



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN DE LOS
ESPORANGIOS DE *Phytophthora
betacei* PRODUCIDOS EN MEDIOS
ARTIFICIALES Y EN LESIONES DE
HOJAS de *Solanum betaceum***

Diana Paola Ortiz Estupiñan

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Instituto de biotecnología IBUN
Bogotá, Colombia
2021

CARACTERIZACIÓN DE LOS ESPORANGIOS DE *Phytophthora betacei* PRODUCIDOS EN MEDIOS ARTIFICIALES Y EN LESIONES DE HOJAS de *Solanum betaceum*

Diana Paola Ortiz Estupiñan

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Microbiología

Directora:

Ph.D. Silvia Restrepo Restrepo

Codirector:

Ph.D. Camilo López Carrascal

Línea de Investigación:

Fitopatología

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes LAMFU

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Instituto de biotecnología IBUN

Bogotá, Colombia

2021

Agradecimientos

A mi directora, la doctora Silvia Restrepo, porque sin conocerme me dio todo su apoyo y me abrió las puertas de su laboratorio de investigación, LAMFU - Laboratorio de micología y fitopatología de la Universidad de los Andes.

A mi codirector, el doctor Camilo López, quien atendió mis solicitudes durante el desarrollo del proyecto, respondiendo oportunamente a las necesidades que se presentaron en el camino.

A todos los miembros del LAMFU, ya que la fitopatología era un tema completamente nuevo para mí y todos estuvieron dispuestos a ayudarme y orientarme, en especial la doctora Martha Cárdenas, M.Sc. María Camila Buitrago y M.Sc. Angelis Marbello.

Al doctor William Fry de la Universidad de Cornell por instruir la pregunta de investigación que se desarrolló en este proyecto.

Por último, infinitas gracias a mi padre y hermanos por su paciencia y por todo el amor que me han brindado siempre.

Resumen

Caracterización de los esporangios de *Phytophthora betacei* producidos en medios artificiales y en lesiones de hojas de *Solanum betaceum*.

El género *Phytophthora* es responsable de causar graves enfermedades a las plantas. En los últimos años, se han publicado varios estudios sobre si el comportamiento expresado en germinación y virulencia, entre otros, de los esporangios de *P. infestans* difiere según su fuente de producción, ya sea *in vivo* (en hojas) o *in vitro* (en cajas de Petri). Dado que recientemente se describió una nueva especie, *Phytophthora betacei*, que infecta los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia, el objetivo de este estudio fue determinar si existen diferencias entre los esporangios de *P. betacei* provenientes de medios de cultivo con los producidos en su hospedero natural. Para ello, se evaluó la morfología de los esporangios, el número de horas hasta la aparición de los primeros síntomas en el hospedero, el área de lesión y la tasa de esporulación. Esto se hizo exponiendo *P. betacei* a dos condiciones de temperatura, favoreciendo la germinación directa (Temperatura ambiente aprox. 20°C) o indirecta (4°C) de los esporangios. No se evidenciaron diferencias en las tasas de esporulación ni en el área de lesión; mientras que el tiempo de aparición de los primeros síntomas fue más corto en los esporangios provenientes de hojas; además, los esporangios que habían sido previamente incubados a 4°C generaron síntomas más rápidamente. A nivel morfológico, se evidenciaron diferencias en sus dimensiones, dependiendo si provienen de hoja o de medio de cultivo, y a nivel molecular, se pudo concluir que los esporangios presentaron cambios en la expresión de genes asociados a la respuesta al estrés, elicinas y metabolismo de azúcares dependiendo su origen. Dichos resultados son muy importantes para guiar el trabajo en laboratorios de fitopatología y sugieren trabajar con esporangios o en general propágulos provenientes de tejido vegetal en los experimentos de laboratorio.

Palabras clave: Tomate de árbol, *Phytophthora betacei*, *Solanum betaceum*.

Abstract

Characterization of *Phytophthora betacei* sporangia produced in artificial media and in *Solanum betaceum* leaf lesions.

The genus *Phytophthora* is responsible of causing serious plant diseases. In recent years, several published studies have started a controversy on whether *P. infestans*' sporangia behavior differs according to their production source, either produced *in vivo* (leaves) or *in vitro* (Petri dishes). Because a new species was recently described, *Phytophthora betacei* infecting tree tomato crops (*Solanum betaceum*) in Colombia, the aim of this study was to determine if there are differences between *P. betacei* sporangia coming from culture media with those produced on its natural host. To this end, we evaluated the morphology of sporangia, the number of hours until the first symptoms appeared in the host, the lesion area and sporulation rate. This was done by exposing *P. betacei* to two temperature conditions, favoring the sporangia's direct (room temperature aprox. 20°C) or indirect (4°C) germination. We observed that there were not differences in sporulation rates or lesion area. On the other hand, the time until the appearance of symptoms was shorter for sporangia coming from leaflets. Furthermore, the sporangia that had been previously incubated at 4°C generated symptoms faster for the appearance of symptoms. Morphological observations prove changes in the dimensions of the sporangia, depending on coming from leaflets or growing medium. At the molecular level, we concluded that sporangia *P. betacei* presented changes in the expression of genes that responded to stress and elicitors, whether produced *in vivo* or *in vitro*. These results are important for the experiments in plant pathology laboratories, and they suggest that we should work with sporangia from leaves in all laboratory experiments.

Keywords: Tree tomato, *Phytophthora betacei*, *Solanum betaceum*.

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Abstract	VI
Contenido.....	VII
Lista de figuras	X
Lista de tablas.....	XV
Introducción.....	1
1. Justificación	4
2. Marco teórico.....	7
2.1 Generalidades del tomate de árbol.	7
2.1.1 Características y biología	7
2.1.2 Condiciones agroclimáticas	10
2.1.3 Beneficios nutricionales e importancia económica	10
2.1.4 Enfermedades y plagas	12
2.2 Generalidades del género <i>Phytophthora</i>.	13
2.3 Descripción de la especie <i>Phytophthora betacei</i>.	18
3. Objetivos.....	20
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos	20
4. Hipótesis.....	21
5. Materiales y métodos	22

5.1 Cepas de <i>Phytophthora betacei</i>.	2
Marcador no definido.	
5.2 Selección de los medios de cultivo, aislamiento de <i>Phytophthora betacei</i> más agresivo y la variedad de <i>Solanum betaceum</i> más susceptible.	23
5.2.1 Medios de cultivo	23
5.2.2. Ensayos sobre hojas <i>S. betaceum</i> para la selección de unidades de análisis: medio óptimo para colección de esporangios, aislamiento más agresivo y variedad de tomate más susceptible.	24
5.3 Ensayos de germinación de esporangios de <i>Phytophthora betacei</i> provenientes de medio de cultivo y de lesiones de hoja, expuestos a dos temperaturas diferentes.	25
5.3.1 Morfología de los esporangios	26
5.3.2 Virulencia de los esporangios	26
5.4 Evaluación de la expresión génica de esporangios de <i>Phytophthora betacei</i> provenientes de medio de cultivo y de lesiones de hoja, expuestos a dos temperaturas distintas.	26
5.4.1 Extracción de ARN	27
5.4.2 Obtención de ADNc	22
5.4.3 Primers	28
5.5.4 RT-PCR	29
6. Resultados	211
6.1 Medios de cultivos para colección de esporangios de <i>Phytophthora betacei</i>.	31
6.2 Establecimiento de unidades de análisis: aislamiento de <i>Phytophthora betacei</i> más agresivo, variedad de <i>Solanum betaceum</i> más susceptible y medio de cultivo óptimo para recolección de esporangios.	33
6.3 Análisis fisiológico.	35
6.3.1 Evaluación del efecto del origen de los esporangios de <i>P. betacei</i> en su morfología	35
6.3.2 Evaluación del efecto del origen de los esporangios en la virulencia de <i>P. betacei</i>	38
6.4 Evaluación del efecto del origen de los esporangios de <i>P. betacei</i> (medio de cultivo y hoja desprendida) en sus características moleculares.	40

7. Discusión	44
8. Conclusiones y recomendaciones	50
9. Referencias	52
A. Anexo 1: Protocolo de infección de <i>Phytophthora betacei</i> sobre hojas de <i>Solanum betaceum</i>	59
B. Anexo 2: Geles de agarosa	63

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 2-1: Características del tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>). A. Flores, B. Fruto, C. Plantas jóvenes.	9
Figura 2-2: Tizón tardío de la papa causado por <i>Phytophthora infestans</i> . A: Esporangios: Estos se dispersan por vía aérea y se depositan sobre la superficie de las hojas de papa. B: Los esporangios liberan zoosporas móviles en condiciones óptimas de humedad C: Penetración: Ocurre cuando atraviesan la epidermis de la hoja, se produce a través de la producción de apresorios. D y E: Síntomas de la enfermedad (Esporulación de lesiones necróticas en el cultivar susceptible en condiciones de campo, Borgeby, Suecia 2015.	18
Figura 2-3: Características de <i>Phytophthora betacei</i> (Modificado de Mideros et al., 2018). A. Relaciones filogenéticas de los aislados de <i>Phytophthora betacei</i> y las especies estrechamente relacionadas. B. Especificidad de hospedero por medio de ensayos de infección en <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Phytophthora betacei</i> y <i>Phytophthora andina</i> en papas (<i>Solanum tuberosum</i>), tomate de mesa (<i>Solanum lycopersicum</i>) y tomates de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) después de 216 horas después de la inoculación (hpi) C. Esporangio de <i>Phytophthora infestans</i> D. Esporangios de <i>Phytophthora betacei</i> E. Esporangio de <i>Phytophthora andina</i>	19
Figura 6-1: Colonias de <i>Phytophthora betacei</i> después de quince días de incubación a temperatura ambiente. De izquierda a derecha se visualiza el crecimiento en medio TTA, PDA y CMA. Las cajas de arriba corresponden al aislamiento N9035 y las de abajo al P8084.	32

- Figura 6-2:** Comportamiento de dos aislamientos *Phytophthora betacei* en tres medios de cultivo (TTA, PDA y CMA), después de 15 de incubación a temperatura ambiente. De izquierda a derecha, el crecimiento en términos de porcentaje de cobertura de la caja (anova: $F= 845,72$; $p <0,001$) y la esporulación (esporangios/ml) anova: $F= 2.46$; $p=0,018$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p <0,05$).**32**
- Figura 6-3:** Esporulación (esporangios/mL) en dos aislamientos de *Phytophthora betacei* de izquierda a derecha aislamiento N9035 Y P8084 a los 9 días posteriores a la inoculación con esporangios provenientes de los medios de cultivo TTA y PDA, en hojas de dos variedades (rojo y común) de *Solanum betaceum* (Anova: $F= 7,67$ $p=0,008$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p <0,05$).**34**
- Figura 6-4:** Área de lesión (mm^2) a los 9 días posteriores a la inoculación con esporangios provenientes de los medios de cultivo TTA y PDA de *Phytophthora betacei* de izquierda a derecha aislamiento N9035 Y P8084, evaluada en hojas *Solanum betaceum* (rojo y común) (anova: $F= 21,33$; $p=0,01$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p <0,05$).**35**
- Figura 6-5.** Proporción largo:ancho de esporangios *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y de medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C , observados a los 9 días posteriores a la inoculación (Anova: $F=7,72$; $p=0.04$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p <0,05$).**37**
- Figura 6-6.** Esporangio de *Phytophthora betacei* (P8084) aislado de lesiones en hojas de *Solanum betaceum* variedad común observado mediante microscopía óptica A. Inóculo de infección proveniente de hojas *Solanum betaceum* B. Inóculo de infección proveniente de medio de cultivo TTA.**37**
- Figura 6-7.** Esporulación (esporangios/mL) anova: $F=9,30$ $p=0.39$ y área de lesión (mm^2) anova; $F=0,43$ $p=0.51$, producida a los 9 días posteriores a la inoculación por *Phytophthora betacei* (P8084) proveniente de hojas *Solanum betaceum* variedad común y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C**38**

- Figura 6-8.** Tiempo (horas) de aparición de los primeros puntos de necrosis producidos por *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas de *Solanum betaceum* variedad común y de medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. Los tratamientos que no comparten al menos una letra indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).....**39**
- Figura 6-9.** Hojas de *Solanum betaceum* variedad común infectadas con *Phytophthora betacei* (P8084). A. Día uno de la infección. B. Punto de infección a las 35 horas posteriores a la inoculación, usando una suspensión de esporangios provenientes del medio de cultivo TTA conservada a temperatura ambiente. C. Día noveno posterior a la inoculación D. Punto de infección a las 35 horas posteriores a la inoculación, usando una suspensión de esporangios provenientes de medio de cultivo expuesto a 4°C. **40**
- Figura 6-10.** Expresión de elicinas (INF4, INF6 e INF2B) en esporangios de *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. A. Expresión absoluta de elicinas normalizada con actina (anova: $F = 18,71$; $p = 0,006$), los tratamientos que no comparten al menos una letra indican que son significativamente diferentes (Tukey $p < 0,05$). B. Evaluación del efecto de la temperatura y el origen de los esporangios, con base en la expresión relativa de elicinas (método Pfaffl) respecto a los esporangios provenientes de medio de cultivo expuestos a 4°C (inóculo empleado rutinaria en los laboratorios). **41**
- Figura 6-11.** Expresión de genes vinculados en la respuesta al estrés en esporangios de *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. A. Expresión absoluta de genes vinculados en la respuesta al estrés normalizada con actina, los tratamientos que no comparten al menos una letra indican que son significativamente diferentes (Tukey $p < 0,05$). B. Evaluación del efecto de la temperatura y el origen de los esporangios, con base en la expresión relativa de genes vinculados en la respuesta al estrés (método Pfaffl) respecto a los esporangios provenientes de medio de cultivo, expuestos a 4°C (inóculo empleado rutinaria en los laboratorios). El cambio de la expresión del gen *PITG_13006/MFS* corresponde a la escala en rojo. **42**

- Figura 6-12.** Expresión de genes vinculados al metabolismo de azúcares en esporangios de *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. A. Expresión absoluta de genes asociados al metabolismo de azúcares normalizada con actina, los tratamientos con letras distintas indican que son significativamente diferentes (Tukey $p < 0,05$). B. Evaluación del efecto de la temperatura y el origen de los esporangios, con base en la expresión relativa de genes asociados al metabolismo de azúcares (método Pfaffl) respecto a los esporangios provenientes de medio de cultivo, expuestos a 4°C (inóculo empleado rutinaria en los laboratorios). **43**
- Figura 8-1.** Resumen de resultados del estudio “Caracterización de los esporangios de *Phytophthora betacei* producidos en medios artificiales y en lesiones de hojas de *Solanum betaceum*”. **51**
- Figura A-1.** Lavados para el proceso de desinfección de hojas desprendidas *Solanum betaceum*. **59**
- Figura A-2.** Conservación de hojas *Solanum betaceum* en cámaras húmedas. **62**
- Figura B-1.** Gel de agarosa al 1,5% mostrando la amplificación de 300 pb del RNA obtenido de hojas *Solanum betaceum* variedad común infectadas con *Phytophthora betacei* (P8084) mediante cuatro tipos de inóculo (M1, M2, M3 y M4). MPM= Marcador de peso molecular 100bp+3K DNA Ladder *Smobio*. MN=Muestra no seleccionada (descartada), M1= Suspensión de esporangios conservada a temperatura ambiente proveniente de hojas *S. betaceum*, M2= Suspensión de esporangios expuesta a 4°C proveniente de hojas *S. betaceum*, M3= Suspensión de esporangios conservada a temperatura ambiente proveniente del medio de cultivo TTA, M3= Suspensión de esporangios expuesta a 4°C proveniente del medio de cultivo TTA, (C-) = Control negativo. **63**
- Figura B-2.** Gel de agarosa al 1% como control de amplificación por PCR para evaluación de primers correspondientes a nueve genes, 1= *PITG_14461*, 2= *PITG_12562*, 3= *PITG_12556*, 4= *PITG_12872*, 5= *PITG_09907*, 6= *PITG_13006* 7= *PITG_14993* 8= *PITG_12551*, 9= *PITG_21410*, MPM= Marcador de peso molecular 100bp+3K DNA Ladder *Smobio*, (C-) = Control negativo. La letra P corresponde a ADNc

obtenido de micelio de *Phytophthora betacei* y la letra *I* corresponde a ADNc de micelio de *Phytophthora infestans*.**64**

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 2-1: Composición nutricional del fruto <i>Solanum betaceum</i>	11
Tabla 5-1: Descripción de aislamientos N9035 y P8084 de <i>Phytophthora betacei</i>	22
Tabla 5-2: Genes expresados diferencialmente en esporangios de <i>Phytophthora infestans</i> Genotipo US-23 procedentes de hojas de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> y de medio de cultivo arveja/centeno, identificados por Fry y colaboradores en 2019 y seleccionados para el análisis de expresión en este estudio.....	27
Tabla 5-2: Secuencia de Primers utilizados para evaluar efecto del origen de los esporangios sobre la expresión de genes específicos de <i>Phytophthora betacei</i> por qRT-PCR.	28
Tabla 6-1: Dimensiones de los esporangios <i>Phytophthora betacei</i> (P8084), provenientes de hojas <i>Solanum betaceum</i> y de medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C y observados a los 9 posteriores a la inoculación.	36

Introducción

Phytophthora (del griego 'destructor de plantas') pertenece al grupo de los protistas, la familia *Peronosporaceae*, orden *Peronosporales*, clase *Peronosporomycetes*, reino *Stramenipila*; es un oomiceto responsable de enfermedades graves en los ecosistemas naturales, así como en la agricultura y la horticultura (Drenth & Guest, 2013). Debido a su capacidad infecciosa y fácil propagación, cuando las condiciones ambientales son favorables, puede producir pérdidas de cultivos de hasta el 100% (Hyun & Choi, 2014). Se ha estimado que a escala mundial, más del 66% de todas las enfermedades de las raíces finas y más del 90% de todas las pudriciones del cuello de las plantas leñosas son causadas por especies de *Phytophthora* (Jung et al., 2018).

Una de las especies de este género, *Phytophthora infestans*, es el agente infeccioso del tizón tardío de la papa y el tomate, enfermedad que representa una importante amenaza para la seguridad alimentaria y por lo cual ha sido ampliamente estudiada (Acuña, 2018). Por ejemplo, en un cultivo de papa, la infección por *Phytophthora infestans* puede avanzar con una velocidad impresionante, en donde un campo que parecía "saludable" en el momento, puede estar a simple vista gravemente enfermo la siguiente semana, y en una semana más puede ser totalmente destruido (Fry, 2008).

Debido al impacto de este microorganismo y la importancia de su estudio, los experimentos de laboratorio son trascendentales para la evaluación de su biología. Llevar a cabo la identificación y estudiar el desarrollo de mecanismos de resistencia, tanto a nivel fisiológico como a nivel molecular, su respuesta a fungicidas, las interacciones y respuestas del hospedero entre otros, son importantes para conocer su comportamiento y propagación, generando así estrategias de control (Solano et al., 2016) .

Por ende, los ensayos que se realizan en los laboratorios deben ser reproducibles en campo; por lo que en los últimos años se ha evaluado la incidencia del inoculo con el cual se evalúa la enfermedad (Generalmente suspensiones de esporangios). En el año 2000, por ejemplo,

se analizó el efecto de la irradiancia solar sobre la viabilidad de los esporangios de *Phytophthora infestans*, observando que los esporangios cuyo inoculo provenía de una suspensión de lesiones de hojas sobrevivieron a una exposición de radiación solar a la cual los esporangios producidos sobre placas o medios artificiales no lo hicieron (Mizubuti et al., 2000). Más adelante, cuando se quiso reproducir un estudio que evaluaba la resistencia sistémica adquirida mediada por ácido araquidónico (AA) en plantas de papa contra *P. infestans*, en el cual se mostró como las hojas inducidas con AA generaban lesiones más pequeñas, se presentaron diferencias en los resultados dependiendo del origen de los esporangios empleados. Los esporangios de placa, produjeron los resultados esperados pero cuando se hizo una suspensión procedente de hoja, las lesiones en las plantas inducidas fueron similares a las de las plantas no inducidas (Fry et al., 2016). Así, se fue ampliando el debate de la reproducibilidad de los ensayos llevados a cabo en el laboratorio con esporangios de este género, con el fin de evaluar si los ensayos de laboratorio realmente describen el comportamiento en el campo de este microorganismo.

