

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum* L. en la provincia de Tungurahua.

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA.

AUTORA:

DAYANA ESTEFANÍA JÁCOME PILCO

TUTOR:

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

CEVALLOS- ECUADOR

2021-2022

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, JÁCOME PILCO DAYANA ESTEFANIA, portador (a) de cédula identidad número: 1804754214 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum* L. en la provincia de Tungurahua” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.



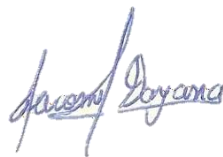
.....
Dayana Estefanía Jácome Pilco

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN CULTURAL Y MORFOLÓGICA DE AISLADOS MONOSPÓRICOS DEL AGENTE CAUSAL DEL MOHO GRIS DE LA HOJA DE *SOLANUM LYCOPERSICUM* L. EN LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA” , como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



.....
Dayana Estefanía Jácome Pilco.

“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN CULTURAL Y MORFOLÓGICA DE AISLADOS MONOSPÓRICOS DEL AGENTE CAUSAL DEL MOHO GRIS DE LA HOJA DE *SOLANUM LYCOPERSICUM* L. EN LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA”.

REVISADO POR:



Firmado electrónicamente por:
MICHEL LEIVA MORA

.....

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**MANOLO SEBASTIAN
MUNOZ ESPINOZA**

FECHA

.....

Ing. Manolo Muñoz PhD.

03/02/2022

.....

PRESIDENTE TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS**

.....

Ing. Marco Perez. PhD

03/02/2022

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**ISABEL
CRISTINA
LOPEZ**

.....

BQF. Cristina López

03/02/2022

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicado a Dios y a ti Manuelito por otorgarme la salud y la vida y ser mi guía en todo mi proceso de formación dándome siempre la sabiduría para siempre cumplir con mis sueños y metas.

A mis padres Miltón y Céllica que con su esfuerzo y trabajo han sido mi pilar fundamental en cada uno de mis pasos, por el amor, la educación y la paciencia que siempre me han brindado y haber hecho de mí una persona capaz, educada y responsable. A mis hermanos por estar siempre a mi lado y alentarme día a día en este proceso, brindándome siempre su apoyo incondicional.

A mis abuelitos Pedro, Juan y Dolores que a pesar de no estar a mi lado sé que estarán orgullosos de mí, a ti Mamilo que siempre estas a mi lado y me incentivas a seguir adelante y nunca rendirme. A mis tíos y tías que con sus consejos y apoyo nunca me han dejado caer y siempre han estado motivándome para llegar hacer una gran profesional. A mis primos y primas que con sus locuras siempre me han brindado su cariño y su apoyo incondicional.

A ti ñaño Jonathan, que a pesar de tu cansancio siempre tenías tiempo para ayudarme en lo necesitaba, apoyarme y siempre darme ánimos para seguir adelante.

A todos mis compañeros por haberme brindado su amistad en mis años de formación. A mis amigas que siempre estuvieron en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por haberme abierto sus puertas para alcanzar mi formación profesional.

A mi tutor Ing. Michel Leiva Mora Dr.C. por compartirme sus enseñanzas y brindarme su apoyo en esta investigación y de la misma manera al Ing. Marco Pérez y por brindarme cada uno de sus consejos y opiniones para la elaboración de este proyecto, a la Ing. Cristina López por brindarme su apoyo incondicional y opiniones en ejecución de la investigación.

A los maestros (as) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por sus sabios consejos para alcanzar con satisfacción la culminación de esta investigación.

Dayana Estefanía Jácome Pilco

INDICE

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes investigativos	3
1.3. Categorías fundamentales o marco conceptual	6
1.3.1. Cultivo de Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	6
1.3.2. El moho de la hoja de tomate (<i>P. fulva</i>)	11
1.3.3. Aislamiento en medios de cultivo	14
1.3.4. Caracterización cultural.....	15
1.3.5. Identificación morfológica	15
1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
1.4.1. HIPÓTESIS	17
1.4.2. OBJETIVOS.....	17
CAPÍTULO II	18
METODOLOGÍA	18
2.1. Ubicación del experimento	18
2.2. Características del lugar	18
2.3. Equipos y materiales	19
2.3.1. Material experimental.....	19
2.3.2. Equipos.....	19
2.3.3. Materiales.....	19
2.4. Factores de estudio.....	20
2.4.1. Objetivo 1. Obtener aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.....	20
2.4.2. Objetivo 2. Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).	20
2.4.3. Objetivo 3. Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.....	21
Factor 1. Influencia de la localidad en la eficiencia en las características morfológicas de los aislados de <i>C. fulvum</i>	21

2.5.	Diseño experimental.....	21
2.6.	Manejo del experimento.....	22
2.6.1.	Objetivo 1. Obtener aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.....	22
2.6.2.	Objetivo 2. Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).	23
2.6.3.	Objetivo 3. Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.....	24
2.8.	VARIABLES RESPUESTA.....	25
2.9.	Procesamiento de la información	25
CAPÍTULO III.....		26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		26
3.1.	Obtención de aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.....	26
3.2.	Descripción de las características de las colonias de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).....	29
3.3.	Caracterización morfológica de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.	52
CAPITULO IV.....		56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		56
4.1.	CONCLUSIONES	56
4.2.	RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA.....		58
ANEXOS.....		64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del Tomate	7
Tabla 2. Etapas fenológicas del Tomate.....	8
Tabla 3. Taxonomía de <i>P. fulva</i>	12
Tabla 4. Altura a la que se encuentran ubicados los sitios de muestreos pertenecientes a los cantones de la provincia de Tungurahua.....	18
Tabla 5. Crecimiento de colonias de <i>C. fulvum</i> a partir de un solo conidio germinado.....	26
Tabla 6. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Tisaleo. .	29
Tabla 7. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Baños. ...	32
Tabla 8. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Patate. ...	34
Tabla 9. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Ambato.	37
Tabla 10. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Cevallos.	40
Tabla 11. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Mocha.	43
Tabla 12. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Píllaro.	45
Tabla 13. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> del cantón Pelileo.	48
Tabla 14. Crecimiento micelial de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i>	51
Tabla 15. Caracterización morfológica de <i>C. fulvum</i> observada bajo microscopio..	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recoleccion de hojas que presenten signos y sintomas de <i>C. fulvum</i>	64
Figura 2. Obtención de aislados de <i>C. fulvum</i>	64
Figura 3. Colección de aislados monospóricos.....	65
Figura 4. Instalación de ensayo para el crecimiento micelial.	65

