg de muestra.

### **3.2.2. Aplicación foliar del BTH en plantas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216 bajo condiciones controladas.**

Se realizaron dos ensayos en condiciones controladas, en un invernáculo ubicado en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), donde se analizó la severidad de la “mancha gris de la hoja de tomate” en plantas tratadas con un inductor de RSA.

Se utilizó tomate cv. Elpida, el que no presenta resistencia a *Stemphylium* spp. (Catálogo de Enza Zaden, 2009). Se partió de semilla y luego de un mes de almácigo las plantas fueron trasplantadas al envase definitivo con tierra negra. Se trabajó con un n: 20 plantas por tratamiento.

Se incluyeron cuatro tratamientos: 1) (Testigo), plantas asperjadas con agua destilada; 2) (CIDEFI 216), inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216; 3) (BTH), aplicación del inductor BTH; y 4) (BTH + CIDEFI 216), aplicación del inductor BTH y luego de un tiempo definido el aislamiento CIDEFI 216.

Para inducir RSA sobre plantas con 4 hojas expandidas, cultivadas en un invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad, se aplicó BTH (a una concentración de 50 mg/l). Los productos correspondientes a cada tratamiento se aplicaron cada uno en forma de pulverización foliar, hasta lograr un mojado completo en todas las plantas. Se consideró al día de aplicación del inductor BTH como día cero del ensayo, transcurridos tres días se inoculó con el patógeno, mediante una suspensión de conidios del aislamiento CIDEFI 216 siguiendo la metodología descrita en el apartado del *Capítulo 2: 2.2.4.4*.

Posteriormente las plantas se cultivaron hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad.

#### **3.2.2.1. Ensayo 1.**

Luego de la aplicación del BTH a los 3 días post-aplicación (dpa) se realizó la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216.

En este primer ensayo los parámetros de crecimiento se midieron en 5 oportunidades: 4 dpa, 6 dpa, 8 dpa, 10 dpa y 21 dpa. Se evaluaron los siguientes parámetros: altura (cm), número de hojas y diámetro del tallo al nivel de los cotiledones (mm). Se expresaron como diferencia entre el momento inicial y final del ensayo (Dif. Altura, Dif. Diámetro y Dif. n° de hojas).

La severidad se evaluó a los 13 dpa, 15 dpa, 17 dpa y 21 dpa. Se analizaron 3 maneras distintas de medir severidad:

- a) Se contó el número de manchas totales por planta.

- b) Se utilizó escala diagramática, representando la proporción de área foliar lesionada (planta entera) por *Stemphylium* (Boff *et al.* 1991).
- c) Se determinó si el tamaño de la lesión fue mayor o menor a 1 mm.

Para las variables destructivas se muestrearon 5 plantas/tratamiento. En el caso de los parámetros de crecimiento y la severidad se realizaron 20 repeticiones por tratamiento.

### **3.2.2.2. Ensayo 2.**

Aunque el ensayo se llevó a cabo en forma equivalente a lo reportado en el experimento anterior, no se estimaron los parámetros métricos en plantas. Asimismo, la severidad de la enfermedad causada por el aislamiento CIDEFI 216 se realizó contando el número de manchas totales por planta a los 38 dpa,

Para las variables destructivas se muestrearon 5 plantas/tratamiento. En el caso de la severidad se realizaron 20 repeticiones por tratamiento.

### **3.2.2.3. Parámetros evaluados**

En el primer ensayo los indicadores evaluados fueron: POX, Fenoles y TBARS y parámetros de crecimiento (altura, número de hojas y diámetro de tallo) y severidad.

En el segundo ensayo se registraron los niveles de Fenoles y los TBARS y la severidad. Los parámetros fueron evaluados según lo indicado para el apartado 3.2.2.

### **3.2.3. Aplicación de BTH en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial.**

Los ensayos se realizaron en parcelas de tomate cv. Colibrí ubicadas en un establecimiento productivo en Colonia La Armonía, Arana, La Plata. Es de destacar que a estos cultivos no se le aplicó ningún tratamiento de inoculación. Se realizaron dos ensayos de 5 meses de duración, el primero entre agosto-diciembre 2011 y el segundo diciembre-abril 2012. Se utilizó como referencia la metodología empleada en los experimentos del punto 3.2.1. y 3.2.2.

### 3.2.3.1. Ensayo 1.

Los tratamientos consistieron en parcelas de 7 metros de surco que incluyeron 10 plantas de muestreo y 1 m a cada lado de bordura, asimismo consistieron en parcelas tratadas con los inductores (BTH y AS) y Testigos no tratados. Para inducir la RSA se realizaron 10 aplicaciones; y los tratamientos fueron: 3 concentraciones (C, C1: 0,025 g/l, C2: 0,05 g/l y C3: 0,075 g/l) de BTH a 2 frecuencias (F, cada 7 días F1 y cada 15 días F2): C1: 0,025 g/l-F1 cada 7 días; C1: 0,025 g/l-F2 cada 15 días; C2: 0,05 g/l-F1 cada 7 días; C2: 0,05 g/l-F2 cada 15 días; C3: 0,075 g/l- F1 cada 7 días; C3: 0,075 g/l-F2 cada 15 días y finalmente aplicaciones con AS a 0,05 g/l semanalmente (F1 cada 7 días).

Se evaluó la aplicación de AS bajo 3 formas: - vía pulverización, - aplicación dirigida al cuello de la planta (*drench*) - y la combinación de pulverización y *drench* simultáneamente. Para todos los casos se utilizó una pulverizadora manual de mochila, y en el caso de *drench* se removió la boquilla de la misma y se aplicó al cuello de la planta.

De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas en el estrato inferior (Hoja 1), arriba de la tercera corona de tomate y en el estrato superior (Hoja 2), arriba de la cuarta corona de tomate, y en 2 fechas de muestreo; a los 83 y 97 días post- aplicación inicial (dpa i) de los soluciones de BTH y AS. Para medir severidad se contó el número de manchas totales por hoja.

### 3.2.3.2. Ensayo 2.

El diseño de las parcelas, la aplicación de la solución del BTH y AS y las condiciones de cultivo de las plantas fueron equivalentes al establecido para el Ensayo 1. Sin embargo, el AS se aplicó solamente mediante pulverización. En 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (Hoja 1), arriba de la tercera corona de tomate y en el estrato superior (Hoja 2), arriba de la cuarta corona de tomate, y en 3 fechas de muestreo; a los 92, 108 y 122 días post-aplicación inicial (dpa i) del BTH. Para medir severidad se contó el número de manchas totales por hoja.

### **3.2.3.3. Parámetros evaluados**

En el Ensayo 1 se evaluó en carácter de prospección (debido al bajo número de unidades experimentales) POX y Fenoles siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2. solamente para 2 tratamientos (C1F1 y C3F3) y la severidad de la enfermedad.

En ambos ensayos se evaluó el rendimiento del cultivo de tomate en parcelas de 8 plantas cada una, en 8 momentos de cosecha. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Se contabilizó el número de frutos y el peso de los mismos, y considerando la densidad de 22.000 plantas/Ha es que se estimó el rendimiento por Ha.

### **3.2.5. Análisis estadístico**

El diseño experimental fue enteramente al azar con las características particulares que se especifican en cada uno de los ensayos mencionados previamente. En los casos que se compararon dos medias se utilizó la prueba T de Student. En los casos que se compararon más de dos medias la comparación se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor con los datos correspondientes y se compararon las medias utilizando el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GrapPad Prism 7.

### 3.3. RESULTADOS.

#### 3.3.1. Aplicación del BTH en hojas desprendidas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216.

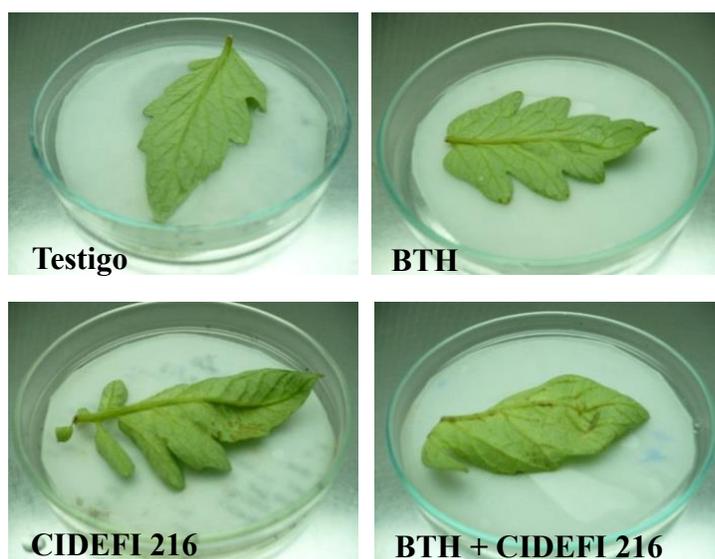
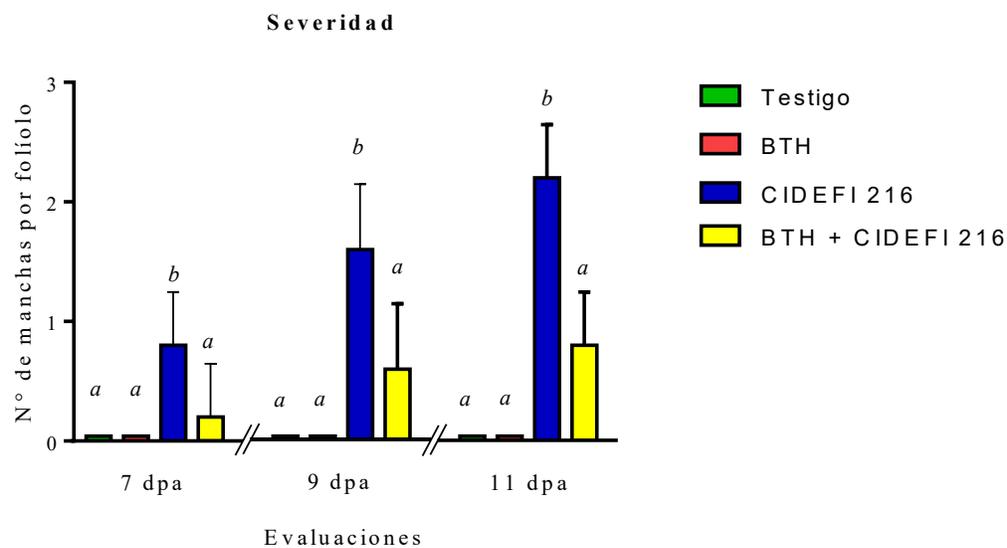
La pulverización con suspensión de conidios de *Stemphylium* del aislamiento CIDEFI 216 fue la mejor forma de realizar la inoculación en un sistema *in vitro* para reproducir los síntomas de la enfermedad en estudio. Y pese a que las hojas de tomate son anfiestomáticas (estomas en ambas caras) resultó mejor colocar la superficie abaxial hacia arriba de la placa de Petri puesto que se produjo el desarrollo de la enfermedad.

En este ensayo se observó que el hongo desarrolló *in vitro* manchas foliares características de la enfermedad sobre las hojas desprendidas (Figura 3.4.). La aplicación de BTH con una concentración de 50 mg/l en el sistema reveló una reducción en la severidad de 37,50 % ( $p < 0,05$ ), siendo significativa respecto al tratamiento con el aislamiento CIDEFI 216 después de los 9 dpa; este patrón se mantuvo hasta a los 11 dpa con un 36,36 % de reducción ( $p < 0,01$ ).

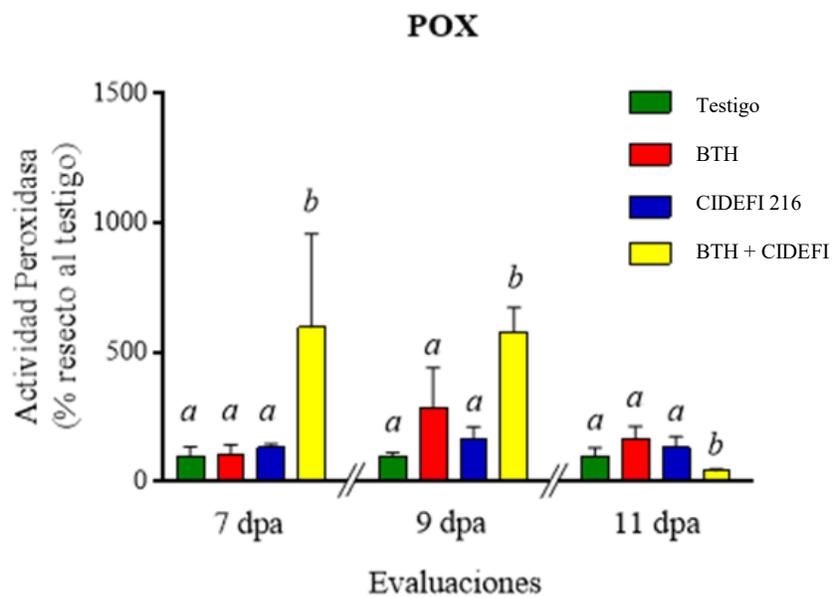
La aplicación de BTH a las hojas no inoculadas no reveló ninguna modificación con relación al testigo. Se evaluaron diferentes parámetros tales como POX, TBARS, SPAD y Clorofila. Con relación a los niveles de actividad POX se observaron incrementos relativos sólo en la presencia conjunta del BTH + CIDEFI 216 hasta los 9 dpa, observándose disminución relativa del mismo tratamiento a los 11 dpa (Figura 3.5). En el caso de 7 dpa el tratamiento BTH + CIDEFI 216 incrementó la actividad POX en un 600 % ( $p < 0,01$ ).

La evaluación de TBARS en las muestras no relevó ninguna diferencia entre los tratamientos y los distintos tiempos (Figura 3.6). Con respecto al SPAD (Figura 3.7.) se observó que todos los tratamientos redujeron el índice de verdor de las hojas, siendo variable su detección en el tiempo; a los 7 dpa en presencia del BTH + CIDEFI 216 disminuyó un 20 % ( $p < 0,0001$ ), y todos los tratamientos a los 11 dpa en relación al testigo, que presentó el valor más alto de unidades SPAD (46,19).

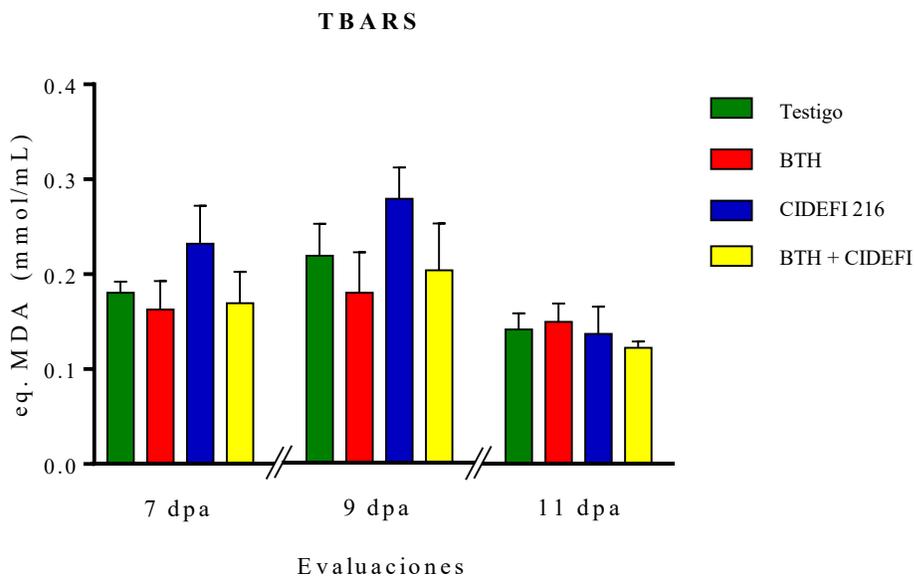
Se observó un patrón similar en el nivel de clorofilas (Figura 3.8), aunque el aislamiento CIDEFI 216 ya desde los 7 dpa redujo el nivel de clorofila a, en un 24,51 % ( $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento BTH + CIDEFI 216 lo hizo en un 48,61 % ( $p < 0,0001$ ). No obstante, el tratamiento con BTH lo hizo después de 11 dpa con un reducción del 27,70 % ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, la reducción del nivel de clorofila b por la presencia del hongo se hizo evidente a un tiempo relativo posterior.



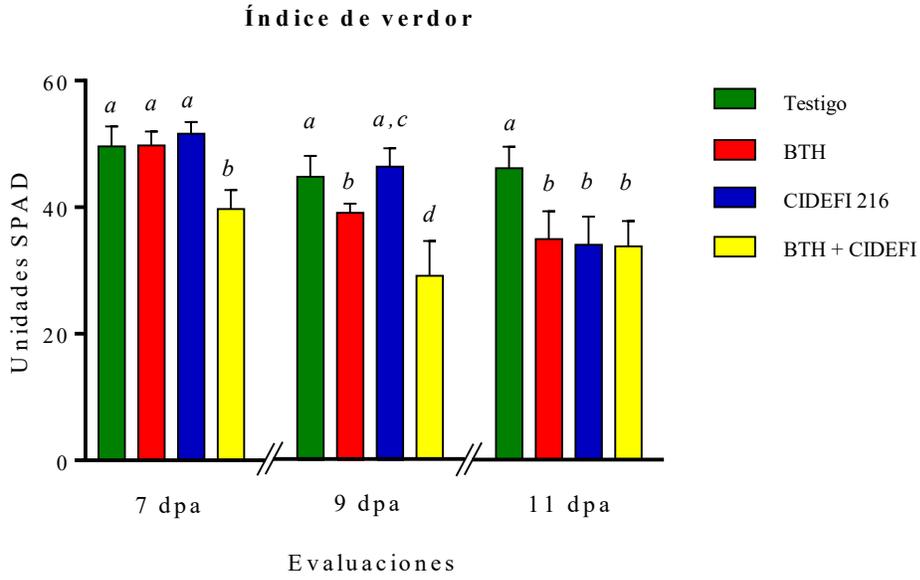
**Figura 3.4. Severidad.** Expresada como número total de manchas por foliolo. Envés de foliolos de tomate cv. Elpida hacia arriba en placas de Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Fotografías representativas a los 11 dpa. **Testigo**, cajas de Petri con foliolos de tomate pulverizadas con agua destilada; **BTH**, cajas de Petri con foliolos de tomate con el inductor BTH; **CIDEFI 216**, cajas de Petri con foliolos de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y **BTH + CIDEFI 216**, cajas de Petri con foliolos de tomate con aplicación del inductor BTH y luego inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



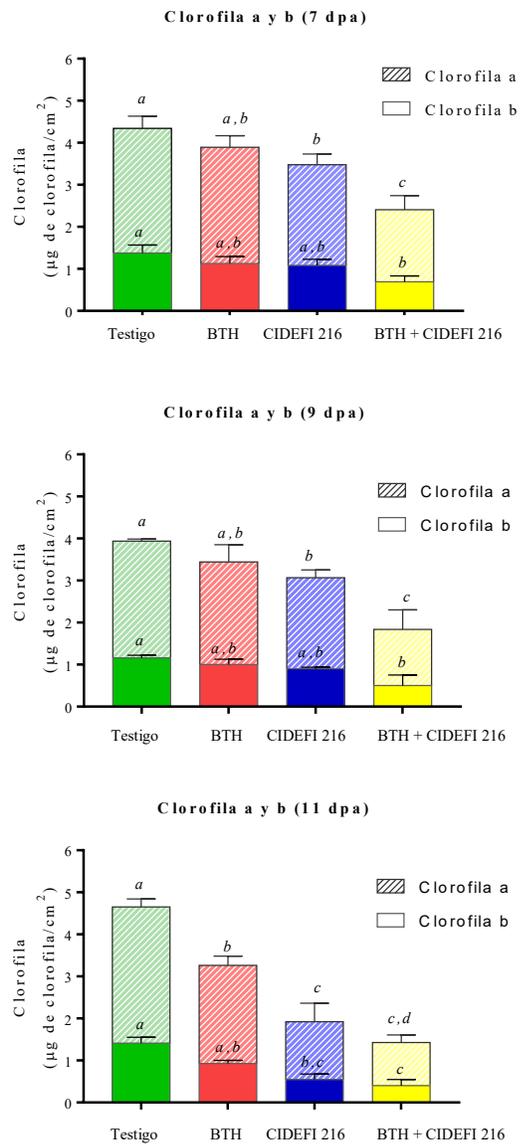
**Figura 3.5. Actividad peroxidasa (POX).** Actividad peroxidasa expresada como % respecto al Testigo. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



**Figura 3.6. TBARS.** Evaluación de la peroxidación de lípidos a través del contenido de sustancias que reaccionan con el ácido Tiobarbitúrico (TBARS), expresada como eq. MDA (n mol/ml). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



**Figura 3.7. SPAD.** Índice de verdor expresado como unidades SPAD (unidades arbitrarias). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



**Figura 3.8. Clorofila.** Se evaluó el contenido de clorofila a través de la extracción mediante N,N-Dimetilformamida (DMF) tras 48 hs de oscuridad, expresado en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , distinguiendo el contenido de clorofila a y b. Envés de folíolos de tomate cv. Elpida hacia arriba en placas de Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. . Barra entera: clorofila b y Barra con líneas oblicuas: clorofila a.