En 1996, se habían descrito 50 especies de *Phytophthora* (Erwin & Ribeiro, 1996). Durante las últimas dos décadas, más de 100 nuevas especies de *Phytophthora* han sido descritas o informalmente designadas (Jung et al., 2018). Este aumento exponencial se puede explicar por varios factores. En primer lugar, antiguamente, las investigaciones de la diversidad de *Phytophthora* se centraban en cultivos agrícolas, ahora, también se ha estado estudiando en ecosistemas naturales. En segundo lugar, los análisis filogenéticos de las regiones de genes nucleares y mitocondriales permiten discriminar complejos de especies morfológicamente similares, pero filogenéticamente distintas (Burgess et al., 2018; Mideros, et al., 2016), y en último lugar, podemos relacionar este descubrimiento de especies, al aumento exponencial de las importaciones y exportaciones de plantas, que permiten la introducción accidental de plagas y patógenos, que junto con las normas de bioseguridad y fitosanitarias, se ha podido identificar (Brasier, 2008).

Recientemente, mediante estudios filogenéticos, morfológicos, genética de poblaciones y análisis de infección, se describió la nueva especie, *Phytophthora betacei*, que pertenece al clado 1c del género *Phytophthora* y que infecta los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en los departamentos del sur de Colombia. Se identificó una afinidad muy marcada para este tipo de cultivo, produciendo enormes pérdidas económicas (Mideros et al., 2018).

De esta manera, el propósito de este proyecto es comparar los esporangios de *Phytophthora betacei* producidos en diferentes medios de cultivo *in vitro*, con los que se producen *in vitro* en hojas desprendidas de *Solanum betaceum*, su hospedero natural. Esta información permitirá proporcionar estrategias sobre la implicación experimental de realizar ensayos de laboratorio utilizando esporangios directamente de lesiones de hoja. Esta comparación se realizó tanto a nivel fisiológico (morfología de esporangios, periodos de incubación, área de lesiones de las hojas y esporulación) y a nivel molecular (expresión de genes asociados a la respuesta al estrés, elicinas y metabolismo de azúcares).

1. Justificación

El tomate de árbol surge como alternativa agrícola y socioeconómica para un amplio sector de productores de clima frío de la región Andina Colombiana dentro del contexto creciente en la producción de frutas y vegetales como producto de exportación, que se ha evidenciado en los países andinos como Perú, Chile, Ecuador y Colombia (Moreno et al., 2020).

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), también llamado tamarillo, es una fruta promisoría para la exportación debido a su sabor agrisado atractivo para el mercado, sus beneficios para el sistema inmunológico, la visión y propiedades antioxidantes (alto contenido de vitaminas A y C). Además, en el campo de la medicina alternativa, se recomiendan dietas a base de esta fruta, por su capacidad de bajar la tensión arterial, aliviar migrañas y cefaleas severas (Céron et al., 2011).

Sin embargo, para obtener una cosecha sana, se han establecidos estrictos programas de control en toda la cadena productiva de frutas y vegetales, debido a que los efectos económicos de las plagas y enfermedades en los productos para la exportación y distribución en grandes mercados pueden ser complejos y representar pérdidas totales. Existen enfermedades que pueden tener efectos duraderos y afectar radicalmente los ingresos agrícolas, mediante la pérdida de la producción en varias cosechas, o la menor eficiencia y calidad de esta (Ramírez, Gil, & Morales, 2017).

En el cultivo de tomate de árbol, existe énfasis en dos enfermedades que pueden generar pérdidas de hasta el 100% de la cosecha. Estos son la Antracnosis y el tizón tardío (Ramírez et al., 2017); en primer lugar, la Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* ataca los frutos en cualquier etapa del desarrollo, haciendo que estos se sequen o momifiquen, tomando una apariencia salmón acuosa en el centro de la lesión, con color

negro en el resto del fruto (Lobo et al., 2000). De la misma manera, el tizón tardío causado por especies de *Phytophthora*, tiene una acción devastadora y puede ocasionar pérdida total si no se toman medidas de control oportunas. El tizón tardío ataca al follaje y ramillas de plantas adultas, y al ápice, follaje y tallos de plantas jóvenes. Las lesiones son de color negro brillante, y en las hojas se observan manchas redondas color café o negro (Garcés et al. 2008). Aunque se ha descrito *Phytophthora infestans* como agente causal del tizón tardío en esta fruta, recientemente en la región sur de Colombia, al igual que en Ecuador y Perú, surgió un aumento de esta enfermedad, lo que provocó una devastadora disminución en la producción, y pérdidas de cosechas enteras de tomate de árbol. Sin embargo, este brote no se había descrito formalmente. (Mideros et al., 2018)

En el año 2018, Mideros y colaboradores tras un estudio filogenético y morfológico, y empleando genética de poblaciones y ensayos de especificidad de hospedero, describieron una nueva especie en el sur de Colombia, con preferencia de hospedero hacia el tomate de árbol. Se identificó así, *Phytophthora betacei* sp. nov. como agente causal del tizón tardío en tomate de árbol (Mideros et al., 2018; Chavez et al., 2020)

Debido a que es una especie recientemente descrita, los experimentos y ensayos en laboratorios de fitopatología empiezan a tener un aumento significativo con el fin de conocer a cabalidad toda su biología. Sin embargo, para que los ensayos de laboratorio sean funcionales, se debe garantizar que sean reproducibles en campo.

En general para los estudios en especies de *Phytophthora*, se emplean los esporangios de estos oomicetes, producidos en medios artificiales, con el fin de investigar el desarrollo de la enfermedad e interacción con el hospedero. Los esporangios también son el material en estudios de interacciones moleculares y respuestas del patógeno a controles químicos y biológicos.

En *Phytophthora infestans*, una especie cercana y la más representativa de este género, se debate si estos esporangios provenientes de medios artificiales son funcionalmente equivalentes a los que se aíslan de las lesiones de las hojas del hospedero natural.

Patev y colaboradores, concluyeron en sus investigaciones, que los esporangios de *P. infestans* producidos en cultivo y en lesiones de hoja de tomate muestran diferencias marcadas en las tasas de germinación indirecta, agresividad y perfiles transcripcionales

(Patev, 2017). Por otro lado, en el Departamento de Microbiología y Fitopatología, de la Universidad de California, Estados Unidos, investigaron esta misma variable, y publicaron que los esporangios de *P. infestans* producidos en medios artificiales y en las lesiones de plantas tienen perfiles transcripcionales con pequeñas diferencias asociadas al medio donde crecieron, pero un potencial de infección y una agresividad equivalentes (Leesutthiphonchai & Judelson, 2019) .

Por lo anterior, existe un debate respecto al comportamiento y potencial de infección entre los esporangios que se obtienen en medios de cultivo y de lesiones en plantas. Se plantea la hipótesis de que el uso de los esporangios provenientes de lesiones de hoja permitiría actualizar las técnicas empleadas en los laboratorios de fitopatología y garantizar que los experimentos logren los objetivos propuestos a la hora de medirlos en campo.

Por todo lo antes expuesto, la finalidad de este trabajo fue obtener esporangios de *P. betacei* con las técnicas de laboratorio rutinarias adecuadas en medio de cultivo, y realizar una comparación con aquellos provenientes de las hojas de *S. betaceum*, su hospedero natural. Esto se llevó a cabo mediante una caracterización de los esporangios de *P. betacei* según su origen, evaluando si su virulencia era equivalente y si existían cambios a nivel morfológico y molecular.

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades del tomate de árbol

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es un frutal que se encuentra en regiones de clima subtropical, siendo originario de América del Sur (Ordóñez et al., 2010). Proviene de un árbol pequeño y de rápido crecimiento. Se reconocieron tres tipos morfotipos en función del color de la fruta: rojo oscuro o púrpura (Variedad roja), rojo-naranja (Variedad común) y amarillo (Variedad mango) (Díaz et al., 2017). Este fruto es carnoso y puede ser consumido crudo, en ensaladas, como postre, mermelada o compotas (Torres, 2012).

2.1.1 Características y biología

El tomate de árbol es una planta diploide con 24 cromosomas, originalmente clasificado como *Solanum betaceum* por Cavanilles en 1799, en 1845 fue transferido al género *Cyphomandra* por Sendtner, donde permanecía hasta hace poco tiempo. Bohs (1995) lo reintegró a *Solanum*, este cambio obedeció a estudios moleculares basado en DNA cloroplástico realizados por Olmstead y Palmer en 1992. (Heiser & Anderson, 1999)

Esta fruta es originaria de los bosques andinos de climas templados de altitudes de entre 1500 y 2600 metros, y se han encontrado especies silvestres en Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia (Feicán et al., 2016).

Su clasificación taxonómica se describe a continuación:

Reino:	Vegetal
División:	Fanerogamas
Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledóneas

Subclase:	Metaclamideas
Orden:	Tubiflorales
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum betaceum</i> (Cevallos et al., 2004)

Las principales características morfológicas se describen a continuación:

- Raíz: La raíz de este frutal alcanza profundidades de hasta un metro de profundidad (Leon & Veteri, 2003).
- Tallo: El tomate de árbol es un arbusto de tallo cilíndrico que puede alcanzar alturas entre 2.5 – 3.0 metros, y se ramifica en tres ramas a un rango de altura entre 1.0 – 1.5 metros de acuerdo con el genotipo cultivado. En etapas jóvenes, el tallo es erecto y de coloración verde oscura, en estado adulto, empieza a tornarse semileñoso, se ramifica y la coloración torna a verde grisácea (Núcleo Ambiental S.A.S, 2015).
- Hojas: Las hojas son cordiformes, en plantas jóvenes se pueden observar hojas de 20 a 40 centímetros de largo. El color varía de acuerdo con la variedad siendo verde oscuro en “V. Rojo” y verde claro en “V. común y V. mango” (Leon & Veteri, 2003)
- Inflorescencia: Son de tipo racimo y se desarrollan en las axilas de las hojas o sobre ellas, están conformadas por 10 y hasta 40 flores, las cuales son pediceladas, con corola color rosado (Leon & Veteri, 2003).
- Fruto: Este fruto es ovalado, liso y brillante. La epidermis es roja en la variedad rojo y común, y amarillo en la variedad mango. La pulpa es roja en la variedad rojo y anaranjado en las otras dos variedades (Cevallos et al., 2004).
- Semillas: Son pequeñas, de 2 a 4 milímetros de largo y de forma aplanada lenticular, son de color blanco cuando están tiernas y van cambiando a tonos rojizos (Leon & Veteri, 2003).

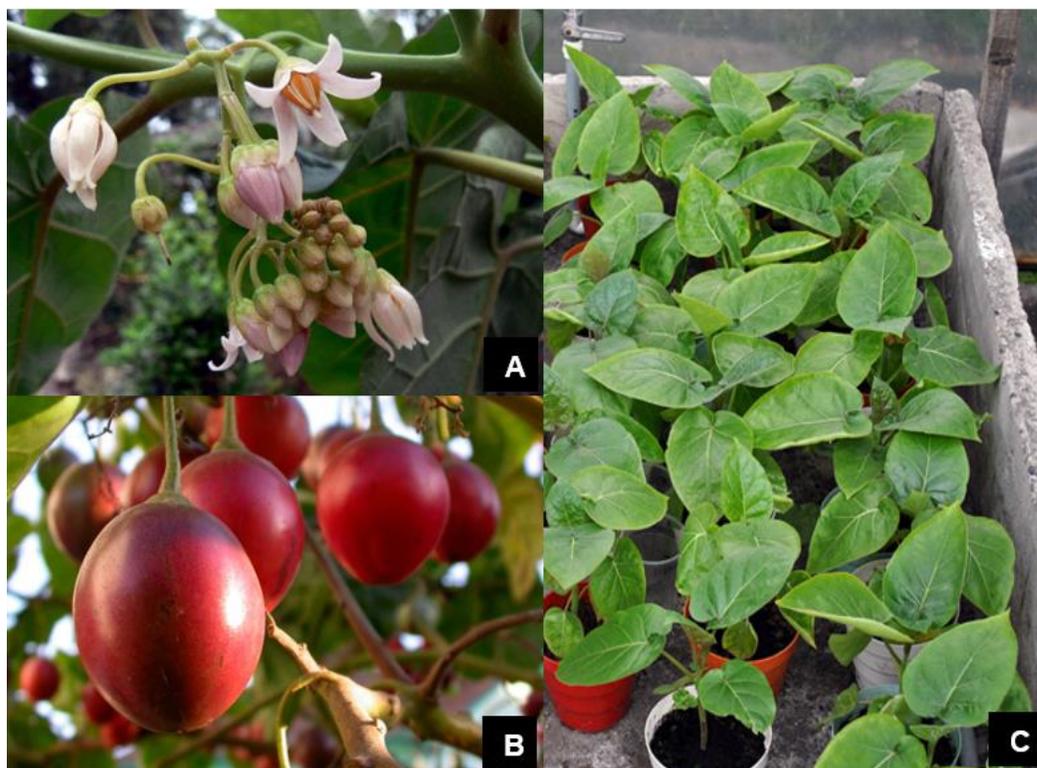


Figura 2-1. Características del tomate de árbol (*Solanum betaceum*). **A.** Flores, **B.** Fruto, (Macé, 2010) **C.** Plantas jóvenes (Invernadero facul. Biología UNAL, feb. 2018).

2.1.2 Condiciones agroclimáticas

Esta especie prospera en valles subtropicales y bosques montañosos, desarrollándose eficientemente en temperaturas entre los 13°C - 20 °C; crece entre los 1.200 a 3.000 msnm, y a una humedad relativa entre 70% al 80%. El cultivo de tomate de árbol es sensible a radiaciones solares intensas, por lo que se desenvuelve mejor en condiciones de nubosidad, característica de las zonas de la región andina de donde proviene (Acosta, 2011).

2.1.3 Beneficios nutricionales e importancia económica

El tomate de árbol es conocido internacionalmente como “Tamarillo” en Nueva Zelanda y Estados Unidos, “Baum tomate” en Alemania, “Chimango” en Portugal, “Tree tomato” en Inglaterra, “Terong blanda” en Holanda y “Tomate de aji” en España (Cevallos et al., 2004).

Esta fruta tiene importancia comercial y es producto de exportación en Colombia y Nueva Zelanda. Además en China, Holanda, Brasil y Argentina se comenzó a

considerar un cultivo de interés hace unos años por sus características nutricionales (Torres, 2012).

Por su alto contenido de pectina (aporta viscosidad y actúa como agente gelificante) puede emplearse en la producción de compotas para niños y mermeladas. El alto consumo de fibra dietaria como lo es la pectina presenta beneficios para la salud, ya que posee propiedades anti-cancerígenas y contribuye a disminuir los niveles de glucosa y colesterol en sangre: Su alta viscosidad disminuye la velocidad de absorción de los micronutrientes, e incrementan la sensibilidad a la insulina. También interfiere con la absorción del colesterol debido a la formación de micelas en el lumen intestinal que encapsulan ácidos biliares, y finalmente disminuye la concentración del colesterol de baja densidad a nivel sanguíneo (Martínez et al., 2011)

Igualmente, este fruto es una fuente importante de vitaminas, minerales (Tabla 2-1) y compuestos con capacidad antioxidante como licopeno, polifenoles y antocianinas (Kou et al., 2009).

Su incremento en la exportación se explica por el uso cada vez más frecuente en la medicina alternativa y tratamientos homeopáticos, debido a su capacidad de mejorar cuadros de depresión y de reducción de presión arterial (Flores et al., 2017). Esto se debe a su alto contenido de ácido gamma aminobutírico (GABA), neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central (SNC) que modula el balance inhibitorio-excitatorio en el cerebro, involucrándose aproximadamente en un tercio de las sinapsis en regiones como la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, los ganglios basales, el cerebelo y el tallo cerebral. Así mismo está involucrado en el funcionamiento correcto de circuitos interneuronales como los noradrenérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos (Flores et al., 2017).

Tabla 2-1. Composición nutricional del fruto *Solanum betaceum* (Feicán et al., 2016).

FACTOR	COMPOSICION EN 100 GRAMOS DE PULPA BASE HÚMEDA.
Proteína	2 g
Energía	27 calorías
Vitamina E	2010 U.I.
Caroteno	0.67 mg
Vitamina B1	0.1 mg
Vitamina B2	0.03 mg
Vitamina C	29 mg
Niacina	1.1 mg
Calcio	9 mg
Fosforo	41 mg
Hierro	0.9 mg
Vitamina A	1000 U.I.
Fibra	1.1 g
Grasa	0 g
Agua	89.1 g

Para el año 2012 los principales países importadores de tomate de árbol fueron China con 799.855 ton., Indonesia con 152.746 ton., Rusia con 127.987 ton. y Países Bajos con 126.991 ton. Para este mismo año hubo exportaciones de tomate de árbol desde Colombia por valor de 1.353.980 dólares (Núcleo Ambiental S.A.S, 2015).

En Colombia, respecto al mercado interno, se vende en plazas mayoristas como Abastos en 2500 pesos colombianos el kilo. Cabe aclarar que el tomate de árbol variedad común y rojo son los más importantes en el mercado, ya que la variedad mango no es atractiva para el comprador por su color amarillo pálido y además, suele ser un poco más amargo (Díaz et al., 2017). La superficie cultivada de tomate de árbol alcanza aproximadamente las 8.107 ha., y va incrementando con los años en

los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Nariño y Boyacá debido a la demanda de exportación. Sin embargo, este incremento se ha visto afectado por problemas fitosanitarios causados por patógenos de importancia como *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum acutatum*, virus, entre otras, los cuales afectan el rendimiento y la calidad del producto, reduciendo significativamente los ingresos del agricultor (Chañag et al., 2017).

2.1.4 Enfermedades y plagas

- Antracnosis: causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta enfermedad se encuentra distribuida en todas las zonas productoras. Los síntomas se centran en los frutos, donde se observa decoloración y pequeñas lesiones de apariencia aceitosa, posteriormente se vuelven negras y ligeramente hundidas, secando el fruto y tomando finalmente una apariencia momificada (Rondón, 2006).
- Lancha, gota o tizón: causado por especies del oomicete *Phytophthora*. Se encuentra distribuida en la mayor parte de las zonas productoras; se presenta con mayor frecuencia en zonas húmedas y especialmente en épocas lluviosas. Causa grandes pérdidas, atacando especialmente las hojas, donde aparecen manchas húmedas de color café a negro y, en las ramillas y tallos, aparecen manchas negras brillantes de consistencia acuosa (Feican et al., 2016). La gravedad de esta enfermedad se ha atribuido históricamente a la especie *Phytophthora infestans*, la cual no solo afecta el cultivo del tomate de árbol (*S. betaceum*), sino también tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) y en la papa (*Solanum tuberosum*). En Colombia la presencia de este patógeno reporta que las pérdidas pueden alcanzar hasta un 100% en la producción y su incidencia se atribuye a la disponibilidad de fuentes constantes de inóculo en campo y a la ubicación de sus hospederos en regiones con condiciones ambientales favorables para el establecimiento de poblaciones del patógeno (Chañag et al., 2017). En el año 2018, Mideros y colaboradores tras un estudio filogenético y morfológico, y empleando genética de poblaciones y ensayos de especificidad de hospedero, describieron que la especie *Phytophthora betacei* sp. nov. es el agente causal del tizón tardío en tomate de árbol (Mideros et al., 2018).

- Virosis del tomate de árbol: causado por el virus alargado y flexuoso (género de los Potyvirus), se transmite mecánicamente de árboles afectados a sanos mediante el uso de herramientas contaminadas. Los síntomas se pueden observar en cualquier órgano de la planta, y en cualquier estado de su desarrollo. Se visualizan deformaciones en las hojas, mosaico, moteado y presencia de ampollas en la lámina foliar. En los frutos se presenta deformación, pulpa muy seca y amarga (Tamayo, 2001).
- Chinche: también conocido como chinchorro, causado por *Leptoglossus zonatus*. Su daño lo causa en frutos, donde se alimenta del jugo de éstos en estado tierno o maduro, tornándolos color café, y provocando zonas endurecidas debido a las toxinas que tiene en la saliva (Feican et al., 2016).
- Mancha negra o pata de puerco: causado por *Fusarium solani*, produce manchas necróticas, de color pardo en el tallo y, de allí avanza a las raíces, provocando descomposición del tejido y por ende emitiendo fuertes olores (Revelo, et al., 2004).

