

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL  
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario  
Laboratorio de Micología**

**Protocolo de Diagnóstico:**

***Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous, 2003  
(Moho de la hoja del tomate)**

**Tecámac, Estado de México, julio 2019**



**GOBIERNO DE  
MÉXICO**

**AGRICULTURA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Senasica, agricultura sana para el bienestar



### **Aviso**

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Passalora fulva*. La metodología descrita tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.



## I. ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
2.1 Información sobre la plaga.....	1
2.2 Información taxonómica.....	2
2.3 Flujo de trabajo.....	3
<b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN</b> .....	<b>4</b>
3.1 Descripción morfométrica.....	4
3.1.1 Descripción colonial.....	4
3.1.2 Descripción morfológica.....	4
3.2 Identificación morfológica.....	6
3.2.1 Observación directa.....	6
3.2.1.1 Interpretación de resultados.....	6
3.2.2 Incubación en papel secante.....	7
3.2.2.1 Interpretación de resultados.....	8
3.2.3 Aislamiento en medios de cultivo.....	8
3.2.3.1 Interpretación de resultados.....	8
3.3 Identificación del patógeno.....	9
<b>4. REGISTROS</b> .....	<b>9</b>
<b>5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL</b> .....	<b>9</b>
<b>6. RECONOCIMIENTO</b> .....	<b>10</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>10</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>12</b>
8.1 Síntomas y signos.....	12
8.2 Medios de cultivo.....	12
8.3 Elaboración de montajes.....	13
8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	13
8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva.....	13
8.3.3 Preparaciones permanentes.....	14
8.4 Medios de montaje.....	14
8.5 Corroboración molecular.....	15
8.5.1 Extracción de DNA.....	15
8.5.1.1 A partir de cultivos puros.....	15
8.5.1.2 Verificación de la calidad del DNA.....	16
8.5.2 Ensayo de control endógeno.....	16
8.5.3 Interpretación de resultados para la amplificación de la región ITS rRNA.....	18
8.5.4 Corroboración mediante filogenia molecular.....	18
8.5.5 Interpretación de los resultados de la filogenia molecular.....	20

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Crecimiento cultural y estructural de <i>Passalora fulva</i> .....	<b>5</b>
---	----------



<b>Figura 2.</b> Descripción morfológica de <i>Passalora</i> sp. y <i>Cladosporium</i> sp.....	6
<b>Figura 3.</b> Síntomas y signos de <i>Passalora fulva</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Alineamiento de la accesión MK405711.1 para <i>Passalora fulva</i> .....	19
<b>Figura 5.</b> Alineamiento múltiple de secuencias de la región ITS del rRNA .....	19
<b>Figura 6.</b> Filogenia molecular para <i>Passalora fulva</i> . .....	20

### III. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS rRNA.....	17
<b>Cuadro 2.</b> Mezcla de reacción para la amplificación de la región ITS rRNA.....	17
<b>Cuadro 3.</b> Programa para la amplificación de la región ITS rRNA .....	17



## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para la detección e identificación de *Passalora fulva* mediante caracterización morfométrica y técnicas moleculares a partir de tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*).

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Información sobre la plaga

El moho de la hoja del tomate, causada por el hongo *P. fulva*, es una enfermedad común y destructiva en cultivos de tomate, cuando éstos crecen bajo condiciones de alta humedad relativa, afectando a cultivos bajo invernadero y ocasionalmente a cielo abierto (Thomma, Van Esse, Crous y De Wit, 2005; Iida et al., 2018).

Los síntomas iniciales de la enfermedad ocurren una semana después de la infección. Los conidios de *P. fulva* se adhieren al envés de la hoja, germinando y penetrando a través de las aperturas estomáticas, por lo que comienzan a presentarse manchas con apariencia blanquecina, tornándose cafés después de la esporulación del hongo. En el haz, dichas manchas se manifiestan como puntos difusos de color verde pálido o amarillento, los cuales crecen adquiriendo un color amarillo oscuro debido a la muerte celular de las hojas (Joosten y de Wit, 1999; Thomma et al., 2005). Debido a la obstrucción de los estomas, las hojas pueden presentar enrollamiento, clorosis y defoliación. En infecciones severas estos síntomas se presentan sobre tallos, peciolo y frutos ocasionando la muerte del hospedante (Jones, Zitter, Momol y Miller, 2016).

*P. fulva* no forma estructuras especializadas como haustorios, en su lugar, obtiene nutrientes a través del crecimiento micelial intercelular y la liberación de proteínas y péptidos que inducen en las células del hospedante la liberación de sustancias nutritivas. Presenta alta especificidad de hospedantes, ya que afecta solo a cultivares de tomate (*S. lycopersicum*), debido a dicha especificidad, se piensa que el origen de *P. fulva* coincide con el centro de origen de *S. lycopersicum* en Sudamérica (Joosten y De Wit, 1999; Thomma et al., 2005).

Hasta ahora el estado teleomorfo de *P. fulva* es desconocido; sin embargo, de acuerdo al análisis molecular de las secuencias ITS1, 5.8S e ITS2 del DNAr, *P. fulva* posee un alto porcentaje de similitud con otros taxones que poseen una fase teleomorfa dentro de *Mycosphaerella* como *M. kensiensis* y *M. hedericola*, razón por la que se le coloca dentro de la familia Mycosphaerellaceae. Morfológicamente *Passalora* se distingue por poseer una cicatriz conidial más oscura y engrosada, pero no protuberante como en el caso de *Cladosporium*, el cual a diferencia de *Passalora* presenta su fase teleomorfa dentro de *Davidiella* (Braun, Crous, Dugan, Groenewald y De Hoog, 2003).



