

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Identificación de *Alternaria Lycopersici* como Patógeno Responsable de la Pérdida de Rendimiento en Líneas Avanzadas de Jitomate Tipo Saladette (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

**DANIA SAMANTHA CASTAÑEDA VILLA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Identificación de *Alternaria Lycopersici* como Patógeno Responsable de la Pérdida de Rendimiento en Lineas Avanzadas de Jitomate Tipo Saladette (*Solanum lycopersicum L.*)

Por:

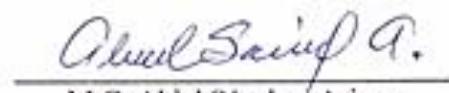
**DANIA SAMANTHA CASTAÑEDA VILLA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Asesor Principal

  
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas  
Coasesora

  
M.C. Alexander López Hernández  
Coasesor

  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2025

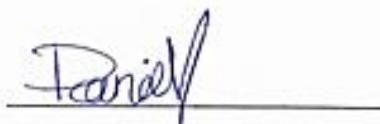
### **Declaración de no plagio**

El autor principal quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo es original.

Pasante de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo



Dania Samantha Castañeda Villa

*"El estudio de la fitopatología no solo nos enseña sobre las enfermedades de las plantas, sino también sobre la resiliencia y la adaptabilidad de los ecosistemas "* - George N. Agrios

## CRÉDITOS

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección y colaboración de:

**M.C. Abiel Sánchez Arizpe**, Maestro Investigador de la UAAAAN, responsable de la supervisión académica y metodológica de esta tesis.

**Ph.D. Ricardo Lobato Ortiz**, Profesor Investigador Titular del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, responsable del programa de investigación *Recursos Genéticos y Mejoramiento: Jitomate (Solanum lycopersicum L.)*, del cual se deriva este trabajo.

**Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, Profesora Investigadora Titular del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, colaboradora en el desarrollo técnico y científico de la presente línea de investigación.

**M.C. Alexander López Hernández**, coasesor en el diseño experimental y ejecución del ensayo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por abrirme sus puertas y formarme en sus aulas como Ingeniero Agrónomo Parasitólogo.

Al **COLEGIO DE POSTGRADUADOS, CAMPUS MONTECILLO**, por permitirme desarrollar el presente proyecto de investigación en sus instalaciones.

A la memoria del **M.C. Víctor Manuel Sánchez Valdez**, por su orientación y apoyo durante mi formación universitaria.

Al **M.C. Abiel Sánchez Arizpe**, por su guía y consejos durante mi paso por la UAAAN y por su dirección en el presente trabajo.

A la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, por su apoyo fundamental y dirección en la identificación del patógeno de estudio.

Al **M.C. Alexander López Hernández**, por su valiosa guía y aportaciones en el diseño, establecimiento y conducción del experimento de la presente investigación.

A **Ricardo Lobato Ortiz, Ph.D.**, por integrarme a su equipo de trabajo y brindar el apoyo financiero necesario para la realización de la presente investigación.

## **DEDICATORIAS**

*Para Sophia*

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>III. OBJETIVO.....</b>	<b>3</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>V. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>5.1 Origen y domesticación del jitomate.....</b>	<b>4</b>
<b>5.2 Importancia del cultivo de jitomate en el mundo.....</b>	<b>4</b>
<b>5.3 Producción de jitomate en México.....</b>	<b>5</b>
<b>5.4 Impacto de patógenos en plantas.....</b>	<b>5</b>
<b>5.5 Efecto de los hongos fitopatógenos en el jitomate.....</b>	<b>6</b>
<b>5.6 Interacción de <i>Alternaria</i> y jitomate.....</b>	<b>7</b>
<b>5.7 Identificación de <i>Alternaria</i> a través de técnicas moleculares.....</b>	<b>8</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>6.1 Aislamiento del agente causal.....</b>	<b>10</b>
<b>6.2 Extracción de DNA y PCR.....</b>	<b>11</b>
<b>6.3 Identificación molecular.....</b>	<b>13</b>
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>7.1 Identificación de <i>Alternaria lycopersici</i> como patógeno responsable de la pérdida de rendimiento en líneas de jitomate Saladette S<sub>4</sub>.....</b>	<b>15</b>

VIII. CONCLUSIONES.....	18
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	19

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Alternaria</i> y números de accesión en GenBank, usados en el análisis filogenético multilocus del presente estudio.....	14
---	----

Cuadro 2. Características de la matriz concatenada utilizada para la construcción del árbol filogenético.....	16
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético construido con secuencias concatenadas de la región ITS y del gen <i>alt a 1</i> , con el método de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud para <i>Alternaria</i> spp.....	17
--	----