2.2 Generalidades y biología del género *Phytophthora*

En el pasado, los oomicetes, un grupo de microorganismos en el cual está ubicado el género *Phytophthora*, fueron incluidos en el reino de los hongos por sus hábitos de crecimiento micelial, la formación de esporas para su reproducción asexual y por el modo de adquirir los nutrientes (Fry & Grünwald, 2010).

Sin embargo, la ausencia de septos en las hifas, resultante en una condición multinucleada (llamada cenocítica), la pared celular compuesta de β -1,3 y β -1,6 glucano y no de quitina (el polímero de N-acetil glucosamina, que se encuentra en las paredes de los hongos verdaderos) y la producción de zoosporas carentes de pared celular con un aparato biflagelar heterocóntico (morfológica y funcionalmente diferentes), fueron características que suscitaron discusiones en torno a la clasificación taxonómica de los oomicetes, para finalmente ser agrupados junto a las algas *chrysophytas*, diatomeas y algas pardas, en un ensamble denominado *Stramenopila* dentro del grupo de los protistas (Henao, 2017).

Los oomicetes son una clase de eucariotas filamentosos microscópicos, que incluye patógenos ecológicamente significativos, como lo es, el género *Phytophthora* (Mccarthy & Fitzpatrick, 2017).

Phytophthora (del griego *Phyton*: planta; *phthora*: destructor) fue propuesto por de Bary en 1876 con la especie *P. infestans* de Bary. Este investigador reconoció a dicho microorganismo para entonces clasificado como hongo, como causante del tizón tardío en la papa, en Europa. Previamente había sido identificado como *Botrytis infestans* Montagne y luego como *Peronospora infestans* (Medina, 2009).

Este género ha tenido impacto a lo largo de la historia, al causar enfermedades en plantas de importancia agrícola y ecológica. Como hecho histórico, la especie *P. infestans*, provocó la “Gran hambruna irlandesa” entre 1845 y 1849, donde murieron aproximadamente un millón de personas. A la vez originó la extraordinaria emigración de irlandeses a los Estados Unidos (aproximadamente 1,5 millones personas emigraron) por pérdida total de cultivos de papa, cultivo que predominaba en todos los hogares de la clase trabajadora (Lehsten et al., 2017).

En cuanto la ubicación taxonómica, en el árbol global de los eucariotas, los oomicetes están incluidos en el grupo SAR (*Stramenopiles*, *alveolates*, and *Rhizaria*), subgrupo *Stramenopiles*, y las especies del género *Phytophthora* se ubican en el orden *Peronosporales* (Burki, 2014;Mccarthy & Fitzpatrick, 2017).

En el género *Phytophthora* se encuentran patógenos hemibiotróficos de gran importancia en cultivos agrícolas y forestales ya que causan grandes pérdidas económicas en un amplio rango de especies vegetales en el mundo (R. Flores, 2010).

Entre las especies de este oomicete que ocasionan mayores daños o pérdidas se encuentran: *Phytophthora infestans* causante del tizón tardío de la papa, el tomate y otras plantas de la familia *Solanaceae*; *P. ramorum*, agente causal de la enfermedad denominada muerte repentina del roble, que afecta también a otros árboles y arbustos, *P. palmivora* causante de la pudrición de brotes, yemas y frutos en palmas; *P. capsici* patógeno que causa marchitez y pudrición de la corona y raíz en chile, cucurbitáceas y otros cultivos comerciales, y *P. cinnamomi* que infecta a más de 3000 especies de plantas en el mundo (Yang et al., 2017) .

Actualmente las especies de este género se encuentran distribuidas a nivel mundial, causando pérdidas económicas severas y diseminándose en cientos de cultivos. El impacto causado por las especies de *Phytophthora* ha seguido aumentando con la aparición de nuevos patógenos y enfermedades. El número de especies conocidas en el género se ha duplicado durante la última década debido a los extensos estudios en ecosistemas previamente inexplorados, como los bosques naturales, arroyos, ecosistemas ribereños y sistemas de irrigación. Además, las enfermedades en las plantas originadas por este género son difíciles de controlar químicamente, por eso como estrategia contra ellas se está extendiendo el cultivo de variedades resistentes (Lehsten et al., 2017).

El comportamiento de las especies de *Phytophthora* se debe en gran medida a las estructuras especializadas que posee, las cuales le confieren capacidad de dispersión en el ambiente y resistencia a condiciones adversas. El fitopatógeno hiberna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. Una vez las condiciones son favorables, las oosporas y las clamidosporas germinan, mientras que el micelio prosigue su desarrollo y/o produce zoosporangios que liberan zoosporas. Estas últimas nadan en el agua del suelo entorno a las raíces y las infectan si las plantas son susceptibles, al entrar en contacto con la punta de la raíz por medio de una prolongación hifal que penetra la superficie de estas. El oomicete forma más micelio y zoosporas en climas húmedos y moderadamente fríos y disemina la enfermedad a otras plantas a través del contacto raíz-raíz. En climas secos, cálidos e incluso demasiado fríos, sobrevive en forma de oosporas, clamidosporas o micelio, con las cuales pueden iniciar nuevamente infecciones cuando las condiciones de humedad y temperatura se tornan favorables nuevamente (Collins et al., 2012). Las características de las principales estructuras son las siguientes:

- Micelio: las especies del género poseen un micelio cenocítico (sin septos), toruloso, hialino, ramificado, con nódulos redondos. En los medios de cultivo el micelio se presenta aéreo y de textura algodonosa (Medina, 2009).
- Zoosporangio: son estructuras de la reproducción asexual que puede germinar por elongación hifal directa o por fraccionamiento del citoplasma en compartimentos uninucleados que son liberados al ambiente como zoosporas por disolución del material de la pared del ápice. Pueden ser ovoides, ovopiriformes o elipsoides; además, pueden mantenerse viables por 3-42 días (I. Acosta, 2008).

- Zoospora: las zoosporas son estructuras de diseminación y las que causan una nueva infección de las raíces. Proviene de los zoosporangios, son de vida corta, frágiles y producidas en gran número; poseen movilidad a través de un flagelo anterior que le sirve para desplazarse con un movimiento sinusoidal y otro posterior liso que funciona como timón, son atraídas a los sitios de infección de las raíces por quimiotaxis y atacan la superficie más externa de las puntas de la raíz (Henao, 2017).
- Clamidospora: son estructuras de supervivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados bajo condiciones de crecimiento desfavorables, con un tiempo de vida medio de 84-365 días. Las clamidosporas de *P. cinnamomi* tienen diámetros promedio de 40 a 135 μm , son de pared delgada (0.5 μm), globosas y muchas son de forma irregular, pueden presentar grupos de dos a tres por hifa de forma terminal, con apariencia similar a un racimo de uvas, o intercaladas en el micelio (Acosta, 2008; Castañeda, 2009).
- Órganos sexuales: los órganos sexuales constituyen el elemento taxonómico más constantes y por tanto son de gran valor en la clasificación de las especies. No todas las especies los producen, por lo que en algunos casos se requieren medios de cultivo especiales. Incluso en la naturaleza existen casos, como *P. citrphthora*, donde no se ha observado la producción de estos órganos de reproducción (Henao, 2017).

Todos los procesos de reproducción ya sean sexuales o asexuales, juegan un papel fundamental en el ciclo de vida del oomicete. A nivel general, esta especie tiene un comportamiento hemibiotrófico. Es decir, que tiene una infección biotrófica inicial, fase durante la cual el patógeno se propaga dentro del tejido del hospedero, y posteriormente entra en la etapa necrotrófica donde se induce la muerte de las células del hospedero. La enfermedad generalmente no presenta síntomas visibles durante al menos dos días (característica de un hemibiótrofo). Después aparecen pequeñas áreas de necrosis, y dentro de uno o dos días ya se visualiza una necrosis foliar completa. (Fry, 2008).

Adicionalmente el ciclo de vida es policíclico, es decir, tiene múltiples ciclos de infección durante una sola epidemia. Las lesiones en las hojas infectadas producen esporangios que se pueden dispersar en otras ubicaciones de la misma hoja, otras hojas u otras plantas,

asentándose en tejido sano y pudiendo ocasionar nuevas lesiones, nuevos esporangios y finalmente infecciones adicionales (Danies, 2015).

Los esporangios (asexual de esporas) se desprenden fácilmente, particularmente en respuesta a cambios en la humedad relativa y pueden dispersarse aéreamente a otros tejidos vegetales (Drenth & Guest, 2013). Estos se producen en esporangióforos que crecen a partir del tejido infectado y germinan a través de un tubo germinal a temperaturas altas (20–25°C, germinación directa), o liberando zoosporas a temperaturas frías (debajo de los 15°C, germinación indirecta). Estas zoosporas son móviles por un corto tiempo (a menudo menos de 60 min) antes de enquistarse, una vez enquistadas germinan directamente a través de un tubo germinal para penetrar en la hoja o en el tejido del tallo.

Los ensayos de laboratorio se realizan con esporangios aislados de medios de cultivo, y que hayan sido expuesto a 4°C de 2-4 horas antes de la inoculación ya que puede estimular la liberación de 8 a 12 zoosporas biflageladas por cada zoosporangio, y cada una es capaz de iniciar una infección, aumentando así la probabilidad de conseguir infecciones exitosas en comparación con las altas temperaturas (Danies, 2015) (Childers et al., 2015) (Patev, 2017).

En cuanto a los medios de cultivo, existen diferentes alternativas respecto a su base nutritiva que garantiza un óptimo desarrollo del microorganismo (Curvero & Rojas, 2010). Los medios pueden tener una base ser natural o artificial, siendo predilectos para este género los medios con extractos naturales, como la avena, papa, zanahoria, centeno y tomate (Medina, 2009).

Los medios orgánicos tienen sitosteroles, mezclas de β -sitosterol y ciertos esteroides saturados, fundamentales en el desarrollo y reproducción de varios organismos del género; estos son esenciales para modular la fluidez, la permeabilidad y la integridad de las membranas celulares (Fundora et al., 2014).

A diferencia de los hongos verdaderos, *Phytophthora sp.* no puede sintetizar esteroides de *novo* pero los necesita para la reproducción sexual y asexual, por lo cual deben ser proporcionados exógenamente de medios de cultivo o fitosteroides de la planta hospedante (Fundora et al., 2014).

Después del aislamiento, el estudio de las enfermedades producidas por este género debe estar basado en un diagnóstico y manejo preciso, actualmente acompañado de técnicas

moleculares que han contribuido para la comprensión armónica de su biología, filogenia y diversidad junto con una correcta recuperación de fitopatógeno (Drenth & Guest, 2013).

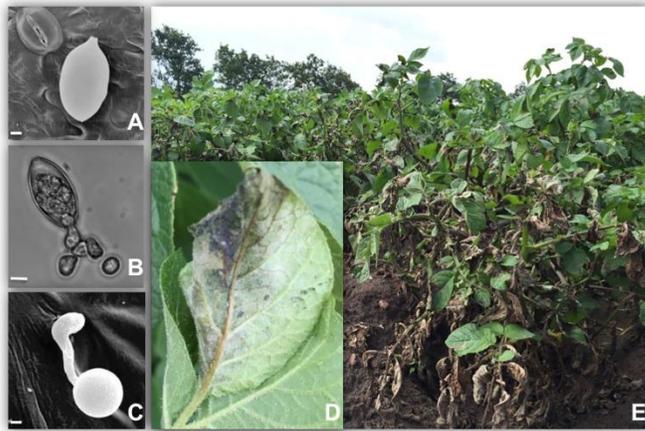


Figura 2-2. Tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans*. A: Esporangios: Estos se dispersan por vía aérea y se depositan sobre la superficie de las hojas de papa. B: Los esporangios liberan zoosporas móviles en condiciones óptimas de humedad C: Penetración: Ocorre cuando atraviesan la epidermis de la hoja, se produce a través de la producción de apresorios. D y E: Síntomas de la enfermedad (Esporulación de lesiones necróticas en el cultivar susceptible en condiciones de campo, Borgeby, Suecia 2015. (Lehsten et al., 2017).

2.3 Descripción de la especie *Phytophthora betacei*

En los últimos años, se han informado síntomas similares a la enfermedad del tizón tardío en una variedad de cultivos en América del Sur. A pesar de la importancia económica de estos cultivos, los agentes causales de las enfermedades pertenecientes al género *Phytophthora* no se habían caracterizado completamente. Mideros y colaboradores en 2018 hallaron una nueva especie de *Phytophthora* en Colombia infectando tomate de árbol (*Solanum betaceum*), la cual describieron como *Phytophthora betacei* - sp. nov. (Mideros et al., 2018).

Mediante análisis filogenéticos se confirmó la diferenciación genética de esta especie perteneciendo al clado 1c del género *Phytophthora*. Además, su descripción morfológica muestra características diferentes respecto a *P. andina* y *P. infestans* (especies del clado 1c)

tales como el ancho y largo de la hifa primaria, esporangios y crecimiento micelial. Los ensayos de patogenicidad del hospedero indican que *P. betacei* es específico en tomate de árbol incapaz de colonizar la papa y el tomate común (Figura 2-3) (Mideros et al., 2018).

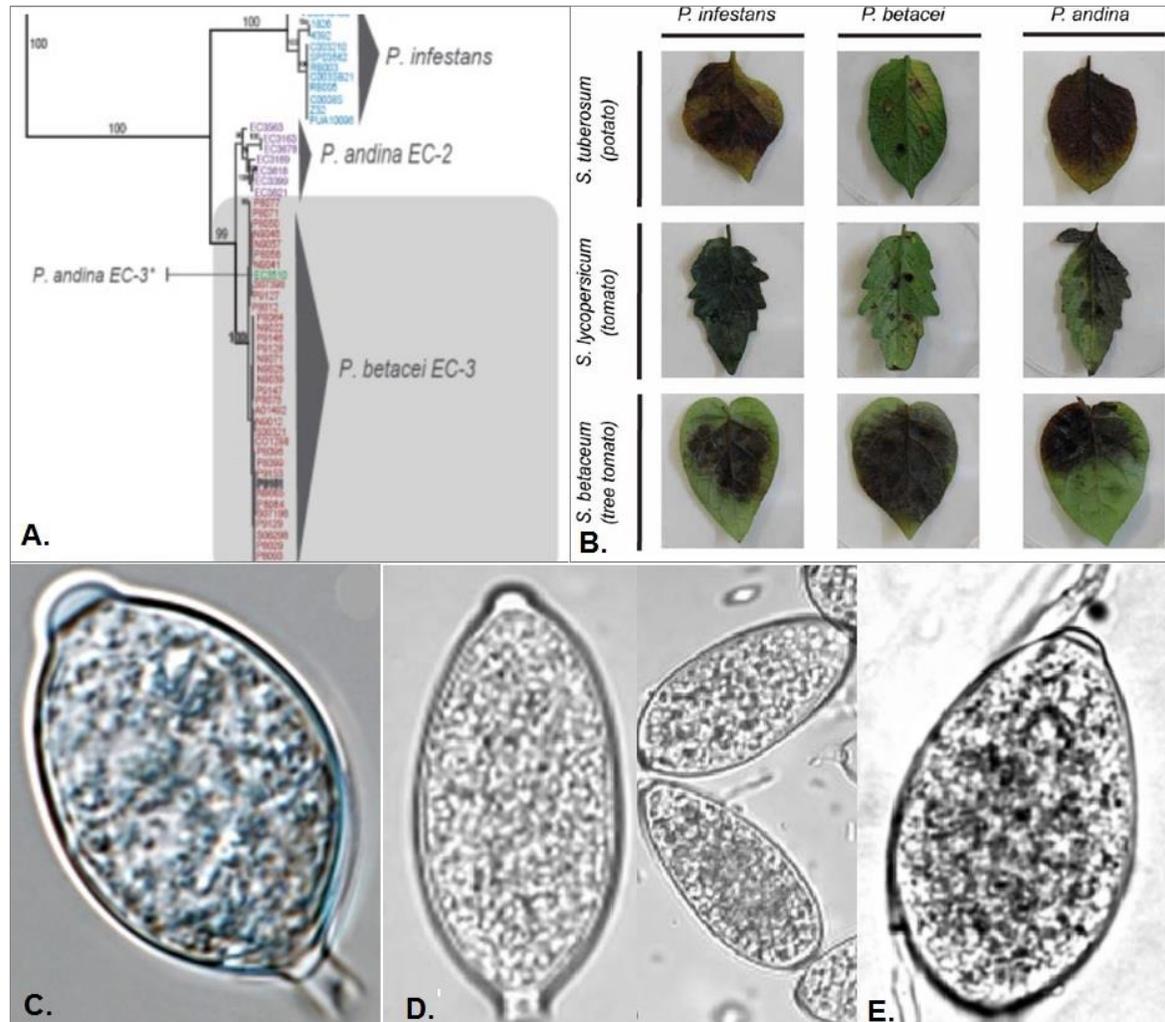


Figura 2-3. Características de *Phytophthora betacei* [Modificado de (Mideros et al., 2018)]. **A.** Relaciones filogenéticas de los aislados de *Phytophthora betacei* y las especies estrechamente relacionadas (Mideros et al., 2018). **B.** Especificidad de hospedero por medio de ensayos de infección en *Phytophthora infestans*, *Phytophthora betacei* y *Phytophthora andina* en papas (*Solanum tuberosum*), tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) y tomates de árbol (*Solanum betaceum*) después de 216 horas después de la inoculación (hpi) (Mideros et al., 2018). **C.** Esporangio de *Phytophthora infestans* (De Vries et al., 2017). **D.** Esporangios de *Phytophthora betacei* (Mideros et al., 2018). **E.** Esporangio de *Phytophthora andina* (Oliva et al., 2010).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar las diferencias morfológicas, fisiológicas y moleculares entre los esporangios de *Phytophthora betacei* provenientes de medios de cultivo *in vitro* con los provenientes de las hojas de *Solanum betaceum*, su hospedero natural.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del origen de los esporangios de *P. betacei* (medio de cultivo y hoja desprendida) en su morfología.
- Determinar el efecto del origen de los esporangios (medio de cultivo y hoja desprendida) en la virulencia de *P. betacei*.
- Determinar el efecto del origen de los esporangios de *P. betacei* (medio de cultivo y hoja desprendida) en sus características moleculares.

4. Hipótesis

Las hipótesis de este trabajo de acuerdo con los objetivos planteados son:

- A. Los esporangios de *P. betacei* provenientes de medio de cultivo son morfológicamente diferentes a los provenientes de lesiones de hojas.
- B. Los esporangios de *P. betacei* provenientes de medio de cultivo son menos virulentos que los provenientes de lesiones de hojas.
- C. Los esporangios de *P. betacei* provenientes de medio de cultivo muestran una expresión de genes diferentes a los provenientes de lesiones de hojas.

5. Materiales y métodos

5.1 Cepas de *Phytophthora betacei*.

Se seleccionaron dos aislamientos de *Phytophthora betacei*, N9035 y P8084 (Tabla 5-1) de la colección de *Phytophthora* spp. del Museo de Historia Natural de la Universidad de los Andes. Estos aislamientos se reactivaron en hojas *Solanum betaceum* y se conservaron en medio TTA (Tree tomato agar: 1,8% de agar bacteriológico, 1,8% de sacarosa, 0,05% de CaCO₃, 20% de jugo de tomate de árbol).

Tabla 5-1. Descripción de aislamientos N9035 y P8084 de *Phytophthora betacei*.

Especies	<i>P. betacei</i>	<i>P. betacei</i>
Número de identificación	MFM-P8084-5	MFM-N9035-62
Localización (país / estado / municipio)	Colombia / Putumayo / Colón	Colombia / Nariño / Buesaco
Hospedero original	<i>Solanum betaceum</i>	<i>Solanum betaceum</i>
Año	2008	2008
Linaje clonal	EC-3	EC-3
Ensayos	A B C D ¹	A B C D ¹
Fuente	(Mideros et al., 2018)	(Mideros et al., 2018)

[Continuación Tabla 5-1]

¹Análisis en los aislamientos, A = Morfológico, B = Fisiológico, C = Análisis filogenético con datos de GBS (Genotyping-by-sequencing), D = Ensayo de preferencia de hospedero.