Actualmente, el cultivo de tomate en invernadero ha contribuido en la creación de condiciones ambientales favorables para la dispersión del hongo en áreas templadas de todo el mundo (Thomma et al., 2005). En países donde se registra alta prevalencia de la enfermedad, la presión impuesta por variedades de tomate resistentes ha favorecido el surgimiento de nuevas razas que vencen rápidamente la resistencia, ocasionando pérdidas severas a la producción de tomate en invernadero (Iida et al., 2018). Por esta razón, *P. fulva* es considerada una plaga de importancia económica, pues, de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2019), en 2018 la superficie sembrada de tomate en México fue de 88 500 ha, con una producción total de 4.02 millones de toneladas.

## 2.2 Información taxonómica

**Nombre:** *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous, 2003

**Sinonimias:** *Fulvia fulva* (Cooke), 1954

*Cladosporium fulvum* Cooke, 1883

*Mycovellosiella fulva* (Cooke), 1983

**Nombres comunes:** Moho de la hoja del tomate (español)

Tomato leaf mold (inglés)

### Posición taxonómica:

**Dominio:** Eukaryota

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Dothideomycetes

**Subclase:** Dothideomycetidae

**Orden:** Capnodiales

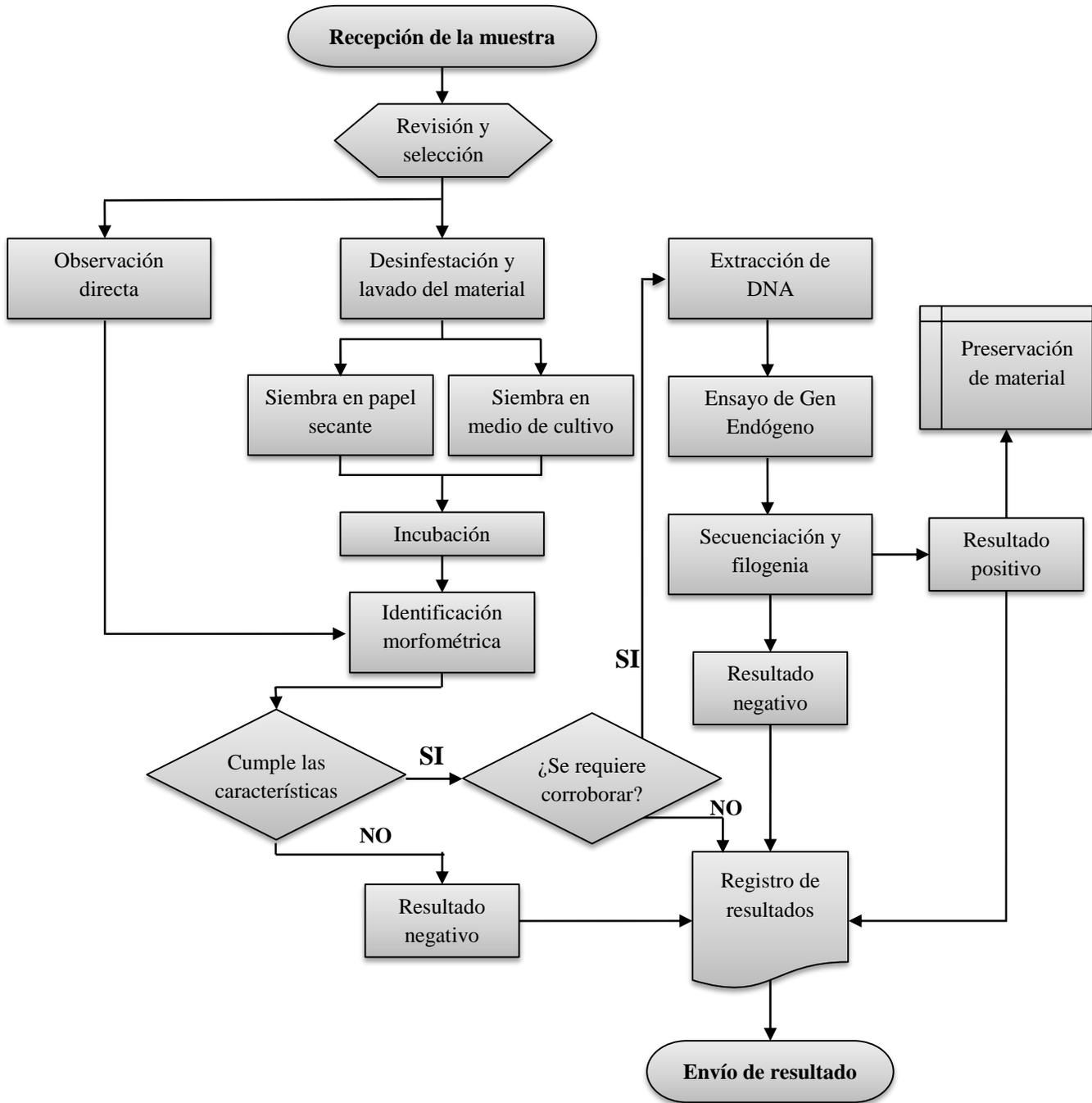
**Familia:** Mycosphaerellaceae

**Género:** *Passalora* Fr., 1849

**Especie:** *P. fulva* (Cooke) U. Braun & Crous, 2003

(Braun et al., 2003)

### 2.3 Flujo de trabajo



### 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *P. fulva* se debe partir de material vegetal fresco, que presente signos y síntomas característicos de la enfermedad. Sin embargo, de acuerdo a Tsatsia y Jackson (2017), existe la posibilidad de que el patógeno también se disperse a través de semillas asintomáticas o contaminadas superficialmente con esporas.