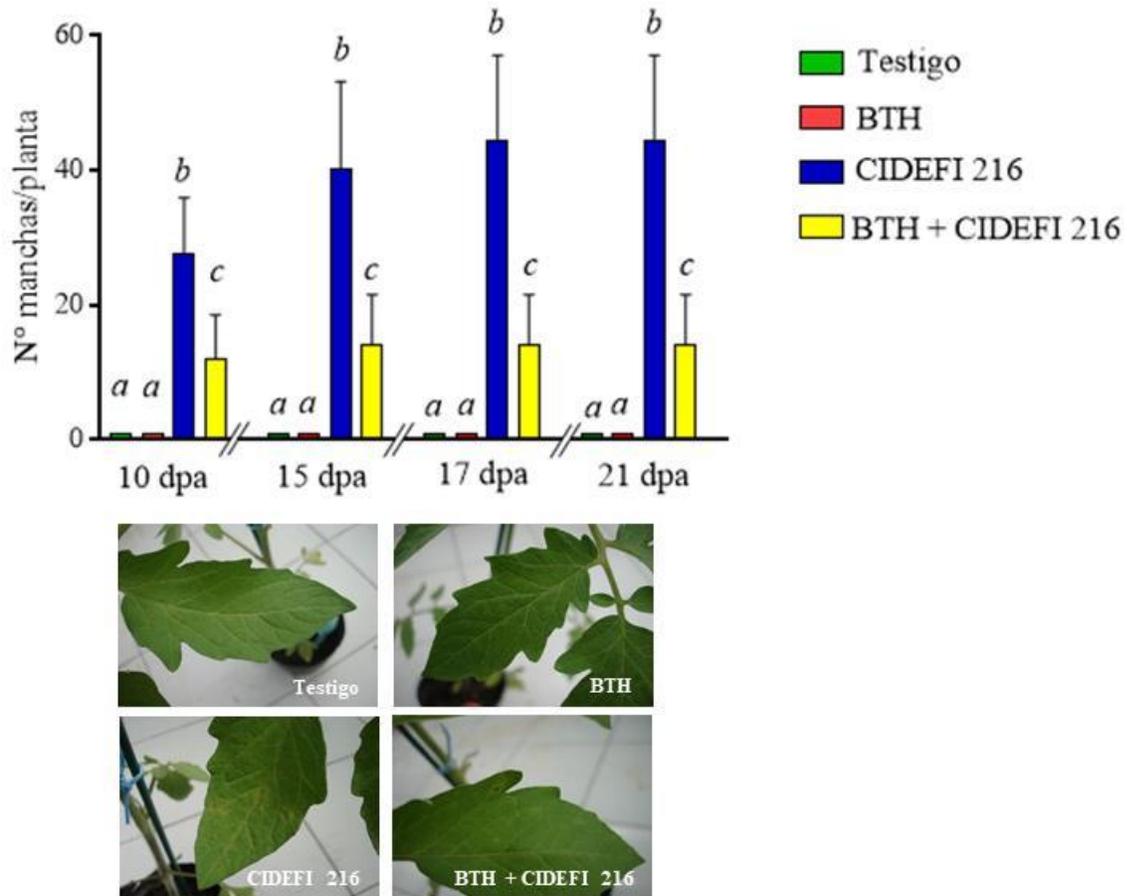
### **3.3.2. Aplicación foliar del BTH en plantas de tomate expuestas al aislamiento CIDEFI 216 bajo condiciones controladas.**

#### **3.3.2.1. Ensayo 1.**

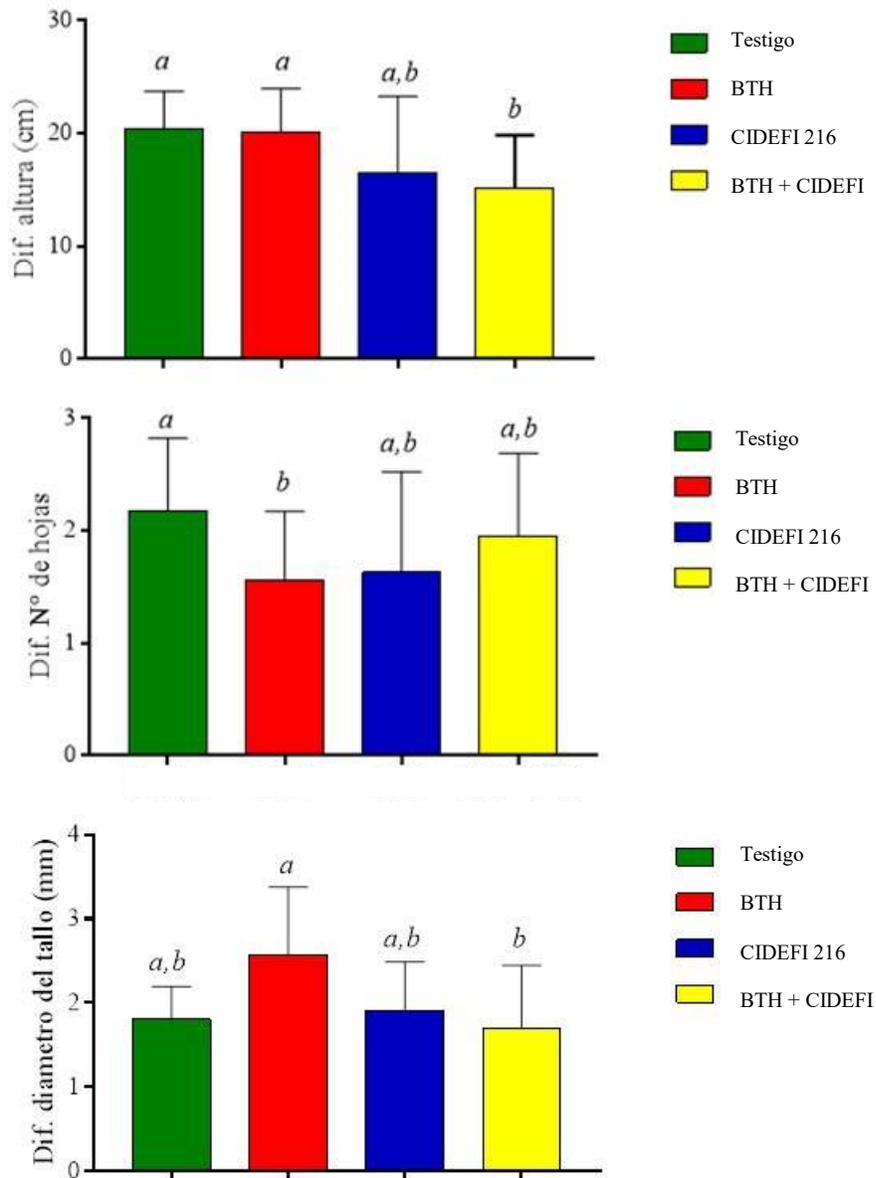
De las tres variables que se probaron para evaluar la severidad, la elegida fue el número de manchas totales por planta. Esto se debió a que el n° de manchas fue la única determinación que mostró una variación significativa, ya que la escala y el tamaño, si bien se midieron, no representaron las diferencias detectables entre los tratamientos.

En este ensayo en las 4 evaluaciones realizadas se observó (Figura 3.9) una reducción de la severidad de un 70 % en el tratamiento que se aplicó BTH, en relación al tratamiento en el cual sólo se inocularon las plantas ( $P < 0,0001$ ). Respecto a los parámetros de crecimiento hay diferencias significativas para la altura, redujo un 25,28 % el tratamiento BTH + CIDEFI 216 respecto al testigo y analizando el número de hojas el tratamiento BTH redujo un 37 % respecto al testigo (Figura 3.10.).

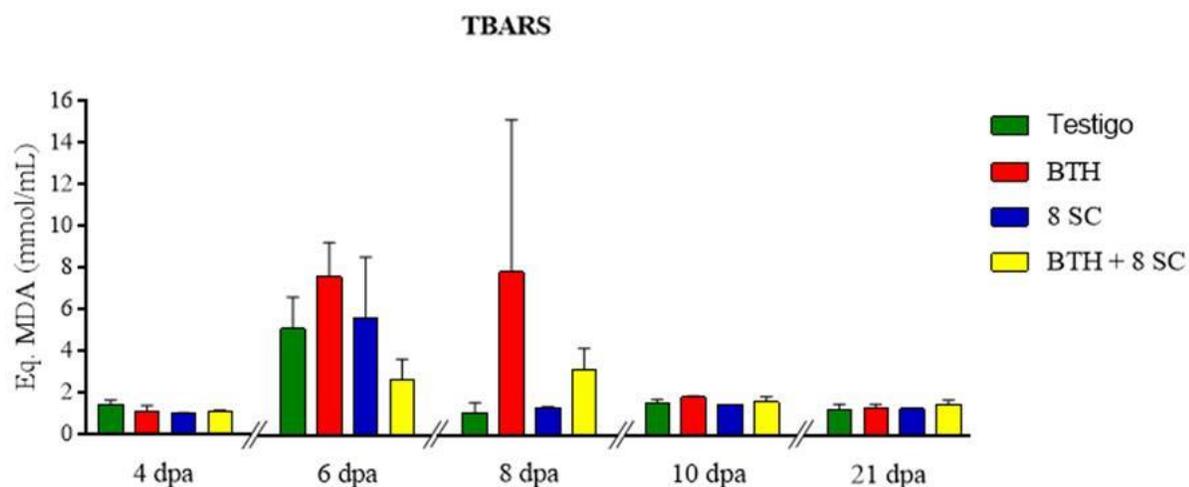
La determinación realizada de POX dio actividad no detectable (datos no mostrados). En el caso de los TBARS (Figura 3.11) y Fenoles totales (Figura 3.12) para las evaluaciones realizadas no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.



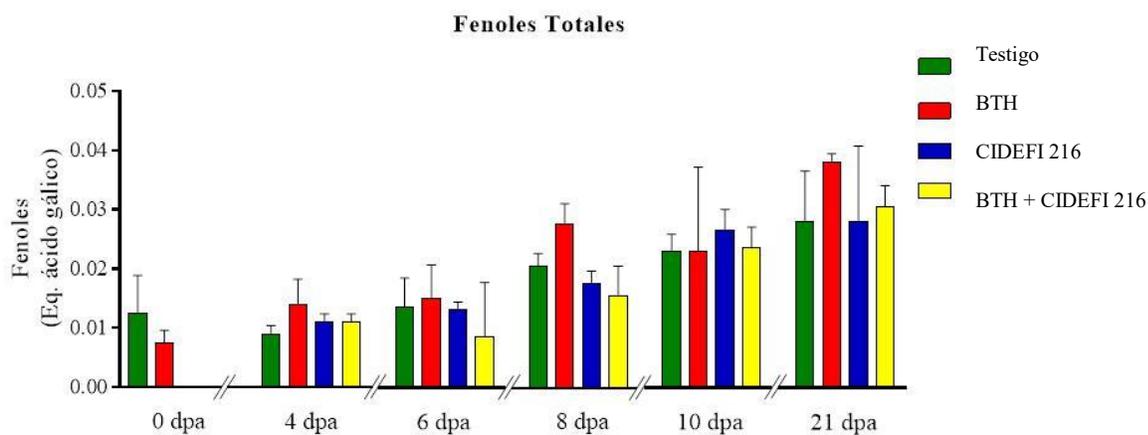
**Figura 3.9. Severidad.** Plantas de tomate cv. Elpida. A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el aislamiento CIDEFI 216; (CIDEFI 216), plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (BTH + CIDEFI 216), plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. Se analizaron 3 maneras distintas de medir severidad, expresada como el número de manchas totales por planta (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



**Figura 3.10. Parámetros de crecimiento.** Plantas de tomate cv. Elpida, cultivadas en un invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad, con 4 hojas expandidas se aplicó BTH a una concentración de 50 mg/l en forma de pulverización foliar. A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el asilamiento CIDEFI 216 (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).



**Figura 3.11. TBARS.** Se evaluó la peroxidación de lípidos a través del contenido de malondialdehído (MDA). Expresada como eq. MDA (n mol/ml). A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el asilamiento CIDEFI 216 (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



**Figura 3.12. Fenoles totales.** Los resultados fueron expresados en eq. de ácido gálico por 10 mg de muestra. A los 3 dpa del inductor (BTH) se realizó la inoculación con el asilamiento CIDEFI 216. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).

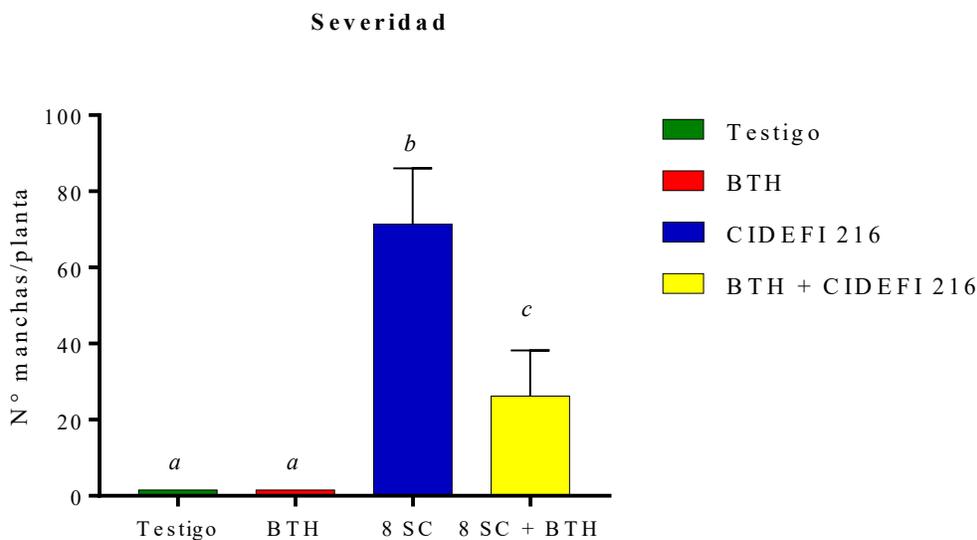
### 3.3.2.2. Ensayo 2.

En este segundo ensayo en el cual se midió una única vez la severidad a los 35 dpa, se observó una reducción del 65 % para el tratamiento CIDEFI 216 + BTH respecto al tratamiento que sólo estuvo inoculado ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3.13).

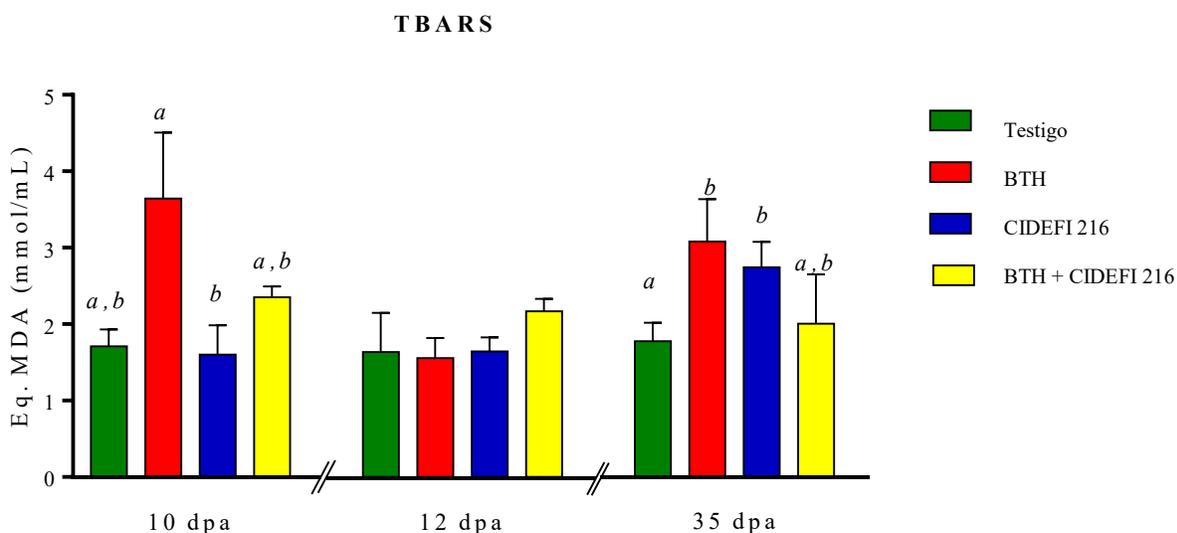
La determinación realizada de POX dio actividad no detectable, datos no mostrados.

En el caso de los TBARS (Figura 3.14) a los 10 dpa el tratamiento BTH tuvo el contenido de malondialdehído (MDA) mayor respecto al resto de los tratamientos; en relación al BTH + CIDEFI 216 hay una reducción del 35,68% ( $p < 0,01$ ); y cuando nos referimos al Testigo y CIDEFI 216 ( $p < 0,01$ ), 53,04 % y 56,11 % de disminución respectivamente. Para la segunda fecha de muestreo no hay diferencias significativas. En el último muestreo (35 dpa) existe una tendencia similar respecto de los valores más altos de BTH y hay una reducción del Testigo del 42,32 % comparando con el tratamiento de BTH ( $p < 0,01$ ); mientras que el tratamiento CIDEFI 216 aumentó respecto al Testigo un 45,64 % ( $p < 0,01$ ).

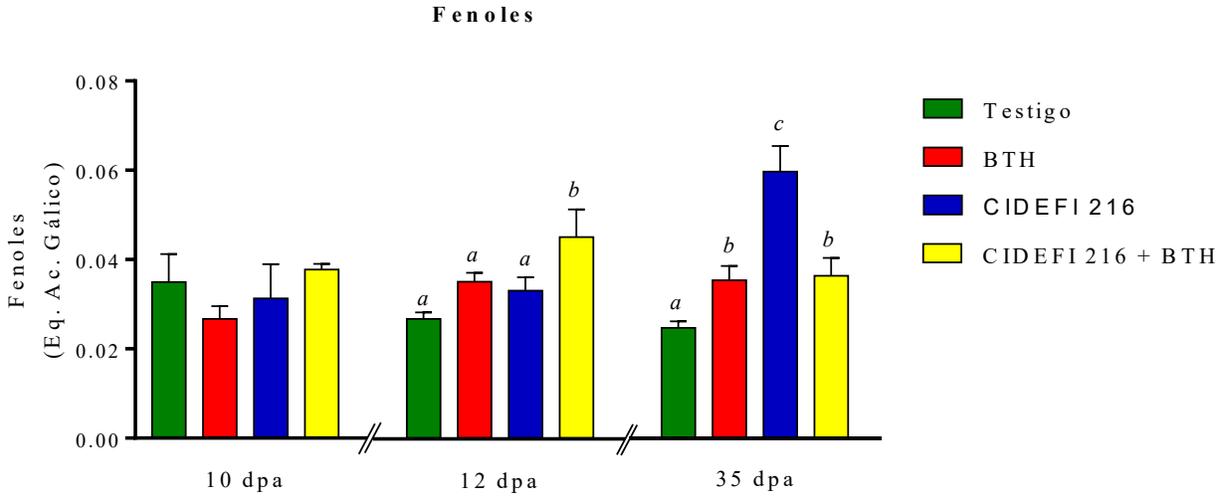
En el caso de los Fenoles totales (Figura 3.15) para la primera evaluación (10 dpa) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. A los 12 dpa, el tratamiento BTH + CIDEFI 216 mostró un incremento respecto al resto de los tratamientos, y aumentó el contenido de fenoles un 68 % respecto al Testigo. A los 35 dpa, todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente respecto al Testigo; el tratamiento CIDEFI 216 aumentó un 140 % respecto al Testigo, mientras que los tratamientos BTH y BTH + CIDEFI 216 ( $p < 0,0001$ ), aumentaron 47 % en relación al Testigo. El tratamiento CIDEFI 216 es el que más contenido de fenoles tuvo, difiriendo estadísticamente del resto de los tratamientos, para el caso de BTH y de BTH + CIDEFI 216 un incremento del 68 % y 62 % respectivamente ( $p < 0,001$ ).