5.2 Selección de los medios de cultivo, aislamiento de *Phytophthora betacei* más agresivo y la variedad de *Solanum betaceum* más susceptible.

En esta primera fase se seleccionaron las unidades de análisis para los experimentos posteriores: el medio de donde provendrán los esporangios con los cuales se realizará la infección, el aislamiento más agresivo de *P. betacei* entre los probados: N9035 y P8084, y la variedad de tomate de árbol *S. betaceum* más susceptible a la infección, entre rojo oscuro o morado (Variedad rojo) y rojo anaranjado (Variedad común).

5.2.1 Medios de cultivo

Se realizó una primera evaluación de medios de cultivo, con el fin de elegir con cual o cuales realizar los ensayos de infección sobre hoja.

Se probaron tres medios de cultivo: TTA (Descrito anteriormente), PDA (Potato Dextrose Agar: Reagen, HiMedia laboratories Pvt. Ltd. India) Y CMA (Corn Meal Agar: Neogen, acumedialab. USA), los tres enriquecidos con 0,1% de β -sitosterol. Los medios CMA y TTA se seleccionaron con base en los resultados de Mideros y colaboradores en 2018, donde evaluaron la tasa de crecimiento micelial (mm/día) de diferentes medios (PDA, CMA, TTA y V8 juice agar), siendo estos los que presentaron un crecimiento mayor (Mideros et al., 2018). El medio PDA se eligió porque es un medio utilizado rutinariamente, donde crecen de forma óptima la mayoría de las especies de *Phytophthora*. Los aislamientos se sembraron mediante la técnica de *plug*, y se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Los esporangios se colectaron a los 15 días de crecimiento.

Las variables que se evaluaron fueron la esporulación (esporangio/mL) y el crecimiento sobre cada medio de cultivo en términos de porcentaje de cobertura de la placa de petri tamaño estándar (100*15 mm).

Se realizaron tres réplicas técnicas en cada medio de cultivo para cada aislamiento y tres réplicas biológicas en diferentes días con medio recién preparado.

En primer lugar, se evaluó la esporulación mediante la recolección de esporangios, raspando la totalidad de micelio de cada placa de petri y suspendiéndolos en 1 mL agua destilada. Se realizó vortex por un minuto y de forma inmediata se contaron los esporangios en hemocitómetro (el conteo se realizó por triplicado).

Por otro lado, mediante registro fotográfico y usando el software *ImageJ* (ImageJ 1.49 software Maryland, USA) , se estimó el área de cobertura del micelio de cada aislamiento, en cada medio de cultivo y se convirtieron estos valores a porcentaje considerando como 100% el área de la placa de petri.

5.2.2. Ensayos sobre hojas *S. betaceum* para la selección de unidades de análisis: medio óptimo para colección de esporangios, aislamiento más agresivo y variedad de tomate más susceptible

Se inocularon esporangios de los dos aislamientos *P. betacei* provenientes de los medios (o el medio) seleccionados en el paso anterior, en hojas desprendidas de las dos variedades de tomate de árbol.

Los esporangios de cada aislamiento se recolectaron entre los 13 a 15 días de comenzar el cultivo y se suspendieron en solución Petri. La solución petri es una mezcla de sales (CaCl₂ 0,25 mM, 122 MgSO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 1 mM, KCl 0,8 mM; pH ajustado a 4,9) descrita en 1917, que asemejan el ambiente de los exudados de una planta. (Petri et al., 1917)

Se inocularon cuatro gotas de 25 µl con suspensión de esporangios de 2.5 x 10⁴ esporangios ml⁻¹ (Bashan, 1989) en el envés de las hojas. Esta técnica se usó para todos los ensayos en hoja y se siguió el protocolo de infección estandarizado en este estudio (Anexo 1).

Las hojas de las dos variedades de *S. betaceum* (rojo y común) usadas en estos ensayos fueron de tres meses de edad conservadas en condiciones de invernadero (Invernadero de la facultad de Biología de la Universidad Nacional de Colombia (temperatura: 18-22°C y humedad relativa: 75 85%).

La esporulación (esporangios/ml) y el área de lesión (mm²) se evaluaron a los 9 días posteriores a la inoculación (dpi). Este tiempo se seleccionó con base en los resultados de

Mideros y colaboradores en 2018, donde identificaron que a las 216 (hpi) horas posteriores a la inoculación se obtenía la concentración más alta de esporulación (Mideros et al., 2018).

La esporulación se determinó tomando las 4 lesiones de cada hoja y suspendiéndolas en 1 mL agua destilada. Se realizó vortex por un minuto y de forma inmediata se contaron los esporangios por triplicado en un hemocitómetro. El área de cada lesión se midió mediante registro fotográfico y usando el software *ImageJ* (ImageJ 1.49 software Maryland, USA).

Estas metodologías se emplearon para todos los ensayos que midieron estas variables.

Se realizaron réplicas biológicas en diferentes días, y tres réplicas técnicas para cada aislado proveniente de cada medio de cultivo y en cada una de las variedades de tomate de árbol. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó un aislamiento de *P. betacei*, un medio de cultivo y una variedad de *S. betaceum* para llevar a cabo los posteriores ensayos.

5.3 Ensayos de germinación de esporangios de *Phytophthora betacei* provenientes de medio de cultivo y de lesiones de hoja, expuestos a dos temperaturas distintas.

Se trabajaron esporangios con dos fuentes de producción distintas, *in vitro* o *in vivo*: Los primeros son los producidos en medio de cultivo, y los segundos son los aislados de lesiones de hojas infectadas, ambos ajustados a la misma concentración [2.5×10^4 esporangios mL^{-1} (Bashan, 1989)].

Las infecciones se realizaron utilizando hojas desprendidas de tres meses de edad. El conteo de esporangios y la medida del área de lesión se hicieron en lesiones de 9 dpi., y los esporangios producidos *in vitro* e *in vivo* fueron expuestos tanto a temperatura ambiente como a 4°C.

Todo el material vegetal empleado, se desinfectó, inoculó y conservó de acuerdo con el protocolo descrito en el anexo 1, para finalmente mantenerse a temperatura ambiente evitando la luz directa. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

5.3.1 Morfología de los esporangios

Los esporangios de cada uno de los cuatro tratamientos evaluados (Primero, esporangios provenientes de medio de cultivo inoculados a 4°C, segundo, esporangios provenientes de medio de cultivo inoculados a temperatura ambiente, tercero, esporangios provenientes de hojas inoculados a 4°C y cuarto, esporangios provenientes de hojas inoculadas a temperatura ambiente) fueron observados mediante microscopía de luz óptica. Se registraron las medidas de ancho y largo para cada esporangio observados con ayuda de un registro fotográfico y posterior análisis en el software *ImageJ* (*ImageJ* 1.49 software Maryland, USA). Se contaron en promedio 30 esporangios por cada replica técnica. Se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 biológicas en tiempos diferentes.

5.3.2 Virulencia de los esporangios

Para cada uno de los tratamientos evaluados, se registró el tiempo de incubación (tiempo en visualizar a través de un estereoscopio al menos un punto de necrosis en la lesión, medido en hpi, los tiempos evaluados fueron 24-28-38-45-48-52-69 y 72 horas). El área de lesión se evaluó mediante registro fotográfico y posterior estimación en el software *ImageJ* (*ImageJ* 1.49 software, Maryland, USA), y el número de esporangios producidos fue determinado mediante el conteo por triplicado en hemocitómetro, usando la fórmula matemática para concentración de esporangios (Anexo 1). Estas dos últimas variables fueron evaluadas únicamente a los 9 dpi.

5.4 Evaluación de la expresión génica de esporangios de *Phytophthora betacei* provenientes de medio de cultivo y de lesiones de hoja, expuestos a dos temperaturas distintas.

En *Phytophthora infestans*, Fry y colaboradores en 2019 observaron que los esporangios obtenidos en medios artificiales o en lesiones de hojas de su hospedero natural, eran diferentes en su perfil transcripcional global. La expresión de genes que dan respuesta al estrés, elicinas, o genes implicados en el transporte de azúcares o solutos fue diferente (Fry

et al., 2019). Con base en estos resultados, y con el fin de evaluar el efecto a nivel molecular de las dos formas de obtención de esporangios expuestos a dos temperaturas diferentes, se seleccionaron para este estudio ocho genes (Tabla 5-2), cuya expresión se evaluó mediante qRT-PCR, usando la actina como gen normalizador de la expresión.

Tabla 5-2. Genes expresados diferencialmente en esporangios de *Phytophthora infestans* Genotipo US-23 procedentes de hojas de tomate *Solanum lycopersicum* y de medio de cultivo arveja/centeno, identificados por Fry y colaboradores en 2019 y seleccionados para el análisis de expresión en este estudio. (Fry et al., 2019)

Gen	Anotación	Índice de cambio ^a US-P vs US-L ^b
PITG_21410	Elicitin-like INF4	63
PITG_12562	Elicitin-like protein	15
PITG_12556	Elicitin-like INF6	11
PITG_12872	MtN3-like protein	>1000
PITG_09907	4-beta-galactosidase	>200
PITG_13006	Major facilitator superfamily (MFS)	196
PITG_14993	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	161
PITG_14721	12-Oxodienoate reductase	117

^a Un valor de 10 significa que el gen se expresó 10 veces mayor en los esporangios US-P en comparación con los esporangios US-L, un valor de 1 significa que no hubo diferencias en los esporangios US-P en comparación con los esporangios US-L, un valor de 0,10 significa que hubo una décima parte de la expresión en los esporangios US-P que en los esporangios US-L.

^b Origen de los aislamientos US (US-23 *P. infestans*). -P (*Plate*): Esporangios provenientes de medio de cultivo, -L (*Leave*) esporangios provenientes de hojas de tomate.

5.4.1 Extracción de ARN

Como material para la extracción de ARN se usó tejido vegetal infectado por *P. betacei* P8084 recolectado a los 9 dpi para los cuatro tratamientos probados con sus respectivas replicas (Tres replicas técnicas y tres biológicas).

La recolección se realizó obteniendo las lesiones de hojas *S. betaceum* variedad común conservadas en cámaras húmedas en tubos eppendorf con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro (Cinco lesiones por tubo equivalente a aproximadamente 100 mg). El tejido se colocó en nitrógeno líquido y se transfirió inmediatamente a un congelador a -80°C donde se almacenó hasta su uso.

La disrupción del tejido se realizó mediante un macerado con mortero y pistilo. Finalmente, el proceso de extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el kit *InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit* (Stratec Molecular, InviTrap® Berlín, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se conservó en hielo unos minutos, mientras se realizaba la cuantificación por Nanodrop, y la evaluación de su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Anexo 2). El material se almacenó en un congelador a -80°C hasta su uso.

5.4.2 Obtención de ADNc

Se sintetizó ADNc empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Foster, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se conservaron tres alícuotas por muestra, cada una de 25µL en un congelador a -30°C (Se uso dentro de los cinco días posteriores a uso obtención).

5.4.3 Primers

Con el fin de evaluar la expresión de los genes seleccionados, se diseñaron los primers en el programa *primer BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) (Tabla 5-2). Para todos los primers el tamaño del producto esperado fue menor a 150 pb, su temperatura de alineamiento estuvo entre 50-65°C, y se verificó que no hubiese auto-complementariedad y que el anillaje se llevara a cabo en sólo una región del genoma *P. betacei* (P8084). Los primers se evaluaron mediante PCR con ADNc obtenido de micelio de *P. betacei* P8084 (Anexo 2).

Tabla 5-2. Secuencia de Primers utilizados para evaluar efecto del origen de los esporangios sobre la expresión de genes específicos de *Phytophthora betacei* por qRT-PCR.

Primer	Anotación	Secuencia (5'-3')
PITG_21410 F	Elicitina INF4	ACCAGTGC GTT GAGATG TTC
PITG_21410 R		TATGCTCG TTCTCCATCAGC
PITG_12562 F	Elicitina INF2B	CAGGGAACGTCTCTCAGCAC
PITG_12562 R		ATGTTGAGGTCGCAGTCAGG
PITG_12556 F	Elicitina INF6	GCCTCGGAATCAGGCTACAA
PITG_12556 R		ACGCTTGAACAACGCACATC
PITG_12872 F	Proteína transportadora MtN3	GGTTTACGCTTCGACACTGC
PITG_12872 R		TGCAGATTAAGGCCAAGGCA
PITG_09907 F	β-galactosidasa	ATCACCATCGGCTTCCTGTG
PITG_09907 R		CGTGCTGCCTTCCATAGAGT
PITG_13006 F	Transportador MFS (<i>Major Facilitator Superfamily</i>)	CTGCATCGGCATGAACTGGT
PITG_13006 R		GCCAACAGGAAGAAGATTGCAAGAA

[Continuación Tabla 5-2]

PITG_14993 F	L-isoaspartato O-metiltransferasa	CGATGGTCAAGACAGACCGT
PITG_14993 R		GTGGAAGCCGATAGGGTGAG
PITG_14721 F	12-oxodienoato reductasa	GTGTCCAGCTGAAGCATCGT
PITG_14721 R		CGTTGCACGTTGCGAGTAAT
PITG_14461 F	Actina	AGCTGTGGGCACACTTAAT
PITG_14461 R		CTGGTCCATGCTCTCATTCA

5.4.4 qRT-PCR

Se realizó una qRT-PCR estándar para examinar la expresión de los ocho genes seleccionados en los cuatro tratamientos determinados en este estudio, y se utilizó un termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems™ QuantStudio™, Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Las reacciones consistieron en un volumen final de 15 μ L, incluido 1 μ L de ADNc (80ng/ μ L en cada muestra), 0,45 μ L de cada primer 10pmol/ μ L, 6,25 μ L de *Maxima SYBR Green qPCR Mix (2X)* (Thermo Scientific®, CA, USA), 0.03 μ L de ROX 10nM y agua libre de nucleasas para completar el volumen. Los parámetros de la PCR fueron los siguientes: 95°C, 10 min; 95°C, 15s; 55°C, 1 min (40 ciclos). Este protocolo se realizó en conjunto con una curva de melting por cada ejecución para confirmar productos individuales leyendo cada 1°C. Los valores de Ct de expresión génica se normalizaron con la actina. Los resultados se calcularon utilizando cuantificación absoluta, mediante el cálculo del número de copias y normalización con el gen housekeeping, actina, evaluando la expresión diferencial en los cuatro tratamientos mediante análisis estadístico (Goss et al., 2013). Por otro lado para evaluar el efecto del origen del inóculo de los esporangios y de la temperatura de exposición de los mismos, en los niveles de expresión de los genes seleccionados, se empleó la expresión relativa a la obtenida en los esporangios producidos en medio de cultivo a 4°C (Método de recolección esporangial rutinario), este análisis se realizó mediante el método Pfaffl (Pfaffl, ML, USA, 2002).

5.5 Análisis estadístico

Se calcularon estadísticos de resumen para cada variable medida por cepa y por tratamiento, según correspondiera. Posteriormente, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Se trabajaron datos con comportamiento normalizado, y para

identificar las diferencias entre los tratamientos de interés, se realizó ANOVA multifactorial. La prueba post hoc de Tukey, el test de significancia honesta de Tukey o la prueba HSD de Tukey, realiza comparaciones múltiples creando parejas entre todas las medias de los tratamientos de una experiencia. Esta prueba se usó para evaluar si existía efecto entre los respectivos contrastes mediante todas las combinaciones posibles.

6. Resultados

6.1 Medios de cultivos para colección de esporangios de *Phytophthora betacei*.

Para los dos aislamientos evaluados (P8084 Y N9035), el crecimiento en términos de porcentaje de cobertura (Anova: $F= 845,72$; $p <0,001$) y esporulación (esporangios/mL) anova: $F= 2.46$; $p=0,018$, dependieron del medio de cultivo. Se observó que la concentración de esporangios/mL y el porcentaje de cobertura es mayor en los medios de cultivo PDA y TTA frente al CMA (Tukey $p<0,05$). Estos resultados permitieron descartar el medio CMA para los experimentos siguientes. Efectivamente, el crecimiento fue mayor al 80% en los medios TTA y PDA, mientras que en medio CMA no superó el 30% en ninguno de los aislamientos (Figura 6-3). En cuanto a la esporulación, en el medio CMA se obtuvo concentraciones de esporangios hasta 10 veces menores respecto a los otros medios evaluados (Figura 6-2).

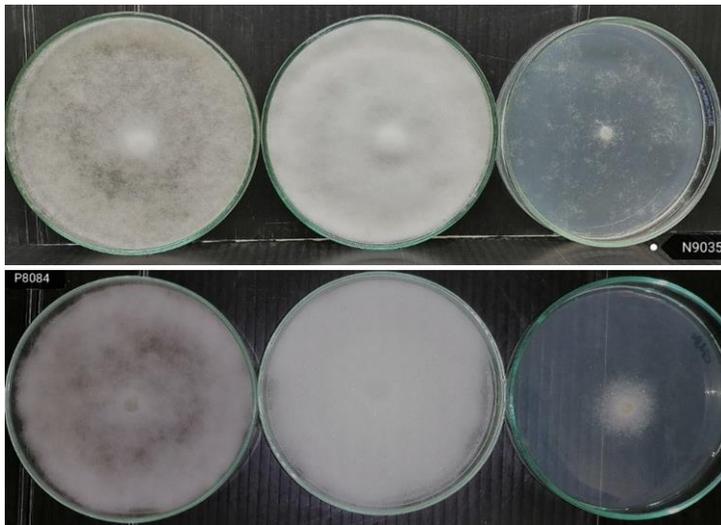


Figura 6-1. Colonias de *Phytophthora betacei* después de quince días de incubación a temperatura ambiente. De izquierda a derecha se visualiza el crecimiento en medio TTA, PDA y CMA. Las cajas de arriba corresponden al aislamiento N9035 y las de abajo al P8084.

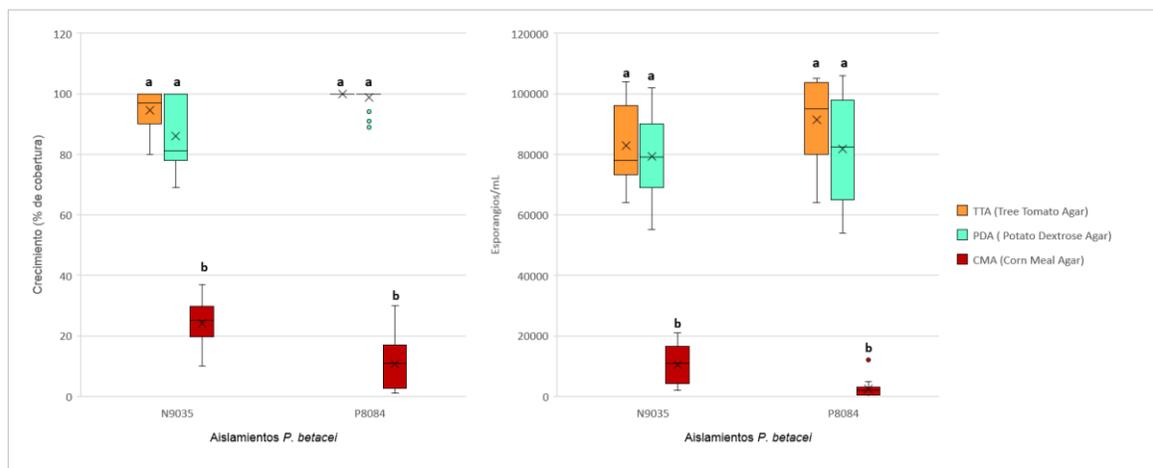


Figura 6-2. Comportamiento de dos aislamientos *Phytophthora betacei* en tres medios de cultivo (TTA, PDA y CMA), después de 15 de incubación a temperatura ambiente. De izquierda a derecha, el crecimiento en términos de porcentaje de cobertura de la caja (Anova: $F= 845,72$; $p < 0,001$) y la esporulación (esporangios/ml) anova: $F= 2.46$; $p=0,018$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

6.2 Establecimiento de unidades de análisis: Aislamiento de *Phytophthora betacei* más agresivo, variedad de *Solanum betaceum* más susceptible y medio de cultivo óptimo para recolección de esporangios.