Los primeros síntomas sobre el tejido vegetal se manifiestan en un periodo comprendido de siete a diez días después de la infección. Éstos se observan inicialmente como manchas pequeñas de color verde claro o amarillo sobre el haz de las hojas y estomas (Anexo 8.1). Al crecer, estas manchas se tornan de color amarillo oscuro y presentan agregaciones hifales de color blanco sobre ellas, a partir de las cuales emergen los conidióforos, cambiando su color a un café oscuro al ocurrir la esporulación (Thomma et al., 2005). Otros síntomas visibles son clorosis, defoliación y enrollamiento de las hojas. Mientras que en infecciones severas también es posible observar la presencia de micelio sobre tallos, peciolo y frutos (Jones et al., 2016).

Si la muestra recibida carece de los órganos vegetales necesarios para el diagnóstico de la enfermedad, o éstos se encuentran en mal estado con signos de descomposición avanzada se registra el motivo del rechazo: “Material en mal estado” o “No se procesó” y se concluye el diagnóstico.

#### 3.1 Descripción morfométrica

La identificación morfométrica se debe realizar a partir del tejido vegetal o del aislamiento y cultivo *in vitro* del patógeno. Contrastando su morfometría colonial y estructural con la reportada por la literatura.

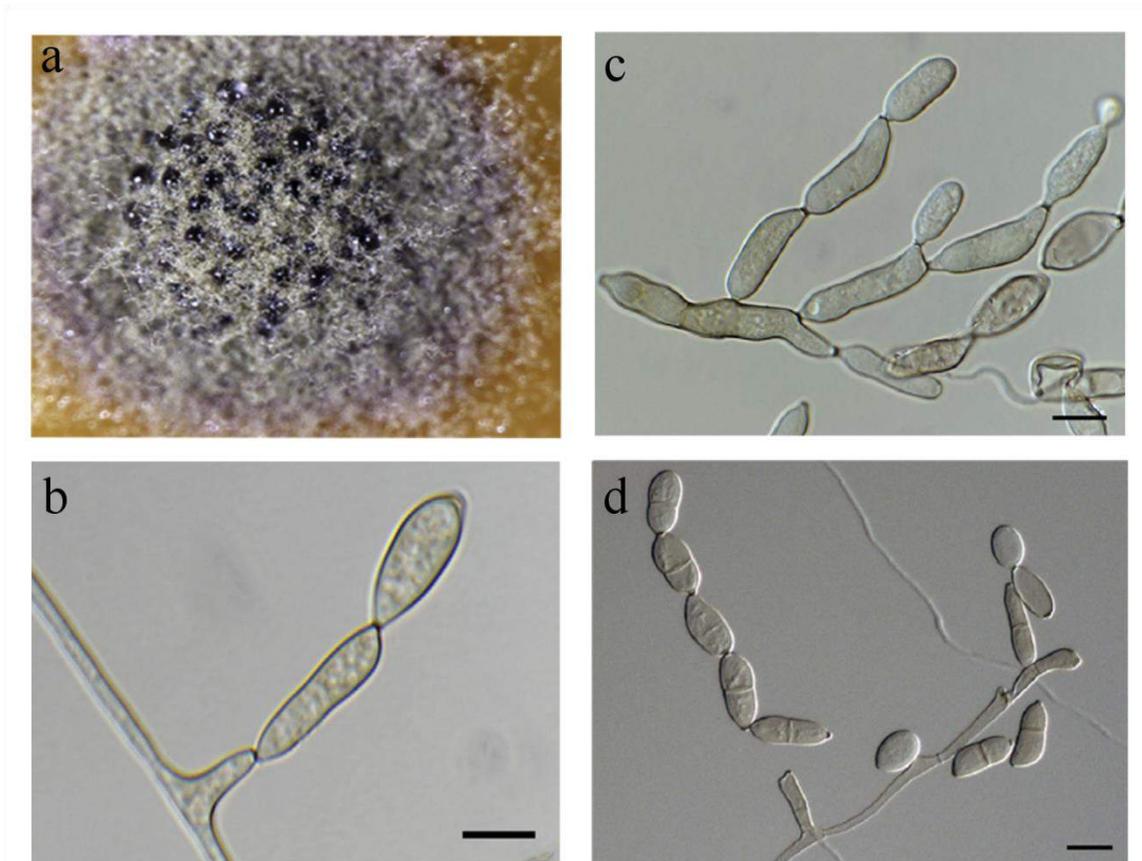
##### 3.1.1 Descripción colonial

En condiciones *in vitro* la colonia de *P. fulva* presenta un crecimiento lento, desarrollando un micelio semi compacto, con una pigmentación que va del amarillo o verde oscuro al marrón oscuro (Figura 1a) (Iida et al., 2018).