**Figura 3.13. Severidad.** (A) Testigo, plantas de tomate asperjadas con agua destilada; (B) BTH, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH; (C) CIDEFI 216, plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (D) (BTH + CIDEFI 216) plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente).



**Figura 3.14. TBARS.** Se evaluó la peroxidación de lípidos a través del contenido de malondialdehído (MDA). Expresada como eq. MDA (n mol/ml). (A) Testigo, plantas de tomate asperjadas con agua destilada; (B) BTH, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH; (C) CIDEFI 216, plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y (D) (BTH + CIDEFI 216), plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente)



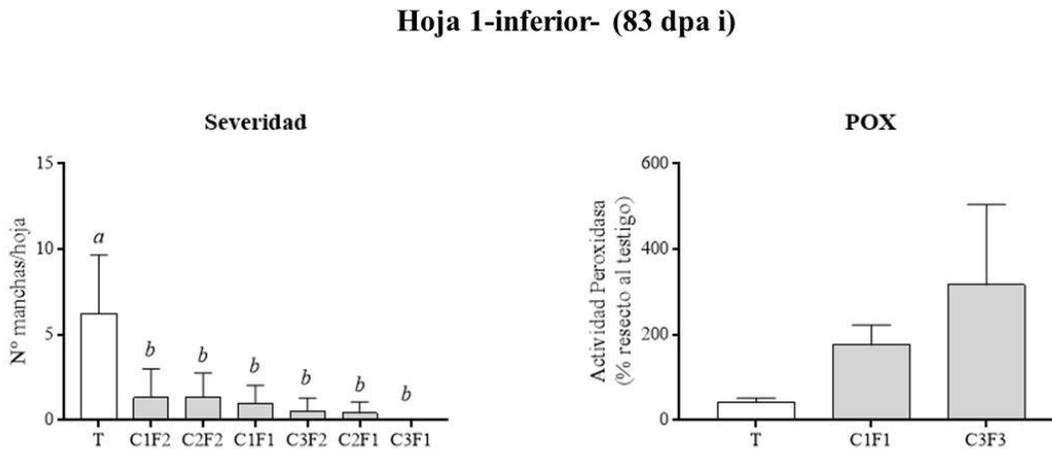
**Figura 3.15. Fenoles totales.** Los resultados fueron expresados en eq. de ácido gálico por 10 mg de muestra. **(A) Testigo**, plantas de tomate asperjadas con agua destilada; **(B) BTH**, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH; **(C) CIDEFI 216**, plantas de tomate inoculadas con el aislamiento CIDEFI 216 y **(D) (BTH + CIDEFI 216)**, plantas de tomate pulverizadas con el inductor BTH y luego el aislamiento CIDEFI 216. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori. Cada fecha de muestreo fue comparada en forma independiente)

### 3.3.3. Aplicación de BTH en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial.

#### 3.3.3.1. Ensayo 1

Es importante señalar que cuando se empleó el AS (indistintamente de su modo de aplicación) la severidad del “moho de la hoja del tomate” no fue reducida en comparación con el testigo (datos no mostrados). El mejor resultado se obtuvo con pulverización de hojas mediante AS, por lo que fue el tratamiento considerado para el próximo ensayo.

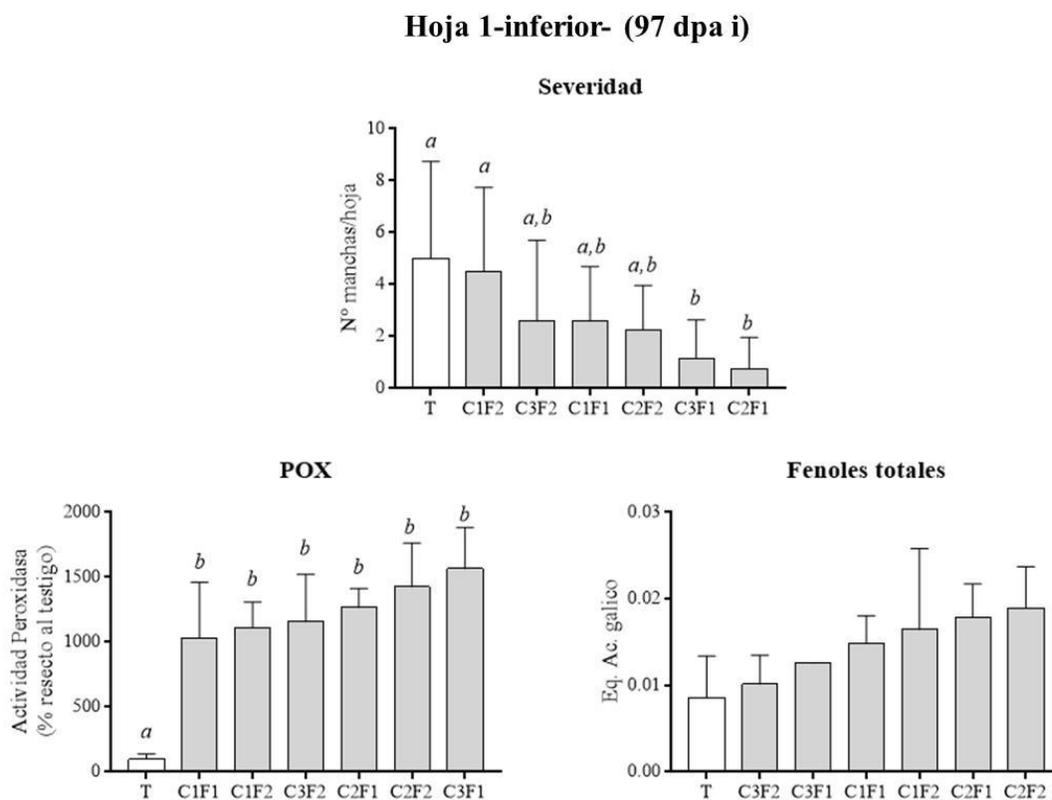
En la Figura 3.16 correspondiente a la Hoja 1 -inferior- en la primera evaluación 83 (dpa i) se observa; la evaluación de la severidad y la determinación de POX. La aplicación del inductor resultó en una disminución de la severidad superior al 70 %, siendo diferente estadísticamente en todos los tratamientos. En cuanto a POX para C3F1 aumentó 316,82 %, mientras que para C1F1 lo hizo en un 175,71 % en relación al testigo, sin diferencias entre tratamientos.



**Figura 3.16. Severidad y Actividad Peroxidasa (POX) del Ensayo 1 Hoja 1-inferior- en la 1er fecha de muestreo,** a los 83 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (H1). (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori)

En la Figura 3.17 correspondiente a la Hoja 1 -inferior- en la segunda evaluación 97 (dpa i) se observa, la cuantificación de la severidad y la determinación de POX y Fenoles totales. Referido a la severidad solo los tratamientos C3F1 y C2F1 mostraron diferencias significativas con el testigo alcanzando un nivel de reducción de la enfermedad superior al 70 %. En relación a POX, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas respecto al testigo; los tratamientos C3F1 y C2F2

son los que tuvieron mayor actividad POX con incrementos cercanos al 1500 % en relación al testigo. El resto de los tratamientos tuvo aumentos en el orden de 1200-1000 %, siendo los valores extremos de ese intervalo para los tratamientos C2F1 y C1F1 respectivamente. En relación al contenido de Fenoles no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, aunque los tratamientos C2 para ambas frecuencias son los que tuvieron mayor contenido con un incremento en relación al testigo del 120 % y 108 % para C2F2 y C2F1, respectivamente. Luego con incrementos decrecientes le siguen los tratamientos C1F2 y C1F2, los cuales tuvieron aumentos del 91,33 % y 72,22 % respectivamente. Finalmente incrementos menores, del 46 % y 18 % corresponden para los tratamientos C3F2 y C3F1 en comparación con el testigo.

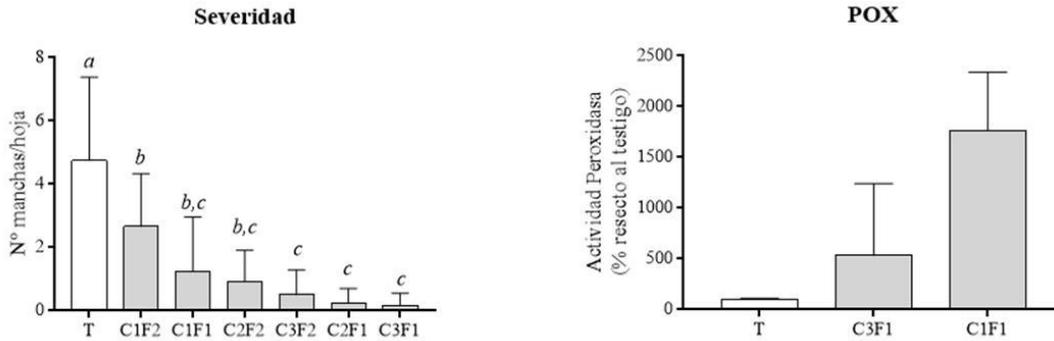


**Figura 3.17. Severidad, Actividad Peroxidasa (POX) y Fenoles del Ensayo 1 Hoja 1 -inferior- en la 2da fecha de muestreo, a los 97 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (H1); (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo); (C) Fenoles. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).**

La Figura 3.18 corresponde a la Hoja 2 -superior- en la primera evaluación 83 (dpa i), y puede observar la evaluación de la severidad y la determinación de POX. En este caso todos los tratamientos son estadísticamente diferentes respecto al testigo, logrando importantes niveles de reducción de la severidad, desde un 40 % para el tratamiento C1F2 hasta alcanzar reducciones

mayores al 80 %. En cuanto a POX no se observaron diferencias estadísticas, pero el tratamiento C1F1 aumenta poco más de 1700 % y el tratamiento C3F1 incrementa un 532 % en relación al testigo.

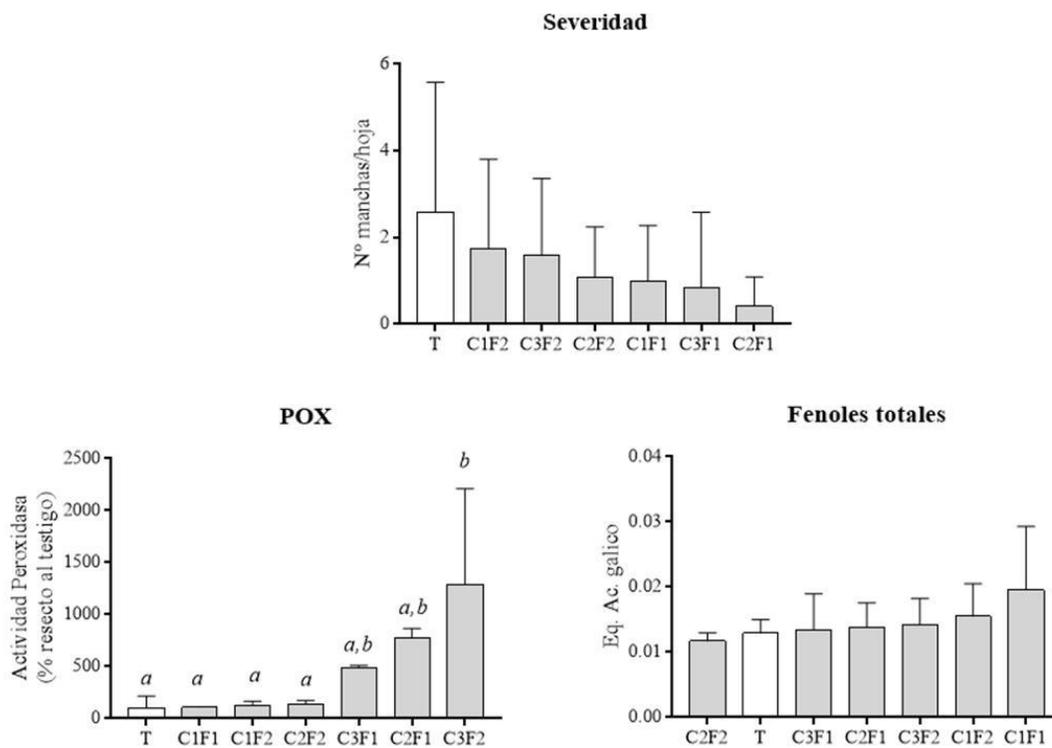
**Hoja 2-superior- (83 dpa i)**



**Figura 3.18. Severidad y Actividad Peroxidasa (POX) del Ensayo 2 Hoja 2-superior- en la 1er fecha de muestreo, a los 83 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato superior (H2). (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).**

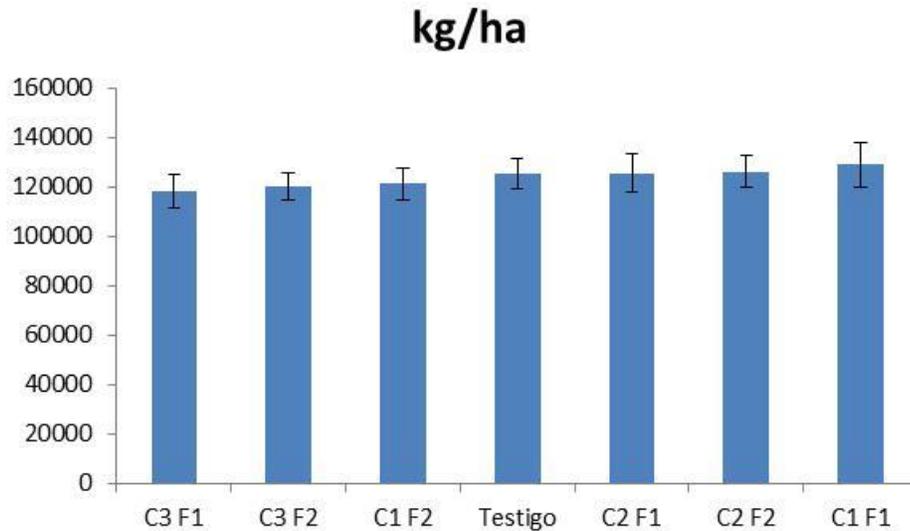
La Figura 3.19 corresponde a la Hoja 2 -superior- en la segunda evaluación 97 (dpa i), y se puede observar: la cuantificación de la severidad y la determinación de POX y Fenoles totales. A los 97 (dpa i) en lo que respecta a H2, ningún tratamiento es estadísticamente diferente respecto al testigo, sin embargo es bueno señalar los altos niveles de reducción de la severidad alcanzados, superiores al 60 %. En relación a la POX, existen diferencias significativas siendo el tratamiento C3F2 el que tuvo mayor actividad POX con un incremento en relación al testigo del 1300 %; mientras que los tratamientos C2F1 y C3F1 tuvieron aumentos de 700 y 490% respectivamente. El resto de los tratamientos, C2F2 y C1 (en ambas frecuencias) tuvieron incrementos del orden del 100% respecto al testigo. En cuanto al contenido de Fenoles totales no hay diferencias significativas, pero los tratamientos C1 en (ambas frecuencias) son los que tuvieron mayor contenido de fenoles totales con un incremento en relación al testigo del 51 % y 21 % para C1F1 y C1F2, respectivamente. En orden descendente se obtuvieron aumentos menores, el tratamiento CF2 tuvo un incremento del 10 %, seguido por los tratamientos C2F1 y C3F1 con subas del 7 % y 4 % en comparación al testigo. Por último, y a diferencia del resto de los tratamientos, C2F2 tuvo un menor contenido de Fenoles que el testigo.

## Hoja 2-superior- (97 dpa i)



**Figura 3.19.** Severidad, Actividad Peroxidasa (POX) y Fenoles del Ensayo 1 Hoja 2 -superior- en la 2da fecha de muestreo, a los 97 días post- aplicación inicial (dpa i) del BTH. (A) De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato superior (H2); (B) Actividad Peroxidasa (% respecto al Testigo); (C) Fenoles. (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).

En cuanto a la evaluación del rendimiento para el Ensayo 1, se observa en la Figura 3.20 el estimado para una Ha. Como puede observarse no hay variación en el rendimiento en función de los tratamientos, sin embargo, la concentración C3 (en ambas frecuencias) reduce levemente el rendimiento; C3F1 5,39 % y C3F2 y casi 4 % en relación al testigo. Asimismo, la los tratamientos de C2 en ambas frecuencias están levemente por encima del testigo, con una diferencia menor al 1%; mientras que el tratamiento C1F1 tuvo un incremento del casi 3%.

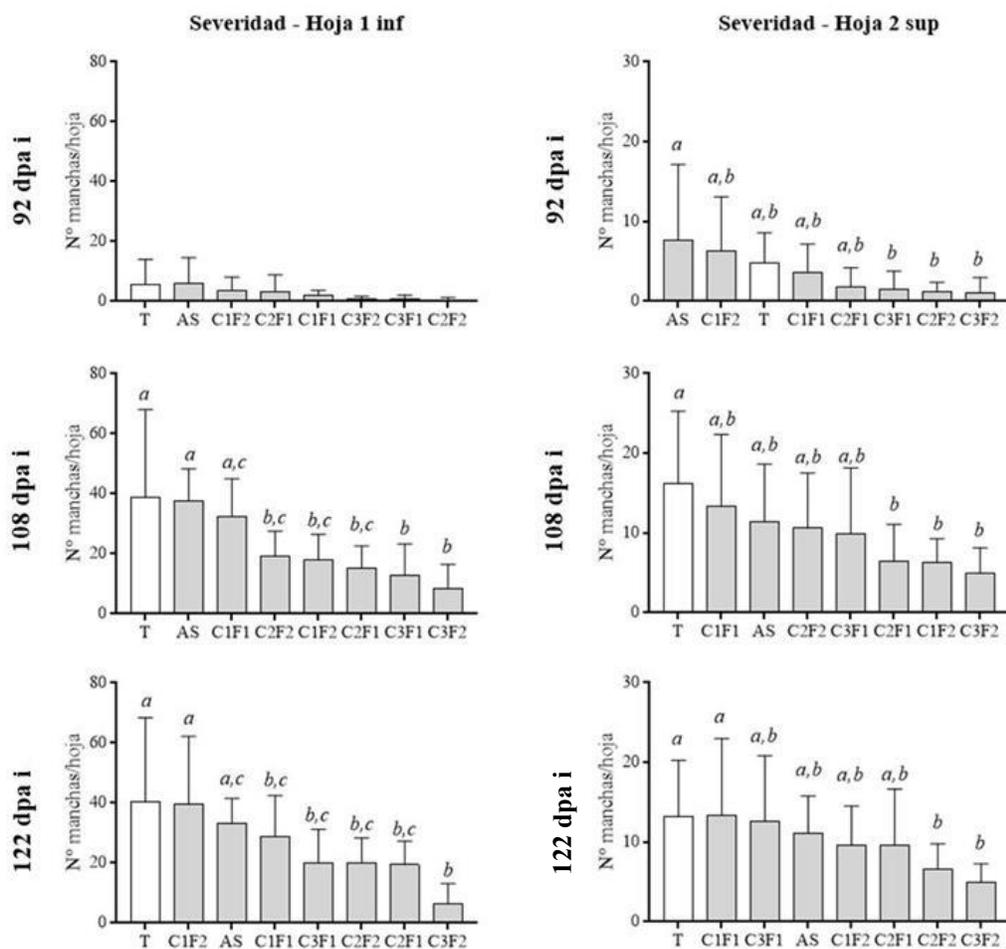


**Figura 3.20. Rendimiento del Ensayo 1.** En invernáculo de producción comercial. Se contabilizó el número de frutos y el peso de los mismos, y considerando la densidad de 22.000 plantas/Ha es que estimo el rendimiento por Ha.

### 3.3.3.2. Ensayo 2.

En este segundo ensayo se evaluó el rendimiento y la severidad en dos hojas, en elestrato inferior (Hoja 1) y en el estrato superior (Hoja 2), durante 3 fechas de muestreo.

En la Figura 3.21(A) Hoja 1-inferior- en la primera evaluación no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A los 108 (dpa i) los tratamientos C2F2, C1F2, C2F1, C3F1 y C3F2 mostraron reducciones del 50 al 30 % de la severidad, mientras que el tratamiento C3F2 alcanzo reducciones del 80 % de la severidad ( $p < 0,0001$ ). No se observaron diferencias significativas cuando se utilizó C1F1. En la tercer evaluación el tratamiento C3F2 mostró una reducción aún mayor al 80 % respecto al testigo ( $p < 0,0001$ ).