Con el fin de determinar las unidades de trabajo a emplear en los ensayos posteriores, se evaluaron la esporulación (esporangios/ml) y el área de lesión (mm^2) obtenidas en hojas de dos variedades de *S. betaceum* (rojo y común) empleando como inóculo esporangios de dos aislamientos de *P. betacei* (N9035 Y P8084) producidos en dos medios de cultivo (PDA y TTA).

Se encontró que la esporulación (Anova: $F= 7,67$; $p=0,008$) y el área de lesión (Anova: $F= 20,64$; $p=0,02$) dependen del aislamiento, la variedad de tomate empleada y el medio de cultivo en el cual se produzcan los esporangios utilizados como inóculo (Figuras 6-3 y 6-4).

Para el aislamiento N9035, la esporulación y el área de la lesión no dependieron del medio de cultivo en el cual se produjo el inóculo mientras que para P8084 sí. En efecto, se observó que la esporulación y el área de la lesión para este aislamiento son significativamente mayores cuando los esporangios provienen de medio TTA (Tukey, $p<0.05$), en las dos variedades de tomate inoculadas. Además, los valores de esporulación y área de la lesión fueron mayores en la variedad común (Tukey, $p<0.05$).

Por lo anterior, se seleccionaron el aislamiento P8084, el medio de cultivo TTA y la variedad común de *S. betaceum*.

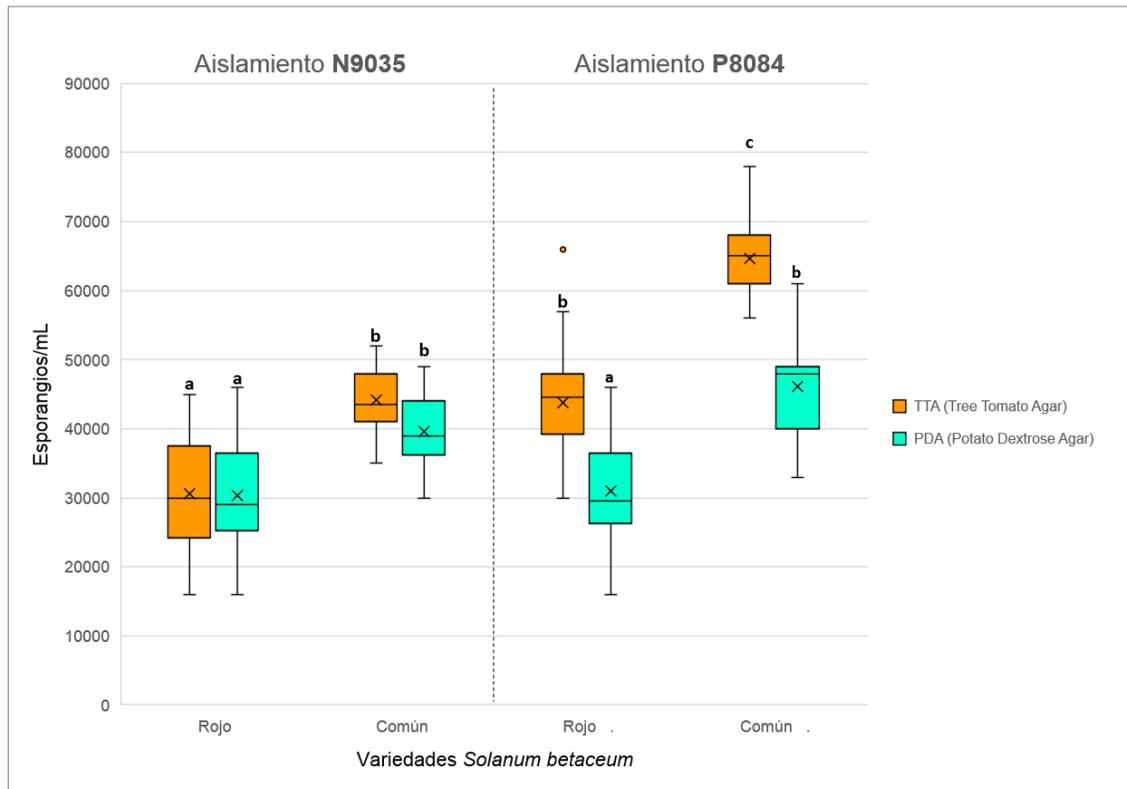


Figura 6-3. Esporulación (esporangios/mL) en dos aislamientos de *Phytophthora betacei* de izquierda a derecha aislamiento N9035 Y P8084 a los 9 días posteriores a la inoculación con esporangios provenientes de los medios de cultivo TTA y PDA, en hojas de dos variedades (rojo y común) de *Solanum betaceum* (Anova: $F=7,67$ $p=0,008$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p<0,05$).

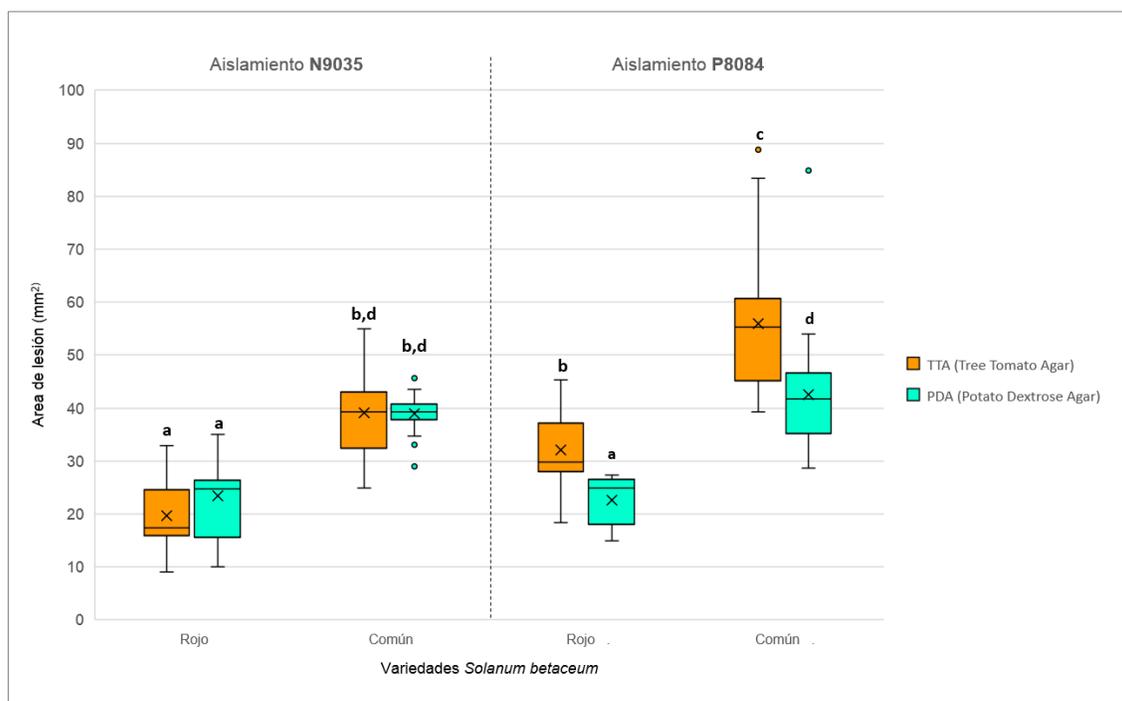


Figura 6-4. Área de lesión (mm^2) a los 9 días posteriores a la inoculación con esporangios provenientes de los medios de cultivo TTA y PDA de *Phytophthora betacei* de izquierda a derecha aislamiento N9035 Y P8084, evaluada en hojas *Solanum betaceum* (rojo y común) (Anova: $F=21,33$; $p=0,01$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p<0,05$).

6.3 Análisis fisiológico.

La unidad de análisis seleccionada consistió en: *P. betacei* aislamiento P8084 proveniente del medio de cultivo TTA inoculado sobre hojas desprendidas de *S. betaceum* variedad común. A partir de allí se establecieron cuatro tratamientos para la respectiva evaluación fisiológica y molecular, los cuales se abreviarán de la forma entre paréntesis: esporangios provenientes de hoja expuestos a temperatura ambiente (hoja/ambiente) y a 4°C (hoja/ 4°C), y esporangios provenientes de medio de cultivo expuesto a temperatura ambiente (medio/ambiente) y a 4°C (medio/ 4°C).

6.3.1 Evaluación del efecto del origen de los esporangios de *P. betacei* en su morfología

Se obtuvieron las medidas de largo y ancho de los esporangios, y la proporción entre estas dimensiones (Tabla 6-1), y se pudo determinar que el largo (μm) de los esporangios no

variaba respecto al origen ni a su temperatura de exposición (Anova: $F=0,21$; $p=0,28$). Por el contrario, el ancho de los esporangios (Anova: $F=2,46$; $p=0,03$) dependió del origen del inóculo (Tukey, $p<0,05$), y fue independiente de la temperatura de exposición (Anova: $F=1,01$; $p=0,66$). Y de igual forma, la proporción (largo:ancho) no dependió de la temperatura de exposición (Anova: $F=6,55$; $p=0,57$). Sin embargo, los esporangios medio/4°C presentaron una proporción mayor (Anova: $F=7,72$; $p=0,04$) estadísticamente significativas en comparación con los de hoja/4°C (Tukey, $p<0,05$) (Figura 6-5).

Los procedentes de hojas *S. betaceum* fueron más anchos que los de medio de cultivo y por lo tanto su proporción largo:ancho fue menor. Efectivamente, los esporangios de *P. betacei* presentaron una longitud promedio de $38,1\pm 4,5$ μm en los cuatro tratamientos realizados, (Mideros y colaboradores en 2018, reportaron una longitud de $39,3\pm 4,8$ μm). El ancho de los esporangios provenientes de medio de cultivo fue de $14,3 \pm 3,7$ μm en promedio para las dos temperaturas de exposición, y para los provenientes de hoja desprendida tuvo un promedio de $18,9 \pm 2,1$ μm en las dos temperaturas de exposición. Según lo reportado por Mideros y colaboradores en 2018, los esporangios de *P. betacei* tienen un ancho de $15,8 \pm 5,7$ μm (Mideros et al., 2018).

Tabla 6-1. Dimensiones de los esporangios *Phytophthora betacei* (P8084), provenientes de hojas *Solanum betaceum* y de medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C y observados a los 9 posteriores a la inoculación.

Experimento*	Largo (μm)	Ancho (μm)	Proporción Largo/Ancho
1 Hoja/ambiente	$39,60 \pm 7,83$	$19,57 \pm 4,51$	$2,06 \pm 0,48$
2 Hoja/ambiente	$37,69 \pm 3,76$	$18,05 \pm 3,74$	$2,08 \pm 0,39$
3 Hoja/ambiente	$37,01 \pm 4,74$	$17,97 \pm 1,97$	$2,18 \pm 0,38$
1 Hoja/4°C	$42,55 \pm 6,02$	$22,41 \pm 2,13$	$1,87 \pm 0,31$
2 Hoja/4°C	$41,36 \pm 3,04$	$22,61 \pm 5,14$	$2,00 \pm 0,14$
3 Hoja/4°C	$41,43 \pm 3,88$	$24,66 \pm 4,55$	$2,08 \pm 0,41$
1 Medio/4°C	$34,55 \pm 4,96$	$15,46 \pm 4,33$	$2,17 \pm 0,24$
2 Medio/4°C	$34,08 \pm 3,84$	$11,92 \pm 2,86$	$2,34 \pm 0,55$
3 Medio/4°C	$36,56 \pm 4,89$	$14,35 \pm 2,23$	$2,24 \pm 0,46$
1 Medio/ambiente	$31,16 \pm 6,27$	$13,01 \pm 4,15$	$2,40 \pm 0,70$
2 Medio/ambiente	$26,70 \pm 3,12$	$13,29 \pm 4,35$	$1,90 \pm 0,42$
3 Medio/ambiente	$31,93 \pm 3,43$	$13,37 \pm 4,37$	$2,54 \pm 0,35$

*La numeración de 1 a 3 indica la réplica biológica.

± Desviación estándar

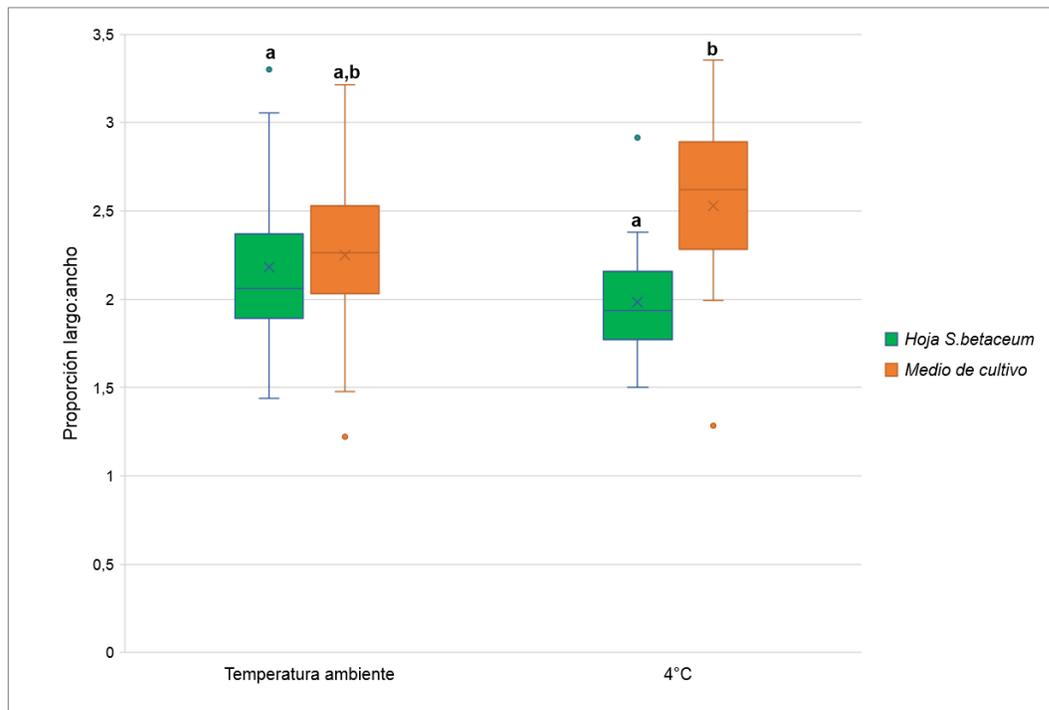


Figura 6-5. Proporción largo:ancho de esporangios *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y de medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C, observados a los 9 días posteriores a la inoculación (Anova: $F=7,72$; $p=0.04$). Los tratamientos con letras distintas indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p<0,05$).

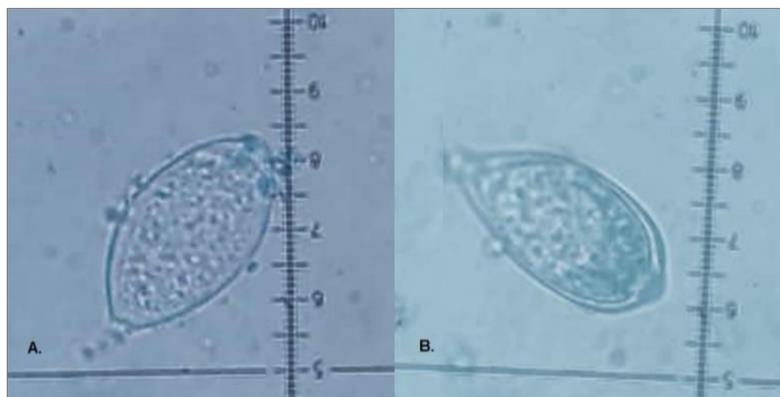


Figura 6-6. Esporangio de *Phytophthora betacei* (P8084) aislado de lesiones en hojas de *Solanum betaceum* variedad común observado mediante microscopía óptica **A.** Inóculo de infección proveniente de hojas *Solanum betaceum* **B.** Inóculo de infección proveniente de medio de cultivo TTA.

6.3.2 Evaluación del efecto del origen de los esporangios en la virulencia de *P. betacei*.

Se encontró que la esporulación (Anova: $F=9,30$ $p=0.39$) y el área de lesión (Anova: $F=0,43$ $p=0.51$) son equivalentes entre los esporangios provenientes de hojas *S. betaceum* y de medio de cultivo, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C (Figura 6-7). Por otro lado, el tiempo de incubación sí mostro diferencias estadísticamente significativas (Anova: $F=14,13$ $p=0,008$) dependiendo del origen del inóculo, siendo menor en los tratamientos hoja/4°C y hoja/ambiente respecto al tiempo en medio/4°C y medio/ambiente (Figura 6-8). Además, se observó que los esporangios de medio/4°C generaron los primeros indicios de necrosis más rápidamente en comparación con los de medio/ambiente (Tukey $p<0,05$).

En promedio el tiempo (horas) en visualizar los primeros puntos de necrosis de menor a mayor para cada uno de los inóculos fue: $27,88 \pm 5,23$ horas hoja/4°C, $32,25 \pm 2,59$ horas hoja/ambiente, $36 \pm 4,83$ hora medio/4°C $48,13 \pm 6,29$ medio/ambiente.

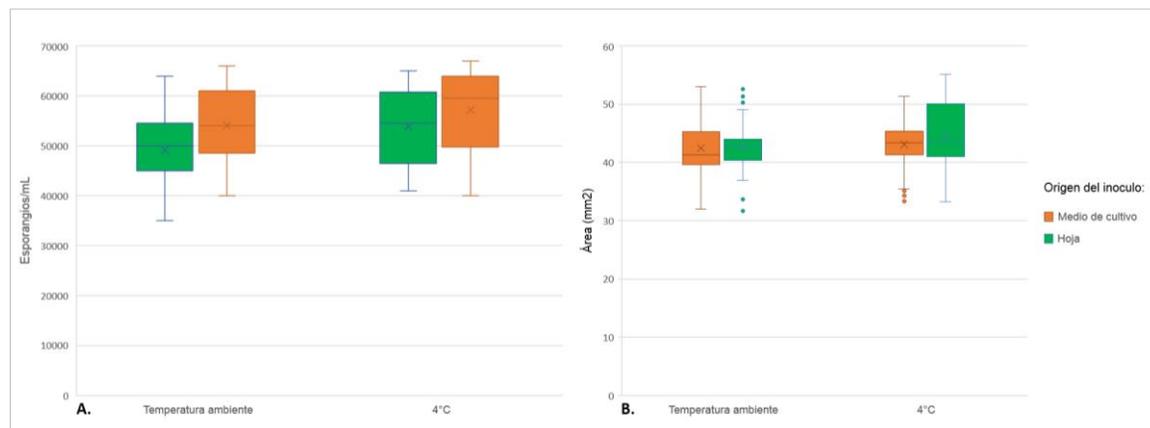


Figura 6-7. Esporulación (esporangios/mL) anova: $F=9,30$ $p=0.39$ y área de lesión (mm^2) anova; $F=0,43$ $p=0.51$, producida a los 9 días posteriores a la inoculación por *Phytophthora betacei* (P8084) proveniente de hojas *Solanum betaceum* variedad común y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C.