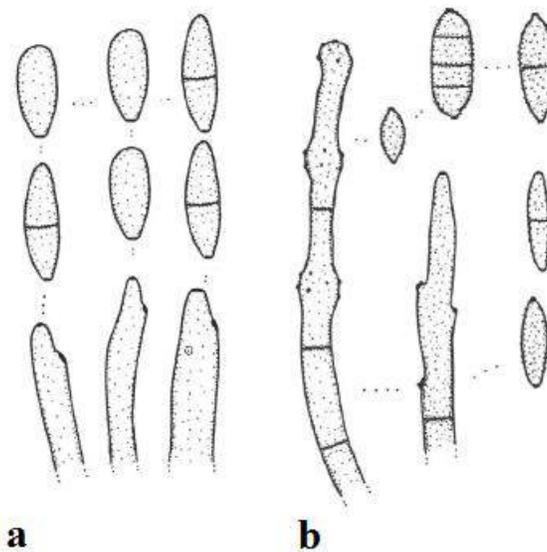
##### 3.1.2 Descripción morfológica

Micelio liso, 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, bien desarrollado, septado, noduloso y ramificado. Conidióforos septados, ligeramente pigmentados, coloración verde olivo a café oscuro, lisos, en ocasiones ramificados, solitarios o en fascículos, rectos o sinuosos, usualmente con puntas apicales curvas, formando células conideogénicas apicales y laterales, de 20-160  $\mu\text{m}$  x 5-10  $\mu\text{m}$ . Esporulación abundante (Crous, Braun, Schubert y Groenewald, 2007). Conidios hialinos, globosos, lisos elípticos, no alargados, sin septos o uniseptados, raramente hasta 4 septos, formando cadenas simples o ramificadas, pigmentación amarillo claro a hialino, de 10-30  $\mu\text{m}$  x 5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 1b-d) (Braun, 1995; Videira et al., 2017).

A diferencia de *P. fulva*, *Cladosporium* spp. presenta cicatrices conidiales e hilum prominentes, engrosados y oscuros; sus conidios son subglobosos, elipsoides, ovoides o subcilíndricos, con uno o varios septos, con superficie verruculosa y formando cadenas ramificadas (Figura 2) (Braun, 1995; Crous et al., 2007).



**Figura 1. Crecimiento cultural y estructural de *Passalora fulva*.** (a) morfología colonial color verde oliva en medio de cultivo V8; (b) conidióforo reducido a una célula conidiógena, (c-d) conidióforos libres y conidios en cadena, globosos, elípticos, uni o aseptados. Escala de 10  $\mu$ m. (Videira et al., 2017)



**Figura 2. Descripción morfológica.** a). *Passalora* spp., conidióforos libres, solitarios, rectos y poliblasticos; conidios globosos, elípticos, uniseptados o aseptados. b). *Cladosporium* spp., conidios ovoides, subcilíndricos, con uno o varios septos, cicatriz conidial e hilum prominentes y superficie verruculosa (Braun, 1995).

## 3.2 Identificación morfológica

La identificación morfológica se debe realizar a partir de signos sobre el tejido vegetal o del crecimiento *in vitro* de las estructuras en papel secante y medio de cultivo.

### 3.2.1 Observación directa

- 1) Partir de semillas, hojas, ramas, tallos o frutos con presencia de síntomas y observar con un microscopio estereoscópico la presencia de signos del hongo (micelio, conidióforos libres y conidios).
- 2) Obtener fragmentos de aproximadamente 0.2 mm de grosor, utilizando navaja de bisturí o navaja de afeitar.
- 3) Elaborar montajes temporales o permanentes (Anexo 8.3) para su observación con un microscopio compuesto. Marcar las preparaciones con el número de identificación y los datos de la muestra.
- 4) Medir el ancho y largo de las estructuras del hongo (micelio, conidióforos libres y conidios) y comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia, con el fin de definir el género y especie de acuerdo a la descripción morfométrica.

#### 3.2.1.1 Interpretación de resultados

Cuando los signos en el tejido vegetal correspondan a conidióforos y conidios que coincidan con la descripción de *P. fulva*, el diagnóstico debe reportarse como positivo para esta técnica.



Opcionalmente, como prueba de corroboración se debe realizar el análisis filogenético de los aislamientos. La corroboración por secuenciación puede ser necesaria en aquellos casos en donde se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal, si es el caso, se debe seguir el procedimiento descrito en el Anexo 8.5 para la extracción de ADN y análisis filogenético.

Si no se detecta la presencia de estructuras características de *P. fulva*, entonces el diagnóstico debe reportarse como negativo para esta técnica y el resultado se verifica por incubación en medio de cultivo y papel secante.

### **3.2.2 Incubación en papel secante**

- 1) A partir de semillas o tejido vegetal con o sin síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y en condiciones de asepsia, desinfectarlos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y enjuagar en 3 ocasiones con agua destilada estéril. Para permitir el secado del material vegetal, colocar los fragmentos sobre papel absorbente estéril durante 2 a 3 horas aproximadamente.
- 2) Armar cámaras húmedas. Colocar en cajas Petri de cristal un círculo de papel filtro Whatman® del número 4 (puede utilizarse otro tipo de papel filtro o papel absorbente) y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C y 15 psi (libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés) o durante 2 horas a 160 °C con calor seco. Una vez que las cajas están estériles y frías, bajo condiciones asépticas, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua) y con plumón permanente etiquetarlas con los datos de identificación de la muestra.
- 3) Colocar en la cámara húmeda de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco. Incubar durante 5 días a 25 °C, bajo condiciones de 80% de humedad.
- 4) Transcurrido el tiempo de incubación, observar con un microscopio estereoscópico si hay estructuras del hongo, de haberlas, realizar el montaje para visualizar sus características y obtener aislamientos puros en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar, por sus siglas en inglés) o V8 (Anexo 8.2).
- 5) Incubar los aislamientos puros durante 10 días a 25 °C, al término de este tiempo observar el tipo de crecimiento y coloración del micelio, además de la formación de estructuras del hongo (micelio, conidióforos y conidios).
- 6) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con sus características morfométricas.