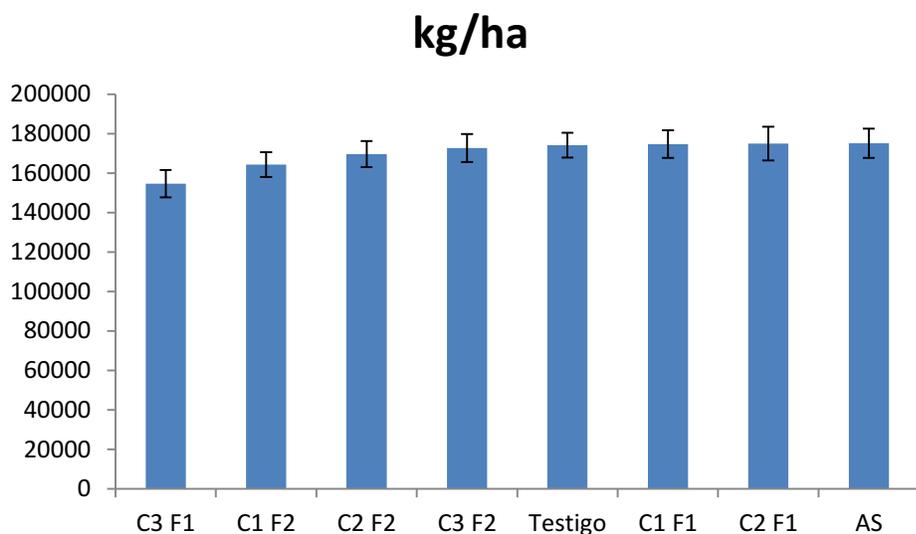
**Figura 3.21. Severidad del Ensayo 2. (A) Hoja 1-inferior en tres fechas de muestreo y (B) Hoja 2-superior en tres fechas de muestreo:** a los 92, 108 y 122 días post-aplicación inicial (dpa i) del BTH. En invernáculo de producción comercial. Para inducir RAS se realizaron 10 aplicaciones con BTH, en la combinación de 3 concentraciones (C1: 0.025; C2: 0.05 y C3: 0.075 g/l) y 2 frecuencias (7 y 15 días) y otro tratamiento fue Ácido Salicílico (AS) a 0.05 g/l. Con el Testigo son 8 tratamientos. De 4 plantas se evaluó severidad en dos hojas, en el estrato inferior (H1) y en el superior (H2). (ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).

En el caso de la Figura 3.21 (B) para H 2-superior-, se observó una reducción de la enfermedad que se manifestó más en el segundo y tercer muestreo. En el segundo muestreo se encontraron reducciones entre el 40-70% de la severidad utilizando los tratamientos C2F1, C1F2 y C3F2 ( $p < 0,0001$ ). La aplicación de AS no mostró diferencias respecto al control en ninguno de los muestreos realizados. En el último muestreo los tratamientos C2F2 y C3F2 son los que lograron un menor número de manchas por hoja.

En cuanto al análisis del rendimiento del Ensayo 2 se observa en la Figura 3.22 el estimado para una Ha. Se puede observar que no hay variación en el rendimiento en función de los tratamientos, sin embargo la concentración C3 en ambas frecuencias reduce levemente el rendimiento respecto al testigo, un 11 % para C3F1 y 1 % para C3F2. Asimismo los tratamientos:

C1F2 y C2F2 reducen un 3% y un 6% el rendimiento respecto al testigo; mientras que los tratamientos C1F1, C2F1 y AS tuvieron incrementos leves en el intervalo comprendido: 0,3-0,5 % comparando con el testigo.

En ambos ensayos se dio que la concentración más alta (C3) de BTH en ambas frecuencias redujo levemente el rendimiento respecto al Testigo indicando cierto grado de fitotoxicidad.



**Figura 3.22. Rendimiento del Ensayo 2.** En invernáculo de producción comercial. Se contabilizó el número de frutos y el peso de los mismos, y considerando la densidad de 22.000 plantas/Ha es que se estimó el rendimiento por Ha.

### 3.4. DISCUSIÓN.

Ensayos preliminares revelaron que la pulverización fue un procedimiento adecuado para inocular el aislamiento CIDEFI 216 en el sistema *in vitro* de estudio, en respuesta a generar síntomas sobre las hojas incubadas. Y pese a que las hojas de tomate son anfiestomáticas (estomas en ambas caras), probablemente debido al predominio en la superficie abaxial (Flores & Espinoza 1977), resultó mejor colocar el envés hacia arriba de la placa de Petri (Bañuelos-Balandrán & Mayek-Pérez 2008; Imathiu *et al.* 2008; Opoku *et al.* 2011). El método utilizado, en el cual se consideró a los folíolos como unidades experimentales, se seleccionó en repuesta a sus dimensiones y que bajo las condiciones resultantes se mantenían turgentes un período más extenso de tiempo, a la vez que constituyó una técnica que mostró ser económica, rápida y confiable. Sin embargo, existen trabajos que no están de acuerdo con esta técnica porque puede producir resultados diferentes, de acuerdo con la situación del ambiente de producción y reproducción de los síntomas (Gozzo & Faoro 2013) A fin de contrarrestar lo mencionado, las limitaciones impartidas con este sistema de análisis foliar *in-vitro*, es que se abordaron las secciones: 3.3.2 (plantas de tomate bajo condiciones controladas) y 3.3.3 (en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial).

Bajo el sistema de estudio en hojas desprendidas, el tratamiento con BTH redujo un 37 % los síntomas de la “mancha gris de la hoja” respecto al tratamiento solamente inoculado con el aislamiento CIDEFI 216. En las hojas tratadas con BTH la enfermedad fue menos severa, lo que fue acompañado de un aumento del nivel de POX. Específicamente se observó como la actividad POX aumenta solo durante un tiempo, lo que puede deberse a un efecto directo del inductor sobre el patógeno. Analizando los TBARS no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, aunque si se observó fitotoxicidad a través del análisis del índice de verdor (SPAD) y la determinación de clorofila. Del mismo modo Hussein *et al.* (2007), realizaron ensayos *in vitro* utilizando una metodología similar, y utilizaron 3 dosis de BTH en placas de Petri con *S. vesicarium*, y observaron que no hubo diferencias significativas en el control del patógeno en relación a su crecimiento. Diversos autores (Al-Masri & Barakat 2003; Triki *et al.* 2018; Ramteke 2019), han utilizado diversos patógenos y relizaron evaluaciones de inductores como si fueran fungicidas, determinando el efecto del crecimiento del hongo sobre las placas de Petri.

Para evaluar la aplicación del inductor BTH en condiciones controladas, se realizaron los dos ensayos en invernáculo, y se analizó la severidad de la “mancha gris de la hoja” en plantas de tomate cv. ‘Elpida’. De las tres variables que se probaron para evaluar la severidad, la elegida fue el número de manchas totales por planta, la que resultó de utilidad ya que las restantes: escala

diagramática y tamaño de la mancha, no pudieron mostrar diferencias entre los tratamientos probablemente debido al desarrollo aún precoz de las manchas. Porcentajes de control similares en relación al testigo (65-70 %) obtenidos en estos ensayos fueron reportados por Vallad & Goodman (2004) utilizando BTH e INA en 12 cultivos diferentes contra más de 30 plagas. Los mismos porcentajes de control (70 %) se observaron en ensayos en invernáculos en plantines de tomate inoculados con *Clavibacter michiganensis* con previa aplicación de BTH (Baysal *et al.* 2003b). Anith *et al.* (2004) encontraron que aplicaciones de BTH en tomate fueron efectivas para controlar a *Ralstonia solanacearum*, disminuyendo la incidencia en un 20% aproximadamente respecto a los testigos. Mientras que en otros ensayos con plantas de tomate en invernadero obtuvieron niveles menores de protección (20 al 30 %), frente al marchitamiento bacteriano ocasionado por *R. solanacearum* (Araujo *et al.* 2005; Pradhanang *et al.* 2005). En lo que refiere a estudios de RSA en patosistemas que involucren hongos, Malolepsza (2006) encontró en tomates inoculados con *Botrytis cinerea* resultados positivos con la aplicación del BTH; solo el 27% de la superficie de las hojas estaba afectada, mientras que en el control más del 60%. Asimismo, Achuo *et al.* (2004) encontraron que en tomates cultivados en invernáculo cuando fueron tratados 4 días antes con el inductor BTH, la severidad de *B. cinera* disminuía. En el trabajo de Amini (2009) el BTH redujo en un 54% la severidad en plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mientras que con el mismo patosistema en estudio Benhamou & Bélanger (1998) encontraron que cuando se aplicó el BTH la aparición de los síntomas fue posterior en el tiempo en plantas de tomate como así también se produjo un mayor número de lesiones en la raíz en más de un 70%.

Respecto al análisis de los parámetros de crecimiento, el tratamiento BTH + CIDEFI 216 redujo la altura respecto al testigo pero cuando se analizó el número de hojas no se encontraron diferencias entre ambos tratamientos, en cambio el BTH sí redujo la altura respecto al testigo (Figura 3.10). Estos resultados son diferentes respecto a estudios de infección natural con diversos patógenos foliares, con tratamientos con distintos inductores (entre los que estaba el BTH) en los que no afectaron la altura (cm) de las plantas de tomate en dos evaluaciones; a los 30 y 60 días (de Araujo & Menezes 2009). En otro estudio evaluaron el efecto del BTH en el control de *B. cinerea* en diferentes cultivos, entre los que estaba el tomate, y encontraron que las concentraciones más altas del producto redujeron la severidad, pero asimismo también tuvieron efectos negativos al reducir la altura de las plantas (Azami-Sardoei *et al.* 2013). En cultivos de arroz se analizaron diferentes inductores, entre ellos el BTH, y encontraron porcentajes de control de dos enfermedades muy importantes ocasionadas por *Bipolaris oryzae* y *Cercospora oryzae*, en algunas evaluaciones

obtuvieron valores de control del 50%, así como también un leve aumento en parámetros de crecimiento como altura y tamaño de la espiga respecto al testigo (Hossain *et al.* 2011).

Aunque la técnica para la determinación de POX se utilizó en el apartado 3.2.1. y se pudo evaluar actividad de la enzima, en los ensayos realizados con plantas de tomate la actividad no fue detectable. Sin embargo, en ensayos en plantas de tomate con distintos inductores, cuando midieron POX a los 50 días encontraron que el tratamiento BTH había incrementando la actividad enzimática el triple respecto al testigo (de Araujo & Menezes 2009).

Se sugiere que los compuesto fenólicos causan inhibición frente a patógenos, por estar acumulados en la pared celular de las plantas y tener un rol en la neutralización de los radicales libres (Ruiz & Romero 2001; Lattanzio *et al.* 2006; Ringuélet & Viña 2013). Cuando se analizó el contenido de compuestos fenolicos totales en esta tesis en el ensayo 1, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, a medida que avanzan las evaluaciones el contenido de fenoles siempre es levemente mayor para el tratamiento de BTH (Figura 3.12). En cambio, en el ensayo 2 los diferentes tratamientos a partir de la segunda evaluación (12 dpa) revelaron un incremento respecto al testigo (Figura 3.15).

Por otro lado, en un ensayo con plantas de cebolla tratadas con el inductor BTH evaluaron el contenido de fenoles al día 2 dpa y notaron que el tratamiento *Stemphylium vesicarium* + BTH duplicó al testigo (Kamal *et al.* 2008). Además, en el mismo ensayo los fenoles con el tratamiento de BTH tiene su máximo en el día 8, triplicando al testigo y luego descendió en el día 10, por lo que es importante considerar los momentos de evaluación del parámetro.

Por otra parte, en plantas de caña de azúcar tratadas con el inductor BTH e inoculadas con *Colletotrichum falcatum*, el contenido de fenoles encontró un máximo a los 10 dpa. Al igual que lo observado en esta tesis, el contenido de fenoles siempre es mayor en el tratamiento BTH (Ramesh Sundar *et al.* 2009). En cambio, Bressan (2011) trabajó con plantas de poroto enfrentándolo a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y midieron fenoles, no encontrando diferencias significativas entre los tratamientos con BTH y el control. Baysal *et al.* (2005) constataron un aumento significativo (5 veces más que el control) del contenido de fenoles al 3 dpa BTH para el tratamiento BTH + *Phytophthora capsici*.

La peroxidación lipídica, siendo los ácidos grasos los principales componentes de las membranas en las plantas, es una característica importante de la muerte celular durante las interacciones de las plantas con patógenos (Ruiz & Romero 2001). En el ensayo 1, cuando se realizó la determinación de TBARS no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; mientras que en el ensayo 2 se observó que a los 10 dpa y a la tercera evaluación (35

dpa) sólo el contenido de MDA en el tratamiento BTH es mayor respecto al testigo (Figuras 3.13 y 3.14).

Skłodowska *et al.* (2010) utilizaron BTH como inductor frente al patógeno *Erwinia amylovora* en plantas de manzana en invernáculos, entre otros parámetros se midió el nivel de peroxidación de lípidos-TBARS a los 2, 7 y 14 días, y encontraron diferencias significativas en la primer evaluación en favor del tratamiento con BTH aumentando 160 % comparando con el testigo. Está reportado que el aumento de peroxidación lipídica puede participar en la síntesis de jasmonatos u otros derivados de lípidos involucrados en las vías de señales y reacciones de respuesta de defensa (Weber 2002; Kachroo & Kachroo 2009). Aunque no se hayan encontrado diferencias en estos ensayos, en los tratamientos con BTH hay una tendencia al aumento de TBARS. Esto puede explicarse porque la peroxidación de los lípidos de las membranas pueden causar su deterioro, disminución de la fluidez, inactivación de receptores y enzimas unidos a membranas, permeabilidad a iones y eventualmente, su ruptura (Gutteridge 1995). Estos resultados avalan que el BTH en la concentración utilizada provocó cambios en la planta que condujeron a una reducción de la severidad de *Stemphylium*.

En un invernadero comercial se analizó el efecto de inductores de RAS sobre la infección natural de *Passalora fulva* en plantas de tomate para lo cual se realizaron dos ensayos de duración de 5 meses.

Considerando el Ensayo 1 para ambas evaluaciones 83 y 97 (dpa i) y en los dos estratos de hojas evaluados (Hoja 1 y 2) se lograron niveles de reducción de la enfermedad del 60-70%, conjuntamente con el aumento de la actividad POX para los tratamientos C1F1 y C3F3 en relación al Testigo (Figuras 3.16-3.19). No se han encontrado trabajos con determinaciones de POX en ensayos a campo, por lo que en la tesis se realizan comparaciones con los trabajos realizados en macetas en invernáculos, con tiempos de evaluación menores. En el día 5 después de la inoculación el tratamiento con BTH + *Clavibacter* tuvo el triple de actividad POX en relación al Testigo. En los días 2, 3 y 7 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y a partir de la última evaluación los niveles de POX descendieron (Baysal *et al.* 2003b). En otro trabajo, la actividad de POX comenzó a incrementarse a los 4 días después de la aplicación de BTH para el tratamiento BTH + *S. vesicarium*, y esto se repitió en todos los momentos evaluados: 6, 8 y 10 días post aplicación. El mismo patrón se observó para el tratamiento solo de BTH pero en menor nivel (Kamal *et al.* 2008). En relación al contenido de Fenoles totales, en el caso de la Hoja 1, los tratamientos C2 en ambas frecuencias (F1, cada 7 días y F2, cada 15 días) son los que tuvieron

mayor contenido en relación al testigo, mientras que en la Hoja 2 los tratamientos C1 en ambas frecuencias son los que tuvieron mayor contenido (Figuras 3.17 y 3.19).

En un estudio muy amplio Louws *et al.* (2001), plantearon una red de ensayos a campo en Estados Unidos, para evaluar el efecto del inductor BTH (35 g a. i./ha) en aplicaciones cada 7 y 14 días, contra la enfermedad causada por *Xanthomomas anoxopodis* pv. *vesicatoria* y por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; concluyeron que fue efectivo frente a estas bacterias mientras que el rendimiento no fue afectado. En el mismo trabajo evaluaron diferentes dosis (17,5; 35 y 70 g a. i./ha), y encontraron que al inicio del cultivo con la dosis más baja no se controló la enfermedad y al final de la temporada tenía igual efecto que la utilización de la dosis media, mientras que la aplicación de la dosis más alta no provocó valores mayores de control. Cole (1999) cuando estudio *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* observó que el inductor BTH redujo más del 60 % las zonas de clorosis y necrosis en plantas de tabaco, tanto en condiciones controladas como a campo. En ensayos a campo con *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) cuando incorporaron al BTH se pudo observar el efecto positivo en una reducción del 50 % que tuvo este en el control de la enfermedad pero reportaron una leve toxicidad del producto en concentraciones más elevadas (26 g a. i./ha) que las utilizadas en este trabajo (Momol *et al.* 2004). En el siguiente trabajo Töfoli & Domingues (2005) analizaron varios productos para el control de la enfermedad causada por *Alternaria solani* sobre un cultivo comercial de tomate y encontraron que la aplicación conjunta de fungicida más el inductor BTH, siempre repercutió en un mejor control. Considerando al patógeno *Xanthomomas campestris* pv. *vesicatoria* de tomate en ensayos en invernáculos encontraron que el BTH redujo la severidad de la enfermedad en valores mayores al 60 %. En el mismo trabajo se describen ensayos a campo para el patosistema en estudio, y la reducción de la severidad en frutos cosechados para el BTH en relación al Testigo fue del 50 % (Abbasi *et al.* 2002).

En cuanto al análisis del rendimiento en los ensayos a campo realizados en esta Tesis, como se mencionó no hay variación en función de los tratamientos (Figura 3.20 y 3.22), y en ambos se observó que la concentración más alta (C3) de BTH en ambas frecuencias redujo levemente el rendimiento respecto al Testigo indicando cierto grado de fitotoxicidad. Esto coincide con Louws *et al.* (2001) quienes tampoco encontraron una fitotoxicidad notable en cultivos de tomate en los múltiples ensayos realizados; sin embargo, si la mencionan en ensayos con otros cultivos; pimiento y tabaco.

En un ensayo realizado a campo de tomate inoculado con *Ralstonia solanacearum* observaron el efecto negativo de la aplicación del inductor BTH sobre el rendimiento, a pesar de haber reducido la enfermedad (10-14%) en relación al testigo (Kunwar *et al.* 2017).

En los dos ensayos a campo realizados en esta tesis se manifestó que algunos tratamientos tuvieron un rendimiento levemente superior y otros levemente inferior al testigo. Esta reducción de rendimiento si bien no es estadísticamente diferente es importante considerarla desde el punto de vista comercial para los productores, dicha observación también la sostienen en su trabajo Huang *et al.* (2012) cuando analizaron en varios ensayos de tomate inoculados con *Xanthomonas vesicatoria* y observaron que la mayor reducción de la enfermedad la lograron con aplicaciones semanales de BTH, mientras que el rendimiento no fue afectado. En cultivos a campo de tomate inoculados con *Xanthomonas vesicatoria* previamente inducidos con BTH, en experimentos de dos años diferentes, el rendimiento no mostró diferencias significativas con el Testigo (Al-Dahmani *et al.* 2003). En ensayos a campo de cultivos de tomate orgánico encontraron que no había diferencias en el rendimiento entre los distintos tratamientos de control (caldo bordeles y otros, pero no evaluados como inductores) que redujeron la enfermedad causada por *Stemphylium solani* (Vieira Ferreira 2014). En trabajos con pimientos en experimentos en invernáculos y campo evaluando el efecto de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* encontraron que hubo reducción en el crecimiento e incluso en el rendimiento por efecto del BTH (Louws *et al.* 2001; Romero *et al.* 2001a).

Como sostienen Walters *et al.* (2005) la efectividad de la RSA depende de muchos factores; del genotipo de las plantas, del ambiente, del tipo de inductor, de la fenología del cultivo, de las dosis empleadas de los inductores, entre otras. Es importante optimizar todos los factores para lograr una aplicación de esta herramienta, que sea económica y adoptable en los manejos tecnológicos de los productores, como afirman también Beckers & Conrath (2007) que el BTH no logró una mayor difusión entre los productores debido al papel promotor del compuesto y no curativo, una vez que apareció la enfermedad. Como menciona Huang *et al.* (2012) el período entre la aplicación del BTH y la activación de RSA en tomate es relativamente corto, unos 3 a 7 días, esto es debido a que el producto se trasloca rápidamente. Es necesario terminar de ajustar las dosis y frecuencias de aplicación del BTH como para optimizar su uso en cada patosistema.