RESUMEN

El moho gris de la hoja del tomate descubierto en Inglaterra en 1883 se caracteriza por producir zonas amarillas en las hojas, observándose en el envés un color verde olivo, lo cual afecta el rendimiento agrícola y la calidad de los frutos. El presente trabajo tuvo como objetivo obtener aislados monospóricos a partir de hojas de tomate con signos del moho gris para caracterizarlos cultural y morfológicamente. Para el aislamiento monospórico se utilizó el método de impresión de hoja y posteriormente se utilizó una modificación del método de Valmas. Para la caracterización cultural de las colonias de los aislados se evaluaron las siguientes características: color del anverso y reverso de las colonias, elevación, textura, bordes, pigmentación y presencia o no de líquido de transpiración. Para la caracterización morfológica se utilizó el método de microcultivo y observación bajo el microscopio del diámetro de las hifas, la longitud de los conidióforos y el largo y ancho de los conidios. Por vez primera para Ecuador se obtuvieron 80 aislados monospóricos procedentes de 8 cantones de la provincia Tungurahua (Tisaleo, Baños, Patate, Ambato, Cevallos, Píllaro, Mocha y Pelileo) presentando todos colores verdes oliváceos en el anverso de la colonia, mientras que en reverso fueron de color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular. Los aislados 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que en el 5 mostró bordes regulares. Ningún aislado pigmentó el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración en sus colonias. El crecimiento micelial a los 7 días estuvieron en un rango entre $0,50 \text{ mm.día}^{-1}$ a $1,29 \text{ mm.día}^{-1}$, siendo la velocidad promedio de $0,93 \text{ mm.día}^{-1}$ y a los 14 días alcanzaron valores que estuvieron en el rango entre $0,95 \text{ mm.día}^{-1}$ a $1,46 \text{ mm.día}^{-1}$ siendo la velocidad promedio de $1,23 \text{ mm.día}^{-1}$. El diámetro promedio de las hifas de los aislados obtenidos de *C. fulvum* mostró como menor valor $2 \mu\text{m}$, mayor valor $11 \mu\text{m}$ y un valor promedio de $5,41 \mu\text{m}$. En los conidióforos el menor tamaño fue de $9 \mu\text{m}$ mientras que el mayor fue de $116 \mu\text{m}$ con un valor promedio de $33,01 \mu\text{m}$. Los conidios respecto al largo tuvieron un valor mínimo de $3 \mu\text{m}$ y el mayor de $13 \mu\text{m}$ con un valor promedio de $6 \mu\text{m}$, mientras que el ancho de los conidios mostró un mínimo valor de $1,5 \mu\text{m}$ y el máximo fue de $5 \mu\text{m}$ para un valor promedio de $5 \mu\text{m}$.

Palabras clave: *Cladosporium fulvum*, colonias fúngicas, conidióforos, conidios, tomate.

SUMMARY

The gray mold of the tomato leaf discovered in England in 1883 is characterized by producing yellow areas on the leaves, observing an olive green color on the underside, which affects the agricultural yield and the quality of the fruits. The objective of this work was to obtain monosporic isolates from tomato leaves with signs of gray mold in order to characterize them culturally and morphologically. For the monosporic isolation, the leaf printing method was obtained and later a modification of the Valmas method was obtained. For the cultural characterization of the colonies of the isolates, the following characteristics were evaluated: color of the front and back of the colonies, elevation, texture, edges, pigmentation and presence or absence of perspiration liquid. For the morphological characterization, the microculture method and observation under the microscope of the diameter of the hyphae, the length of the conidiophores and the length and width of the conidia were obtained. For the first time for Ecuador, 80 isolated monospores will be acquired from 8 cantons of the Tungurahua province (Tisaleo, Baños, Patate, Ambato, Cevallos, Píllaro, Mocha and Pelileo) all presenting olive green colors on the obverse of the colony, while in the reverse was black, in addition a superficial elevation, plush texture and irregular shape appeared. Isolates 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 had lobed borders in their colonies, while 5 showed regular borders. no pigment isolated from the culture medium (PDA), nor was there evidence of transpiration liquid in its colonies. The mycelial growth at 7 days was in a range between $0.50 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$ to $1.29 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$, with the average speed being $0.93 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$ and at 14 days it reached values which were in the range between $0.95 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$ to $1.46 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$, with the average velocity being $1.23 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$. The average diameter of the hyphae of the isolates obtained from *C. fulvum* showed a lower value of $2 \mu\text{m}$, a higher value of $11 \mu\text{m}$ and an average value of $5.41 \mu\text{m}$. In the conidiophores, the smallest size was $9 \mu\text{m}$ while the largest was $116 \mu\text{m}$ with an average value of $33.01 \mu\text{m}$. The conidia regarding the length had a minimum value of $3 \mu\text{m}$ and the largest value of $13 \mu\text{m}$ with an average value of $6 \mu\text{m}$, while the width of the conidia showed a minimum value of $1.5 \mu\text{m}$ and the maximum was $5 \mu\text{m}$ for an average value of $5 \mu\text{m}$.