### **3.3.2.1 Interpretación de resultados**

Si durante la incubación en papel secante, se obtienen estructuras típicas del hongo sobre el tejido vegetal que correspondan a *P. fulva*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como positivo.

Opcionalmente, como prueba de corroboración se debe realizar el análisis filogenético de los aislamientos. La corroboración por secuenciación puede ser necesaria en aquellos casos en donde se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal, si es el caso, se debe seguir el procedimiento descrito en el Anexo 8.5 para la extracción de ADN y análisis filogenético.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *P. fulva*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por incubación en medio de cultivo y observación directa.

### **3.2.3 Aislamiento en medios de cultivo**

- 1) A partir de semillas o tejido vegetal, con o sin presencia de síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, desinfectarlos y secarlos siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2 inciso 1.
- 2) Sembrar las semillas o fragmentos vegetales secos en cajas Petri con medio de cultivo PDA o V8 (Anexo 8.2) e incubar a 25 °C ± 3 °C durante 5 días.
- 3) Aislar cultivos puros del hongo en medio de cultivo PDA o V8 e incubar durante 12 días. Observar la presencia de micelio, conidióforos y conidios mediante un microscopio estereoscópico.
- 4) Obtener preparaciones temporales o permanentes (Anexo 8.3) de las estructuras y observar con un microscopio compuesto.
- 5) Medir las estructuras del hongo (conidióforos y conidios) y obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstas. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo.

#### **3.2.3.1 Interpretación de resultados**

Si durante la incubación en medio de cultivo, se obtienen estructuras típicas del hongo sobre el tejido vegetal que correspondan a *P. fulva*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como positivo.

Opcionalmente, como prueba de corroboración se debe realizar el análisis filogenético de los aislamientos. La corroboración por secuenciación puede ser necesaria en aquellos casos en donde se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido



vegetal, si es el caso, se debe seguir el procedimiento descrito en el Anexo 8.5 para la extracción de ADN y análisis filogenético.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *P. fulva*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por incubación en papel secante y observación directa.

### **3.3 Identificación del patógeno**

Para reportar una identificación positiva de *P. fulva*, es necesaria la detección en conjunto de las siguientes pruebas: aislamiento y caracterización de la colonia; y caracterización morfométrica de las estructuras distintivas del hongo.

Opcionalmente, como prueba de corroboración se debe realizar el análisis filogenético de los aislamientos. La corroboración por secuenciación puede ser necesaria en aquellos casos en donde se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

## **4. REGISTROS**

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *P. fulva*.

- El material vegetal que no fue usado en el diagnóstico se debe mantener dentro de su empaque original, bajo refrigeración a 4 °C durante al menos 1 mes posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.

En caso de obtener un resultado positivo:

- Conservar montajes permanentes, donde se encuentren estructuras distintivas del hongo como evidencia de la identificación morfométrica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, no realizar transferencias continuas del aislamiento.
- Si aplica, resguardar los resultados de las pruebas moleculares y análisis filogenético (fotografía del gel y secuencias) y mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (de ser posible a -70 °C).

## **5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL**

**Correo:** lab.micologia@senasica.gob.mx



**Teléfono:** 011 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51424, 51409 y 51373

## 6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por los técnicos del Laboratorio de Micología del CNRF (Adrián González Saucedo, Jire Ajeleth Muñoz Jaimes, Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz); revisado por la Jefatura del Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández); y editado por personal del Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata y Lizeth Guadalupe Durán Espinosa).

## 7. REFERENCIAS

- Avance de siembras y cosechas. Año Agrícola 2018 Riego y temporal. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Recuperado el 30 de mayo de 2019 en: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma)
- Braun, U. (1995). A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (Phytopathogenic Hyphomycetes). Vol. 1. IHW-Verlag, Eching.
- Braun, U., Crous, P. W., Dugan, F. y Groenewald, J. Z. (Ewald), Sybren De Hoog, G. (2003). Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress*, 2, 3-18. doi: 10.1007/s11557-006-0039-2.
- Crous, P. W., Braun, U., Schubert, K. y Groenewald, J. Z. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*, 58, 33-56. doi: 10.3114/sim.2007.58.02.
- Crous, P. W., Schoch, C. L., Hyde, K. D., Wood, A. R., Gueidan, C., de Hoog, G. S. y Groenewald, J. Z. (2009). Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology*, 64, 17-47. doi: 10.3114/sim.2009.64.02.
- Iida, Y., Ikeda, K., Sakai, H., Nakagawa, H., Nishi, O. y Higashi, Y. (2018). Evaluation of the potential biocontrol activity of *Dicyma pulvinata* against *Cladosporium fulvum*, the causal agent of tomato leaf mould. *Plant Pathology*, 67, 1883-1890. doi: 10.1111/ppa.12916.
- Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M. y Miller, S. A. (2016). PART I: Infectious Diseases. En J. B. Jones, S. A. Miller, T. M. Momol, T. A. Zitter (Eds.), *Compendium of Tomato Diseases and Pests* (2ª ed.). (15-119). St. Paul, EE. UU: The American Phytopathological Society. doi: 10.1094/9780890544341.002
- Joosten, M. y De Wit, P. (1999). The tomato - *Cladosporium fulvum* interaction: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 335-367. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.335.