Es importante señalar los alcances de las escalas de estudio y evitar generalizaciones (Hemming 2011). Como sostienen varios autores (Romero *et al.* 2001b; Huang *et al.* 2012; Llorens *et al.* 2017) existen teorías de que la energía y los recursos que las plantas desvían a la síntesis de compuestos defensivos, no puede ser utilizada en el metabolismo primario, provocando la reducción del crecimiento y por ende disminuyendo el rendimiento. Por otro lado, estos autores también sugieren el efecto sinérgico de que los inductores sean aplicados con un plan de manejo fitosanitario clásico en los campos productivos. A pesar de que en la bibliografía existen se menciona lo señalado de reducción de rendimiento, en el presente estudio los ensayos en cultivos

comerciales de tomate con la aplicación del BTH provocaron simultáneamente reducir la severidad de la enfermedad en estudio y no ocasionar alteraciones en los rendimientos.

### 3.5. CONCLUSIONES PARCIALES.

El BTH en los ensayos de hojas desprendidas redujo la severidad de la “mancha gris de la hoja” en un 37 %.

El índice de verdor (SPAD) y el contenido de clorofila revelaron que el BTH puede generar fitotoxicidad en las hojas de tomate.

El BTH en el ensayo en plantas de tomate bajo condiciones controladas redujo promisoriamente la severidad en un 65-70 %.

La medición de los parámetros de crecimiento vegetal como la altura y el número de hojas revelaron que el BTH puede generar fitotoxicidad en las plantas de tomate.

Los fenoles totales y TBARS no mostraron ser útiles como parámetros indicadores de la activación de RSA en el ensayo estudiado.

El BTH redujo también los niveles de severidad en un 50-70 % de *P. fulva* en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial, y no se observaron alteraciones en los rendimientos del cultivo.

Capítulo 4.

Conclusiones Finales y Perspectivas.

## CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Cuarenta y nueve aislamientos monospóricos pertenecientes al género *Stemphylium* que se obtuvieron a partir de muestras de hojas con síntomas de “mancha gris de la hoja de tomate”, colectadas de diversas variedades comerciales y procedentes de las provincias de Buenos Aires y Corrientes durante las campañas correspondientes al periodo 2010-2013, revelaron diferencias fenotípicas en crecimiento, pigmentación y morfometría del sistema conidial, existiendo algunos aislamientos que fueron incapaces de esporular bajo las condiciones de cultivo *in-vitro* analizadas.

En base de la secuencia amplificada del ITS, los aislamientos CIDEFI 210, CIDEFI 212 y CIDEFI 216 están filogenéticamente asociados a un complejo de especies de *Stemphylium*, y las características morfométricas de los conidios de los aislamientos estudiados coinciden a las reportadas para *S. lycopersici*.

Esta Tesis es el primer trabajo en el que se registran datos sobre el perfil de metabolitos secundarios del género *Stemphylium* en Argentina, que es compatible con una estrategia competitiva típica de fitopatógenos necrótrofos. Aunque existe variabilidad en la síntesis de metabolitos secundarios por los aislamientos CIDEFI estudiados, entre los 23 identificados, la infectopirona es el metabolito más representado.

El aislamiento CIDEFI 216, cuyo fenotipo varía según las condiciones de cultivo, incluyendo su respuesta al estrés hídrico, es capaz de afectar diferencialmente el material foliar de diferentes cultivares de tomate. Este aislamiento es polífago, revelando también sintomatología de manchas foliares sobre otras especies vegetales.

Bajo ciertas condiciones de aplicación, el BTH reduce la severidad del aislamiento CIDEFI 216 en hojas de tomate. Aunque su respuesta en planta no es estable y puede causar fitotoxicidad, el BHT es una molécula que tiene potencial en la inducción de la protección del tomate frente a la “mancha gris de la hoja de tomate”. La fitotoxicidad se observó en ensayos en plantas de tomate cuando se aplicó BTH (a una concentración de 50 mg/l) sobre plantas con 4 hojas expandidas, cultivadas en un invernáculo bajo condiciones controladas. También, en los ensayos en cultivos de tomate bajo invernáculos de producción comercial se observó que luego de 10 aplicaciones del inductor BTH, contemplando todo el ciclo del cultivo, con la concentración más alta (C3; 0,075 g/l) en ambas frecuencias (F1, cada 7 días y F2, cada 15 días) redujo levemente el rendimiento respecto al Testigo indicando cierto grado de fitotoxicidad.

Esta Tesis es el primer reporte de estudio del patosistema: Tomate-*Stemphylium*, contribuyendo al posible rol de la RSA en el manejo de la enfermedad. Parámetros como TBARS,

fenoles totales y la actividad POX no son indicadores fidedignos de la activación de RSA. No obstante, su estimación puede contribuir en el monitoreo de la interacción entre tomate y *Stemphylium* en presencia de BHT.

En base a lo realizado en esta Tesis, se rechaza la primera hipótesis planteada, ya que la “mancha gris de la hoja en tomate” estuvo asociada solo a representantes del género *Stemphylium*, aún cuando no se pudieron identificar los aislamientos obtenidos a nivel específico.

En relación a la segunda hipótesis planteada en este trabajo, ésta también es rechazada puesto que los parámetros evaluados como potenciales indicadores de RSA no mostraron ser útiles como evidencia positiva de su activación.

Aunque en esta Tesis en los ensayos en invernáculo de producción no se plantó un estudio utilizando un amplio rango de concentración y frecuencia de aplicación de BTH -como estrategia potencial de activación de RSA-, sobre la base de los datos obtenidos se recomienda, como prometedor el uso de BTH a una concentración en el rango de 0,025 - 0,05 g/l utilizando una frecuencia de aplicación semanal en forma de pulverización foliar.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se propone en el futuro:

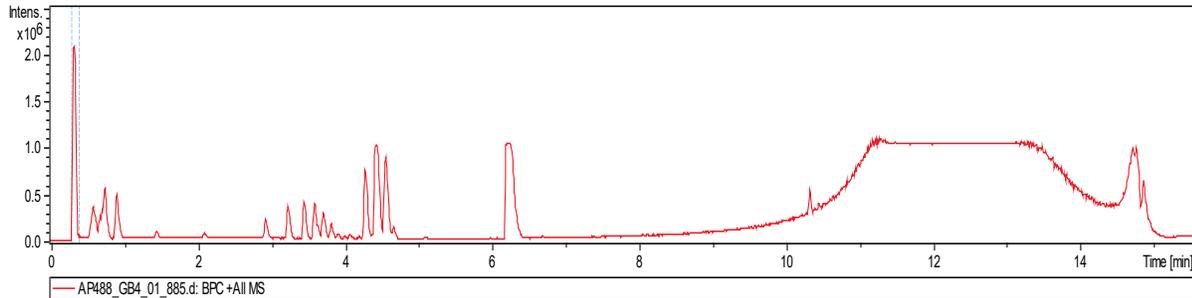
- Utilizar otros marcadores moleculares como gpd (gliceraldehído 3-fosfato) para completar la identificación a nivel molecular de los aislamientos CIDEFI obtenidos en esta tesis.
- Evaluar en este patosistema si otras actividades enzimáticas y parámetros químicos en plantas pueden ser utilizados como indicadores de RSA.
- Optimizar los procesos de extracción de enzimas de utilidad como índice de establecimiento de RSA.
- Detectar la inducción de RSA por medio del análisis de la expresión de proteínas PR's, incluyendo diferentes enzimas relacionadas con la RSA, bajo condiciones controladas y variando la dosis del inductor.

- Evaluar variaciones en la dosis, frecuencia y duración de la protección que ejerce la RSA (o el producto BTH) en el patosistema *Stemphylium* - tomate bajo condiciones de invernáculo.
- Evaluar el nivel de protección a diferentes dosis con fertilización nitrogenada, a fin de reducir los síntomas de fitotoxicidad del BTH.

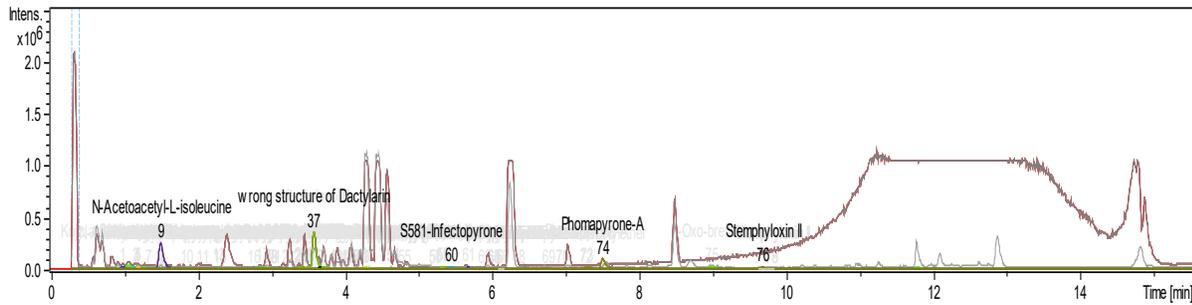
# Anexo

Se analizó el perfil metabólico de 20 aislamientos cuando éstos se cultivaron en el medio DRYES, en el eje x se observa el tiempo de retención en (min), mientras que en el eje y se muestra la intensidad de la señal (intens.).