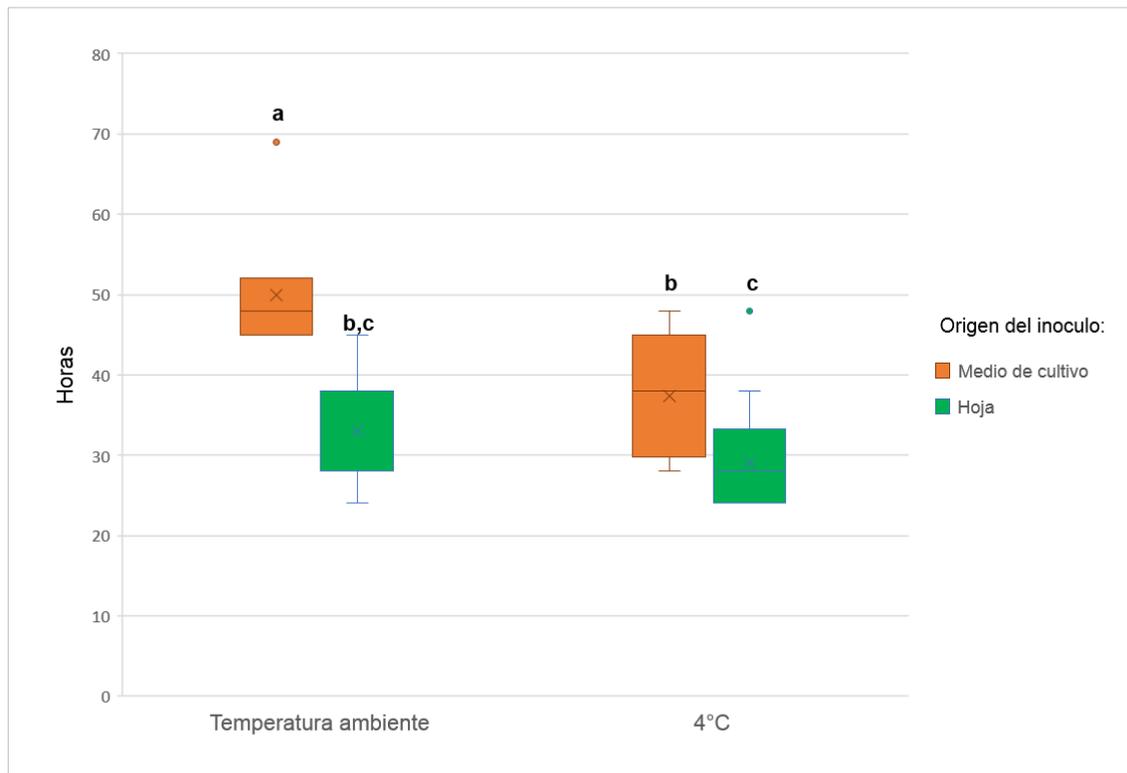


Figura 6-8. Tiempo (horas) de aparición de los primeros puntos de necrosis producidos por *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas de *Solanum betaceum* variedad común y de medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. Los tratamientos que no comparten al menos una letra indican que tiene diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

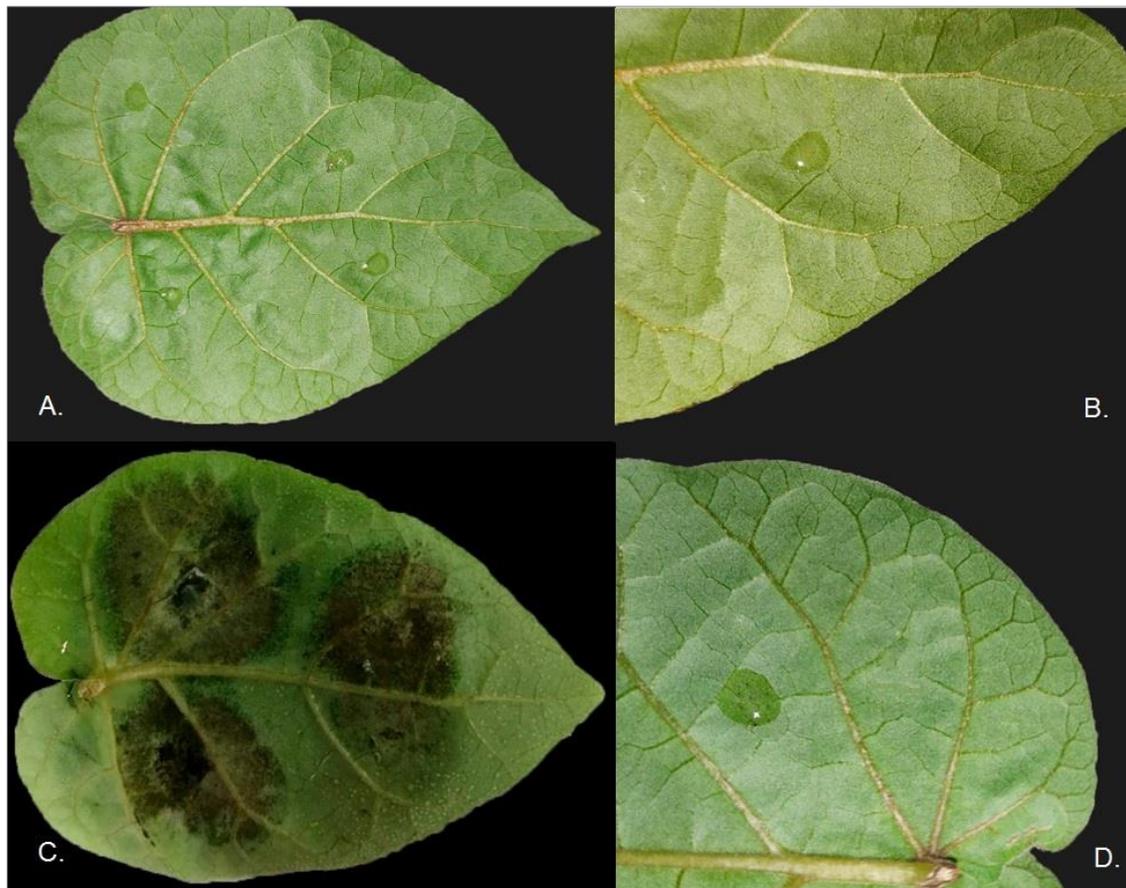


Figura 6-9. Hojas de *Solanum betaceum* variedad común infectadas con *Phytophthora betacei* (P8084). **A.** Día uno de la infección. **B.** Punto de infección a las 35 horas posteriores a la inoculación, usando una suspensión de esporangios provenientes del medio de cultivo TTA conservada a temperatura ambiente. **C.** Día noveno posterior a la inoculación **D.** Punto de infección a las 35 horas posteriores a la inoculación, usando una suspensión de esporangios provenientes de medio de cultivo expuesto a 4°C.

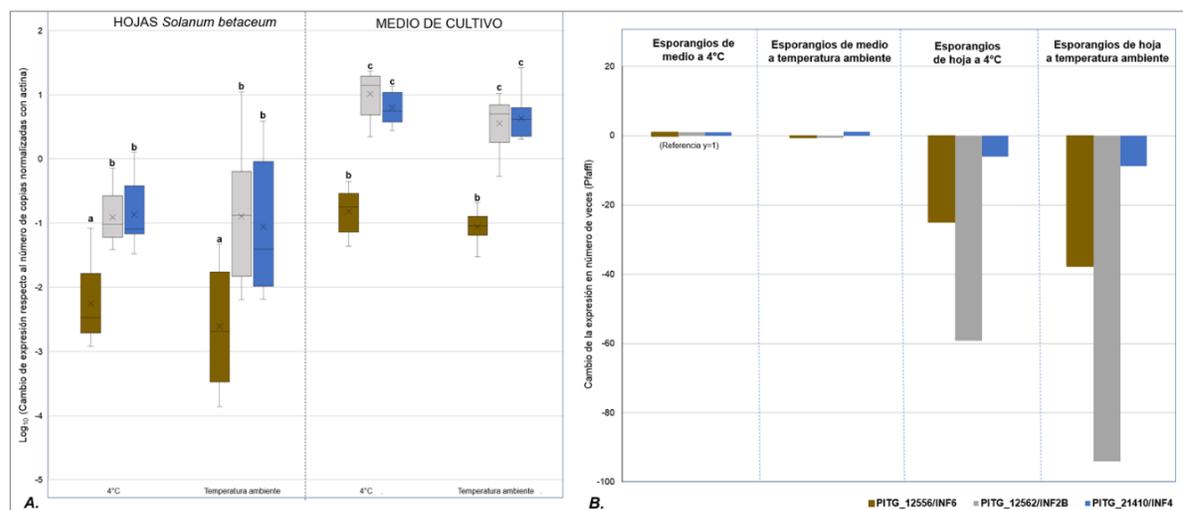
6.4 Evaluación del efecto del origen de los esporangios de *P. betacei* (medio de cultivo y hoja desprendida) en sus características moleculares.

Se analizó la expresión diferencial de ocho genes clasificados en tres grupos: i) elicinas, ii) genes vinculados a la respuesta al estrés y iii) genes implicados en el metabolismo de azúcares.

En el primer grupo, no se observó que la temperatura estuviera implicada en los cambios de la expresión de las elicinas (Anova: $F= 7,93$; $p=0,22$), pero sí dependió del origen de los esporangios (Anova: $F= 18,71$; $p=0,006$) (Figura 6-8 A). Cada una de las tres elicinas evaluadas en el caso de esporangios procedentes de hojas de *S. betaceum* tuvieron una menor expresión en comparación con las elicinas de los procedentes de medio de cultivo (Tukey, $p<0.05$). Además, se calculó la expresión relativa tomando como referencia el tratamiento medio/4°C se pudo confirmar el claro efecto del origen del inóculo en los niveles expresión de las elicinas (Figura 6-8).

Para el segundo grupo correspondiente a los genes relacionados con la respuesta al estrés, la expresión absoluta fue mayor en los tratamientos procedentes de medio de cultivo (Anova: $F= 8,01$; $p=0,01$); y en el caso del gen *PITG_13006/MFS*, se observó que la temperatura influyó sus niveles de expresión, siendo mayor en el tratamiento medio/4°C respecto a la que se obtuvo en tratamiento medio/ambiente (Tukey, $p<0.05$). Además, la expresión relativa de este gen para los inóculos provenientes de hoja fue hasta 800 veces menor en comparación con los que provenían de medio de cultivo (Figura 6-8).

En el grupo tres, genes vinculados al metabolismo de azúcares, se encontró que la temperatura no incidió en los cambios de expresión de ninguno de los dos genes evaluados (Anova: $F= 7,12$; $p=0,73$), y que los cambios estadísticamente significativos de la expresión de éstos dependían exclusivamente del origen de los esporangios (Anova: $F= 2,93$; $p=0,002$) (Figura 6-9).



[figura 6-10]

[Continuación figura 6-10]

Figura 6-10. Expresión de elicitinás (INF4, INF6 e INF2B) en esporangios de *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. **A.** Expresión absoluta de elicitinás normalizada con actina (Anova: $F= 18,71$; $p=0,006$), los tratamientos que no comparten al menos una letra indican que son significativamente diferentes (Tukey $p<0,05$). **B.** Evaluación del efecto de la temperatura y el origen de los esporangios, con base en la expresión relativa de elicitinás (método Pfaffl) respecto a los esporangios provenientes de medio de cultivo expuestos a 4°C (inóculo empleado rutinaria en los laboratorios).

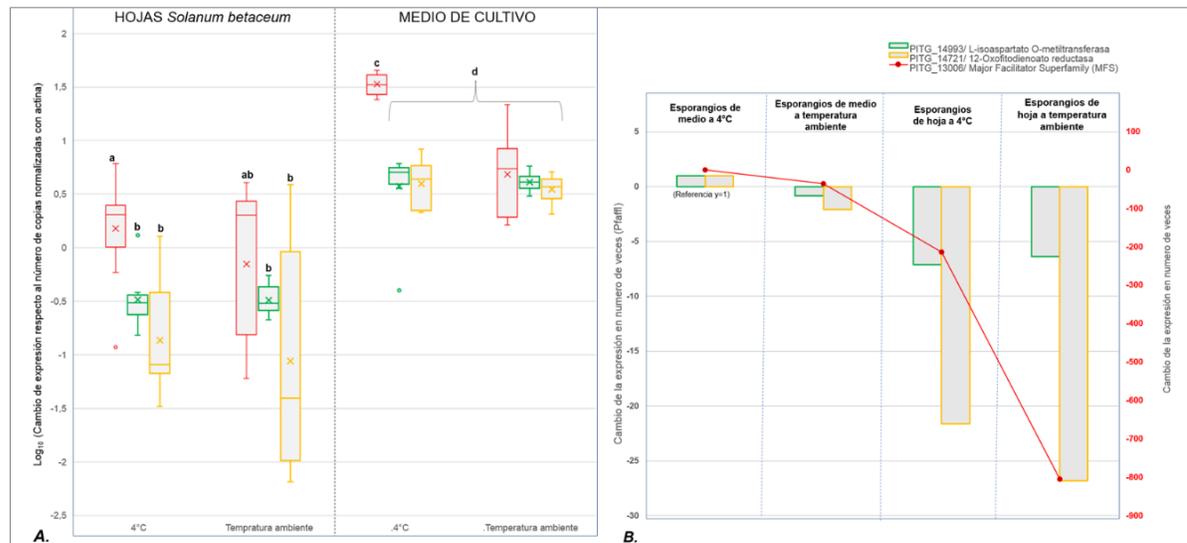


Figura 6-11. Expresión de genes vinculados en la respuesta al estrés en esporangios de *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. **A.** Expresión absoluta de genes vinculados en la respuesta al estrés normalizada con actina, los tratamientos que no comparten al menos una letra indican que son significativamente diferentes (Tukey $p<0,05$). **B.** Evaluación del efecto de la temperatura y el origen de los esporangios, con base en la expresión relativa de genes vinculados en la respuesta al estrés (método Pfaffl) respecto a los esporangios provenientes de medio de cultivo, expuestos a 4°C (inóculo empleado rutinaria en los laboratorios). El cambio de la expresión del gen *PITG_13006/MFS* corresponde a la escala en rojo.

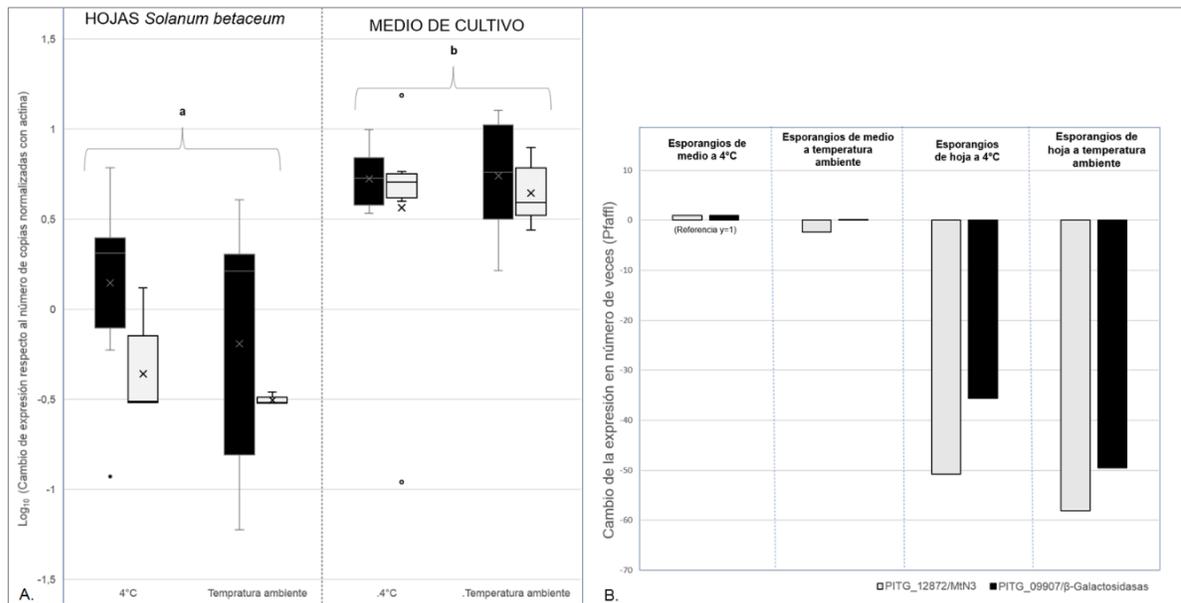


Figura 6-12. Expresión de genes vinculados al metabolismo de azúcares en esporangios de *Phytophthora betacei* (P8084) provenientes de hojas *Solanum betaceum* y del medio de cultivo TTA, expuestos a temperatura ambiente y a 4°C. **A.** Expresión absoluta de genes asociados al metabolismo de azúcares normalizada con actina, los tratamientos con letras distintas indican que son significativamente diferentes (Tukey $p < 0,05$). **B.** Evaluación del efecto de la temperatura y el origen de los esporangios, con base en la expresión relativa de genes asociados al metabolismo de azúcares (método Pfaffl) respecto a los esporangios provenientes de medio de cultivo, expuestos a 4°C (inóculo empleado rutinaria en los laboratorios).

7. Discusión

Con el objetivo de comparar a nivel fenotípico y genotípico los esporangios de *P. betacei* provenientes de medio de cultivo con los provenientes de hojas de su hospedero natural (*S. betaceum*), en este trabajo se realizó la evaluación de un aislamiento de *P. betacei* (P8084). Tanto el aislamiento del patógeno como la variedad del hospedero y el medio de cultivo se seleccionaron con el propósito de desarrollar todos los experimentos de forma eficiente, identificando que la variedad común de *S. betaceum* es más susceptible que la variedad rojo a una infección por *P. betacei*, que el aislamiento P8084 se comportó de manera más agresiva en comparación con el N9035, y que la concentración de esporangios fue mayor a los 9 días posteriores a la inoculación para el inóculo producido en el medio del cultivo TTA en comparación con el del medio de cultivo PDA. Además, de evaluar el origen del inóculo de infección (proveniente de medio o de hoja), los esporangios no solo se mantuvieron a temperatura ambiente, sino que se expusieron a 4°C con el fin de inducir la germinación indirecta como ocurre en *P. infestans* (Daniei, 2015).

En primer lugar, se observó que la temperatura no influyó en el ancho ni largo de los esporangios, pero el origen del inóculo sí. Los esporangios de *P. betacei* presentaron una longitud promedio equivalente para los cuatro tratamientos realizados, pero en cuanto al ancho, fueron diferentes los provenientes de medio de cultivo que los provenientes de hoja desprendida. La longitud que se determinó en este estudio estuvo acorde con lo reportado por Mideros y colaboradores en 2018, en la descripción de esta especie, y el ancho coincidió con lo que se obtuvo en los esporangios procedentes de medio de cultivo (Mideros et al., 2018). El ancho promedio que reportamos para los esporangios provenientes de hoja es mayor que los de medio de cultivo.

Dado que generalmente se han usado inóculos procedentes de medio de cultivo para realizar ensayos de infección en *Phytophthora* sp., la única investigación disponible sobre una

evaluación morfológica del origen de los esporangios lo registra Leesutthiphonchai y colaboradores en 2019. Estos autores evaluaron la razón entre el largo y ancho de los esporangios de *P. infestans* provenientes de medio centeno-sacarosa, hojas de papa (*S. tuberosum*) y hojas de tomate (*S. lycopersicum*), y determinaron que no hay efecto significativo sobre las dimensiones en los tres tipos de esporangios evaluados (Leesutthiphonchai & Judelson, 2019). Sin embargo, nuestros resultados dan un primer panorama de que sí pueden existir diferencias morfológicas en los esporangios *P. betacei* según su origen, lo cual puede explicarse porque la extensibilidad de la pared esporangial se adapta al ambiente donde se encuentre (Morejón & Pardo, 2008). Adicionalmente, se ha reportado que en *Phytophthora palmivora* las condiciones de crecimiento pueden afectar la morfología de los esporangios presentando cambios respecto a la temperatura, exposición a la luz y medio de cultivo del que provengan (Brasier & Griffin, 1979). Por otro lado, se sabe que la morfología de otros organismos, como en hongos entomopatógenos varía cuando se subcultivan en medios artificiales (Butt et al., 2006). Por estos motivos, se puede considerar que alguna propiedad de los tejidos vegetales induce cambios morfológicos en los esporangios de la especie *Phytophthora betacei*.

En cuanto al potencial de esporulación y el tamaño de la lesión, se observó que los resultados fueron equivalentes para los cuatro inóculos evaluados.

No obstante, respecto al periodo de incubación de la enfermedad sí hubo diferencias dependiendo del origen de inóculo, y de la temperatura de exposición, siendo el menor periodo para el tratamiento hoja/4°C y el mayor para medio/ambiente. Los periodos obtenidos se correlacionan con el tiempo en que se expresan los efectores de necrotrofia en *P. betacei*. *Phytophthora sp.* tiene un repertorio de proteínas efectoras que son importantes para infectar con éxito a sus anfitriones. Estos efectores en *P. betacei* fueron descritos por Buitrago y colaboradores en 2019, quienes indican que Npp1 y Nlp1 (efectores asociados a la etapa necrotrófica de enfermedad) tienen una mayor expresión entre las 24 a 72 horas de posteriores a la inoculación (Buitrago, et al., 2019).