- Kubota, M., Morishima, M. e Iida, Y. (2015). First occurrence of tomato leaf mold caused by the novel races 2.5.9 and 4.5.9 of *Passalora fulva* in Japan [Figura]. *Journal of General Plant Pathology*, 81. doi: 10.1007/s10327-015-0592-0.
- Thomma, B. P. H. J., Van Esse, H. P., Crous, P. W. y De Wit, P. J. G. M. (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology*, 6, 379-393. doi: 10.1111/J.1364-3703.2005.00292.X.
- Tsatsia, H. y Jackson, G. (2017). Tomato leaf mould (076) - Fact Sheets. Australian Centre for International Agricultural Research. Recuperado el 19 de junio de 2019 de [http://www.pestnet.org/fact\\_sheets/tomato\\_leaf\\_mould\\_076.htm](http://www.pestnet.org/fact_sheets/tomato_leaf_mould_076.htm)
- Videira, S. I. R., Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Braun, U., Barreto, R. W., De Wit, P. J. G. M. y Crous, P. W. (2017). Mycosphaerellaceae – Chaos or clarity? [Figura] *Studies in Mycology*, 87, 257-421. doi: 10.1016/j.simyco.2017.09.003.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (Eds), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. (315-322). San Diego, EE. UU. Academic Press. Inc.

#### **Forma recomendada de citar:**

- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019). Protocolo de Diagnóstico: *Passalora fulva* (Moho de la hoja de tomate) [Versión 1.0]. Tecámac, México.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Síntomas y signos



**Figura 3. Síntomas y signos de *Passalora fulva* en tomate.** (a) Micelio verde olivo creciendo sobre el envés de las hojas; (b) puntos cloróticos sobre el haz de hojas (Kubota, Morishima e Iida , 2015).

### 8.2 Medios de cultivo

A continuación, se señalan los medios de cultivo usados para el crecimiento y determinación de *P. fulva* en condiciones *in vitro*.

#### **Jugo V8 y Agar (V8)**

Jugo V8	50 ml
Extracto de levadura	1 g
Carbonato de calcio	1 g
Glucosa	1 g
Agar	10 g
Agua destilada	500 ml



Procedimiento: centrifugar el jugo V8 a 4,436 g, recuperar el sobrenadante y desechar el precipitado. Mezclar 50 ml del sobrenadante y el resto de los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, integrando todo mediante un agitador magnético. Esterilizar la mezcla en autoclave a 121 °C por 15 min. Enfriar el medio de cultivo sin que llegue a solidificar y posteriormente vaciarlo en cajas Petri.

### **Papa, agar y dextrosa (PDA)**

Papa	100 g
Dextrosa	7.5 g
Agar nutritivo	9 g
Agua destilada	500 ml
Agar destilada	10 g

Procedimiento: colocar los trozos de papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min. Filtrar el agua de cocción y aforar a 500 mL. Agregar la dextrosa y el agar, mezclando con agitador magnético. Esterilizar la mezcla en autoclave a 121 °C por 20 min. Enfriar el medio de cultivo sin que llegue a solidificar y posteriormente vaciarlo en cajas Petri.

## **8.3 Elaboración de montajes**

### **8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos**

- 1) Partir de tejido vegetal con signos del hongo, o de cultivos puros, colocar el tejido vegetal o estructuras en un portaobjeto o caja Petri de cristal, sobre la platina del microscopio estereoscópico para observar a detalle el área de interés.
- 2) Tomar directamente un fragmento de micelio o las estructuras del hongo a partir del tejido vegetal o cultivo del hongo.
- 3) Colocar las estructuras del hongo sobre un portaobjetos con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Adicionar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4), hidratando el tejido, teniendo cuidado de no formar burbujas de aire.
- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos, secar con papel absorbente el exceso de medio de montaje, cuidando que no se pierda el espécimen. Calentar por segundos para eliminar burbujas de aire.

Observar el espécimen mediante un microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, debe repetirse el proceso haciendo cortes más finos.

### **8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva**

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.4).



- 2) Con un trozo de cinta adhesiva transparente tocar por la cara del pegamento, el área superficial del tejido vegetal o medio de cultivo con crecimiento micelial.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto.

### **8.3.3 Preparaciones permanentes**

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo dentro de la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar las burbujas que se formen con una aguja o calentado el portaobjetos.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de la gota.

**Nota:** el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar con un microscopio compuesto.

## **8.4 Medios de montaje**

### **Lactofenol**

Fenol (cristales)	20 g
Ácido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml
Azul de Nilo	0.1- 0.5 g

Procedimiento: agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente, calentar ligeramente para disolver los cristales, adicionar la glicerina y el ácido láctico, colocar una cantidad mínima de colorante y agitar hasta que se diluya, agregar colorante hasta obtener la coloración deseada.

**Nota:** este medio de montaje actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes.

### **Agua- glicerina**

Glicerina	50 ml
Agua destilada	50 ml



Consiste en mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina. Se puede adicionar algún colorante como azul de Nilo.

**Nota:** se utiliza en montajes temporales y permanentes.

## 8.5 Corroboración molecular

La corroboración molecular de *P. fulva* debe complementar su determinación morfológica, para ello se debe extraer el DNA de una cepa pura del hongo, amplificar un fragmento mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y secuenciar dicho fragmento alineando y contrastando su secuencia con secuencias de referencia documentadas para *P. fulva*.

**Nota:** para la estandarización de este protocolo se utilizaron diversos reactivos y equipos, éstos se pueden remplazar por otras marcas siempre y cuando cumplan con las mismas especificaciones técnicas.