## RESUMEN

El jitomate es una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial, México destaca como principal exportador; sin embargo, durante el proceso de producción, el jitomate es susceptible a un sin número de agentes causales de enfermedades debido a su reducida diversidad genética (Adhikari *et al.*, 2017). Se estima que el 70% al 80% de estas enfermedades son causadas por hongos fitopatógenos (Nowinski *et al.*, 2024), entre ellos el género *Alternaria* es uno de los patógenos que afecta al cultivo desde etapas tempranas hasta la cosecha, con pérdidas potenciales de rendimiento de 50% a 80% (Rodrigues y Furlong, 2022). El objetivo del presente estudio fue identificar el agente causal de la pérdida de rendimiento en líneas avanzadas de jitomate tipo "Saladette", mediante secuenciación del espacio transrito interno (ITS) del rDNA y el gen alergénico mayor *alt a 1*. Se plantea la hipótesis de que el patógeno pertenece a una especie del género *Alternaria*. Para ello, se realizó el aislamiento del hongo a partir de tizones foliares, las que se purificaron para la obtención de cultivos monoconidiales, seguido de la extracción de ADN, PCR y análisis filogenéticos. Los resultados revelaron que *Alternaria lycopersici* es el agente causal de la pérdida de rendimiento en el jitomate. Este hallazgo es relevante para la selección e incorporación de genotipos con resistencia parcial o total al Programa de Mejoramiento Genético de Jitomate del Colegio de Postgraduados y de otros programas nacionales de otras instituciones.

**Palabras clave:** *Solanum lycopersicum*, *Alternaria lycopersici*, fitopatía, fisiopatía.

## I. INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la segunda hortaliza de mayor consumo después de la papa. En 2022 se reportó una producción mundial de jitomate de 38.4 millones de toneladas en una superficie de 4,917,735 hectáreas (FAOSTAT, 2022). A nivel mundial México es el mayor exportador de jitomate fresco y refrigerado. En 2023 se obtuvo una producción de 3.64 millones de toneladas (SIAP, 2023), siendo Estados Unidos de América el principal destino comercial de estas exportaciones (DATA MÉXICO, 2024).

El jitomate comercial es afectado por múltiples fitopatógenos que causan diversas enfermedades debido a su reducida diversidad genética (Adhikari *et al.*, 2017). Se estima que el 70% al 80% de estas enfermedades son causadas por hongos (Nowinski *et al.*, 2024), *Alternaria* es uno de los géneros que afecta al cultivo de jitomate desde etapas tempranas hasta la cosecha, con pérdidas potenciales de rendimiento de 50% a 80% (Rodrigues y Furlong, 2022). Por lo tanto, es deseable tener genotipos con resistencia parcial o total a las especies más comunes de *Alternaria*. En la actualidad los programas de mejoramiento genético están enfocados en desarrollar no solo materiales con alto potencial de rendimiento, sino también en incorporar esta resistencia a patógenos que pueden causar pérdidas significativas o totales en los cultivos (Duan *et al.*, 2024).

Una manera eficaz de seleccionar materiales susceptibles y resistentes a *Alternaria* es identificar el agente causal a través de la secuenciación de la región del espacio transcrita interno (ITS) del rDNA, que junto con el gen *alt a 1* permite identificar las especies de *Alternaria* de forma precisa (Hong *et al.* 2005), con el fin de seleccionar donantes con resistencia parcial o total a especies de *Alternaria* que afectan específicamente a *Solanum lycopersicum* L.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Durante el ciclo primavera-verano 2020, en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, se evaluó el nivel de severidad foliar con sintomatología comparable a *Stemphylium* y a *Alternaria* en condiciones de infección natural, sobre variables de rendimiento de 90 genotipos de tomate, que incluían 89 líneas avanzadas S<sub>4</sub> y el híbrido comercial ‘El Cid’ como testigo. Se observa una correlación entre la severidad foliar de la planta a la enfermedad y el peso promedio del fruto ( $r = 0.13^{**}$ ) y el peso total de frutos por planta ( $r = 0.15^{***}$ ). Estos resultados indican que al aumentar la calificación en la escala de severidad foliar, es decir al tener una calificación cercana a 9 o 10, el genotipo muestra un menor grado de síntomas de la enfermedad en el área foliar, permitiendo al fruto desarrollar el tamaño y peso característico de cada línea avanzada. Sin embargo, es importante hacer una correcta identificación del patógeno que causa la pérdida de rendimiento en los genotipos evaluados, para seleccionar materiales con resistencia total a la enfermedad e incorporarlo a programas de mejoramiento genético de jitomate (Castañeda-Villa, 2021).