Key words: *Cladosporium fulvum*, conidiophores, conidia, fungi colonies, tomato

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1.Introducción

Con la llegada de los españoles a América, se empezaron a cultivar pequeños huertos de tomate en las regiones andinas de Sudamérica, sobre todo en el área Mesoamericana, sin tener significancia económica, pero la domesticación tuvo un alto grado, existiendo variedades de tamaños, formas y colores de sus frutos (**Herrera, 2014**). A raíz de este antecedente, el tomate en la actualidad es considerado como uno de los productos agrícolas más comercializados tanto a nivel nacional como internacional, se considera que su consumo alcanza un total de 211 millones de toneladas métricas (tm), que genera alrededor de 25 millones de dólares (**López, 2016**).

A nivel nacional, la producción de tomate de riñón se lo realiza en todas las regiones, por ser una hortaliza que se adapta fácilmente a cualquier tipo de suelo, se estima que el área de cultivo está más allá de las 1970 hectáreas a nivel de todo el país, llegando a tener una producción total de 62.675 toneladas métricas, con un promedio de 32 toneladas por hectárea (t/ha) por año. Las provincias con mayor producción son: Tungurahua, Pichincha y Santa Elena, con un rendimiento elevado (**Guamán, 2019**).

En la provincia de Tungurahua, el cultivo de tomate ha generado un gran interés económico en los agricultores, teniendo una producción del 70 % de esta hortaliza, en la mayoría de los casos el sistema de producción se realiza bajo cubierta, lo cual ha potenciado los rendimientos y la calidad del producto (**Santamaría, 2018**). Se ha constituido en uno de los productos más importante en la dieta diaria de las personas debido a su alto valor nutricional. El cultivo a lo largo de ciclo vegetativo, presenta algunos inconvenientes por la presencia de numerosas plagas, causadas por hongos, bacterias, virus, nemátodos e insectos que pueden demeritar la calidad del fruto, disminuir la productividad, el proceso de eliminación de estas plagas puede llegar a representar hasta un 20% del costo de producción, lo que se ve reflejado en la rentabilidad de los agricultores (**Jaramillo, 2015**).

Dentro de la clasificación taxonómica, el tomate pertenece a la familia de la Solanácea cuyo género es *Solanum*. La planta presenta un tallo grueso, pubescente con una coloración verde. Puede medir desde 2 hasta 4 cm de diámetro. Sus hojas son compuestas con borde dentado. La flor es perfecta y regular, en la base del ovario se encuentran insertados los sépalos, pétalos y estambres, mientras que el cáliz y la corola constan de 5 sépalos y 5 pétalos con una coloración amarilla, dispuestos de manera helicoidal. El fruto presenta un diámetro entre 3-16 cm y tiene forma de baya bilocular **(López, 2016)**.

El cultivo se ve afectado por enfermedades fúngicas las mismas que afectan sus etapas fenológicas provocando daños en toda la planta e incluso la muerte prematura; entre las principales se puede encontrar: *Fusarium oxysporum* sensu (Smith & Swingle), *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout 1896, *Rhizoctonia solani* (J.G. Kühn 1858), *Phytophthora infestans* (Mont.de Bary 1876), *Leveillula taurica* (Lév. G. Arnaud 192), *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous 2003 **(López, 2016)**. En el Ecuador, una de las enfermedades fúngicas que afecta el cultivo de tomate con mayor frecuencia es el moho gris de la hoja, causada por el hongo ascomicete *P. fulva*, cuyo estado anamorfo corresponde con *C. fulvum* **(Lucentini et al., 2017)**.

El *C. fulvum* se reproduce de manera asexual, mientras que la producción de cladofulvina se observa por medio de conidios **(Griffiths et al., 2018)**. Los principales síntomas son manchas amarillas en el haz mientras que en el envés aparece un crecimiento filamentosos cubiertos de los conidios con color pardo oliváceos del hongo, lo cual causa daño en la superficie foliar, donde ya no se puede realizar eficientemente la fotosíntesis por lo tanto se disminuirá la calidad y el rendimiento del fruto **(Lucentini et al., 2017)**.

Se ha considerado que, para el control de esta enfermedad, se puede aplicar algunas medidas agronómicas como el tener una buena ventilación en los invernaderos, mantener una adecuada fertilización, control de la temperatura, evitar la humedad excesiva en el invernadero, no debe existir película de agua en las hojas, y mantener una densidad de siembra adecuada acorde con lo recomendado por las fichas técnicas de las variedades **(Peteira et al., 2011)**.

1.2. Antecedentes investigativos

En Ecuador la siembra y producción del tomate se considera que genera extraordinarios ingresos a los agricultores, debido a su alto valor nutricional. Universidades y Escuelas Politécnicas han empezado a realizar investigaciones enfocadas a mejorar la tecnificación del cultivo de esta hortaliza, realizando métodos de prevención y control de enfermedades y plagas que lo afectan, las cuales generan grandes pérdidas económicas a sus productores (**Romero et al., 2020**).

Torres et al., (2008), llevaron a cabo un estudio basado en el biocontrol del moho gris del tomate utilizando cuatro hongos antagonistas: *Trichoderma harzianum* (Rifai 1969), *Trichoderma viride* (Pers. 1794), *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster, Arx 1987) y *Hansfordia pulvinata* (Berk. & M.A. Curtis, S. Hughes 1958), en el cual evaluaron la efectividad de estos hongos y determinaron la temperatura óptima a la cual la se evidencia el mejor efecto antagonista frente al patógeno.

De Cara et al., (2008) evaluaron el efecto fungicida del extracto de canela y el sulfato de cobre frente a *P. fulva* utilizando 4 ml/l y 6 ml/l de sulfato de cobre, 1 ml/l y 2 ml/l de extracto de canela, así como 1,5 ml/l y 3 ml/l del antibiótico polioxina-B. El extracto de canela y el sulfato de cobre inhibieron la germinación de los conidios en su totalidad. En condiciones *in vitro* manifestaron que las concentraciones de 4 ml/l y 1 ml/l para el sulfato de cobre y el extracto de canela respectivamente fueron letales para *P. fulva*.