### 8.5.1 Extracción de DNA

#### 8.5.1.1 A partir de cultivos puros

La extracción se realiza a partir de cultivos puros en medio de cultivo PDA, previa y morfológicamente caracterizados.

**Nota:** cualquier kit comercial de extracción de DNA puede resultar óptimo para tal fin, para ello es importante obtener una buena calidad, cantidad e integridad del DNA.

Se sugiere seguir la metodología propuesta por Cenis (1992), con algunas modificaciones que se describen a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads, Roche) transferir 0.01 g de micelio de una caja Petri del ítem de interés.

**Nota:** para facilitar la obtención de sobrenadante, previamente sustraer del tubo un poco menos de la mitad de las perlas de cerámica; o duplicar los volúmenes de los reactivos que se mencionan a continuación.

- 2) Agregar 500 µL de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, centrifugar 5 min a 17 940 g, decantar el sobrenadante con una micropipeta.

**Nota:** evitar decantar el buffer TE mediante inversión del tubo, ya que las perlas de cerámica y micelio pueden perderse.

- 3) Adicionar 300 µL de buffer de extracción y macerar el micelio usando un disruptor de tejidos durante 10 min (Minibeadbeater-96, BioSpect Products o equipos con características similares).



**Nota:** el buffer de extracción consiste en 200 mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) y 0.5% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio).

- 4) Adicionar 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir suavemente dos a tres veces el tubo y posteriormente colocar los tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.
- 5) Centrifugar los tubos durante 10 min a 15 290 g, transferir 250  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril (evitar la suspensión del sedimento).
- 6) Agregar 250  $\mu$ L de isopropanol (almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), mezclar por inversión dos a tres veces y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min.

Centrifugar 10 min a 15 290 g y desechar el isopropanol por decantación, evitando perder la pastilla.

**Nota:** al final del proceso puede ser o no visible la pastilla de DNA.

- 7) Agregar 500  $\mu$ L de etanol al 70% para lavar la pastilla y centrifugar durante 2 min a 15 290 g. Desechar el alcohol por decantación.
- 8) Repetir el paso 8. Posteriormente, para permitir el secado de la pastilla, colocar el tubo invertido sobre papel secante estéril durante 3 horas o hasta que no se observen gotas en la pared del tubo.
- 9) Resuspender el DNA en 50  $\mu$ L de agua grado biología molecular o buffer TE 1X, y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La cantidad de DNA obtenida por este método debe ser la suficiente para cubrir el intervalo de trabajo del ensayo de PCR.

#### **8.5.1.2 Verificación de la calidad del DNA**

La cuantificación de la calidad y cantidad del DNA extraído se realiza por espectrofotometría UV-Vis, siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante del equipo. Se recomienda el uso de espectrofotómetros para micro volúmenes con características similares al equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™). La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia de  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  en intervalos de 1.8 a 2.0 y 2.0 a 2.2, respectivamente.

#### **8.5.2 Ensayo de control endógeno**

La amplificación del material genético se debe llevar a cabo con los oligonucleótidos ITS-1 e ITS-4 propuestos por White, Bruns, Lee y Taylor (1990), los cuales reconocen las regiones conservadas 18S, 5.8S y 28S del rRNA. Las secuencias de los oligonucleótidos se observan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS rRNA.**

Tipo	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ITS-1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	650~
Antisentido	ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	

Para realizar la amplificación por PCR se recomienda utilizar el kit Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen™) o reactivos con características similares. El procedimiento de reacción se debe ejecutar de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Mezcla de reacción para la amplificación de la región ITS rRNA**

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Oligonucleótido ITS-1	10 µM	0.5 µM	1.25
Oligonucleótido ITS-4	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	25 – 500 ng/µL	2 – 40 ng/µL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.625
<b>Volumen final</b>			<b>25</b>

El programa térmico de amplificación se muestra en el Cuadro 3. Para la verificación de este protocolo se emplearon termocicladores modelo Techne-Flexigene y Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Sin embargo, otros equipos con características similares pueden ser utilizados.

**Cuadro 3. Programa para la amplificación de la región ITS rRNA**

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	45 s	
Alineamiento	58	45 s	35
Extensión	72	45 s	
Extensión final	72	10 min	1

Todos los ensayos de amplificación de las muestras por gen endógeno deben incluir al menos un control positivo de referencia, para lo que se recomienda el uso de DNA que en un ensayo previo haya tenido una amplificación exitosa con el par de oligonucleótidos ITS-1 e ITS-4. Así mismo, es necesario incluir un control negativo, el cual no debe contener DNA en la mezcla de reacción.



Una vez realizada la amplificación con los oligonucleótidos ITS-1 e ITS-4, el producto de PCR debe revelarse por electroforesis en gel de Agarosa ultra pura al 2 % en Buffer TAE 1X, teñido con 0.6 X de GelRed™ Biotum durante 60 min a 100 V.

El gel de agarosa se debe revelar utilizando un fotodocumentador, para lo cual se recomienda el uso de equipos con características análogas al modelo Gel Doc™ EZ Gel Documentation System, Biorad.

### **8.5.3 Interpretación de resultados para la amplificación de la región ITS rRNA**

La presencia de una banda que corresponda a fragmentos de peso aproximado de 622pb, indica que la calidad del DNA es óptima. La ausencia de bandas en las muestras indica que la extracción de DNA no fue adecuada.

Por otro lado, también se debe verificar la ausencia de bandas en el control negativo, de observarse, es necesario repetir el ensayo de gen endógeno para corroborar la fiabilidad de los resultados.