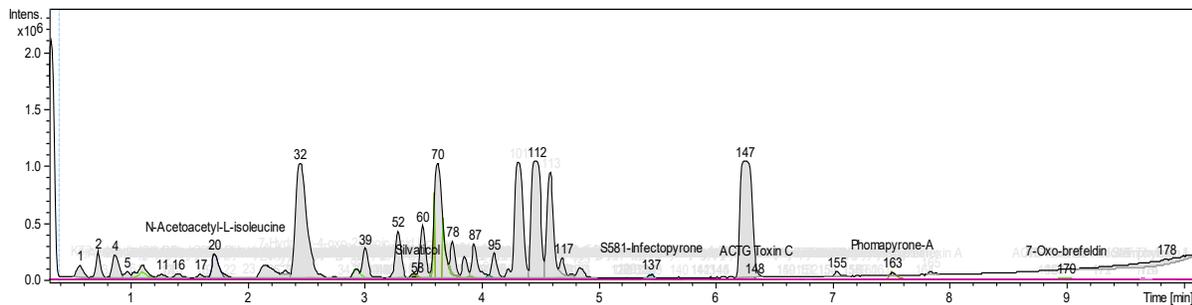
## Blanco



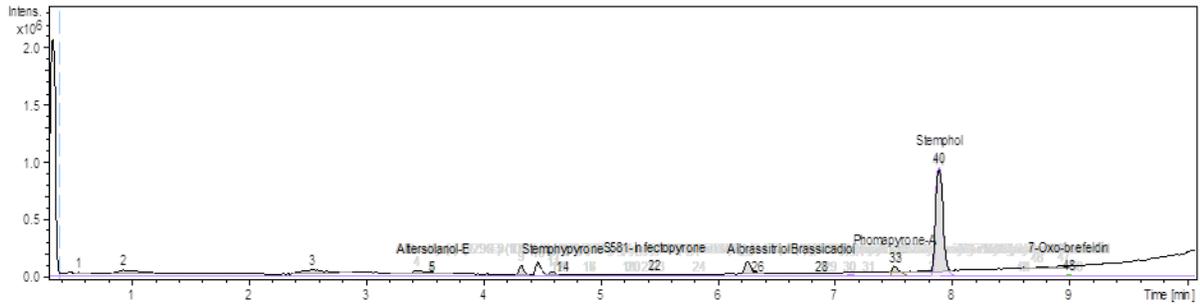
## Aislamiento CIDEFI 201



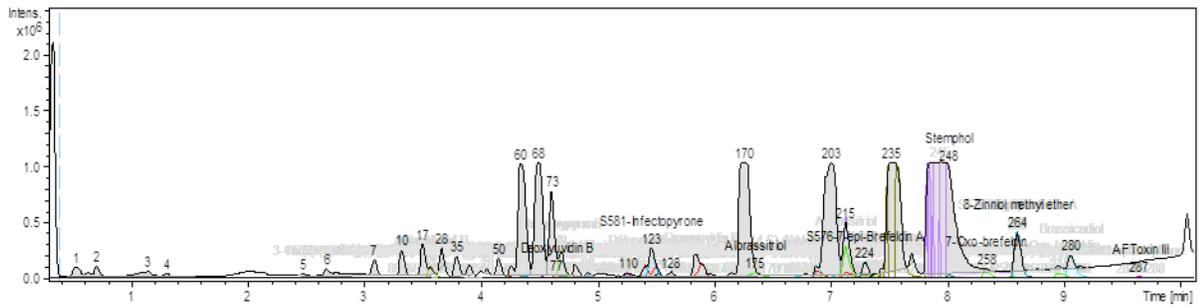
## Aislamiento CIDEFI 203



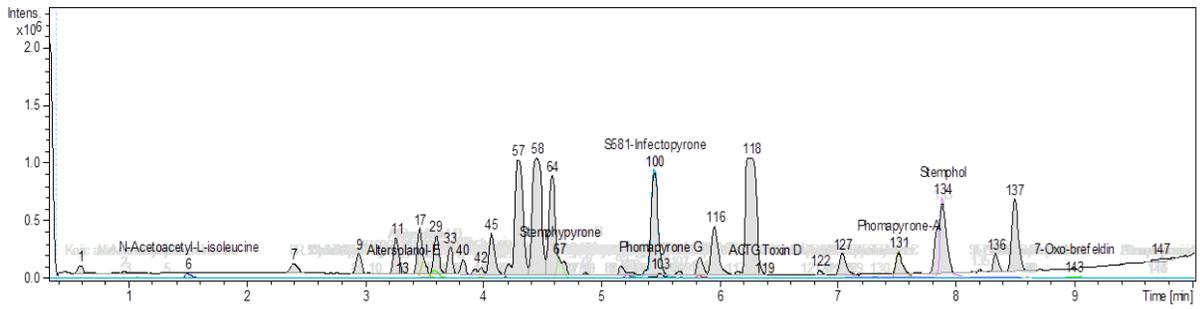
### Aislamiento CIDEFI 206



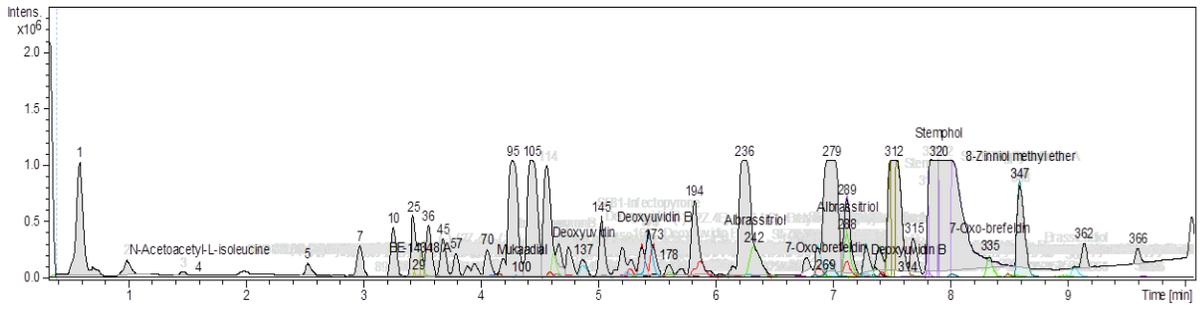
### Aislamiento CIDEFI 207



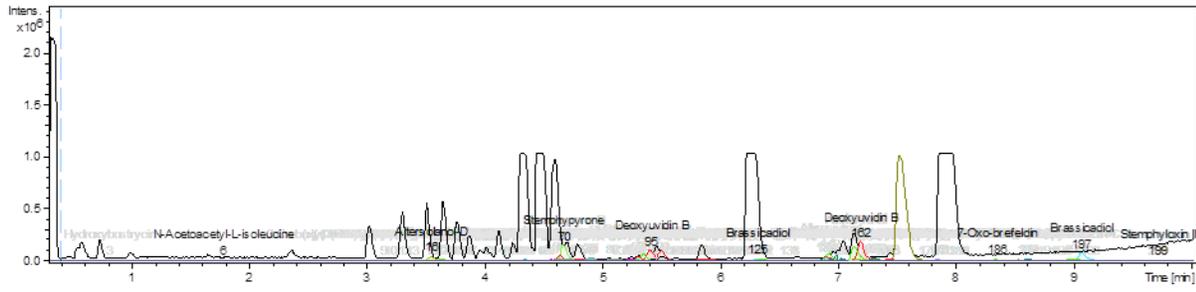
### Aislamiento CIDEFI 208



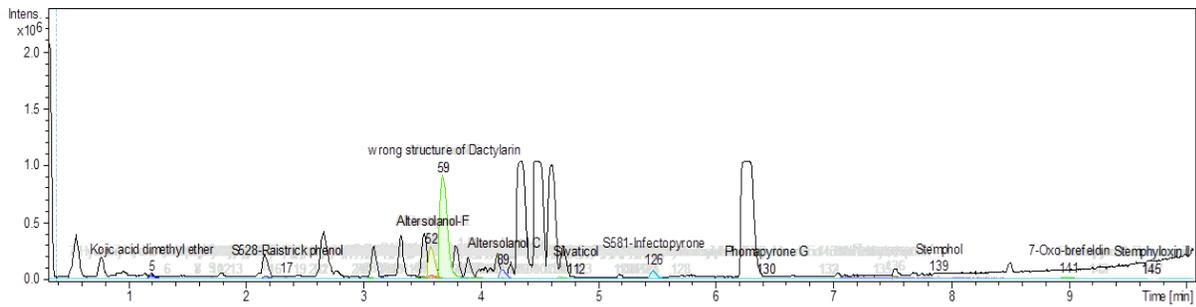
### Aislamiento CIDEFI 210



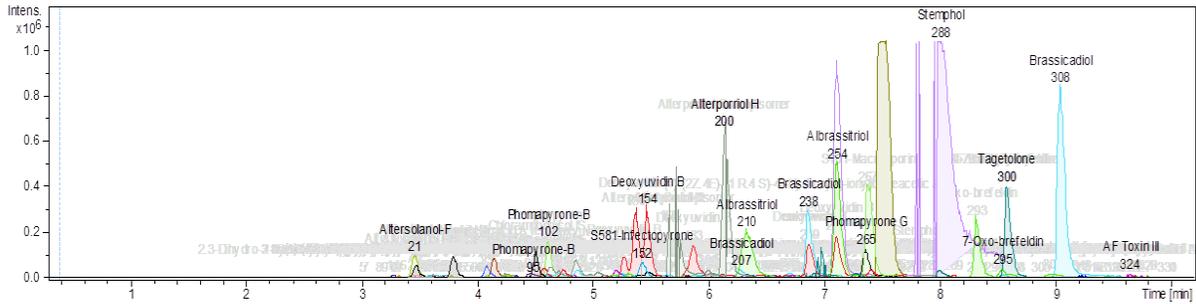
### Aislamiento CIDEFI 211



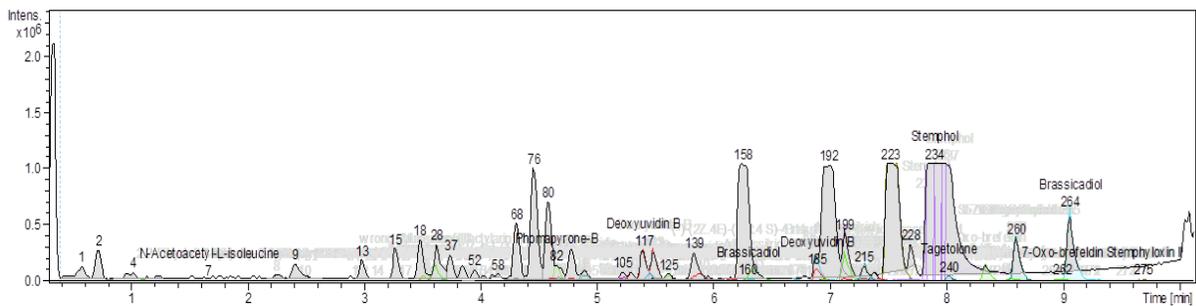
### Aislamiento CIDEFI 213



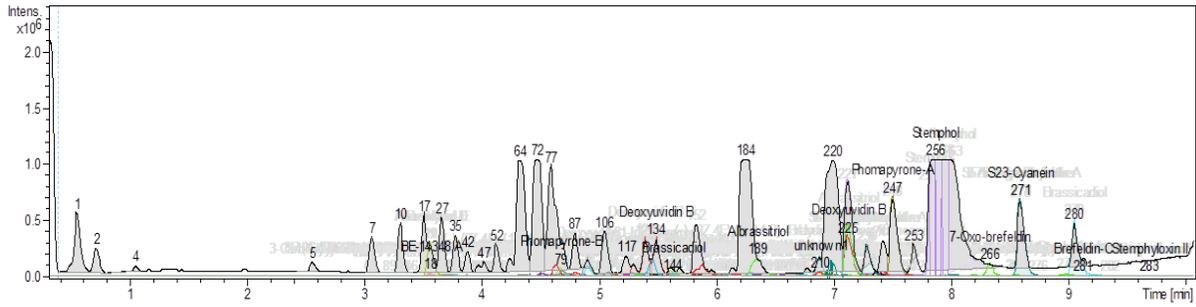
### Aislamiento CIDEFI 214



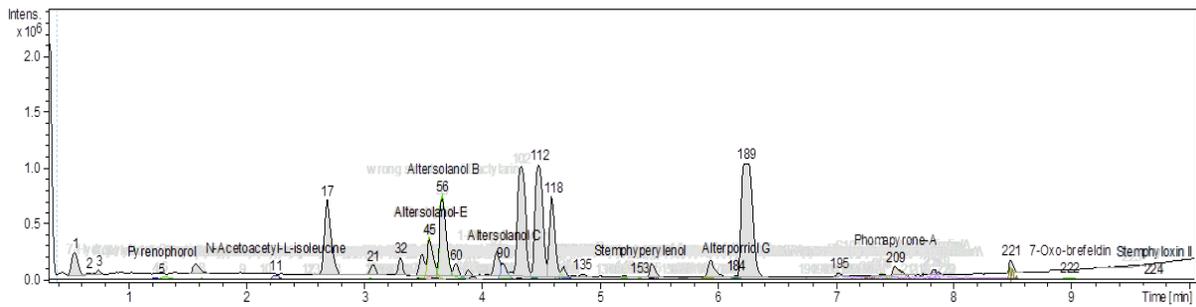
### Aislamiento CIDEFI 215



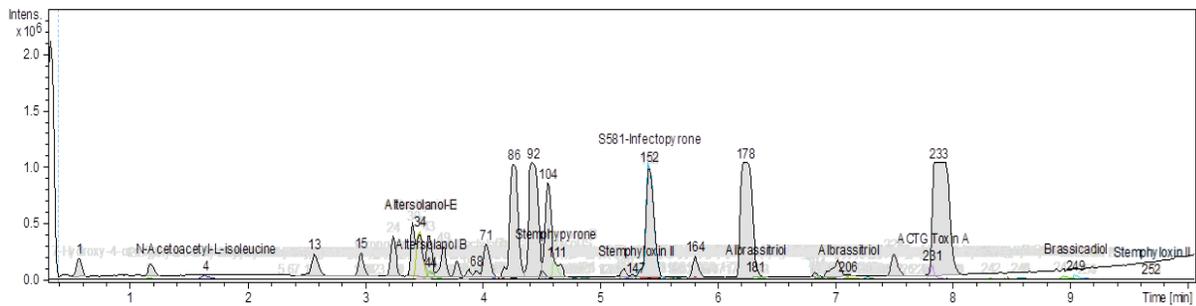
### Aislamiento CIDEFI 221



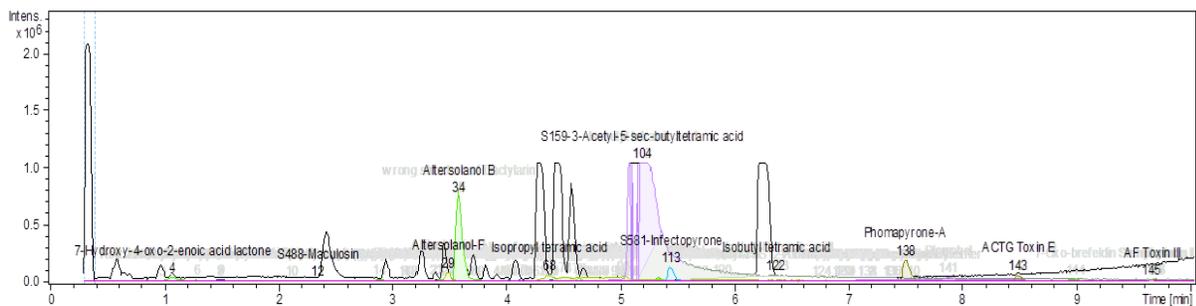
### Aislamiento CIDEFI 224



### Aislamiento CIDEFI 225

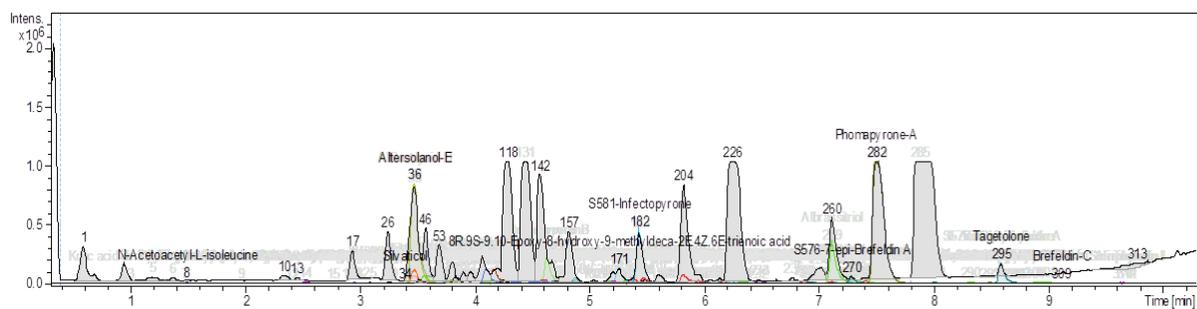


### Aislamiento CIDEFI 226





# Aislamiento CIDEFI 231



# Bibliografía

- Abbasi PA, Soltani N, Cuppels DA & Lazarovits G 2002 Reduction of Bacterial Spot Disease Severity on Tomato and Pepper Plants with Foliar Applications of Ammonium Lignosulfonate and Potassium Phosphate. *Plant Disease* **86** 1232–1236. (doi:10.1094/PDIS.2002.86.11.1232)
- Achuo EA, Audenaert K, Meziane H & Höfte M (2004) The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology* 65–72. (doi:10.1046/j.1365-3059.2003.00947.x)
- Agrios GN 2005 *Plant Pathology*. Elsevier. 922p
- Aguirre N atalia;, C., Villamizar R.; Espinel C. C. & Cotes P. AM 2009 Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). **35** 138–144.
- Al-Dahmani JH, Abbasi P a., Miller S a. & Hoitink H a. J 2003 Suppression of Bacterial Spot of Tomato with Foliar Sprays of Compost Extracts Under Greenhouse and Field Conditions. *Plant Disease* **87** 913–919. (doi:10.1094/PDIS.2003.87.8.913)
- Al-Masri MI & Barakat R 2003 Role of the auxin , Naphthalene Acetic Acid ( NAA ) in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* , causative organism of white mold disease. *Hebron University Journal* **1** 4–15.
- Alam S, Shah HU & Magan N 2010 Effect of calcium propionate and water activity on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Science* **75** M61-64. (doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01462.x)
- Altieri MA & Nicholls CI 2017 The adaptation and mitigation potential of traditional agriculture in a changing climate. *Climatic Change* **140** 33–45. (doi:10.1007/s10584-013-0909-y)
- Amini J 2009 Induced Resistance in Tomato Plants Against *Fusarium* Wilt Invoked by Nonpathogenic *Fusarium* , Chitosan and Bion. **25** 256–262.
- Andersen B & Frisvad JC 2004 Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** 7507–7513. (doi:10.1021/jf048727k)
- Andersen B, Solfrizzo M & Visconti A 1995 Metabolite profiles of common *Stemphylium* species. *Mycological Research* **99** 672–676. (doi:10.1016/S0953-7562(09)80526-1)
- Andersen B, Hansen ME & Smedsgaard J 2005 Automated and Unbiased Image Analyses as Tools in Phenotypic Classification of Small-Spored *Alternaria* spp. *Phytopathology* **95** 1021–1029. (doi:10.1094/PHYTO-95-1021)
- Andersen B, Nielsen KF, Fernández Pinto V & Patriarca A 2015 Characterization of *Alternaria*

- strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology* **196** 1–10. (doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.029)
- Andrade F, Taboada M, Lema D, Maceira N, Echeverría H, Posse G, Prieto D, Sánchez E, Ducasse D, Bogliani M *et al.* 2017 Los desafíos de la agricultura Argentina. Satisfacer las futuras demandas y reducir el impacto ambiental. Ed INTA. 124p.
- Anfoka GH 2000 Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. *Challenge* **19** 401–405.
- Anith KN, Momol MT, Klopper JW, Marois JJ, Olson SM & Jones JB 2004 Efficacy of Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria*, Acibenzolar- S -Methyl, and Soil Amendment for Integrated Management of Bacterial Wilt on Tomato. *Plant Disease* **88** 669–673. (doi:10.1094/PDIS.2004.88.6.669)
- Arango C, Garita S & Bernardo V 2019 Parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento inoculadas con *Funneliformis mosseae* en condiciones de hidroponía y con altas concentraciones de cobre. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata* **118** 79–91.
- Araujo JS de P, Gonçalves K da S, Oliveira BC de, Ribeiro R de LD & Polidoro JC 2005 Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira* **23** 5–8. (doi:10.1590/S0102-05362005000100001)
- de Araujo FF & Menezes D 2009 Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico ( Acibenzolar-S-Metil ). 169–172.
- Arie T, Takahashi H, Kodama M & Teraoka Y 2007 Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology* **24** 135–147.
- Astoreca A, Barberis C, Magnoli C, Combina M & Dalcerro A 2009 Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains in irradiated corn grains. *International Journal of Food Microbiology* **129** 174–179. (doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.019)
- Aveling TAS & Naude SP 1992 First Report of *Stemphylium vesicarium* on garlic in South Africa. *Plant Disease* **76** 426. (doi:10.1094/PD-76-0426E)
- Azami-Sardooei Z, Seifi HS, De Vleeschauwer D & Höfte M 2013 Benzothiadiazole (BTH)-induced resistance against *Botrytis cinerea* is inversely correlated with vegetative and generative growth in bean and cucumber, but not in tomato. *Australasian Plant Pathology* **42** 485–490. (doi:10.1007/s13313-013-0207-1)
- Babitha S, Soccol CR & Pandey A 2007 Effect of stress on growth, pigment production and

- morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. *Journal of Basic Microbiology* **47** 118–126. (doi:10.1002/jobm.200610261)
- Balbi A 2018 Estudio de la virulencia de aislados de *Stemphylium lycopersici*. (2018). 40p
- Balmford A, Bennun L, Brink B ten, Cooper D, Côté IM, Crane P, Dobson A, Dudley \* Nigel, Dutton I, Green RE *et al.* 2005 The Convention on Biological Diversity's 2010 Target. *Himalayan Journal of Sciences* **3** 43–45. (doi:10.1126/science.1106281)
- Bañuelos-Balandrán JJ & Mayek-Pérez N 2008 Evaluación no Destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* **26** 71–75.
- Barash I 1982 A Novel Enolic B-Ketoaldehyde Phytotoxin Produced by *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici*. **69** 23–27.
- Barash I, Karr AL & Strobel GA 1975 Isolation and Characterization of Steiiiphylin , Glucoside from *Stemphylium botryosum*. *Plant Physiology* **55** 646–651.
- Basallote-Ureba MJ, Prados-Ligero M & Melero-Vara JM 1999 Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *Plant Pathology* **48** 139–145. (doi:10.1046/j.1365-3059.1999.00313.x)
- Baysal Ö, Soylu EM & Soylu S 2003a Induction of disease resistance and antioxidant enzymes by acibenzolar-S-methyl against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato. *Journal of Plant Pathology* **85** 175–181. (doi:10.1016/S0168-9452(03)00302-9)
- Baysal O, Soylu EM & Soylu 2003b Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology* **52** 747–753.
- Baysal O, Turgut C & Mao G 2005 Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia Plantarum* **49** 599–604. (doi:10.1007/s10535-005-0055-0)
- Beckers GJ & Conrath U 2007 Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* **10** 425–431. (doi:10.1016/j.pbi.2007.06.002)
- Behare J, Laterrot H, Sarfatti M & Zamir D 1991 Restriction fragment length polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4** 489–492.
- Benezer-Benezer M, Castro-Mercado E & García-Pineda E 2008 La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* **26** 56–61.

- Benhamou N & Bélanger RR 1998 Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* **118** 1203–1212.
- Bentes JLS & Matsuoka K 2005 Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* **30** 224–231.
- Berg CC & Leath KT 1996 Responses of red clover cultivars to *Stemphylium* leaf spot. *Crop Science* **36** 71. (doi:10.2135/cropsci1996.0011183X003600010012x)
- Bernardo V, Collado F, Arango C, Ruscitti M & Garita S 2017 Efecto del ácido salicílico en plantas de *Capsicum annuum* micorrizadas, en presencia de metales pesados en el suelo. Resumen de Jornadas Fisiología Vegetal Investigación Joven **4** 2 68
- Bernardo V, Collado F, Arango C, Garita S & Ruscitti M 2018 La inoculación con hongos micorrícicos y la aplicación de ácido salicílico aumentan la tolerancia a cobre en plantas de pimiento . *Ciencias Agronómicas* **18** 7–16.
- Bettiol W 2006 Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. *Fitosanidad* **10** 85–98. (doi:10.1142/S021881040700364X)
- Bettiol W, Tratch R & Galvão JAH 1998 Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. 22p.
- Bettiol W, Inácio L, Stephanes R, Fontelles JG, Antonio P, Pereira A, Antonio P & Pereira A 2009 Biocontrol de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. 341p
- Blancard D 1992 *Enfermedades Del Tomate. Observar, Identificar Y Luchar*. 212p
- Blancard D, Laterrot H, Marchoux G & Candresse T 2011 *Enfermedades Del Tomate: Identificar, Conocer, Controlar*. 679p
- Boff P, Zambolim L & Ribeiro do Valle F 1991 Escalas para avaliação de severidade da mancha de estenfilio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* **16** 280–283.
- Borges OL, Standford EH & Webster RK 1976 The host- pathogen interaction of alfalfa and *Stemphylium botryosum*. *Phytopatholog* **66** 749–753.
- Bornet B & Branchard M 2001 Non-anchored simple sequence repeat markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* **19** 209–215.
- Brahamanage RS, Hyde KD, Li XH, Zhang W, Liu M, Rs J, Ehc M & Jy Y 2018 Are pathogenic cosmopolitan ? *Plant Pathology & Quarantine* **8** 153–164. (doi:10.5943/ppq/8/2/7)
- Breiman A & Barash I 1976 Characterization of L-asparagine transport systems in *Stemphylium botryosum*. *Journal of Bacteriology* **127** 1127–1135.
- Bressan DF 2011 Uso dos eliciadores acibenzolar-s-metílico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao crestamento bacteriano. 64p

- Buell CB & Weston WH 1947 Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany* **34** 555. (doi:10.2307/2437337)
- Bueno Dias G & Azevedo Rangel TB 2007 Inducao de resistencia em plantas: o papel do oxido nitrico. *Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia*, 3 1–8.
- Buonaurio R, Scarponi L, Ferrara M, Sidoti P & Bertona A 2002 Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *European Journal of Plant Pathology* 108: 41–49.
- Câmara MPS, O'Neill NR & van Berkum P 2002 Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **94** 660–672.
- Camarena Gutierrez G 2006 Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* **12**(1) 25–30.
- Camarena Gutierrez G & de la Torre Almaráz R 2007 Resistencia Sistémica Adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(2): 157–162.
- Castagnino A, Díaz K, Fernández Lozano J, Guisolis A, Liverotti O, Rosini MB & Sasale S 2020 Panorama of the argentine horticultural sector : 1 . Characterization and priorities of national horticulture **39** (99) 76–102.
- Cerkauskas R 2005 Gray Leaf Spot on Tomato. *AVRDC*. 05-634
- Cervantes-García D, Saúl Padilla-Ramirez J, Simpson J & Mayer-Pérez N 2003 Osmotic potential effects on in vitro growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. **151** 456–462.
- Chavez Suarez, L; Alvarez Fonseca, A; Ramirez Fernandez, R. 2012 Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *cultrop* [online]. 2012, vol.33, n.3.
- Chester KS 1933 The problem of acquired physiological immunity in plants. *The Quarterly Review of Biology* **8** 275–324. (doi:10.2307/2808427)
- Cho H & Hun YS 1998 *Stemphylium vesicarium* on garlic and other *Allium* spp. in Korea. *Korean Journal of Plant Pathology* **14** 567–570.
- Cho HJ, Kim BS & Hwang HS 2001 Resistance to gray leaf spot in *Capsicum peppers*. *HortScience* **36** 752–754.
- Chowdhury HA, Islam N, Hossain B, Moudood Ahmed, Sayed Mohsin & Rafiqul Islam 2015 A Comparative analysis of culture media for optimizing the mycelial growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium* cause of white blotch of onion. *Journal of Agricultural Science and Technology A* **5** 440–448. (doi:10.17265/2161-6256/2015.06.006)

- Cieza RI 2004 Asesoramiento profesional y manejo de nuevas tecnologías en unidades de producción hortícolas del gran La Plata, Argentina. *Scientia Agraria* 5 (1-2) 79-85.
- CNA 2008 Censo Nacional Agropecuario. Secretaria de Agricultura Ganadería Pesca Y Alimentación.
- Cole DL 1999 The efficacy of acibenzolar-S-methyl , an inducer of systemic acquired resistance , against bacterial and fungal diseases of tobacco. **18** 267–273.
- Colombo MH 2002 Manejo de enfermedades en cultivos protegidos de tomate. 69.
- Colombo H, Lenscak MP & Ishikawa A 2001 Primera cita en Argentina de *Stemphylium floridanum*, como agente causal de la mancha gris del tomate. Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. 12. 2001 08 01-03, 1 al 3 de agosto 2001. Corrientes. AR 1–6.
- Corvo Dolcet S 2005 Zonas de producción del cultivo del tomate en la Argentina. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca Y Alimentos- Dirección de Agricultura 1–15.
- Cowling WA & Gilchrist DG 1982 Expression of pathogen virulence and host resistance during infection of alfalfa with *Stemphylium botryosum*. *Phytopathology* **72** 36–42.
- CPHF 2005 Censo Provincial Hortiflorícola. 2005. Datos comparativos correspondientes a La Plata; Municipios de la Región; y Total Provincia. Municipalidad de La Plata. (doi:<http://www.estadistica.laplata.gov.ar/paginas/PDFs/censohortifloricola/CPHFpba.pdf>)
- Csinos AS, Pappu HR, McPherson RM & Stephenson MG 2001 Management of tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar- S -Methyl and Imidacloprid. *Plant Disease* **85** 292–296. (doi:10.1094/PDIS.2001.85.3.292)
- Curtis MD, Gore J & Oliver RP 1994 The phylogeny of the tomato leaf mould fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Current Genetics* **25** 318–322. (doi:10.1007/BF00351484)
- Cvikrová M, Malá J, Hrubcová M & Eder J 2006 Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascochyta blight* infected Norway spruces. *Plant Science* **170** 563–570. (doi:10.1016/J.PLANTSCI.2005.10.011)
- Dal Bello G, Vera Bahima J & Mónaco C 2011 Biocontrol of postharvest tomato grey mould using natural saprophytic fungi. International Congress of Postharvest Pathology. Lleida (España), 11/04/11
- Dann EK & Deverall BJ 2000 Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology* **49** 324–332. (doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00457.x)
- Dann E, Meuwly P, Métraux J-P & Deverall B. 1996 The effect of pathogen inoculation or

- chemical treatment on activities of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49** 307–319. (doi:10.1006/PMPP.1996.0056)
- DasW T, Majumdar HD, Tomnisana Devi RK & Rajesh T 2014 Climate change impacts on plant pathogens and plant diseases. *Journal of Crop Improvement* **28** 99–139. (doi:10.1080/15427528.2014.865412)
- Debbab A, Aly AH, Edrada-Ebel R, Wray V, Müller WEG, Totzke F, Zirrgiebel U, Schächtele C, Kubbutat MHG, Lin WH *et al.* 2009 Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *Journal of Natural Products* **72** 626–631. (doi:10.1021/np8004997)
- Debbab A, Aly AH, Edrada-Ebel R, Wray V, Pretsch A, Pescitelli G, Kurtan T & Proksch P 2012 New anthracene derivatives – structure elucidation and antimicrobial activity. *European Journal of Organic Chemistry* **7** 1351–1359.
- Van Dijke JF 2002 Incidence of pear fruit spot can increase explosively. *Fruittenteel Den Haag* **92**: 8–9. **92** 8–9.
- Dixon RA & Paiva NL 1995 Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7** 1085. (doi:10.2307/3870059)
- Domingues DP 2012 Etiologia e controle da mancha-de-estenfilio do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no estado do Rio de Janeiro.
- Domingues RJ, De Souza JDF, Tofoli JG & Matheus DR 2009 Ação in vitro de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Arquivos Do Instituto Biológico, São Paulo*, v **76** 643.649.
- Dorado J, Almendros G, Camarero S, Martinez AT, Vares T & Hatakka A 1999 Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology* **25** 605–612.
- Doyle J 1991 DNA Protocols for Plants. In *Molecular Techniques in Taxonomy*, pp 283–293. Eds H G.M., J A.W.B. & Y J.P.W. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. (doi:10.1007/978-3-642-83962-7\_18)
- Duran R, Cary JW & Calvo AM 2010 Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins* **2** 367–381. (doi:10.3390/toxins2040367)
- Durrant WE & Dong X 2004 Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42** 185–209. (doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421)