Medina (2011), señala que en la caracterización a nivel morfológico del género *Cladosporium*, mediante la técnica de microcultivo para observar la estructura del micelio, conidióforos y conidios. A su vez este autor realizó la amplificación de los genes ITS conservados mediante PCR identificando a *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries 1952, *Cladosporium sphaerospermum* Penz. 1882 y *P. fulva*. También informó la presencia de los genes de avirulencia Avr 2, Avr4, Avr4E y Avr9.

Peteira et al., (2011), en su trabajo, caracterizaron molecularmente a un grupo de aislados del hongo *C. fulvum* procedentes de plantas de tomate en condiciones de

cultivo, donde realizaron la amplificación de la región 28S para la identificación de los aislados. Posteriormente para la amplificación de los genes Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9 diseñaron cebadores específicos para cada uno. En su estudio mostraron que la patogenicidad de *C. fulvum* depende de un conjunto de factores de virulencia. Por otro lado, reportaron que la proteína efectora codificada por el gen Avr4 posee la función de contribuir con la virulencia completa y protege a las hifas. Además, determinaron que la virulencia de las razas denominadas 2 y 4 están más relacionadas con la proteína Ecp2 en comparación la proteína Ecp1.

Por su parte, **Ramírez (2013)**, evaluó la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle y de *Citrus reticulata* (Blanco, 1837) frente al hongo *P. fulva in vivo* en plantas de tomate, en el cual reportó que el extracto de *C. reticulata* en la concentración de metanol del 70% fue efectiva para el control de *P. fulva*, en tanto que el extracto proveniente de *C. aurantiifolia* en etanol a una concentración del 70% fue la más efectiva. Se afirmó que los extractos en las concentraciones antes mencionadas de etanol y metanol no demostraron efectos perjudiciales para la microbiota del suelo.

Martínez et al., (2016), realizaron una investigación enfocada en los hongos fitopatógenos relacionados con la planta de tomate (*S. lycopersicum*) en la zona árida de México, estudiaron al grupo de hongos conformado por *Botrytis cinérea* (Pers. 1797), *P. infestans*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *Pythium aphanidermatum* (Edson Fitzp. 1923). En la investigación reportaron estrategias para el control y el manejo adecuado de las enfermedades que producen los hongos antes mencionados al cultivo de tomate.

Ruiz et al., (2018), evaluaron en su investigación el efecto de extractos provenientes de cítricos para el control de patógenos que causan enfermedades postcosecha en el fruto de *S. lycopersicum*, mediante el uso de diferentes dosis de extractos (0 pm, 666 pm, 1000 pm, 2000 pm, 4000 pm y 8000pm), en las superficies del fruto de tomate en condiciones *in vitro*. En su estudio manifestaron que los patógenos identificados fueron: *C. fulvum*, *F. oxysporum*, *Alternaria tenuissima* (Kunze, Wiltshire 1933), *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb, Vuill. 1902), *B. cinerea*, *Geotrichum candidum*. (Link 1809), *Colletotrichum coccodes* (Wallr, S. Hughes 1958) y *Stemphylium*

macrosporoides (Berk. & Broome, 1886), siendo 666 pm, 2000 pm y 8000 pm las dosis que mayor efecto mostraron.

Ramos et al., (2019), analizaron la actividad antifúngica de *C. aurantiifolia* frente al moho foliar del tomate causado por *P. fulva*, donde el efecto de los extractos de *C. aurantiifolia* fueron evaluados mediante la liberación de iones K^+ y PO_4^{3-} en el medio extracelular, mientras que el efecto sobre la respiración celular del hongo fue medido por medio de la actividad enzimática de la Succinato deshidrogenasa (SDH). En su estudio observaron que las elevadas concentraciones de K^+ y PO_4^{3-} produjeron daños en la membrana celular de *P. fulva*. Además, la inactividad de la enzima succinato deshidrogenasa demostró la inhibición de la respiración celular *P. fulva*.

Lucentini (2020), analizó los polimorfismos en los genes denominados Avr del hongo *P. fulva* y reportó que el crecimiento lento de *P. fulva* es una característica propia de la especie, y manifestó que la variabilidad genética observada no estaba relacionada con el sitio de muestreo, ni con su raza o tipo de aislado. Además, concluyó que el moho producido por las razas identificadas puede ser controlado mediante el cultivo de híbridos de tomate que contengan al menos un gen de resistencia R.

De su parte, **Bernal et al. (2020)**, estudiaron la interrelación entre *S. lycopersicum* y *C. fulvum* en condiciones de cultivo de tipo protegido en Cuba, en el cual llevaron a cabo una caracterización cultural, patogénica y molecular de una población conformada por 36 aislamientos de *C. fulvum* procedentes de distintas localidades del país. En la investigación demostraron que los aislamientos del hongo poseían características culturales similares. Se detectó por primera vez la raza 9 de *C. fulvum* y manifestaron que los hallazgos encontrados sugirieron que los híbridos de tomate empleados en las localidades cubanas carecen de la presencia del gen de resistencia Cf-9, o que los aislados de *C. fulvum* carecían del gen Avr9.

Las investigaciones reportadas forman parte del compendio necesario para desarrollar la presente investigación, las cuales aportan con información relevante referente al manejo del moho gris de la hoja de tomate (*C. fulva*) en condiciones de campo, invernadero e *in vitro*.

1.3.Categorías fundamentales o marco conceptual

1.3.1. Cultivo de Tomate (*S. lycopersicum*)

Historia

Después del arribo de los españoles, el cultivo del tomate se localiza en la cordillera Andina, desde la zona sur de Colombia hasta la zona norte de Chile, para posteriormente ser cultivado y domesticado en Centroamérica y México. En el siglo XVI fue ingresado a Europa y en el siglo XIX inició su producción y su comercialización alrededor del mundo, en general se universalizó a nivel general con buenos y excelentes resultados de producción y rentabilidad, con beneficios significativos para los agricultores (**López 2017**).