Una vez verificada la amplificación del control positivo, la correcta amplificación del DNA de las muestras y la ausencia de bandas en el control negativo, el material amplificado es apto para secuenciarse.

### **8.5.4 Corroboración por filogenia molecular**

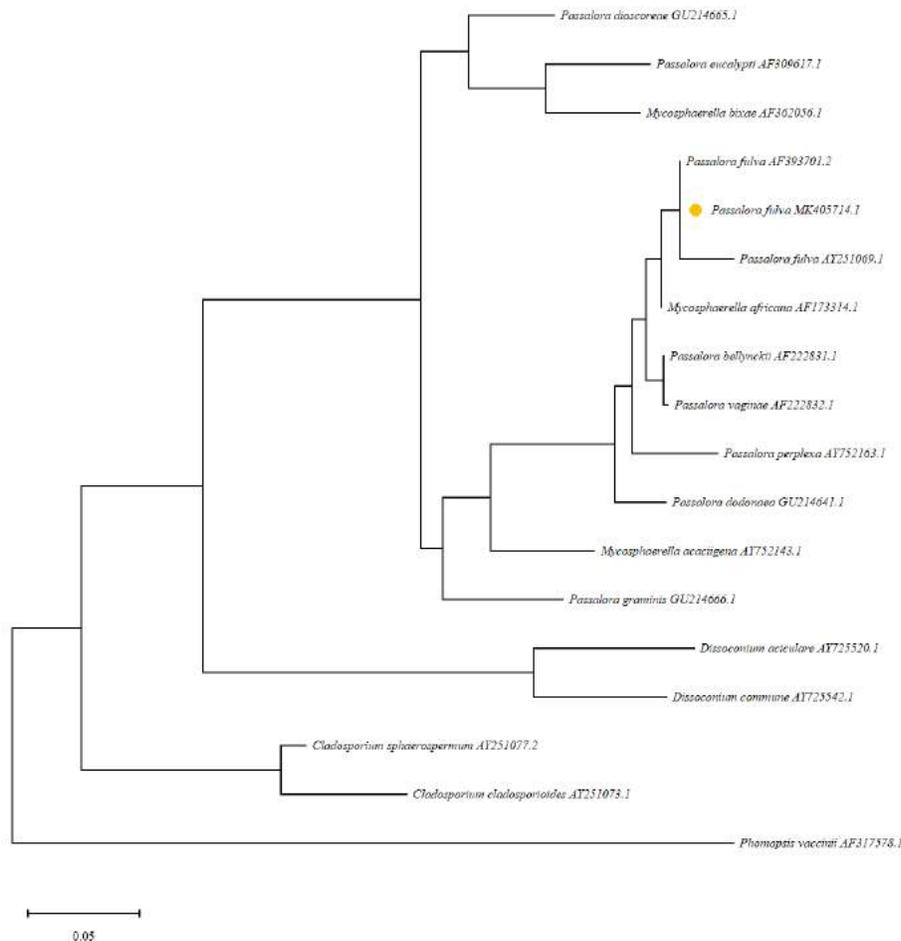
Para la secuenciación y análisis filogenético se debe emplear la región ITS del rRNA. De acuerdo a Braun et al. (2003), el análisis de este gen es suficiente para la diferenciación de *P. fulva*.

El Laboratorio de Micología del CNRF se basa en el análisis filogenético de la región ITS del rRNA amplificado con los oligonucleótidos ITS-1 e ITS-4.

- 1) Los productos de la amplificación se envían a secuenciar, siguiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicite el servicio.
- 2) Las secuencias se ingresan a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), insertando la secuencia y realizando el alineamiento con los parámetros predeterminados.
- 3) En el alineamiento se debe revisar el porcentaje de cobertura e identidad de las secuencias cuya tendencia sea cercana al 100 %, así mismo, el valor de E debe tender a cero, este último representa el valor estadístico generado por BLAST a partir del alineamiento al azar de la secuencia de interés (Figura 4). Es importante verificar el origen de las secuencias consultadas en el análisis filogenético, preferentemente éstas deben encontrarse ligadas a ejemplares tipo o ejemplares determinados por alguna autoridad taxonómica en el grupo.



6) Para la reconstrucción filogenética se puede emplear el método de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood), con un bootstrap de al menos 500 réplicas. Verificar en el árbol que la secuencia de la muestra de interés quede agrupada junto a las secuencias de referencia para *P. fulva*, AF393701.2 y AY251069.1 (Figura 6). Este resultado se puede confirmar al observar los INDELS y SNPs en el alineamiento múltiple de secuencias.



**Figura 6. Filogenia molecular.** Inferida de la región ITS del rRNA mediante el modelo de “Máxima Verosimilitud” (Maximum likelihood) con 1000 réplicas de soporte (Bootstrap), donde se incluyen las secuencias de 16 especies, más la secuencia de ejemplo para *Passalora fulva* con la accesión MK405714.1 y la secuencia de *Phomopsis vaccinii* usada como grupo externo.

### 8.5.5 Interpretación de los resultados de la filogenia molecular

El resultado es positivo a *P. fulva* si la secuencia de la muestra queda agrupada en el mismo clado que las secuencias de referencia AF393701.2, AF393700.3 y AY251069.1.

El resultado es negativo cuando las secuencias de la muestra quedan agrupadas en un clado distinto al de las secuencias de referencia. En este caso la identidad del organismo es



establecida con base en el clado en que se agrupe la secuencia de la muestra, y esta debe registrarse en el resultado final.

Es importante resaltar que la corroboración del resultado final debe respaldarse en los resultados obtenidos por la determinación morfológica.