### **III. OBJETIVO**

Identificar al patógeno responsable de la pérdida del rendimiento total de líneas avanzadas de jitomate tipo Saladette.

### **IV. HIPÓTESIS**

**H<sub>0</sub>:** El patógeno causante de enfermedad en las líneas avanzadas de jitomate tipo “Saladette”, pertenece al género *Alternaria*.

**H<sub>1</sub>:** El patógeno causante de enfermedad en las líneas avanzadas de jitomate tipo “Saladette”, no pertenece al género *Alternaria*.

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1 Origen y domesticación del jitomate

El origen del jitomate se remonta a América del Sur, abarcando países como Perú, Ecuador, Chile y las Islas Galápagos, extendiéndose posteriormente hacia América Central, en época precolombina se dispersó a México donde es domesticado (Gebhardt, 2016).

La domesticación de plantas implica la selección y cultivo de individuos con rasgos deseables, seguido de mejoramiento genético de la población mediante selección individual. Este proceso, complejo, suele afectar y reducir la diversidad genética. Es crucial comprender las trayectorias evolutivas completas en el proceso de domesticación (Razifard *et al.*, 2020).

Se considera que la región del Golfo de México, especialmente en los estados de Veracruz y Puebla, es el centro de su domesticación. Durante su dispersión hacia México, el jitomate experimentó adaptaciones a nuevas condiciones climáticas, tanto similares a su lugar de origen como distintas, lo que implicó cambios en sus requerimientos fisiológicos y características morfológicas para adecuarse a los diferentes entornos (Délices *et al.*, 2022).

### 5.2 Importancia del cultivo de jitomate en el mundo

El jitomate es la segunda hortaliza de mayor consumo después de la papa, debido a sus diferentes formas de consumo y por ser fuente de antioxidantes, vitaminas y minerales (Wang *et al.*, 2022). En 2022 se reportó una producción mundial de jitomate de 38.4 millones de toneladas en una superficie de 4,917,735 hectáreas (FAOSTAT, 2022).

### **5.3 Producción de jitomate en México**

Los países con mayor importación de jitomate en el mundo son Estados Unidos de América (con US\$3,041M), Alemania (US\$1,461M) y Francia (US\$934M). A nivel mundial México es el mayor exportador de jitomate fresco y refrigerado, en 2023 se obtuvo una producción de 3.64 millones de toneladas (SIAP, 2023). La Secretaría de Economía reportó 2.787 millones de dólares de ingreso por exportaciones del país. Estados Unidos de América es el principal destino comercial de estas exportaciones (DATA MÉXICO, 2024).

### **5.4 Impacto de patógenos en plantas**

Las plantas están expuestas a cambios ambientales, que favorecen la llegada de patógenos oportunistas, que inhiben el desarrollo normal de la misma (Ait-El-Mokhtar *et al.*, 2019), incluso son capaces de reducir la calidad de los frutos y granos e introducirse en zonas donde no proliferan y causar enfermedades por ingesta en humanos y animales. El rendimiento potencial en cultivos de importancia económica por su forma de uso y consumo, es frecuentemente afectado por enfermedades de las plantas, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria de la población (Wang *et al.*, 2024), por lo que es deseable tener plantas resistentes a ciertas enfermedades causadas en su mayoría por patógenos en el ambiente. Los programas de mejoramiento genético se enfocan en desarrollar materiales con alto potencial de rendimiento y en inducir resistencia a patógenos que pueden causar pérdidas significativas o totales en los cultivos (Duan *et al.*, 2024).

## **5.5 Efecto de los hongos fitopatógenos en el jitomate**

Las pérdidas totales de plantas cultivadas en el mundo debido a diversas enfermedades alcanzan un 10% a 15% al año (Nowinski *et al.*, 2024). El jitomate comercial es propenso a desarrollar múltiples enfermedades con síntomas visibles como: marchitamiento, necrosis, presencia de moho, pústulas, podredumbre, hipertrofia, hiperplasia, decoloración, deformación, pérdida parcial o total del tejido (Nazarov *et al.*, 2020), provocado por bacterias, hongos y virus, durante el ciclo, debido a su reducida diversidad genética (Adhikari *et al.*, 2017). De acuerdo con Miller y Tanksley (1990), el jitomate cultivado posee 4.48% de la variación existente en sus 12 parientes silvestres. Se estima que el 70% al 80% de las enfermedades que atacan al jitomate son causadas por hongos fitopatógenos (Nowinski *et al.*, 2024). Para evitar la pérdida parcial o total del cultivo, con frecuencia se emplean de fungicidas. No obstante, el uso continuo de estos productos puede resultar en un control insuficiente o ineficaz de las enfermedades debido al desarrollo de resistencia, ya sea parcial o total, por parte de los patógenos hacia los ingredientes activos de los fungicidas. La resistencia se genera debido a la presión de selección ejercida sobre los patógenos por el uso repetitivo de agroquímicos cotidianos, lo que puede llevar a la aparición de nuevas variantes de hongos de importancia económica, como *Fusarium* y *Alternaria* (Nowinski *et al.*, 2024).