En la actualidad, el tomate es catalogado como uno de los cultivos de mayor relevancia a nivel mundial, debido a su alto contenido nutricional compuesto por vitamina A, vitamina C, licopeno y ácido fólico, y por su amplia difusión comercial. Su popularidad sigue en aumento ya que es un cultivo con alto rendimiento, para las familias campesinas, este producto constituye un rubro altamente significativo para su economía (**Guevara y Estrella 2008**).

Clasificación taxonómica del tomate

De acuerdo con López (2016), la clasificación taxonómicamente es la siguiente:

Tabla 1. Taxonomía del Tomate

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>lycopersicum</i>

Fuente: Tomado de López (2016).

Descripción botánica del tomate

El tomate es una especie que pertenece al género *Solanum*, a la familia de las Solanáceas y al orden Solanales, son de ciclo perenne y se cultiva anualmente. Se puede cultivar en cualquier época del año, considerando las condiciones necesarias para su óptimo desarrollo y producción. Posee un sistema radicular compuesto por una raíz principal corta y raíces secundarias adventicias (**Escobar y Lee 2009**). El tallo es semileñoso, pubescente de apariencia herbácea; sus hojas pinneadas y compuestas de forma oblonga u ovalada, poseen de 5 a 9 foliolos con bordes dentados, ápices agudos y bases oblicuas de color verde. Su flor es regular y con forma perfecta, su cáliz está conformado por 5 sépalos y su corola contiene 5 pétalos de coloración amarilla. Su fruto es una baya globosa, subsférica bilocular o plurilocular de color verde cuando se encuentra en estado inmaduro y de color rojo cuando está maduro, puede alcanzar un peso desde unos pocos miligramos hasta 600 gramos (**López, 2017**).

Condiciones agroecológicas del cultivo

El tomate es una planta que puede cultivarse en campo o en invernadero, en zonas andinas, y zonas tropicales, para su óptimo desarrollo en las noches requiere una temperatura entre 10°C y 17°C, mientras que en el día debe ser de 20°C y 30°C. El suelo debe tener una humedad entre 60% y 80%, una precipitación anual aproximada de 750 mm (Fernández, 2019). La luz es otro factor relevante para considerar, por lo menos requiere de 6 horas diarias de exposición solar para facilitar sus procesos de floración y fructificación (Allende, 2017). Además, necesita de un suelo permeable, textura media, sin impedimentos físicos, con gran cantidad de materia orgánica y un buen drenaje, por lo que es recomendable cultivar en suelos franco-arcillosos con una conductividad eléctrica entre 0.75 y 2.0 mmho/cm², con un pH entre 5.8 y 6.8 (Álvarez, 2018).

Etapas Fenológicas

Según Pérez *et al.*, (2003) señala que la fenología de un cultivo está comprendida por las etapas que forman parte de su ciclo de vida. En el caso del cultivo de tomate su fenología está compuesta por tres etapas.

Tabla 2. Etapas fenológicas del Tomate.

Etapas fenológicas		
Inicial	Vegetativa	Reproductiva
1 a 21 días	22 a 80 días	81 a 100 días
Esta etapa inicia con la germinación de la semilla, en la cual existe un rápido aumento de la materia seca, debido a que la planta destina su energía a la fotosíntesis y a la	Esta etapa comienza a los 21 días luego de la germinación de la semilla y a los 25 o 30 días previos a la floración. En ella se aumenta la cantidad de nutrientes para asegurar	Esta etapa inicia con el proceso de fructificación, y se destaca porque la planta detiene su crecimiento mientras que el fruto consume los nutrientes para su óptimo desarrollo y maduración.

síntesis de tejidos de un desarrollo adecuado de absorción nuevos. las hojas y ramas.

Fuente: Tomado de Pérez *et al.*, (2003).

Plagas y Enfermedades

Plagas

Mosca blanca, causado por *Bemisia tabaci* (Gennadius): los daños van desde la germinación hasta tiempos de cosecha, presenta un amarillamiento, debilidad en la planta y caída de las hojas, otros como las manchas en los frutos y dificulta el desarrollo de la planta (**López, 2016**).

Gusano del fruto, es originado por *Helicoverpa sp* (Hubner ,1808): son larvas muy voraces, ocasionan daños en corto tiempo en las hojas, se inicia en los estadios larvarios que se alimentan de las flores. Si la planta es pequeña la puede matar porque le causa daño en la yema apical del tallo (**López, 2016**).

Minador de la hoja, proviene del *Liriomyza trifolii* (Blanchard, 1926): se desarrollan en el interior de las hojas a manera de larvas produciendo así galerías o minas, se alimentan principalmente de hojas viejas y secas. Los adultos son móviles, se encuentra en cualquier parte de la plantación. Los daños iniciales se presentan a manera de cabeza de alfiler en el follaje (**López, 2016**).

Trips causado por, *Frankliniella Occidentalis* (Pergante): se encuentra en el suelo a manera de pupa y cuando es adulto aparece en las flores. Los daños se producen en las hojas que provoca una deformación y enrollamiento hacia arriba, también puede retardar la maduración de la planta (**López, 2016**).

Enfermedades

Tizón tardío, causado por *P. infestans*: Esta enfermedad se desarrolla con una humedad relativa superior a 90% y a una temperatura entre 10°C y 25°C, los daños están en el follaje, tallos y frutos sin importar en la etapa de crecimiento que se

encuentre, es causante de necróticas y pueden expandirse por toda la planta, son de color café y presentan una forma circular delimitadas por las nervaduras (**López, 2016**).

Tizón temprano, causado por la *A. Solani*: Puede ser transportado por el viento, la lluvia e incluso por restos de plantas enfermas, logra sobrevivir por un año en el suelo y en residuos de cosecha. Los daños son en la etapa de desarrollo, siendo más usual en la fructificación, en el tallo se presenta en forma de chancro negro, mientras en las hojas bajas se forma manchas pequeñas de forma circular con unos anillos concéntricos, en el fruto presenta lesiones de color café (**López, 2016**).