En el caso de *P. infestans*, Fry y colaboradores en 2019 reportaron que los esporangios producidos en medios artificiales tienen una agresividad menor respecto a los producidos en lesiones de hojas de tomate (*S. lycopersicum*). Además del estudio mencionado anteriormente, se han evaluado los esporangios de *P. infestans* (especie que logra la liberación de la zoospora tras 2 horas de exposición a temperaturas inferiores a 10°C) frente

a otras variables; por ejemplo, frente a la reacción a la radiación solar, donde los esporangios procedentes de medio de cultivo son más sensibles que los aislamientos de hojas del hospedero natural. Esto fue descrito por Mizubuti y colaboradores 2000, quienes de manera accidental usaron esporangios de tejido infectado en campo, los cuales sobrevivieron durante períodos cortos de luz solar, a diferencia de los esporangios empleados inicialmente para su estudio (producidos en medio de cultivo), que murieron en todas las repeticiones realizadas (Mizubuti et al., 2000) (Fry, 2016). De igual forma, Fry en 2016, evaluó la resistencia frente a *P. infestans* de papa (*S. tuberosum*) mediante la sobreexpresión de osmotina PR5. Se observó que en su laboratorio, estas papas transgénicas retrasaban los síntomas del tizón tardío, sin embargo, en las pruebas de campo no se observó ningún retraso en el desarrollo de los síntomas (Fry, 2016).

En cuanto a las diferencias de expresión génica, los ocho genes evaluados se expresaron de forma diferencial según la procedencia de los esporangios. La evidencia molecular para establecer la diferencia en la manera de obtención de los esporangios de *P. betacei* (P8084) indica que la expresión de los genes seleccionados estuvo aumentada cuando estos provenían de medio de cultivo. Es interesante que la expresión de todos los genes presente mayores niveles en medio de cultivo y eso demuestra el efecto tan marcado sobre el metabolismo que tiene el origen de un inóculo.

Las elicinas, proteínas relacionadas con la estimulación de la respuesta inmune en plantas, presentaron sobreexpresión en los esporangios procedentes del medio del cultivo; esto podría indicar que este inóculo puede ocasionar una defensa más temprana de la planta. Por ejemplo, en *Phytophthora parasítica* frente a *Nicotiana tabacum* (tabaco) se demostró que las elicinas pueden inducir respuestas de defensa fuertes en el tabaco. Yu y colaboradores en 1995 purificaron elicinas y las evaluaron en concentraciones bajas, mostrando respuestas de muerte celular y resistencia contra el ataque posterior de patógenos. De igual forma, la producción de elicinas *in vitro* por los aislados de *P. parasítica* estuvo correlacionada negativamente con su patogenicidad en las plantas de tabaco, mostrando una rápida pérdida de electrolitos, cambios en la fosforilación de proteínas y cantidades de especies de oxígeno activo (Yu, 1995).

Pese a ello, en *P. betacei* (P8084) los tamaños de las lesiones ocasionadas y la concentración de esporangios, no se correlacionaron con el cambio de expresión encontrada en los esporangios según su procedencia.

Respecto a los marcadores de estrés, se evaluaron genes que codifican para tres proteínas diferentes. Se evaluó un transportador MFS (Major Facilitator Superfamily), un tipo de proteína que utiliza gradientes electroquímicos para impulsar la translocación de sustratos a través de la membrana en hongos y oomicetes, por lo que juegan un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos, minimizando la toxicidad de los fungicidas y químicos que generan estrés oxidativo (Hassan et al., 2014). También se evaluó la proteína l-isoaspartato O-metiltransferasa conocida como PIMT que tiene la capacidad de reparar proteínas dañadas, aunque su función en oomicetes no está completamente definida. Se ha sugerido que están involucradas en una variedad de procesos celulares, incluida la protección de las proteínas contra el estrés, convirtiendo residuos anormales de l-isoaspartilo en residuos normales de l-aspartilo para reestablecer la estructura y función de otras proteínas (Kamble & Majee, 2020). Por último la 12-oxofitodienoato reductasa que está involucrada en la síntesis de jasmonato y, por lo tanto, probablemente esté involucrada en la señalización y las respuestas de defensa (Pacheco, 2014).

Los genes asociados a la respuesta al estrés tuvieron un mayor nivel de expresión en los esporangios procedentes de medio de cultivo. Esta sobreexpresión deja muchas preguntas abiertas pues se esperaría que su sobreexpresión diera más tolerancia de los esporangios al estrés encontrado al atacar una planta y se esperaría, en consecuencia, más virulencia. En efecto, los esporangios de hoja presentan menores tiempos de incubación, sin embargo, los tamaños de lesión y la concentración de esporangios a los nueve días posteriores a la inoculación no presentaron cambios según el origen de los propágulos.

Además, el gen *PITG_13006/MFS* fue el gen que presentó cambios no solo respecto al origen de los esporangios, sino también respecto a la temperatura. Este gen se expresó hasta 800 veces más en esporangios de medio de cultivo que de hoja, y su expresión en los inóculos producidos a 4°C estuvo aumentada hasta 600 veces referente a los tratamientos que se mantuvieron a temperatura ambiente. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, está descrito que los transportadores MFS evitan la toxicidad de productos químicos y contrarrestan los efectos de los cambios extremos de temperatura, bombeando fuera de la célula agua, sustancias químicas u oxidantes y regulando la composición de membrana (Lin et al., 2018). Lo cual podría explicar el comportamiento de este gen en nuestros tratamientos, donde la exposición a temperaturas frías activa este tipo de transportadores como mecanismo de regulación para combatir con el estrés ambiental.

En cuanto los genes asociados al metabolismo de azúcares, *PITG_12872/MtN3* asociado al transporte de carbohidratos y *PITG_09907/galactosidasa*, enzima que interviene en diversas vías metabólicas y se encuentra en altas concentraciones en frutas; presentaron cambios de expresión, los cuales hacen referencia exclusivamente al origen de los esporangios, expresándose ambos genes en una cantidad mayor en los esporangios procedentes de medio de cultivo, lo cual puede estar relacionado con el metabolismo de los componentes del medio, un medio natural a base de extracto de tomate de árbol y azúcar de mesa como fuente de carbono (Rodríguez, 2015), un medio mucho más rico en nutrientes que lo que se encuentra en una hoja vegetal.

Estos resultados de expresión génica coinciden con los encontrados por Fry y colaboradores en 2019, quienes identificaron en *P. infestans* una sobreexpresión de elicinas, transportadores de nutrientes y proteínas de estrés en esporangios producidos en medios artificiales, frente a los que produjeron en lesiones de hojas *S. lycopersicum*. Ellos, a diferencia de este estudio correlacionaron los resultados moleculares con el comportamiento de la enfermedad, debido a que los esporangios *P. infestans* de medio de cultivo, sí se comportaron de manera menos agresiva con respecto al desarrollo de la lesión y la esporulación. Sin embargo, en nuestro estudio sí hubo una relación interesante, mayores niveles de expresión génica en esporangios cultivados en medios sintéticos y menores periodos de incubación de la enfermedad con aparición más temprana de síntomas cuando se usaron propágulos obtenidos de hojas.

Si los esporangios *Phytophthora* spp. son diferentes o no, dependiendo de dónde se produzcan, hoja o medio, es motivo de controversia, ya que Fry y colaboradores en 2019 reportaron que en *P. infestans* sí son diferentes en cuanto agresividad y perfil transcricional, pero Leesutthiphonchai y colaboradores en el mismo año publicaron que en esta misma especie sin importar el inóculo utilizado, los esporangios se comportan de manera similar.

En esta investigación, se evaluó una especie recientemente descrita y se encontró una variación de los propágulos según su procedencia. Es verdad que no se encontraron diferencias en todas las variables evaluadas como en caso de Fry y colaboradores en 2019 pero efectivamente, si hubo diferencias que pudieran intervenir en los resultados de los experimentos que se quieran realizar. Por lo cual, el uso de esporangios procedentes de

hojas del hospedero natural, como inóculo en los experimentos de laboratorio podría ser una nueva alternativa.

8. Conclusiones y recomendaciones

En este estudio se determinó que la variedad de *S. betaceum* común es más susceptible que la variedad rojo, que *P. betacei* (P8084) es un aislamiento más agresivo comparado con (N9035) y que el medio de cultivo TTA es idóneo para cultivar la especie *P. betacei*.

En cuanto a la evaluación de la infección empleado inóculos de esporangios producidos en diferentes condiciones, se encontró que existen cambios en ciertos rasgos de patogenicidad. Aunque el área de lesión y la esporulación no mostraron diferencias entre los tratamientos probados, características como el periodo de incubación, la proporción largo:ancho y la expresión de elicinas, genes vinculados a la respuesta al estrés y al metabolismo de azúcares, sí las presentaron. Por lo cual se puede concluir que los esporangios de *P. betacei* (P8084) producidos en medio de cultivo y en lesiones de hojas de *S. betaceum* variedad común son distintos. Los esporangios de *P. betacei* (P8084) producidos en hojas de *S. betaceum* fueron más anchos, generaron menores periodos de incubación, y la expresión de los genes evaluados estuvo significativamente disminuida. Además, en cuanto el efecto de la temperatura, cuando los inóculos de esporangios se expusieron a 4°C por cuatro horas, estos generaron un mayor nivel de expresión de genes vinculados al estrés y se disminuyeron los periodos de incubación (Figura 8-1).

Dichos resultados son muy importantes para guiar el trabajo en laboratorios de fitopatología y sugieren trabajar con esporangios o en general propágulos provenientes de tejido vegetal en los experimentos de laboratorio.

Se podrían considerar variables adicionales, como la evaluación de otros aislamientos de *P. betacei* y variedades de *S. betaceum*, ya que los distintos niveles de agresividad entre aislamientos y la susceptibilidad de las variedades de tomate de árbol, pueden identificar diferencias adicionales en el desarrollo de la infección. Además, un estudio en varios

aislamientos y variedades justificaría un análisis RNA-seq que esquematice la dinámica de las infecciones producidas con esporangios de distintas procedencias. También se podrían hacer ensayos en planta completa, y con condiciones de temperatura controlada.

En cuanto al análisis morfológico, los inóculos de *P. betacei* obtenidos mediante diferentes condiciones, se pueden describir por medio de mediciones adicionales, como el ancho de las hifas primarias, el tipo de ápice, papilación y caducidad. Además, para identificar si la hoja y/o el medio proporciona alguna condiciones especial, se pueden hacer ensayos citoquímicos mediante microscopia de fluorescencia (Javier et al., 2014).

Figura 8-1. Resumen de resultados del estudio “Caracterización de los esporangios de *Phytophthora betacei* producidos en medios artificiales y en lesiones de hojas de *Solanum betaceum*”.

ORIGEN DE LOS ESPORANGIOS DE <i>Phytophthora betacei</i>	HOJAS <i>Solanum betaceum</i>		MEDIO DE CULTIVO TTA	
	4°C	Ambiente	4°C	Ambiente
Área de lesión 9 dpi	Equivalente			
Esporulación 9 dpi	Equivalente			
Tiempo de incubación	↓	↓	↑	↑
Proporción largo: ancho	↓		↑	
Elicitinas	↓		↑	
Respuesta al estrés	↓		↑	↑
Metabolismo de azúcares	↓		↑	

9. Referencias

- Acosta, I. (2008). *Pruebas de tolerancia a Phytophthora cinnamomi* Rands. en plántulas de aguacate criollo Mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263138086011.pdf>
- Acosta, P. (2011). *Caracterización morfológica y molecular de tomate de árbol, solanum betaceum* cav. (solanaceae). Universidad Politécnica de Madrid. Universidad Politécnica de Madrid, España. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=185442>
- Acuña, I. (2018). Red de cooperación latinoamericana sobre el estudio del tizón tardío en Solanaceas. En *III Taller de la Red Tizón Latino* (pp. 1-22). Lima, Peru. <https://doi.org/10.4160/9789290604907>
- Bashan, B. (1989). Infectivity to Potato, Sporangial Germination, and Respiration of Isolates of *Phytophthora infestans* from Metalaxyl-Sensitive and Metalaxyl-Resistant Populations. *Phytopathology*, 79(8), 832. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-832>
- Brasier, C. (2008). The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology*, 57(5), 792-808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x>

- Brasier, C., & Griffin, M. (1979). Taxonomy of 'Phytophthora palmivora' on cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 72(1), 111-143. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(79\)80015-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(79)80015-7)
- Buitrago, C., Restrepo, S., & Bernal, A. (2019). *Insights on the role of core and unique effectors of Phytophthora betacei in the progression of the disease in tree tomato (Solanum betaceum)*. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://hdl.handle.net/1992/43819>
- Burgess, T., Simamora, A., White, D., Williams, B., Schwager, M., Stukely, M., & Hardy, G. (2018). New species from Phytophthora clade 6a: Evidence for recent radiation. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41, 1-17. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.01>
- Burki, F. (2014). The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), 1-18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016147>
- Butt, T., Wang, C., Shah, F. y Hall, R. (2006). *Degeneración de hongos entomógenos: Eilenberg J., Hokkanen H. (eds) An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Progress in Biological Control (vol 2.)*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-1-4020-4401-4_10
- Céron, I., Higueta, J., & Cardona, C. (2011). Antioxidant capacity and total phenolic content of three fruits from Andean region. *Literature-Film Quarterly*, 18(1), 2-10. Recuperado de http://vip.ucaldas.edu.co/vector/downloads/Vector5_2.pdf
- Cevallos, G., Viteri, P., L. J. (2004). Estación Experimental Santa Catalina-Programa de fruticultura granja experimental Tumbaco. *Manual del Cultivo de tomate de árbol NIAP*, 1-56. Recuperado de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/827/4/iniapscm61.pdf>
- Chañag, H., Viveros, J., Álvarez, S., Criollo, H., & Lagos, L. (2017). [*Cyphomandra betacea* (Cav .) Sendt .] frente al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont .) de Bary sensu lato Evaluation of tree tomato genotypes [*Cyphomandra betacea* (Cav .) Sendt .] for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont .) de Bary sensu la. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1), 11-20. Recuperado de

<http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v11n1/2011-2173-rcch-11-01-00011.pdf>

- Chavez, S., Guayazán, N., Mideros, M., Parra, M., Lucca, F., & Restrepo, S. (2020). Two Clonal Species of *Phytophthora* Associated to Solanaceous Crops Coexist in Central and Southern Colombia. *The American Phytopathological Society (APS)*. <https://doi.org/doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0175-R>
- Childers, R., Danies, G., Myers, K., Fei, Z., Small, I. M., & Fry, W. (2015). Acquired resistance to mefenoxam in sensitive isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 105(3), 342-349. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-14-0148-R>
- Collins S., McComb J., Howard K., Shearer B., C. I. & H. G. (2012). The long-term survival of *Phytophthora cinnamomi* in mature *Banksia grandis* killed by the pathogen. *Forest Pathology*, 42, 28-36. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00718.x>
- Curvero, L. Rojas, J. (2010). *Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums ascomycetes, deuteromycetes y oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10554/8741>
- Danies, G. (2015). *Population Genetics Of Phytophthora Infestans In The United States*. Cornell University. Recuperado de <https://hdl.handle.net/1813/40634>
- de Vries, S., von Dahlen, J. K., Uhlmann, C., Schnake, A., Kloesges, T., & Rose, L. E. (2017). Signatures of selection and host-adapted gene expression of the *Phytophthora infestans* RNA silencing suppressor PSR2. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 110-124. <https://doi.org/10.1111/mpp.12465>
- Díaz, L., Canto, M., Alegre, J., Camarena, F., & Julca, A. (2017). Sostenibilidad social de los subsistemas productivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en el cantón Guachapala, provincia de Azuay - Ecuador. *Ecología Aplicada*, 16(2), 99-104. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21704/rea.v16i2.1013>
- Drenth, André; Guest, D. (2013). *Phytophthora: The Plant Destroyer*. PALMAS, Centro de Información de Fedepalma, 49-55. Recuperado de <https://publicaciones.fedepalma.org/>
- Erwin, D. ; Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora diseases worldwide* (Sociedad E). Department

- of Plant Pathology, University of California, Riverside, USA. <https://doi.org/19971001256>
- Feican, C., Alvarado, C., Becerril, A. (2016). Agronomic description of the Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) Crop. *Revista Agro Productividad*, 9, 78-86. Recuperado de <https://core.ac.uk/reader/249320590>
- Flores, M., Margus, S., Carvajal, A., & Rodríguez, L. (2017). El papel del ácido gamma-aminobutírico en la depresión de la mujer. *GACETA MÉDICA DE MÉXICO, Departamen*. <https://doi.org/10.24875/GMM.17002544>
- Flores, R. (2010). *Estudio Poblacional De Oomicetos Aislados De Suelos Hortícolas En Tepetitla Tlax.* Instituto Politecnico Nacional. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/9795>
- Fry, W. (2008). Phytophthora infestans: The plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 385-402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>
- Fry, W. (2016). Phytophthora infestans: New Tools (and Old Ones) Lead to New Understanding and Precision Management. *Annu. Rev. Phytopathol*, 54, 529–547. Recuperado de <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095951>
- Fry, W., & Grünwald, N. (2010). Introducción a los Oomicetes. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2012-0220-01>
- Fry, W., Patev, S., Myers, K., Bao, K., & Fei, Z. (2019). Phytophthora infestans sporangia produced in culture and on tomato leaflet lesions show marked differences in indirect germination rates, aggressiveness, and global transcription profiles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(5), 515-526. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-18-0255-TA>
- Fundora, D. González, D., Costales, D., & Rodríguez, A. (2014). Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de Phytophthora nicotianae Breda de Haan. *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 33-41. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n1/rpv04114.pdf>
- Garcés S., Eloy, J., Revelo, P. (2008). *Enfermedades, nematodos e insectos plaga del tomate de arbol (Solanum betaceum Cav.)*. (Estación experimental Santa Catalina, Ed.). Quito, Ecuador: Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/513/5/iniapscbt115.pdf>

- Goss, E., Press, C., & Grünwald, N. (2013). Evolution of RXLR-class effectors in the oomycete plant pathogen *Phytophthora ramorum*. *PLoS ONE*, 8(11), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079347>
- Hassan, K., Paulsen, K., Elbourne, L., Ren, Q., Cameron, A., & Henderson, P. (2014). Microbial Solute Transporters. En *Enciclopedia de microbiología* (pp. 529-544). <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02464-8>
- Heiser, A. (1999). New solanums: Perspectives of new crops and new uses. *ASHS Press*, (Alexandria, Virginia, USA), 379-384. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0304-2847200700020000700037&lng=en&pid=S0304-28472007000200007>
- Henao, C. (2017). *CARACTERIZACIÓN Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos de Phytophthora cinnamomi obtenidos de huertos de aguacate del departamento de Antioquia, Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59932>
- Hyun, I., & Choi, W. (2014). *Phytophthora* species, new threats to the plant health in Korea. *Plant Pathology Journal*, 30(4), 331-342. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.07.2014.0068>
- ImageJ 1.49 software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). (s. f.). Maryland, USA. Recuperado de <https://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html>
- Javier, E., Baron, R., Rolleri, C., Guarín, F., Mireya, J., & Gálvez, D. (2014). Ontogenia de los esporangios, formación y citoquímica de esporas en licopodios (Lycopodiaceae) colombianos. *Revista de Biología Tropical*, 62(March), 273-298. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442014000200021&lng=en&tlng=es
- Jung, T., Pérez, A., Durán, A., Jung, M., Balci, Y., & Scanu, B. (2018). Canker and decline diseases caused by soil- and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 40, 182-220. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.08>
- Kamble, N., & Majee, M. (2020). Protein l-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) in plants:

- regulations and functions. *Biochemical Journal*, 477(22), 4453-4471. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200794>
- Kou, M., Yen, J., Hong, J., Wang, C., Lin, C., & Wu, M. (2009). Cyphomandra betacea Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 458-463. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.09.010>
- Leesutthiphonchai, W., & Judelson, H. (2019). Phytophthora infestans sporangia produced in artificial media and plant lesions have subtly divergent transcription profiles but equivalent infection potential and aggressiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(9), 1077-1087. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-18-0349-TA>
- Lehsten, V., Wiik, L., Hannukkala, A., Andreasson, E., Chen, D., Ou, T., ... Grenville, L. (2017). Earlier occurrence and increased explanatory power of climate for the first incidence of potato late blight caused by Phytophthora infestans in Fennoscandia. *PLoS One*, (30;12(5)), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177580>
- Leon, J. Veteri, P. (2003). Generación y difusión de alternativas tecnológicas para mejorar la productividad de Tomate de arbol y Babaco en la sierra ecuatoriana. INIAP-PROMSA. *Informe Técnico Flnal. Proyecto IQ CV 008.*, p. 138.
- Lin, H., Yu, P., Chen, L., Tsai, H., & Chung, K. (2018). A major facilitator superfamily transporter regulated by the stress-responsive transcription factor yap1 is required for resistance to fungicides, xenobiotics, and oxidants and full virulence in alternaria alternata. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02229>
- Lobo, M., Medina, C., & Cardona, M. (2000). Resistencia de campo a la antracnosis de los frutos (colletotricum gloeosporioides) en tomate de arbol. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 53(2), 1129-1142. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24202>
- Macé, F. (2010). Ficha del árbol del tomate o tamarillo (Solanum betaceum = Cyphomandra betacea). Recuperado de <https://www.infojardin.com/>
- Martínez, M., Ortiz, B., Pérez, C., & Anzola, C. (2011). The effect of pectin extracted from

- guava on lipid profile in adults with different cardiovascular risk. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*, 59(2), 103-111. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/23706>
- Mccarthy, C., & Fitzpatrick, D. (2017). Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes. *mSphere*, 12;2(2):e0, 1-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00095-17>
- Medina, Y. (2009). *Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Journal of Clinical Oncology.* [cua0007s00]TÍTULO: Phytophthora:Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control.Autor: Yamilé Echemendia Medina.Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Recuperado de <https://docplayer.es/13873225-Titulo-phytophthora-caracteristicas-diagnostico-y-danos-que-provoca-en-algunos-cultivos-tropicales-medidas-de-control.html>
- Mideros, M., Fry, W., Restrepo, S., & Guayazán, N. (2016). Ecological speciation 1 within the *Phytophthora* genus. *Phytopathology*, 97-97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/096842>
- Mideros, M., Turissini, D., Guayazán, N., Ibarra, H., Danies, G., Cárdenas, M., ... Restrepo, S. (2018). *Phytophthora betacei*, a new species within *Phytophthora* clade 1c causing late blight on *Solanum betaceum* in Colombia. *Persoonia*, 41, 39-55. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.03>
- Mizubuti, E., Aylor, D., & Fry, W. (2000). Survival of *Phytophthora infestans* Sporangia Exposed to Solar Radiation. *Phytopathology*, 90(1), 78-84. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.78>
- Morejón, L., & Pardo, E. (2008). *Microbiología I.* (rsidad nacional agraria facultad de ciencia Animal, Ed.), *Texto de Microbiología I.* Managua, Nicaragua. Recuperado de <http://repositorio.una.edu.ni/2454/1/n579m838.pdf>
- Moreno, C., Molina, J. I., Ortiz, J., Peñafiel, C., & Moreno, R. (2020). The value chain of tree tomato (*Solanum betaceum*) network in Ecuador. *Agronomy Mesoamerican*, 31(1), 13-29. <https://doi.org/10.15517/AM.V3111.36887>

- Núcleo Ambiental S.A.S, C. (2015). *Manual Tomate de árbol - Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresarial, Cámara de Comercio de Bogotá Vicepresidencia de Fortalecimiento Empresarial Programa de Apoyo Agrícola y Agroindustrial*. Recuperado de <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/handle/11520/14308>
- Oliva, R., Kroon, L., Chacón, G., Flier, W. G., Ristaino, J., & Forbes, G. (2010). *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology*, 59(4), 613-625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02287.x>
- Ordóñez, R., Cardozo, L., Zampini, I., & Isla, M. (2010). Evaluation of Antioxidant Activity and Genotoxicity of Alcoholic and Aqueous Beverages and Pomace Derived from Ripe Fruits of *Cyphomandra betacea* Sendt. *Revista de química agrícola y alimentaria*, 58(1), 331-337. Recuperado de doi.org/10.1021/jf9024932
- Pacheco, R. (2014). *Caracterización de la necrosis sistémica inducida por la interacción sinérgica entre el*. Universidad Politecnica de Madrid. Recuperado de http://oa.upm.es/29361/1/Remedios_Pacheco_Pina.pdf
- Patev, S. (2017). *Culture-grown sporangia of Phytophthora infestans differ from sporangia harvested from living plant tissue*. *Journal of Personality and Social Psychology*. Thesis, Cornell University. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02280.x>
- Petri, L. (1917). Research on morphology and biology of *Blepharospora cambivora* parasitica from chestnut. Italia: 26. Recuperado de https://scholar.google.com/scholar_lookup?hl=en&volume=26&publication_year=1917&pages=297-299&journal=Atti+R.+Accad.+Lincei&author=L.+Petri&title=Research+on+morphology+and+biology+of+Blepharospora+cambivora+parasitica+from+chestnut#d=gs_cit&u=%252Fscholar%25
- Pfaffl, M., Horgan, G., & Dempfle, L. (2002). Pfaffl. *Journal of Geophysical Research*. <https://doi.org/doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Ramírez, J., Gil, A., & Morales, J. (2017). Etiology of tree tomato (*Solanum betaceum* CAV.) diseases. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 33-51. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n1/rpv04117.pdf>

- Revelo, J., Mora, E., & Reyes, M. (2004). Conozca la enfermedad mancha negra del tronco del tomate de árbol -Boletín Plegable no. 226. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Protección Vegetal.
- Rodríguez, D. (2015). *Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de Kluyveromyces lactis* Study of the synthesis of GOS by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase *Estudo da síntese de GOS pola β -galactosidasa de Kluyveromyces lactis*. Universidade da Coruña, España.
- Rondón, J. (2006). Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* del tomate de árbol *Solanum betaceum*, y generación de alternativas para manejo integrado en Colombia. *Programa Nacional Manejo Integrado De Plantas*. Recuperado de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/>
- Solano, J., Acuña, I., Chauvin, J.-E., & Brabant, P. (2016). In-Vitro Evaluation of Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) in *Solanum* Accessions Native to Chile, by Inoculation of Detached Leaflets Jaime. *American Journal of Plant Sciences*, 07(03), 581-589. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.73051>
- Tamayo, P. (2001). Principales enfermedades del tomate de árbol, mora y el lulo en Colombia. *CORPOICA- Corporación colombiana de investigación agropecuaria. Ministerio de agricultura., Boletín té*, 6-16. Recuperado de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4176/1/083.pdf>
- Torres, A. (2012). Caracterización física , química y compuestos bioactivos de pulpa madura de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). *ALAN [online] ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 62(1), 381-388. <https://doi.org/ISSN 0004-0622>
- Yang, X., Tyler, B. M., & Hong, C. (2017). An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus*, 8(2), 355-384. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.09>
- Yu, L. (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4088-4094. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4088>

A. Anexo1. Protocolo de infección de *Phytophthora betacei* sobre hojas de *Solanum betaceum*

Se establece el siguiente protocolo de infección de *P. betacei* sobre hojas jóvenes sanas de *Solanum betaceum* variedad rojo y común. La técnica de infección es por gota en hojas desprendidas. Las hojas por infectar deben ser desprendidas justo antes del procedimiento, y estar visualmente sanas, diferenciando las hojas de cada una de las variedades.

1. Desinfección de las hojas *S. betaceum*

El exceso de tierra o demás agentes se retiran sumergiendo la totalidad de la hoja en agua del grifo, hasta que esté visiblemente limpia. Luego se procede con diferentes lavados (Figura A-1), donde se debe sumergir la totalidad de la hoja alrededor de 10 segundos en cada paso.



Figura A-1. Lavados para el proceso de desinfección de hojas desprendidas *Solanum betaceum*.

A cada hoja, de ser necesario, se le retira el tallo sobrante. Finalmente, las hojas se colocan sobre toallas de papel estéril hasta que estén totalmente secas.

2. Infección

Las hojas se ubican con el lado abaxial hacia arriba sin tocarse entre sí. Cada hoja se inoculó con una gota de 25 μ L de la suspensión de esporangios (Previo vortex) en cuatro puntos diferentes y equidistantes. Como control negativo se inocula una hoja únicamente con la solución petri empleada para la suspensión de trabajo.

3. Preparación del inóculo de *P. betacei*:

La suspensión para la inoculación puede provenir de dos fuentes (Medio de cultivo u hoja) y exponerse a dos temperaturas (Mantener a temperatura ambiente, o se recomienda exponer a 4°C para estimular la germinación indirecta).

Cuando los esporangios provienen de medio de cultivo, se recolectan las colonias en crecimiento activo (13-15 días de crecimiento en agar tomate de árbol TTA) raspando suavemente el micelio con ayuda de una varilla de vidrio estéril. Si se va a usar como inóculo lesión de hojas *S. betaceum*, se recolectan las lesiones cortandolas con ayuda de una cuchilla nueva u otro elemento cortante estéril.

El inóculo se suspende en un eppendorf estéril con 1 mL de solución Petri estéril, y se ajusta a la concentración deseada mediante un conteo en hemocitómetro usando el siguiente calculo:

$$\frac{\text{Numero de esporangios contados} * 10^4 \text{ cel/mL}}{\text{Numero de cuadrantes contados}}$$

4. Conservación de la suspensión antes de la inoculación

Temperatura ambiente: Una vez se confirma la concentración de esporangios y se mezcla la suspensión con ayuda del vortex, se procede de forma inmediata a inocular las hojas.

4°C: Una vez se confirma la concentración de esporangios, se lleva el inóculo a 4°C por dos horas, pasado este tiempo se mezcla la suspensión con ayuda del vortex y de forma inmediata se inoculan las hojas. Las hojas ya inoculadas se llevan 2 horas más a 4°C y finalmente se conservan en el lugar designado a temperatura ambiente.

5. Conservación de las hojas

Mantenimiento en cámaras húmedas: Son recipientes plásticos transparentes con rejilla. Para la conservación de hojas, estos deben tener tapa y deben estar desinfectados. Las cajas se humedecen con agua destilada estéril cuyo volumen no toque la rejilla y se debe cambiar a diario procurando dejar siempre la rejilla seca.

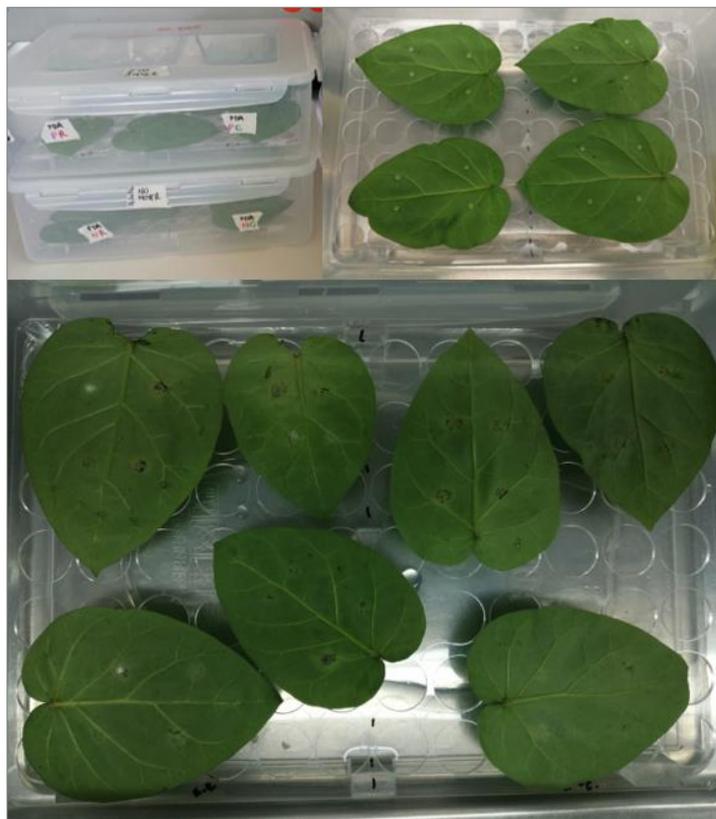


Figura A-2. Conservación de hojas *Solanum betaceum* en cámaras húmedas.

Mantenimiento en agar: Como alternativa a las cajas plásticas donde se pueden conservar cuatro o más hojas, se puede usar el agar agua para mantenimiento individual de hojas. Se utiliza el agar agua al 10% (se estandarizó para *S. betaceum* esta concentración después de probar concentraciones desde el 4% hasta el 16% de agar). La caja de petri debe estar estéril, y su tamaño no debe arrugar o lastimar de ninguna manera la hoja. La capa de agar debe ser fina, de tal manera que no toque la hoja.

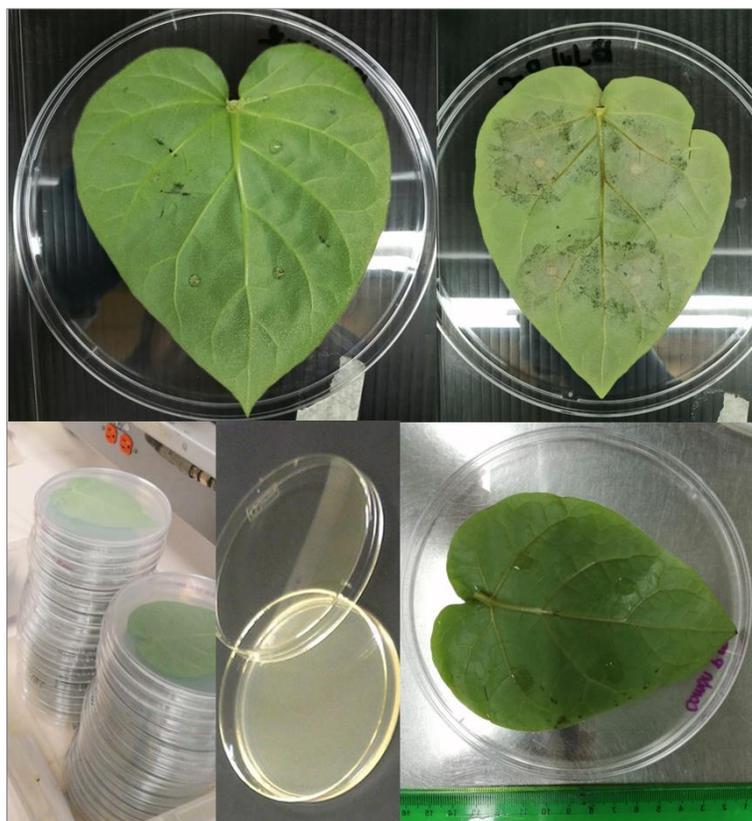


Figura A-3. Conservación de hojas *Solanum betaceum* en agar agua.

B. Anexo 2. Geles de agarosa

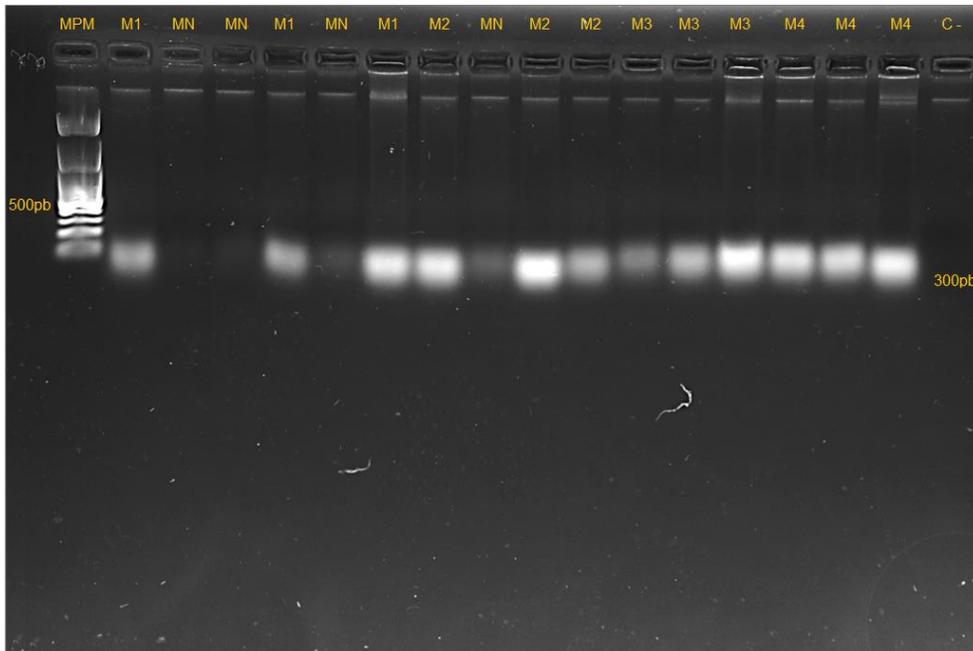


Figura B-1. Gel de agarosa al 1,5% mostrando la amplificación de 300 pb del RNA obtenido de hojas *Solanum betaceum* variedad común infectadas con *Phytophthora betacei* (P8084) mediante cuatro tipos de inóculo (M1, M2, M3 y M4). MPM= Marcador de peso molecular 100bp+3K DNA Ladder *Smobio*. MN=Muestra no seleccionada (descartada), M1= Suspensión de esporangios conservada a temperatura ambiente proveniente de hojas *S. betaceum*, M2= Suspensión de esporangios expuesta a 4°C proveniente de hojas *S. betaceum*, M3= Suspensión de esporangios conservada a temperatura ambiente proveniente del medio de cultivo TTA, M3= Suspensión de esporangios expuesta a 4°C proveniente del medio de cultivo TTA, (C-) = Control negativo.

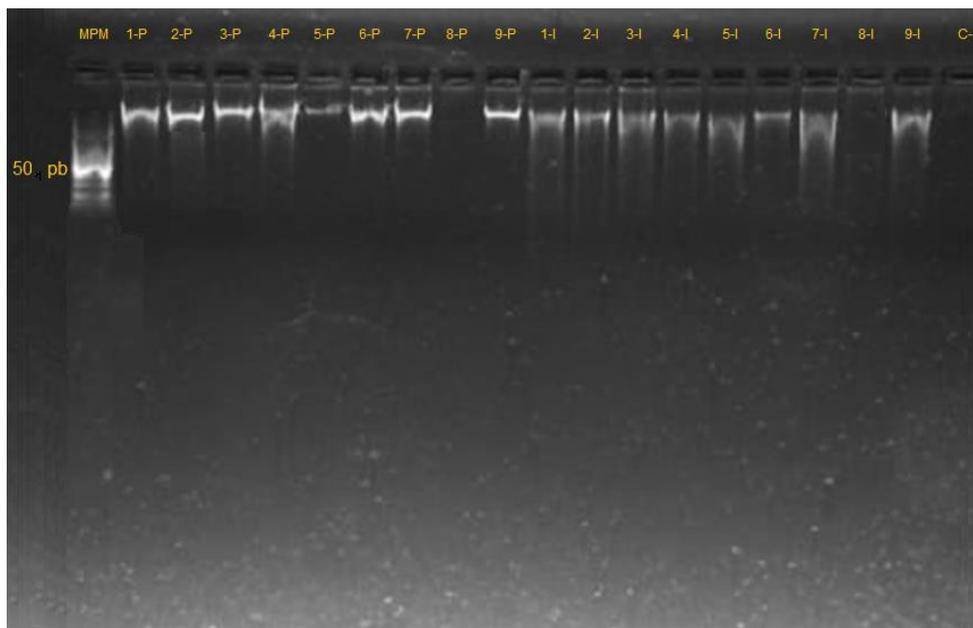


Figura B-2. Gel de agarosa al 1% como control de amplificación por PCR para evaluación de primers correspondientes a nueve genes, 1= PITG_14461, 2= PITG_12562, 3= PITG_12556, 4= PITG_12872, 5= PITG_09907, 6= PITG_13006 7= PITG_14993 8= PITG_12551, 9= PITG_21410, MPM= Marcador de peso molecular 100bp+3K DNA Ladder *Smobio*, (C-) = Control negativo. La letra *P* corresponde a ADNc obtenido de micelio de *Phytophthora betacei* y la letra *I* corresponde a ADNc de micelio de *Phytophthora infestans*.