## **5.6 Interacción de *Alternaria* y jitomate**

*Alternaria* fue descrito por Ness en 1817 como *Alternaria alternata*, es un hongo filamentoso, cosmopolita, de coloración obscura, vive principalmente como saprófito en suelo y tejido vegetal; sin embargo, tiene la capacidad de vivir como endófito, dentro de su hospedante sin manifestar síntomas de la enfermedad (Schmey *et al.*, 2024). Pertenece al filo Ascomycota y al grupo dematiáceos (SENASICA, 2021), de acuerdo a mycobank (2024), el género *Alternaria* comprende al menos 693 especies. La interacción de *Alternaria* en jitomate es motivo de investigación en los programas de mejoramiento genético público y privado, derivado de las pérdidas que va de 50 a 80% en la producción de este cultivo (Rodrigues y Furlong, 2022).

La patogenicidad de *Alternaria* en el jitomate se manifiesta a través de diversos síntomas de la enfermedad en tejido verde. Estos síntomas comienzan como pequeñas lesiones circulares de color marrón y progresan rápidamente a lesiones de color marrón oscuro a negro, que comúnmente desarrollan anillos concéntricos y tizones foliares (Schmey *et al.*, 2024).

Factores ambientales, como la temperatura y la humedad, también influyen en la dinámica de la interacción entre *Alternaria* y el jitomate, afectando la severidad de la enfermedad y la propagación del hongo en el cultivo (Pavón *et al.*, 2015).

## **5.7 Identificación de *Alternaria* a través de técnicas moleculares**

Los primeros estudios sobre la identificación y clasificación de *Alternaria* por la comunidad científica se centraban en rasgos morfológicos, como la forma de los conidios. Sin embargo, esta metodología conducía a diagnósticos erróneos de la especie del género *Alternaria* presente en el cultivo (Schmey *et al.*, 2024).

Con el tiempo, la detección precisa de *Alternaria* ha sido notablemente mejorada gracias al avance de diversas técnicas:

En 1983, la introducción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) automatizada, permitió la amplificación de secuencias específicas de ADN para una detección más precisa de *Alternaria*. Posteriormente, en 1989, surgió el Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP), el cual analizaba patrones de fragmentos de ADN para distinguir entre diferentes especies (Schmey *et al.*, 2024).

A finales de los años 80, la Hibridación Fluorescente in situ (FISH) desarrollada por DeLong *et al.*, (1989), posibilitó la visualización directa de *Alternaria* en muestras mediante sondas marcadas con fluorescencia. Durante los años 90, la PCR en Tiempo Real (qPCR) introducida por Higuchi *et al.*, (1992), ofreció mayor sensibilidad y especificidad al permitir la cuantificación de ADN en tiempo real.

En el año 2000, se implementó el ADN Polimórfico Amplificado Aleatorio (RAPD), proporcionando una resolución genómica general para identificar variaciones entre cepas. Cuatro años después, en 2004, los Microsatélites Amplificados al Azar (RAMS) generaron perfiles genéticos específicos de *Alternaria* mediante secuencias repetitivas cortas.

En 2009, la técnica de Regiones Genómicas Amplificadas Caracterizadas por Secuencia (SCAR) ofreció marcadores más específicos y reproducibles para la identificación de la especie. Dos años después, en 2011, el Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP) permitió una alta resolución en la identificación de diferencias genéticas (Schmey *et al.*, 2024).

En 2012, se introdujo la Hibridación Sustractiva Selectiva para la detección de diferencias genéticas específicas entre muestras de ADN.

Hoy en día, existen técnicas poderosas como:

- LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle), ideal para la detección en campo debido a su simplicidad y rapidez.
- Microarrays de ADN, que permiten la detección simultánea de múltiples secuencias de ADN, siendo útiles para identificar varias especies de *Alternaria*.
- Secuenciación de la región del espacio transcrita interno (ITS), que junto con el gen alergénico mayor *alt a 1*, identifica y caracteriza especies de *Alternaria* en diferentes tipos de muestras (Hong *et al.* 2005).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### **6.1 Aislamiento del agente causal**

En abril de 2023 se sembraron tres líneas seleccionadas como susceptibles al patógeno (calificaciones de 1 y 2, Figura 1) causante de tizón foliar, del Programa de Conservación y Mejoramiento de los Recursos Genéticos del Jitomate del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Para identificar el agente causal se colectaron hojas sintomáticas procedentes de las líneas cultivadas en invernadero. Se procedió a seleccionar 0.5 cm<sup>2</sup> aproximadamente de tejido foliar correspondiente a la zona de avance del síntoma, las que se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v); se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de humedad.