- Edreva A 2005 Pathogenesis-Related Proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology* **31** 105–124. (doi:citeulike-article-id:3441103)
- Elana K 1996 First report of *Stemphylium botryosum* causing stemphylium leaf spot of asparagus in Greece. *Plant Disease* **80** 342.
- Ellis MB 1971 *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew. Surrey. England.
- Ellis M & Ellis J 1985 Microfungi on land plants. An identification handbook.
- Ellis MB & Gibson IAS 1975 *Stemphylium lycopersici*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 471. In Commonwealth Mycol. Inst., Ferry Lane. Kew, Surrey, England.
- Esmailzadeh M, Soleimani MJ & Rouhani H 2008 Exogenous applications of salicylic acid for inducing systemic acquired resistance against tomato stem canker disease. *Journal of Biological Sciences* **8** 1039–1044. (doi:10.3923/jbs.2008.1039.1044)
- Fan J, Hill L, Crooks C, Doerner P & Lamb C 2009 Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* **150** 1750–1761. (doi:10.1104/pp.109.137943)
- FAO-FAOSTA. Disponible en <http://fenix.fao.org/faostat/internal/es/#data/QC> (accedido en 2020)
- Fernandes MCA, Leite ECB & Moreira VE 2008 Defensivos alternativos. Programa Rio Rural, Niterói, (Manual Técnico 1). 17.
- Fernández Lozano J & Olaf Budde C 2018 Boletín de Frutas y Hortalizas. Tomate. **72**.
- Fernández Valiela M V. 1952 Introducción a La Fitopatología. Bs. As.872p
- Flores EM & Espinoza AM 1977 Morfología foliar de *Lycopersicon esculentum* Mill. (*Solanaceae*). *Revista de Biología Tropical* **25** 289–299.
- Franco E 2014 Caracterización morfológica y molecular de *Stemphylium*. UNLP.
- Franco MEE 2017 Primer reporte de *Stemphylium lycopersici* causando mancha gris de la hoja en pimiento en Argentina. Congreso Argentino de Fitopatología ; IV Congreso Argentino de Fitopatología (Mendoza, 2017)
- Franco MEE 2019 “Mancha Gris de la Hoja del Tomate: Identificación, Biología y Genómica del Agente Etiológico”. UNLP 237p
- Franco MEE, López S, Medina R, Saparrat MCN & Balatti P 2015 Draft genome sequence and gene annotation of *Stemphylium lycopersici* strain CIDEFI 216. *Genome Announcements* **3** 1–2. (doi:10.1128/genomeA.01069-15.Copyright)
- Franco ME, Ernesto, Troncozo MI, Marianela S, López Y, Lucentini G, Medina R, Carlos M, Saparrat N, Ronco LB *et al.* 2017a A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives

- which were genetically diverse and differed in their virulence. 983–1000. (doi:10.1007/s10658-017-1248-z)
- Franco MEE, Yanil López MS, Lucentini G, Troncozo MI, Saparrat MCN, Lía Ronco B & Balatti PA 2017b *Corynespora cassiicola* and *Stemphylium lycopersici* infection and disease development on tomatoes in Argentina. (doi:10.1007/s13314-017-0265-2)
- Franco MEE, Troncozo MI, López SMY, Lucentini G, Medina R, Saparrat MCN, Ronco LB & Balatti PA 2017c A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. *European Journal of Plant Pathology* **149** 983–1000. (doi:10.1007/s10658-017-1248-z)
- Galviz-Fajardo YC, Bortolin GS, Deuner S, do Amarante L, Reolon F & Munt do Moraes D 2020 Seed priming with salicylic acid potentiates water restriction- induced effects in tomato seed germination and early seedling growth. *Journal of Seed Science* **42** 1–12.
- García M 2015 Horticultura de La Plata ( Buenos Aires ). Modelo productivo irracionalmente exitoso. **114** 190–201.
- García M 2016 Capacidad competitiva y dinamismo en la horticultura de La Plata interpretada desde el enfoque basado en los aglomerados de empresas. *Huellas* **20** 100–124.
- García M & Hang GM 2007 Impacto de la devaluación de principios de 2002 en el Cinturón Hortícola Platense. Estrategias tecnológicas adoptadas, sus resultados y consecuencias. *Mundo Agrario* **8** 1–16.
- Giorni P, Battilani P & Magan N 2008 Effect of solute, matric potential and temperature on in vitro growth and sporulation of strains from a new population of *Aspergillus flavus* isolated in Italy. *Fungal Ecology* **1** 102–106.
- Gleason FH, Midgley DJ, Letcher PM & McGee P a 2006 Can soil *Chytridiomycota* survive and grow in different osmotic potentials? *Mycological Research* **110** 869–875. (doi:10.1016/j.mycres.2006.04.002)
- Godard J, Smail Z, Monot C, Le Corre D & Silué D 1999 Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection* **18** 397–405. (doi:10.1016/S0261-2194(99)00040-X)
- Gómez-Vásquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR & Cooper RM 2004 Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany* **94** 87–97.

(doi:10.1093/aob/mch107)

- Goodwin SB, Dunkle LD & Zismann VL 2001 Phylogenetic Analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* Based on the Internal Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Phytopathology* **91** 648–658. (doi:10.1094/PHYTO.2001.91.7.648)
- Gorlach J, Volrath S, Ward E, Ryals J, Kogel K-H, Knauf-Beiter G, Kessmann H, Oostendorp M, Beckhove U, Staub T *et al.* 1996 Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* **8** 629–643. (doi:10.2307/3870340)
- Gozzo F & Faoro F 2013 Systemic Acquired Resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61** 12473–12491.
- Groves JW & Skolko AJ 1944 Notes on seed-borne fungi: *Stemphylium*. *Canadian Journal of Research* **22c** 190–199. (doi:10.1139/cjr44c-016)
- Guerrero R 2016 Selección y efectividad del uso de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control del cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).
- Gunes, A; Inal, A; Alpaslan, M; Eraslan, F; Guneri Bagsi, E; Cicek, N 2007 Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zeamays L.*), grown under salinity. *J. Plant Physiol.* 164: 728–736.
- Gupta RP & Srivastava PK 1988 Control of *Stemphylium* blight of onion bulb crop. *Indian Phytopathology* **41** 495–496.
- Gutteridge JMC 1995 Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41** 1819–1828. (doi:7497639)
- Hammerschmidt R 2001 Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* 1–6.
- Hannon LC & Weber FG 1955 A leaf spot of tomato caused by *Stemphylium floridanum* sp. nov. *Phytopathology* **45** 11–16.
- Hao JJ, Subbarao K V & Duniway JM 2003 Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* Sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. *Phytopathology* **93** 443–450. (doi:10.1094/PHYTO.2003.93.4.443)
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I & Lorito M 2004 *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* **2** 43–56.
- Hemming D 2011 *Plant Sciences Reviews* 2010. CABI.

- Henry G, Thonart P & Ongena M 2012 PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors Guillaume. *S E Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16** 257–268.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF & Prange RK 1999 Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207** 604–611. (doi:10.1007/s004250050524)
- Hosen MI 2011 Cultural, physiological comparison and fungicidal sensitivity between two isolates of *Botrytis cinerea* and *Stemphylium botryosum*. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **23** 120–129.
- Hosen MI, Ahmed AU, Zaman J, Ghosh S & Hossain KMK 2009 Cultural and physiological variation between isolates of *Stemphylium botryosum* the causal of *Stemphylium blight* disease of lentil (*Lens culinaris*) **5** 94–98.
- Hossain I, Dey P & Hossain MZ 2011 Efficacy of Bion, Amistar and Tilt in controlling brown spot and narrow brown spot of rice cv . BR11 (Mukta). **9** 201–204.
- Huang C-H, Vallad GE, Zhang S, Wen A, Balogh B, Figueiredo JFL, Behlau F, Jones JB, Momol MT & Olson SM 2012 Effect of application frequency and reduced rates of Acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato *Plant Dis.* **96** 221–227. (doi:10.1021/es60160a605)
- Hussein MAM, Hassan MHA, Allam ADA & Abo-Elyousr KAM 2007 Management of *Stemphylium* blight of onion by using biological agents and resistance inducers. *Egyptian Journal of Phytopathology* **35** 49–58.
- Imathiu SM, Ray R V., Back M, Hare MC & Edwards SG 2008 *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded *in vitro* detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology* **124** 117–126. (doi:10.1007/s10658-008-9398-7)
- Inderbitzin P, Mehta YR & Berbee ML 2009 *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. *Mycologia* **101** 329–339. (doi:10.3852/08-071)
- Inskip WP & Bloom PR 1985 Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology* **77** 483–485. (doi:10.1104/pp.77.2.483)
- Irwin J, Dill-Macky R & Stirling M 1986 Taxonomic studies on Australian isolates of *Stemphylium*

- spp. and associated teleomorphs. *Australian Journal of Botany* **34** 281–292. (doi:10.1071/BT9860281)
- Jennings BYDH & Burkef RM 1990 Compatible solutes - the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. 277–283.
- Johnson DA 1987 First report in Washington state of the teleomorph of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of purple spot of asparagus. *Plant Dis.* 71:192.
- Joly P 1964 Le genre *Alternaria*. In *Encyclopedie Mycologique.*, p vol 33. Paul Lechevalier, Paris.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE & Zitter TA 1992 *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul, Minnesota: APS Press: Cambridge University Press. (doi:10.1017/S0014479700019980)
- Jones JDG & Dangl JL 2006 The plant immune system. *Nature* **444** 323–329. (doi:10.1038/nature05286)
- Jones JB, (ed.), Eng, Jones JP, (ed.), Stall RE, (ed.), Zitter TA & (ed.) 1991 Gray leaf spot. In *Compendium of tomato diseases*.
- Joosten MH & De Wit PJ 1989 Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3-beta-glucanases and chitinases. *Plant Physiology* **89** 945–951.
- Jurado M, Marín P, Magan N & González-Jaén MT 2008 Relationship between solute and matrix potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology* **74** 2032–2036. (doi:10.1128/AEM.02337-07)
- Kachroo A & Kachroo P 2009 Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **47** 153–176. (doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081820)
- Kamal A-E a. M, Mohamed HM a., Aly A a. D & Mohamed H a. H 2008 Enhanced onion resistance against *Stemphylium* leaf blight disease, caused by *Stemphylium vesicarium*, by dipotassium phosphate and benzothiadiazole treatments. *The Plant Pathology Journal* **24** 171–177. (doi:10.5423/PPJ.2008.24.2.171)
- Keisuke T & Toyozo S 2011 Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* **77** 342–344. (doi:10.1007/s10327-011-0337-7)
- Kendrick B 1992 *The Fifth Kingdom*. Focus Texts, Newburyport, USA.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S & Ryals J 1994 Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* **32** 439–459. (doi:10.1146/annurev.py.32.090194.002255)
- Kim B-S, Yu S-H, Cho H-J & Hwang H-S 2004 Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium*

- solani* and *S. lycopersici*. The Plant Pathology Journal **20** 85–91. (doi:10.5423/PPJ.2004.20.2.085)
- Király L, Barna B & Király Z 2007 Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. Journal of Phytopathology **155** 385–396. (doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01264.x)
- Kirk P, Cannon P, David J & Stalpers J 2004 Dictionary of the Fungi.
- Klessig DF, Choi HW & Dempsey DA 2018 Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. Molecular Plant-Microbe Interactions **31** 871–888. (doi:10.1094/mpmi-03-18-0067-cr)
- Klitgaard A, Iversen A, Andersen MR, Larsen TO, Frisvad JC & Nielsen KF 2014 Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. Analytical and Bioanalytical Chemistry **406** 1933–1943. (doi:10.1007/s00216-013-7582-x)
- Köhl J, Groenenboom-de Haas B, Goossen-van de Geijn H, Speksnijder A, Kastelein P, Hoog S & van den Ende BG 2009 Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. European Journal of Plant Pathology **124** 151–162. (doi:10.1007/s10658-008-9402-2)
- Koike ST & Henderson DM 2001 Leaf spot disease of spinach in California caused by *Stemphylium botryosum*. Plant Disease **85** 126–130.
- Koike ST, Van Berkum P, Wolf J, O'Neill N & Daugovish O 2013 *Stemphylium* leaf spot of parsley in California caused by *Stemphylium vesicarium*. Plant Disease **97** 315–322. (doi:10.1094/pdis-06-12-0611-re)
- Kuc J 1995 Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology **33** 275–297. (doi:10.1146/annurev.py.33.090195.001423)
- Kuč J 1982 Induced Immunity to Plant Disease. BioScience **32** 854–860. (doi:10.2307/1309008)
- Kuč J 2001 Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology **107** 7–12. (doi:10.1023/A:1008718824105)
- Kumar P 2007 Genetics of resistance to *Stemphylium* leaf blight of lentil (*Lens culinaris*) in the croos barimasur-4 x CDC Milestone.68 p
- Kunwar S, Paret ML, Freeman JH, Ritchie L & Olson SM 2017 Foliar applications of acibenzolar-S-methyl negatively affect the yield of grafted tomatoes in fields infested with *Ralstonia solanacearum*. **101** 890–894.
- Kurozawa C & Mussi L 1995 Avaliação de resistência em cultivares e híbridos de tomateiro à

- mancha de estenfilio. *Summa Phytopathologica* **21** 199–201.
- Kurozawa C & Pavan M 2005 Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. In Manual de Fitopatologia Vol II: Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Kurozawa, C. & Pavan M 1997 Doenças Do Tomateiro (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). Edição: 3. ed.
- Lacy ML 1982 Purple spot: a new disease of young asparagus spears caused by *Stemphylium vesicarium*. *Plant Disease* **66** 1198–1200.
- Laguerre M, Lecomte J & Villeneuve P 2007 Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* **46** 244–282. (doi:10.1016/j.plipres.2007.05.002)
- Lattanzio V, Lattanzio VMT & Cardinali A 2006 Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 2006: 23-67 ISBN: 81-308-0034-9
- Leach C & Aragaki M 1970 Effects of temperature on conidium characteristics of *Ulocladium chartarum* and *Stemphylium floridanum*. *Mycologia* **62** 1071–1076.
- Leguizamón ES 2018 Historia de La Horticultura. Ed INTA (doi:10.1016/j.angio.2014.05.001)
- Leskovar DI & Kolenda K 2002 Strobilurin + acibenzolar-S-methyl controls white rust without inducing leaf chlorosis in spinach. *Annals of Applied Biology* **140** 171–175. (doi:10.1111/j.1744-7348.2002.tb00170.x)
- Lira-Méndez K, Tamaulipas UA De, Académica U, Reynosa-aztlán M, Chapala L De, Aztlán C, Cp M, Mayek-pérez N, Politécnico I, Genómica CDB *et al.* 2006 Potencial osmótico variable en el crecimiento *in vitro* y la patogenicidad en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de *Fusarium* spp .
- Liu Y, Marmann A, Abdel-Aziz MS, Wang CY, Müller WEG, Lin WH, Mándi A, Kurtán T, Daletos G & Proksch P 2015 Tetrahydroanthraquinone derivatives from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*. *European Journal of Organic Chemistry* **2015** 2646–2653. (doi:10.1002/ejoc.201500079)
- Llorens E, García-Agustín P & Lapeña L 2017 Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola* **74** 90–100. (doi:10.1590/1678-992x-2016-0012)
- Llorente I & Montesinos E 2002 Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* **92** 99–104. (doi:10.1094/PHYTO.2002.92.1.99)

- van Loon LC 1997 Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103** 753–765.
- van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T & Conejero V 1994 Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12** 245–264. (doi:10.1007/BF02668748)
- van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ 2006 Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44** 135–162. (doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425)
- Lopes CA, Reis A & Ávila AC 2003 Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. Informe agropecuário: tomate para mesa. Epamig, Belo Horizonte, **24** 66–78.
- Lopes CA, Reis A & Boiteux L 2005 Doenças fúngicas. In: Ávila AC; Lopes CA. Doenças Fúngicas Do Tomateiro. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 17–52.
- López Lastra CC, Hajek AE & Humber RA 2002 Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* **80** 1126–1130.
- Louws FJ, Wilson M, Campbell HL, Cuppels D a., Jones JB, Shoemaker PB, Sahin F & Miller S a. 2001 Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* **85** 481–488. (doi:10.1094/PDIS.2001.85.5.481)
- Madamanchi, R N & Kuc J 1991 Induced systemic resistance in plants. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* 347–362.
- Madhusudhan KN, Deepak SA, Prakash HS, Kumar G, Jwa NS & Rakwal R 2008 Acibenzolar-S-Methyl (ASM)-induced resistance against *Tobamoviruses* involves induction of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and alternative oxidase (AOX) Genes. **2008** 127–134.
- Maia Junior S de OM, Andrade JR de, Nascimento R de, Lima RF de, Vasconcelos GN & Tavares AJF 2020 Indução de tolerância ao estresse salino em sementes de tomateiro condicionadas com ácido salicílico. *Applied Research & Agrotechnology* **13** 1–10. (doi:10.5935/PAeT.V13.)
- Malolepsza U 2006 Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Protection* **25** 956–962. (doi:10.1016/j.cropro.2005.12.009)
- Martínez-Villarreal R, Garza-Romero TS, Moreno-Medina VR, Hernández-Delgado S & Mayek-Pérez N 2016 Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos : el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología* **48** 347–357. (doi:10.1016/j.ram.2016.05.004)
- Matheron M & Porchas M 2002 Suppression of *Phytophthora* root and crown rot on pepper plants

- treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* **86** 292–297. (doi:Unsp D-2002-0111-01rDoi 10.1094/Pdis.2002.86.3.292)
- Medina R, Franco MEE, da Cruz Cabral L, Vera Bahima J, Patriarca A, Balatti PA & Saparrat MCN 2021a The secondary metabolites profile of *Stemphylium lycopersici*, the causal agent of tomato grey leaf spot, is complex and includes host and non-host specific toxins. *Australasian Plant Pathology* **50** 105–115.
- Medina R, Franco MEE, Lucentini CG, Rosso JA, Saparrat MCN, Bartel LC & Balatti PA 2021b Secondary metabolite gene clusters arrangement and conservation within the genome of *Stemphylium lycopersici* codes the pathways for the synthesis of specific and non-specific toxins. *Australasian Plant Pathology* **50** 51–72.
- Mehta YR 2001 Genetic diversity among isolates of *Stemphylium solani* from cotton. *Fitopatologia Brasileira* **26** 703–709.
- Mehta YR, Agron I & Postal C 1998 Severe outbreak of *Stemphylium* leaf blight, a new disease of cotton in Brazil. *Plant Disease* **82** 333–336.
- Mehta YR, Brogin RL, Paraná-iapar IA & Postal C 2000 Phytotoxicity of a culture filtrate produced by *Stemphylium solani* of cotton. *Plant Disease* **84** 838–842.
- Mello IS & Azevedo JL 2000 Controle Biológico. Embrapa.
- Meyer MP & Hausbeck MK 2000 Optimal fungicide management of purple spot of asparagus and impact on yield. *Plant Disease* **84** 525–530. (doi:10.1094/PDIS.2000.84.5.525)
- Min JY, Kim BS, Cho KW & Yu SH 1995 Grey leaf spot caused by *Stemphylium lycopersici* on tomato plants. *Korean J. Plant Pathol.* **11** 282–284.
- de Miranda B 2009 Identificação de acesso de *Solanum* spp. (Secção *Lycopersicon*) com resistência a murcha-de-verticílio (*Verticillium dahliae*) e a macha-de-estenfilio (*Stemphylium solani* E S. *lycopersici*).
- de Miranda B, Boiteux LS & Reis A 2010 Identificação de genótipos do gênero *Solanum* (seccao *Lycopersicon*) com resistência a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. *Horticultura Brasileira* **28** 178–184.
- Misra JK, Tewari JP & Deshmukh SK 2012 Systematic and evolution of Fungi. USA.
- Mitidieri MS 2009 Efecto del estrés térmico sobre la expresión de síntomas del virus de la ‘peste negra’ (TSWV) en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Universidad Nacional de Córdoba.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M & Van Breusegem F 2004 Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9** 490–498. (doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009)

- Mizubuti ESG & Brommonshenkel SH 1996 Doenças causadas por fungos em tomateiro. Informe Agropecuário **18** 7–14.
- Momol MT, Olson SM, Funderburk JE, Stavisky J, Marois JJ & Florida N 2004 Integrated management of Tomato Spotted Wilt on field-grown tomatoes. *Plant Disease* **88** 882–890.
- Montesinos E & Vilardell P 1992 valuation of FAST as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease* **76** 1221–1226.
- Montesinos E, Moragrega C, Llorente I, Vilardell P, Bonaterra A, Ponti I, Bugiani R, Cavanni P & Brunelli A 1995 Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytoparasitica* 586–592.
- Montesinos E, Bonaterra A, Ophir Y & Beer S V. 1996 Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. *Phytopathology* **86** 856–863.
- Moreau C & Moreau M 1947 Sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. *Bull Trimestr Soc Mycol France* **63** 58–71.
- Moss MO 1996 Mycotoxins. Centenary Review. *Mycological Research* **100** 513–523.
- Nasehi A, Kadir JB, Abidin MAZ, Wong MY & Ashtiani FA 2012a First report of gray leaf spot on pepper caused by *Stemphylium solani* in Malaysia. *Plant Disease* **96** 1227–1227. (doi:10.1094/PDIS-03-12-0262-PDN)
- Nasehi A, Kadir JB, Abidin MAZ, Wong MY & Mahmodi F 2012b First report of tomato gray leaf spot disease caused by *Stemphylium solani* in Malaysia. *Plant Disease* **96** 1226–1226. (doi:10.1094/PDIS-03-12-0223-PDN)
- Neergaard P 1945 Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Taxonomy, Parasitism, Economical Significance. Munksgaard, Copenhagen. 560 p
- Núñez Sánchez MA 2012 Efecto del agua electrolizada sobre el sistema antioxidante y la enzima mirosinasa en brócoli, mínimamente procesado. 40p
- Obradovic A, Jones JB, Momol MT, Balogh B & Olson SM 2004 Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR Inducers. *Plant Disease* **88** 736–740. (doi:10.1094/PDIS.2004.88.7.736)
- Obradovic A, Jones JB, Momol MT, Olson SM, Jackson LE, Balogh B, Guven K & Iriarte FB 2005 Integration of biological Control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease* **89** 712–716. (doi:10.1094/PD-89-0712)
- Obregon V 2018 Mancha gris de la hoja del Tomate. In Manual Técnico En Tomate Y Pimiento. Syngenta, p 47.