Fusarium o marchitez fungosa, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici: sensu Smith & Swingle. La planta presenta una marchitez en la parte aérea, los peciolos se caen en las hojas superiores, en las hojas inferiores presentan un amarillamiento, avanza hasta llegar al ápice lo cual causa la muerte de la planta (**López, 2016**).

Pudrición de la base del tallo por fusarium, producido por *Fusarium solani*. (Mart.) Sacc. 1881: los suelos con poco drenaje y compactos favorecen su crecimiento. Los síntomas se presentan en plántulas recién germinadas, tienen una coloración rojiza a café oscura, mientras que en las hojas bajas se vuelven amarillas, ocasionando daños en toda la planta, a nivel del tallo puede haber una pudrición (**López, 2016**).

Mildiú polvoroso o cenicilla, originado por *Leveillula taurica*. (Lév.) G. Arnaud 1921, *Erysiphe orontii*. Castagne 1851 y *Oidium lycopersicum*. Cooke & Masee 1888: Sus estructuras puede viajar distancias lejanas, afecta principalmente al follaje de la planta, presenta unas manchas de color café amarillentas en el haz, las mismas que en el centro, se vuelven necróticas, y en el envés se puede mirar un micelio de color blanco, al unirse estas lesiones provoca que la hoja se caiga y se seque totalmente, no permite desarrollar los frutos causando pérdidas a los agricultores (**Sygenta, 2018**).

Podredumbre gris, producida por *B. cinerea*: este hongo sobrevive en residuos de plantas cortadas y desechadas por largo tiempo, lo que ocasiona una infección en

tejidos a través de sus heridas, esta enfermedad aparece como lecciones elípticas y acuosas, las mismas que pueden rodear al tallo causando así la muerte de la planta, afectando a flores y frutos, formando esporulaciones de color gris, produce una pudrición acuosa (Sygenta, 2018).

Antracnosis o podredumbre negra, ocasionada por *Colletotrichum* (Wallr.) S. Hughes 1958: Se desarrolla de manera óptima en temperaturas de 20°C a 24°C y con una humedad libre, las hojas y frutos presentan manchas a manera de quemaduras, no afecta a toda la planta. La fruta se infecta cuando esta verde pero los síntomas se presentan cuando la fruta se encuentra madura (López, 2016).

Moho de la hoja causado por *C. fulvum*. Causa lesiones de color verde amarillento en el envés de la hoja provocando su caída, su fruto es afectado en la parte apical, de color oscuro (Sygenta, 2018).

1.3.2. El moho de la hoja de tomate (*P. fulva*)

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por *M.C. Cooke* en el año 1883 en la ciudad de Inglaterra, observando hojas que fueron traídas desde Carolina del Sur. En el siglo XVI el tomate fue traído hacia América Central pero la enfermedad no fue descrita por lo menos 300 años después. Se ha visto que este hongo no se desarrolla en climas templados como Europa y Norte América, tampoco en humedad alta no se propagan (Bernal, 2010).

Importancia

El hongo de la hoja *P. fulva*, considerado como una de las enfermedades que ocasiona grandes pérdidas económicas a los agricultores a nivel mundial. Bernal (2010), señalo que esta patología aparece siempre y cuando se registren altas humedades relativas, así como temperaturas elevadas. Esto ocurre generalmente en los invernaderos mal estructurados en su sistema de ventilación.

Taxonomía

Según **González (2013)**, afirmó, que la *F. fulva*, según su filogenia y su morfología pertenecen al reino Fungí, clase Dothideomycetes, orden Capnodiales, y a la familia Mycosphaerellaceae. La morfología distingue sus conidióforos, que presentan unas dilataciones nudosas en un solo lado desarrollando ramas cortas laterales produciendo conidios de 16-40 x 5-7 μm , de forma cilíndrica o elipsoides, presentan un color verde con cadenas normales ramificadas con una superficie lisa, recta o curvada.

Según **González (2013)** ubicó a *P. fulva* en las siguientes categorías taxonómicas:

Tabla 3. Taxonomía de *P. fulva*.

Taxonomía	
Reino	<u>Fungi</u>
Phylum	<u>Ascomycota</u>
Clase	<u>Dothideomycetes</u>
Orden	<u>Capnodiales</u>
Familia	<u>Mycosphaerellaceae</u>
Género	<u>Passalora</u>
Especie	<u><i>P. fulva</i></u>

Biología

Según **Cedeño y Carrero (2018)**, manifestaron que el hongo de *P. fulva* sobrevive en el suelo y los esclerocios pueden dar origen a otros conidios, estos son resistentes a la desecación, en los invernaderos pueden vivir entre 9 a 12 meses sin que exista cultivo de tomate, asegurando la prevalencia entre un ciclo a otro de cultivo, prevaleciendo en forma de saprófito en residuos de cultivo, semillas, suelo, e incluso en los materiales

de construcción del invernadero. Los conidios al encontrar humedad y temperatura adecuada inmediatamente penetran a los tejidos foliares a través de las estomas y comienza su incubación que tiene un periodo de 12 a 15 días para producir la esporulación que aparece generalmente en el envés de los folíolos.

Signos y Síntomas

Para **Bernal (2010)**, indicó que se pueden observar en primera instancia en las hojas viejas para luego extenderse gradualmente hacia a la parte superior de la planta, presentando zonas amarillentas en la parte superior, luego paralelamente el patógeno empieza a producir conidios en el envés precisamente en las zonas antes mencionadas, como resultado de esta esporulación las hojas se tornan de color verde olivo, a medida que avanza la enfermedad las hojas se tuercen y caen al suelo en forma prematura, registrándose como consecuencia la defoliación precoz, al final los síntomas advierten la defoliación hacia la parte superior de la planta y una marcada marchitez de la misma.

Mecanismos de virulencia *C. fulvum*.