Posteriormente, se procedió a colocar las porciones de tejido desinfestadas sobre cajas Petri con medio papa, dextrosa, agar (PDA); después de 72 horas se observó crecimiento de micelio, el que se transfirió a nuevas cajas hasta la producción de conidios. Después de 8 días, se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> para la obtención de cultivos monoconidiales.

## 6.2 Extracción de DNA y PCR

La extracción de DNA se realizó a partir de cultivos monoconidiales de 7 días de crecimiento, con el método de cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) al 2 % (Doyle y Doyle, 1990) con la adición de acetato de sodio 3M. La calidad del DNA se determinó por espectrofotometría en un Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); se consideró el DNA de buena calidad cuando las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 se encontraron entre 1.8 y 2.2.

La PCR se realizó con los iniciadores ITS-5 (forward; 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS-4 (reverse; 5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC -3') (White *et al.*, 1990) que amplifican un fragmento de 550 pares de bases aproximadamente de la región del espacio transcripto interno (ITS) del rDNA y el gen alergénico mayor (*alt a I*) (forward; ATGCADTTACCACCATCGC) (reverse; ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC) (Hong *et al.* 2005). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 15 µL: 7.86 µL de agua HPLC, 3 µL de 5× PCR buffer, 0.6 µL de dNTPs (20 µM de cada uno), 0.18 µL de cada iniciador (10 µM), 3 µL de DNA genómico (60 ng) y 0.18 µL (2 U) de GoTaq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch ((Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min.

Para verificar la amplificación de los fragmentos de DNA, se tomó 3 µL del producto de PCR y se mezcló con 1 µL de GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA), los que se cargaron en un gel de agarosa Seakem al 2 % (Lonza, Rockland, ME, USA) y se corrieron en un sistema de electroforesis horizontal (Bio-Rad, USA) a 80 V durante 1.5 h. Los amplicones se visualizaron en un transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Collégien, France). Los productos de PCR amplificados se limpiaron con el método enzimático ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se secuenciaron las dos hebras del DNA (*forward* y *reverse*) en la compañía Psomagen (New York, NY, USA).

### **6.3 Identificación molecular**

Las hebras resultantes se ensamblaron usando el programa bioinformático BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), las que se compararon con la opción Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide (BLASTn) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990) para determinar las secuencias más cercanas.

Las secuencias de la región ITS y *alt a 1* se concatenaron con el programa Mesquite y el modelo de sustitución nucleotídica se determinó con el programa jModelTest (Darriba *et al.*, 2012).

La reconstrucción filogenética se realizó utilizando los métodos probabilísticos de inferencia bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (MV) que considera criterios de optimización con caracteres discretos. Para IB se utilizó el programa MrBayes v.3.2.1 (Huelsenbeck y Ronquist 2001; Ronquist *et al.*, 2012) implementado con cuatro cadenas intercambiables, una cadena fría y tres calientes. El análisis se detuvo cuando las desviaciones estándar de los ‘splits’ alcanzaron un valor menor a 0.01, el muestreo de los árboles se realizó cada 1,000 generaciones. Del total de árboles generados se descartó el 25 % de ellos con la opción ‘burn in-phase’, con los árboles restantes se calculó la probabilidad posterior (PP). El árbol se visualizó y editó con el programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

El árbol filogenético de MV se construyó con raxmlGUI 2.0 (Edler *et al.*, 2020), en el que se calculó el soporte de cada uno de los nodos con un análisis de bootstrapping rápido con 1,000 iteraciones utilizando los parámetros establecidos por el programa (modelo general reversible en el tiempo con una distribución gamma GTR + G). El árbol resultante se visualizó con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

**Cuadro 1. Especies de *Alternaria* y números de accesión en GenBank, usados en el análisis filogenético multilocus del presente estudio.**