- Obregón V 2014 Guía para identificación de las enfermedades de tomate en invernadero. 54.
- Opoku N, Back M & Edwards S 2011 Aggressiveness of *Fusarium langsethiae* isolates towards wheat, barley and oats in an in vitro leaf assay. *Plant Breeding and Seed Science* **64** 55–63. (doi:10.2478/v10129-011-0028-8)
- Orozco-Santos M, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Farías-Larios J & Timmer LW 2004 Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) Incubado en Diferentes Medios de Cultivo Sólidos y Líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología* ISSN: **22** 423–428.
- Park S-W, Liu P-P, Forouhar F, Vlot a C, Tong L, Tietjen K & Klessig DF 2009 Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *The Journal of Biological Chemistry* **284** 7307–7317. (doi:10.1074/jbc.M807968200)
- Patiño, L.F. 2002. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka Negra en banano. p. 135-142. Memorias XV Reunión Internacional Asociación para la Cooperación en Investigaciones de bananos en el Caribe y la América Latina (ACORBAT), Cartagena de Indias, Colombia. Oct 27-nov 02 de 2002. Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA), Medellín, Colombia
- Pederson GA, Pratt RG & Brink GE 2000 Response to Leaf Inoculations with *Macrophomina phaseolina* in White Clover. *Crop Science* **40** 687–692.
- Pedras CMS & Chumala PB 2005 Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity. *Phytochemistry* **66** (1) 81–87.
- Pei Y-F, Wang Y, Geng Y, O'Neill NR & Zhang X-G 2010 Three novel species of *Stemphylium* from Sinkiang, China: their morphological and molecular characterization. *Mycological Progress* **10** 163–173. (doi:10.1007/s11557-010-0686-1)
- Penteado SR 1998 Os inimigos da cultura do pêssego. Grupo técnico viticultura e fruticultura de clima temperado, Campinas, SP. *Correio Agrícola* 488–489.
- Persico E 2016 Evaluación del efecto de prácticas combinadas en plantas de tomate injertadas cultivadas en un suelo infestado de nemátodos (*Nacobbus aberrans*). UNLP 28p
- Peteira B & Ondina L 2011 Interacciones hospedante-patógeno: logros y perspectivas en Cuba. **26** 137–143.
- del Pino M 2010 La resistencia sistémica adquirida en el patosistema rucula (*Eruca sativa*)- Downy

- mildew (*Hyaopenospora parasitica*). UNCuyo 126p
- Pittelkow CM, Liang X, Linqvist BA, van Groenigen KJ, Lee J, Lundy ME, van Gestel N, Six J, Venterea RT & van Kessel C 2015 Productivity limits and potentials of the principles of conservation agriculture. *Nature* **517** 365–368. (doi:10.1038/nature13809)
- Polack A 2008 Interacciones tritróficas involucradas en el control de plagas de cultivos hortícolas. UNLP.
- Polack A & Mitidieri M 2005 Producción de tomate diferenciado. Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades Ediciones. *INTA*.
- Polat Z, Besirli G, Sönmez İ & Yavuz B 2012 First report of *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) caused by *Stemphylium vesicarium* in Turkey. *New Disease Reports* (2012) **25**, 29.
- Polfliet M 2002 Infection of *Stemphylium* increases every year. *Fruitteelt* (Den Haag) **92** 16–17.
- Ponti I & Laffi F 1993 Malattie crittogamiche delle piante da frutto. Edizioni L'informatore Agrario, Verona, Italy.
- Ponti I, Cavanni P & Brunelli A 1982 Maculatura bruna delle pere: eziologia e difesa. *Informatore Fitopatologico* **32** 35–40.
- Pradhanang PM, Ji P, Momol MT, Olson SM, Mayfield JL, Extension GC, Jones JB & Hall F 2005 Application of acibenzolar- S -methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* **89**.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S & Kahmann R 2015 Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66** 513–545. (doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114623)
- Quiroga M, Guerrero C, Botella M a, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H & Valpuesta V 2000 A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* **122** 1119–1127.
- Ramesh Sundar a., Viswanathan R & Nagarathinam S 2009 Induction of systemic acquired resistance (SAR) using synthetic signal molecules against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane. *Sugar Tech* **11** 274–281. (doi:10.1007/s12355-009-0047-z)
- Ramirez ML, Chulze S & Magan N 2004 Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* **23** 117–125. (doi:10.1016/J.CROPRO.2003.07.005)
- Ramteke PK 2019 Effect of resistance inducers on in vitro inhibition of mycelial growth and sporulation of *Fusarium solani* causing root rot of fenugreek. *Plant Pathology & Quarantine* **9**

198–209. (doi:10.5943/ppq/9/1/18)

- Rangel Sánchez G, Mercado Castro E, Beltran Peña E, Reyes de la Cruz H & Garcia Pineda E 2010 El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* **12** 90–95.
- Ravi I, Varshney S, Sharma G, Dwivedi V & Behera KK 2012 Studies on activation of Systemic Acquired Resistance (SAR) by Heterocyclic Compounds having azole groups in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Not Bot Horti Agrobo* **40** 74–85.
- Realise D, Castagne P, Coupard H, Kaluzny-Pinon L, Reynier C, Waligora C & Zambujo C 2002 En France: l'année 2002 se fait la poire belle. *Arboriculture Fruitière* Re **565** 25–42.
- Reis A & Boiteux LS 2006a Círculo de hospedeiras de isolados de *Stemphylium solani*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 18 ISSN 1677-2229
- Reis A & Boiteux LS 2006b Mancha-de-estenfilio: ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. *Embrapa Hortaliças. Circular Técnica* **41** 1–10.
- Reis A & Boiteux LS 2006c Resistencia de acessos de Lycopersicon a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 22. ISSN 1677-2229
- Resende ML V, Salgado SML & Chaves ZM 2003 Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a aatógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130. 2003.
- Rice-Evans C, Miller N & Paganga G 1997 Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2** 152–159. (doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Ringuelet J & Viña S 2013 *Productos Naturales Vegetales*. UNLP (doi:http://doi.org/10.1093/aob/mcn043)
- Ritchie F, McQuilken MP & Bain RA 2006 Effects of water potential on mycelial growth, sclerotial production, and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. *Mycological Research* **110** 725–733. (doi:10.1016/J.MYCRES.2006.04.008)
- Rizo-Mustelier M, Vuelta-Lorenzo DR & Lorenzo-Garcia AM 2017 Agricultura, desarrollo sostenible, medioambiente, saber campesino y universidad *Ciencia En Su PC* 106–120.
- Da Rocha AB & Hammerschmidt R 2005 History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology* **15** 518–529.
- Romero a. M, Kousik CS & Ritchie DF 2001a Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by Acibenzolar-S-Methyl. *Plant Disease* **85** 189–194. (doi:10.1094/PDIS.2001.85.2.189)
- Romero AM, Kousik CS & Ritchie DF 2001b Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by Acibenzolar- S -Methyl. *Plant Disease* **85** 189–194. (doi:10.1094/PDIS.2001.85.2.189)
- 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. UNLP.

- Rossi V & Patteri E 2009 Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of Trichoderma-based products. *Biological Control* **49** 52–57. (doi:10.1016/j.biocontrol.2008.12.012)
- Rossmann AY, Crous PW, Hyde KD, Hawksworth DL, Aptroot A, Bezerra JL, Bhat JD, Boehm E, Braun U, Boonmee S *et al.* 2015 Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes. *IMA Fungus* **6** 2 507–523. (doi:10.5598/imafungus.2015.06.02.14)
- Rotem J & Bashi E 1977 A review of the present status of the *Stemphylium* complex in tomato foliage. *Phytoparasitica* **5** 45–58.
- Rotem J, Cohen Y & Wahl I 1966 A new tomato foliage disease in Israel caused by *Stemphylium botryosum*. *Can. J. Plant Sci.* **46** 265–270.
- Ruiz JM & Romero L 2001 Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants. *Studies in Natural Products Chemistry* **25** 651–681.
- Ruiz-Dueñas FJ & Martínez ÁT 2009 Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology* **2** 164–177. (doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x)
- Ruiz Dueñas FJ 1998 Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Universidad Complutense de Madrid 164p
- Ruscitti M 2016 La micorrización modifica la respuesta de las plantas de pimiento en presencia de cobre en el suelo. UNLP 193p
- Ryals J, Uknes S & Ward E 1994 Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* **104** 1109–1112.
- Sakr N 2018 Components of quantitative resistance in barley plants to *Fusarium* head blight infection determined using three in vitro assays. *Journal of Plant Protection Research* **58** 176–183. (doi:10.24425/122933)
- Saksirirat W, Chareerak P & Bunyatrachata W 2009 Asian Journal of Food and Agro-Industry. *Asian Journal of Food Agro-Industry* **9** 99–104.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1546p
- Sanchez Rojo S 2010 Respuesta antioxidante al tratamiento con ácido salicílico en plantas de papa infectadas con fitoplasma. México. 67p
- Sanzón Gómez D & Zavaleta Mejía E 2011 Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* **29** 154–164.
- Saparrat MCN, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT & Martínez MJ 2002 Induction, isolation,

- and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloropsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* **68** 1534–1540. (doi:10.1128/AEM.68.4.1534-1540.2002)
- Sarandon S & Flores C 2014 Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. UNLP (doi:10.1111/j.1600-0579.2011.00721.x)
- Sarandón S 2002 Agroecología: el camino hacia una agricultura sustentable. UNLP
- Sarandón SJ 2014 Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables.
- Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR & Cruz MES 2000 Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta* **30** 129–137.
- Scott JW 1998 University of florida tomato breeding accomplishments and future directions. In *Repinted Soil and Crop Sciences Society of Florida, Proceedings*, pp 16–18.
- Shahin EA & Shepard JF 1978 An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology* **69** 618–620. (doi:10.1016/S0007-1536(87)80160-2)
- da Silva S da C 2011 Caracterização de fungos do género *Stemphylium* associados a pomóideas em Portugal. Instituto Superior de Agronomia. Universidad Técnica de Lisboa. 58p
- Simmons EG 1969 Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia* **61** 1–26.
- Simmons EG 1985 Perfect states of *Stemphylium* II. *Mycologia* **38** 284–293.
- Simmons EG 1989 Perfect states of *Stemphylium* III. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **49** 305–307.
- Simmons EG 2001 Perfect states of *Stemphylium* IV. *Harvard Papers in Botany* **6** 199–208.
- Simmons EG, Road T & Simmons CEG 2004 Novel dematiaceous hyphomycetes. *Studies in Mycology* **50** 109–118.
- Singleton VL & Rossi JA 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16** 144–158.
- Skłodowska M, Gajewska E, Kuźniak E, Mikiciński A & Sobiczewski P 2010 BTH-mediated antioxidant system responses in apple leaf tissues. *Scientia Horticulturae* **125** 34–40. (doi:10.1016/j.scienta.2010.02.019)
- Smith-Becker J, Keen NT & Becker JO 2003 Acibenzolar-S-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and *Cucumber Mosaic Virus* in cantaloupe. *Crop Protection* **22** 769–774. (doi:10.1016/S0261-2194(03)00044-9)
- Sofi TA, Beig MA, Dar GH, Ahmad M, Hamid A, Ahangar FA, Padder BA & Shah MD 2013 Cultural, morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria mali*

- associated with *Alternaria* leaf blotch of apple. **12** 370–381. (doi:10.5897/AJB12.2735)
- Staskawicz BJ 2002 Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* **125** 73–76. (doi:10.1104/pp.125.1.73)
- Sticher L, Mauch-Mani B & Métraux JP 1997 Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35** 235–270. (doi:10.1146/annurev.phyto.35.1.235)
- Stocco MC 2013 Control biológico de *Mycosphaerella graminicola* con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. UNLP
- Subash S & Saraswati N 2016 Effect of incubation temperature on mycelial growth, conidial features and density of *Stemphylium botryosum* Walr. isolates. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* **12** 80–89.
- Suheri H & Price T V. 2000a Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. *Plant Pathology* **49** 375–382. (doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00458.x)
- Suheri H & Price T V. 2000b *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* **29** 192–199. (doi:10.1071/AP00034)
- Takeuchi J & Horie H 1997 Occurrence of leaf spot of drummond phlox caused by *Stemphylium botryosum*. *Proceedings of the Kanto Tosan Plant Protection Society* **44** 171–173.
- Tally A, Oostendorp M, Lawton K, Staub T & Bassi B 1999 Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. In: *Induced Plant Defences against Pathogens and Herbivores; Biochemistry, Ecology and Agriculture*, pp 357–369. Ed E Agrawal, A.A.; Tuzun, S.; Bent. St. Paul, MN, USA.
- Terry L 2004 Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* **32** 1–13. (doi:10.1016/j.postharvbio.2003.09.016)
- Tijerina-Ramírez N, Lira-Méndez K, Moreno-Medina VR, González-Prieto JM & Mayek-Pérez N 2014 Efecto del estrés osmótico in vitro en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Micología* **39** 31–39.
- Töfoli JG & Domingues RJ 2005 Controle da pinta preta do tomateiro com o uso de acibenzolar-s-metil isolado, em mistura com fungicidas e em programas de aplicação. 481–487.
- Toledo VM 2000 Ecología y autosuficiencia alimentaria : hacia una opción basada en la diversidad biológica, ecológica y cultural de México. Siglo Veintiuno. 118p
- Trigos Á, Mendoza G, Espinoza C, Salinas A, Fernández J & Norte M 2011 The role of

- macrosporin in necrotic spots. *Phytochemistry Letters* **4** 122–125.
- Triki E, Trabelsi I, National I & Recherche D 2018 Effect of benzothiadiazole and salicylic acid rInducers on orobanche foetida infestation in *Vicia faba* effect of benzothiadiazole and osalicylic acid resistance inducers on *Orobanche foetida* infestation in *Vicia faba*.
- Ulloa M & Hanlin RT 2006 Nuevo diccionario ilustrado de Micología. American Phytopathological Society. 672 p
- Vakalounakis DJ & Markakis EA 2013 First Report of *Stemphylium solani* as the causal agent of a leaf spot on greenhouse cucumber. *Plant Disease* **97** 287–287. (doi:10.1094/PDIS-08-12-0776-PDN)
- Vallad GE & Goodman RM 2004 Systemic Acquired Resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* **44** 1920–1934.
- Vera Bahima J, Dal Bello G & Mónaco C 2009 Hongos habitantes del filoplano de tomate como potenciales antagonistas de *Botrytis cinerea*. XIII Jornadas Fitosanitarias. Argentinas UNSE
- Vera Bahima J, Bárcena A, Saparrat M, Ronco B & Balatti P 2011 Crecimiento y Pigmentación de *Stemphylium* sp., agente causal de la mancha gris de la hoja de tomate: su respuesta al estrés osmótico y salino. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*. 46(Supl.) 2.
- Vieira Ferreira F 2014 Caldas alternativas no controle de mancha-de-estenfilio (*Stemphylium solani*) em tomateiro, sob manejo orgânico na baixada fluminense. (doi:http://dx.doi.org/10.4236/ojo.2014.48035)
- Villardel P 1988 *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. *Fruticultura Profesional* **18** 51–55.
- Vlot AC, Klessig DF & Park S-W 2008 Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* **11** 436–442. (doi:10.1016/J.PBI.2008.05.003)
- Vlot a C, Dempsey DA & Klessig DF 2009 Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47** 177–206. (doi:10.1146/annurev.phyto.050908.135202)
- Wallroth CFW 1883 *Flora Cryptogamica Germaniae: pars posterior continens Algas et Fungos. Nürnberg (Norimbergae, Sumtibus JL Schragii)*. Compendium Flora Germanicae Sectio II, Plantae cryptogamicae S. cellulosa scripserunt Math. Jos. Bluff et Carol. Ant. Fingerhath.
- Walters D, Walsh D, Newton A & Lyon G 2005 Induced Resistance for Plant Disease Control : Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. *Phytopathology* 1368–1373.
- Wang Y, Geng Y, Pei YF & Zhang XG 2009 Molecular and morphological description of two new species of *Stemphylium* from China and France. *Mycologia* **102** 708–717. (doi:10.3852/09-

- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-goy P, Métraux J, Ryals JA & Carolina N 1991 Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **3**.
- Warnock SJ 1990 Tomato evolution and its implications for tomato culture. *Horticultural Science* **25** 139–140.
- Weber GF 1930 Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani* sp. nov. *Phytopathology* **20** 513–518.
- Weber H 2002 Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **7** 217–224.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp 325–322. Ed WTJ (eds) Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. San Diego.
- Wiltshire SP 1938 The original and modern conceptions of *Stemphylium*. *Transactions of the British Mycological Society* **21** 211–239. (doi:10.1016/S0007-1536(38)80024-3)
- Woudenberg JHC, Hanse B, van Leeuwen GCM, Groenewald JZ & Crous PW 2017 *Stemphylium* revisited. *Studies in Mycology* **87** 77–103. (doi:10.1016/j.simyco.2017.06.001)
- Wu P-C, Tsai J-C, Li F-C, Lung S-C & Su H-J 2004 Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China. *Atmospheric Environment* **38** 4879–4886. (doi:10.1016/J.ATMOSENV.2004.05.039)
- Wu H, Luo J, Raza W, Liu Y, Gu M, Chen G, Hu X, Wang J, Mao Z & Shen Q 2010 Effect of exogenously added ferulic acid on in vitro *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Scientia Horticulturae* **124** 448–453. (doi:10.1016/j.scienta.2010.02.007)
- Zhang X, Wu Y & Zhang T 2003 Taxonomic studies of *Stemphylium* from China. *Mycotaxon* **85** 247–252.
- Zheng L, Lv R, Hsiang T & Huang J 2009 Host range and phytotoxicity of *Stemphylium solani*, causing leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in China. *European Journal of Plant Pathology* **124** 21–30. (doi:10.1007/s10658-008-9387-x)
- Zheng L, Lv R, Huang J, Jiang D, Liu X & Hsiang T 2010 Integrated control of garlic leaf blight caused by *Stemphylium solani* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* **32** 135–145. (doi:10.1080/07060661.2010.484233)
- Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Le Corre D & Silué D 2001 Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)-downy

mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* **50** 579–586. (doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00609.x)