En la interacción *C. fulva*-tomate existe la relación gen a gen, cada producto genético de avirulencia de patógenos (Avr), se reconoce por una proteína receptora codificada por el gen de resistencia dominante (Cf) del huésped. Los genes Avr tienen un rol clave en el patógeno porque son factores de virulencia que definen dos tipos de situaciones en el tomate. A estos genes se conocen como genes de avirulencia cuando las plantas de este vegetal interactúan con otras que contienen genes de R que codifican proteínas que reconocen a estos efectores. Por otra parte, las proteínas codificadas por los genes de virulencia actúan como factores de virulencia cuando el aislado carece de genes de resistencia, así lo manifiesta (**De Wit et al., 2002**).

Las plantas de tomate que contienen en sus genomas genes de resistencia que codifican receptores Cf, reconocen las proteínas efectoras específicas y desencadenan una respuesta de resistencia llamada interacción incompatible, las cuales pueden estar o no asociadas a una respuesta hipersensible (HR), así como a la acumulación de calosa, el aumento en la síntesis de fitoalexinas, como a la expresión de las proteínas relacionadas con la patogénesis (en este sentido ambas respuestas de la planta resultan

en el control de patógenos biotróficos y hemibiotróficos como *F. fulva* (**Bensch et al., 2010**).

1.3.3. Aislamiento en medios de cultivo

Bernal et al., 2006 señalaron que los mejores porcentajes de crecimiento micelial y esporulación se obtuvieron mediante la utilización de medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) en temperaturas que oscilan entre un rango de 20 y 25°C permitiendo diferenciar de esa manera los aislamientos en cuanto a su crecimiento, sin embargo, para la identificación de los aislados que están relacionados a la esporulación obtuvieron mejores resultados a una temperatura de 25 y 30°C.

Para el crecimiento y desarrollo del micelio en cajas Petri, se puede utilizar diferentes medios de cultivo los mismos que deben proporcionar al hongo los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo, por lo general se puede utilizar medios de cultivo sólidos con agar como agente gelificante para conferir consistencia al medio. Los diferentes tipos de hongos necesitan un medio de cultivo distinto ya que cada uno tiene diferentes requerimientos nutricionales (**Romero et al., 2020**).

Para obtener aislados del moho de la hoja de tomate seguiremos los siguientes pasos: tomar fragmentos de 1cm² con presencia de signos y síntomas del hongo en condiciones de invernadero, bajo cabina de flujo laminar hacer impresión de hojas en medio de cultivo PDA con Sulfato de estreptomicina para evitar crecimiento bacteriano, incubar durante 10 días a 20°C y oscuridad constante, seleccionar colonias puras aisladas y transferirlas a Cajas de Petri que contengan medio de cultivo PDA, incubar a 20°C durante 10 días.

A partir de las colonias se toma una pequeña porción de micelio con conidios, se suspende en un tubo de ensayo estéril que contenga 9 ml de agua desionizada estéril, se agita vigorosamente durante 30 segundos, se deja reposar 5 minutos. Se vierte el contenido del tubo en una caja de Petri que contenga el medio de cultivo PDA, se decanta el líquido y se sellan las cajas de Petri y se colocan en posición vertical en incubadora durante toda la noche a una temperatura de 20°C y oscuridad.

Al otro día se toman las cajas de Petri y bajo un microscopio clínico y con la ayuda de una aguja se atrapan conidios individuales germinados y se transfieren a nuevas cajas de Petri que contengan el medio de cultivo PDA. Se incuban durante 10 días a 20°C y oscuridad constante y a partir de esa fecha se registran los aislados en la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Microbiología de la Facultad Ciencias Agropecuarias.

1.3.4. Caracterización cultural

Los aislados de *C. fulvum* presentan características los mismos que fueron descritas sobre caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos. Las colonias alcanzan un diámetro entre 60-72 mm después de 14 días, presenta un color verde oliváceo, gris o gris oliváceo en el anverso y en el reverso un color negro u oscuro uniforme, textura afelpada, bordes enteros, lobulados, ondulado o rizoidal y diferentes colores en la pigmentación como oscuro y claro, también hubo la presencia de líquido de transpiración (Bernal *et al.*, 2020).

Presenta diferentes tipos de elevación como plana, elevada o umbilicada, en este tipo de colonias se puede observar la presencia del líquido de transpiración, presentan un crecimiento lento alcanzando un diámetro de 10 mm en el transcurso de dos a tres semanas. La velocidad de crecimiento micelial, se obtuvo en el medio de cultivo papa-dextrosa –agar (PDA), en el transcurso de 7 y 14 días hidratándolo durante 24 h hasta alcanzar un contenido de humedad entre 65 y 75%, posteriormente los materiales se esterilizaron por 1 h a 121 °C y 15 lb de presión, se puede decir que el crecimiento micelial de *C. fulvum* que se puede alcanzar un promedio de 6.59 mm por día (Sánchez *et al.*, 2008).

1.3.5. Identificación morfológica

En el tejido vegetal se lo hace considerando los signos que producen o a la vez mediante el microcultivo *in vitro*. Para SENASICA (2019), señaló que se puede observar en el microscopio a micelios, conidióforos libres y conidios provenientes de semillas, hojas, ramas, tallos o frutos con síntomas de la enfermedad, para lo cual hay que preparar fragmentos de 0,2 mm de grosor, seguidamente realizar montajes

temporales o permanentes, luego se hace la medición respectiva de cada una de las estructura del hongo, como el ancho y el largo, luego se compara estas dimensiones y se establece el género y especie en relación con las características morfométricas.

La característica principal es poseer un cuerpo vegetativo microscópico, sin diferencia en tejidos y/u órganos, conocido como talo, presenta formas unicelulares y/o filamentosas, conocidas como hifas. En este sentido, **Medina (2011)** afirmó que las hifas son septadas hialinas a olivo pálido con un tamaño 2,2-2,5 μm de ancho. Generalmente crecen en forma polarizada, con un alargamiento del ápice que posteriormente se ramifica, tomando el nombre de micelio. Cuando se desarrollan los micelios, se forman los pseudotejidos, que a la vez dan origen a las estructuras somáticas macroscópicas y/o portadoras de esporas.