Especie	Aislamiento	Números de accesión GenBank	
		ITS	<i>alt a 1</i>
<i>A. alternantherae</i>	CBS 124392 <sup>T</sup>	KC584179	KP123846
<i>A. alternata</i>	EGS 34-016 <sup>T</sup>	AF347031	AY563301
	CBS 119399	KP124361	KP123910
	CBS 102602	KP124332	KP123881
	CBS 102596	KP124328	KP123877
	CBS 121547	KP124372	KP123920
<i>A. arborescens</i>	CBS 102605 <sup>T</sup>	AF347033	AY563303
	CBS 124281	KP124414	KP123961
<i>A. lycopersici</i>	CBS 210.86 <sup>T</sup>	DQ323697	FJ266502
<i>A. lycopersici</i>	YZU 221185	OQ519795	OQ473633
	YZU 221186 <sup>T</sup>	OQ519794	OQ473632
<i>A. mali</i>	CBS 106.24 <sup>T</sup>	KP124298	KP123847
<i>A. orogonensis</i>	CBS 542.94 <sup>T</sup>	FJ266478	AY563283
<i>A. solani</i>	CBS 116442	KJ718240	KJ718747
	CBS 109157	KJ718238	KJ718238
<i>A. solanicola</i>	YZU 221189	OQ534548	OQ473631
	YZU 221190 <sup>T</sup>	OQ519793	OQ473630
<i>Alternaria</i> sp.	<b>CPO 27</b>		
<i>Alternaria</i> sp.	<b>CPO 28</b>		
<i>A. tomaticola</i>	CBS 118814 <sup>T</sup>	KP124357	KP123906
<i>A. tomato</i>	CBS 114.35	KP124446	KP123992
	CBS 103.30	KP124445	KP123991
<i>A. tenuissima</i> (= <i>A. alternata</i> )	CBS 918.96	AF347032	AY563302

Letras en negritas indican aislamientos y números de accesión generados en el presente estudio. \* números de accesión en proceso de asignación.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Identificación de *Alternaria lycopersici* como patógeno causal de la pérdida de rendimiento en líneas S<sub>4</sub>

*Alternaria* es un patógeno ampliamente distribuido en el cultivo de jitomate, y en condiciones favorables de proliferación del hongo, este disminuye la capacidad de rendimiento en el cultivo y en casos extremos es responsable de la pérdida total de la producción potencial (Zhao *et al.*, 2022), por lo que es necesario identificar la especie presente de *Alternaria*, para evitar pérdidas en el rendimiento potencial del cultivo. El análisis filogenético ayuda a identificar de forma precisa y correcta la taxonomía del patógeno (Gou *et al.*, 2023).

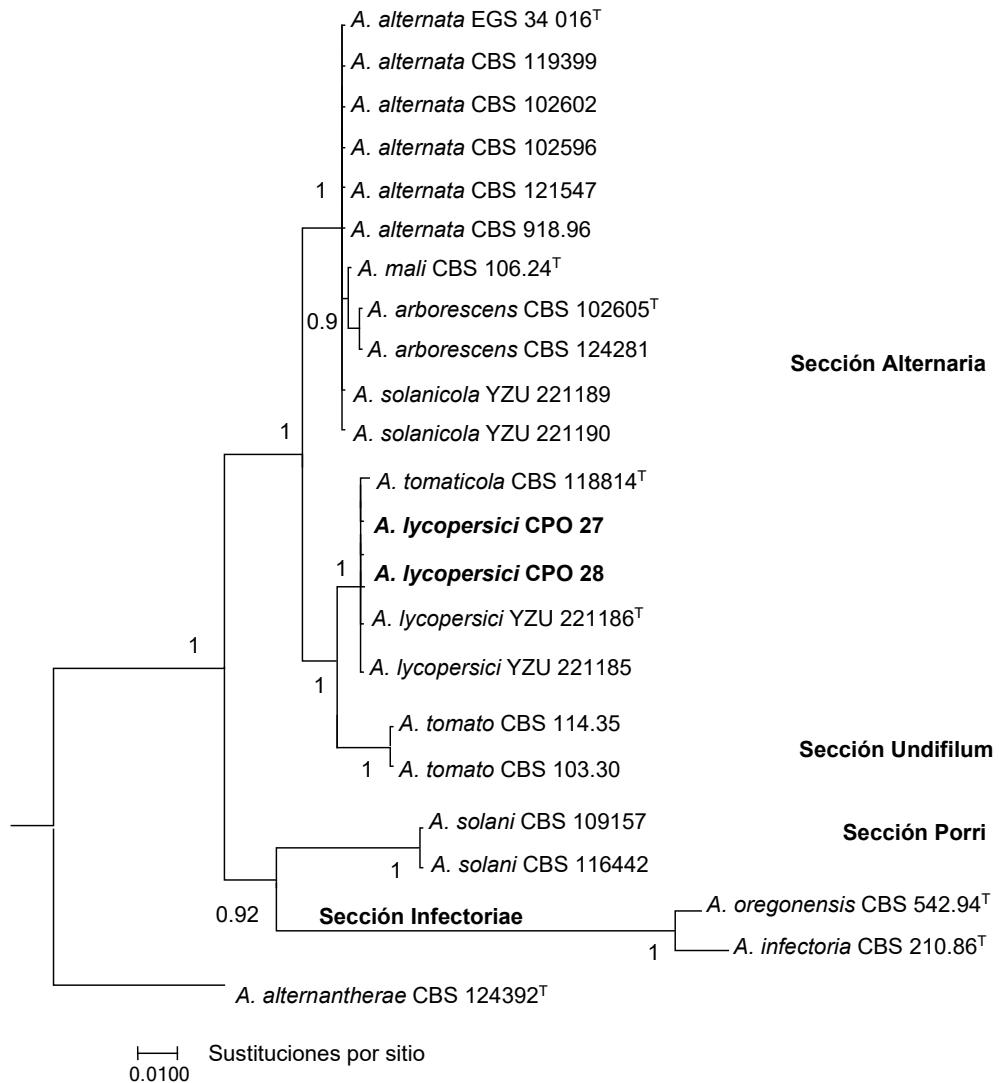
Para la construcción del árbol filogenético se incluyeron las secuencias concatenadas de la región ITS y del gen *alt a 1* de los aislamientos CPO 27 y CPO 28. La longitud de la matriz final consistió de 955 caracteres (Cuadro 2). El análisis bayesiano se corrió con 10 millones de generaciones, con una desviación estándar final de 0.003050, obteniendo 20,002 árboles de los cuales se consideraron 15,002 árboles para el cálculo de la probabilidad posterior.

**Cuadro 2. Características de la matriz concatenada utilizada para la construcción del árbol filogenético**

Región/Gen	Número de caracteres (pb <sup>2</sup> )	Modelo de sustitución nucleotídica
ITS	416	GTR + I
<i>alt α 1</i>	539	HKY +I

ITS: internal transcribed spacer, *alt α 1*: gen alérgeno principal de *Alternaria*, pb<sup>2</sup>: pares de bases.

En la prueba de patogenicidad describen a *Alternaria lycopersici*, como una especie de conidios pequeños que causa lesiones en el área foliar de  $0.02 \pm 1.15$  cm (Gou *et al.*, 2023). México al ser el centro de domesticación y diversidad de tomate (Salgado *et al.*, 2018), es susceptible a una presencia mayor de hongos fitopatógenos, por lo que a pesar del reciente descubrimiento en China de *A. lycopersici*, es posible encontrar esta especie en México que causa pérdida de área foliar y en consecuencia del rendimiento en el cultivo.



**Figura 1.** Árbol filogenético construido con secuencias concatenadas de la región ITS y del gen *alt a 1*, con el método de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud para *Alternaria* spp.

## **VIII. CONCLUSIONES**

En el presente estudio, se identificó a *Alternaria lycopersici* perteneciente a la sección *Alternaria*, como el patógeno causante de la pérdida de rendimiento en las líneas avanzadas de jitomate tipo saladette.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Adhikari, P., Oh, Y., Panthee, D.R., 2017. Current Status of Early Blight Resistance in Tomato: An Update. International Journal of Molecular Sciences. 18 (10).

<https://doi.org/10.3390/ijms18102019>

Ait-El-Mokhtar, M., Laouane, R.B., Anli, M., Boutasknit, A., Wahbi, S., Meddich, A., 2019. Use of mycorrhizal fungi in improving tolerance of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings to salt stress. Scientia Horticulturae. 253, 429-438.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.066>

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.

Castañeda-Villa, A.M., 2021. SELECCIÓN DE LÍNEAS AVANZADAS DE JITOMATE (*Solanum Lycopersicum* L.) TIPO SALADETTE CON BASE GENÉTICA AMPLIADA. Colegio de Postgraduados, , Tesis de maestría.  
[http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4955/Castaneda\\_Vila\\_AM\\_MC\\_RGP\\_Genetica\\_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4955/Castaneda_Vila_AM_MC_RGP_Genetica_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. 9, 772.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

DATA MÉXICO. 2023. Tomates frescos o refrigerados.

<https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/product/tomatoes-fresh-or-chilled>

Délices, G., Leyva-Ovalle, O.R., Mota-Vargas, C., 2019. Biogeography of tomato *Solanum lycopersicum* var. *cerasiform*(Solanaceae) in its center of origin (South America) and domestication (Mexico). Revista de Biología Tropical. 67(4), 1023-1036.

<https://doi.org/10.15517/rbt.v67i4.33754>.

DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. SCIENCE. 243(4896), 1360-1363.

<https://doi.org/10.1126/science.2466341>

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13–15.

Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., Silvestro, D., 2020. raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. Methods Ecology Evolution. 12, 373–377. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>

Duan, Y., Han, M., Schikora, A., 2024. The coordinated responses of host plants to diverse *N*-acyl homoserine lactones. *Plant Signaling & Behavior.* 19(1).

<https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2356406>

Gebhardt, C., 2016. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. Theoretical and applied genetics. 129 (12), 2281–2294.

<https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>

Gou, Y., Aung, S.L.L., Guo, Z., Li, Z., Shen, S., Deng, J., 2023. Four new species of small-spored *Alternaria* isolated from *Solanum tuberosum* and *S. lycopersicum* in China. J. Fungi. 9, 880. <https://doi.org/10.3390/jof9090880>

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *nature biotechnology*. 10(4), 413-417.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>

Hong, S.G., Cramer, R.A., Lawrence, C.B., Pryor, B.M., 2005. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genet. Biol.* 42, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.10.009>

Huelsenbeck, J.P., Ronquist. F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17, 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Miller, J. C., and S. D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoret. Appl. Genet.* 80: 437–448. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00226743>

MycoBank. (2024). Fungal Databases, Nomenclature y Species Banks. *Retrieved* 8 June from <https://www.mycobank.org/Simple%20names%20search>

Nazarov, P.A., Baleev, D.N., Ivanova M.I., Sokolova L.M., Karakozova M.V., 2020. Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta Naturae*. 12(3), 46-59. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>

Nowinski, D., Czapka, T., Maliszewska, I., 2024. Effect of multiple nonthermal plasma treatments of filamentous fungi on cellular phenotypic changes and phytopathogenicity.

International Journal of Food Microbiology. 408.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110428>

Pavón, M.A., González, I., García, T., 2015. Importancia del género Alternaria como patógeno de cultivos vegetales (I). Phytoma España. 265, 48-51.

[https://www.phytoma.com/images/pdf/265\\_ENERO\\_2015\\_TT\\_fitopatologia\\_alternaria.pdf](https://www.phytoma.com/images/pdf/265_ENERO_2015_TT_fitopatologia_alternaria.pdf)

Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A.L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E.J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., van der Knaap, E., Caicedo, A.L., 2020. Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*. 37, 1118–1132.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>

Rodrigues, M.H.P., Furlong, E.B., 2022. Fungal diseases and natural defense mechanisms of tomatoes (*Solanum lycopersicum*): A review. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 122, 101906.

<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101906>

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Salgado-Meraz, L., Lobato-Ortiz, R., Pérez-Flores, L.J., Cruz-Izquierdo, S., Peña-Valdivia, C., García-Zavala, J.J., 2018. Agronomic diversity of “Cherry” type tomato populations *S. lycopersicum* L. and *S. pimpinellifolium* L. with potential in plant breeding. Rev. Fitotec. Mex. 41, 499–507. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.4-A.499-507>

Schmey, T., Tominello-Ramirez, C.S., Brune, C., Stam, R., 2024. *Alternaria* diseases on potato and tomato. Moleculat Plant Pathology. 25, <https://doi.org/10.1111/mpp.13435>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria., 2021. Ficha técnica para el diagnóstico de: Especies del género *Alternaria* que afectan brasicáceas (Tecámac), Mexico. Revisado Junio 7. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/723904/10.\\_Ficha\\_tcnica\\_diagn\\_sti\\_co\\_G\\_nero\\_Alternaria.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/723904/10._Ficha_tcnica_diagn_sti_co_G_nero_Alternaria.pdf)

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera., 2023. Cierre de la producción agrícola 2023. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Wang, S., Jin, N., Jin, Xiao, X., Hu, L., Liu, Z., Wu, Y., Xie, Y., Zhu, W., Lyu, Ji., Yu, J., 2022. Response of Tomato Fruit Quality Depends on Period of LED Supplementary Light. Frontiers in Nutrition. 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.833723>

Wang, N., Sundi, G.W., De La Fuente, L., Cubero, J., Tatineni, S., Brewer, M.T., Zeng, Q., Bock, C.H., Cunniffe, N.J., Wang, C., Candresse, T., Chappell, T., Coleman, J.J., Munkvold, G., 2024. Key Challenges in Plant Pathology in the Next Decade. Phytopathology. 114 (5), 837-842. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-24-0137-KC>

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322 p. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., (eds). PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, London. 482 p.

Zhao, L., Cheng, H., Liu, H.F., Gao, G.Y., Zhang, Y., Li, Z.N., Deng, J.X., 2022. Pathogenicity and diversity of large-spored *Alternaria* associated with three solanaceous vegetables (*Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum* and *S. melongena*) in China. Plant Pathol. 72, 376–391. <https://doi.org/10.1111/ppa.13665>