Cedeño y Carrero (2018), considera que los conidióforos tienen un tamaño de 200 micras de largo, a pesar de que hay registros de tamaños de 100 micras o menos de largo, que presentaban o no ramificaciones rectas o flexuosos, el color marrón pálido o marrón oliváceo, generalmente presentan abultamientos unilaterales dando lugar a ramas laterales cortas. Asimismo, la forma de los conidios es muy variables pueden ser subglobosas, ovoides, elipsoide, fusiforme, limoniforme a subcilíndrico o cilíndrico, presentan características por tener una base truncada o ligeramente convexa, sin abultamiento, sin cúpula o borde elevado de color verde pálido, o marrón oliváceo. Su tamaño varía de acuerdo a sus dimensiones se puede encontrar desde 20, 1 – 23, 2 x 4, 6 – 5, 1 μm .

Para identificar molecularmente a *C. fulvum*, se debe seguir una serie de pasos muy importantes como aislamiento, manipulación y análisis empezando por la extracción del ADN, lo cual debe ser de un hongo que contenga una cepa pura e integra, para luego debe seguir un protocolo el mismo que si obtiene buenos resultados ayudaría al desarrollo de sistemas de diagnósticos y control de la misma enfermedad (**Medina, 2020**).

1.4.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1. HIPÓTESIS

H₀: Mediante la obtención de aislados monospóricos de *C. fulvum* en la provincia Tungurahua no se podría describir sus características culturales, morfológicas ni identificar los aislados del moho gris del tomate procedente de diferentes localidades.

H₁: Mediante la obtención de aislados monospóricos de *C. fulvum* en la provincia Tungurahua se podría describir sus características culturales, morfológicas ni identificar los aislados del moho gris del tomate procedente de diferentes localidades.

1.4.2. OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener aislados monospóricos a partir de hojas de tomate con signos del moho gris y caracterizarlos cultural y morfológicamente.

Objetivos específicos

1. Obtener los aislados monospóricos de *C. fulvum* a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.
2. Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).
3. Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de *C. fulvum* mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La investigación se realizó en la provincia de Tungurahua, en los ocho cantones y posteriormente se trasladarán al laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en la Facultad Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato para su aislamiento.

2.2. Características del lugar

Para la confección de una colección de cultivo del agente causal del moho gris de la hoja del tomate se tomará muestras de distintos invernaderos ubicados en los diferentes cantones de la provincia de Tungurahua mediante el método de muestreo bandera inglesa. En cada invernadero se seleccionaron 5 sitios de muestreos donde se tomaron al menos 3 fragmentos de folíolos con los signos típicos de la enfermedad. En las características de los lugares de muestreo se tomará la altura aproximada de cada sitio como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Altura a la que se encuentran ubicados los sitios de muestreos pertenecientes a los cantones de la provincia de Tungurahua.

Cantón	Sector	Propietario	Variedad	Altitud
Mocha	Pinguili	Sr. Rogeres Palacios	Prieto	3103.75 m.s.n.m
Tisaleo	Alobamba	Sr. José Coello	Micaela y Prieto	3050.77 m.s.n.m
Cevallos	Tambo la Universidad	Universidad Técnica de Ambato	Prieto	2810.22 m.s.n.m
Ambato	Izamba	Sr. Marcelo Telenchana	Prieto	2634.23 m.s.n.m
Píllaro	Santana	Sr. Paul Culi	Prieto	2856.28 m.s.n.m

Pelileo	Pamatú	Sr. Nelson Amaguiña	Prieto	2575.39 m.s.n.m
Patate	Sucre	Sr. Willian Endara	Prieto	2398.27 m.s.n.m
Baños	Runtun	Sr. Mario Barriga	Prieto	2281.15 m.s.n.m

El laboratorio de sanidad vegetal está ubicado en el cantón Cevallos perteneciente a la provincia de Tungurahua tiene una altitud de 2850 m.s.n.m. las coordenadas geográficas son: 01° 24' 27" de latitud Sur y 78° 35' 00" de longitud al Oeste.

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Material experimental

Aislados monospóricos de *C. fulvum* procedentes de distintos invernaderos ubicados en ocho cantones de la provincia de Tungurahua.

2.3.2. Equipos

- Cabina de flujo laminar.
- Agitador magnético.
- Microscopio clínico.
- Incubadora.
- Autoclave
- Refrigerador.
- Cámara fotográfica.

2.3.3. Materiales

- Muestras de hojas de tomate con signos de la enfermedad del moho gris.
- Bolsas de papel Craft.
- Estiletes.
- Bisturí.
- Alcohol al 70%.
- Aguja de inoculación.
- Mechero de Bunsen.
- Tijeras.

- Pinzas.
- Gradilla.
- Atomizador.
- Cajas Petri de 90mm de diámetro.
- Tubos de ensayo.
- Medios de cultivo PDA.
- Vidrio fusible.
- Papel aluminio.
- Papel de liberación.
- Cubre objeto.
- Porta objeto.
- Agar (APG).
- Agua destilada.
- Glicerol.
- Tubos eppendorf.
- Parafilm.
- Gotero.
- Pipeta de Pasteur.

2.4. Factores de estudio

2.4.1. Objetivo 1. Obtener aislados monospóricos de *C. fulvum* a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.

- **Factor N°1.** Influencia de la localidad en la eficiencia en la obtención de obtención de aislados de *C. fulvum*.

2.4.2. Objetivo 2. Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

Factor N°1. Influencia de la procedencia de los aislados sobre el color tanto del anverso como del reverso de las colonias de *C. fulvum* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

2.4.3. Objetivo 3. Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de *C. fulvum* mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.

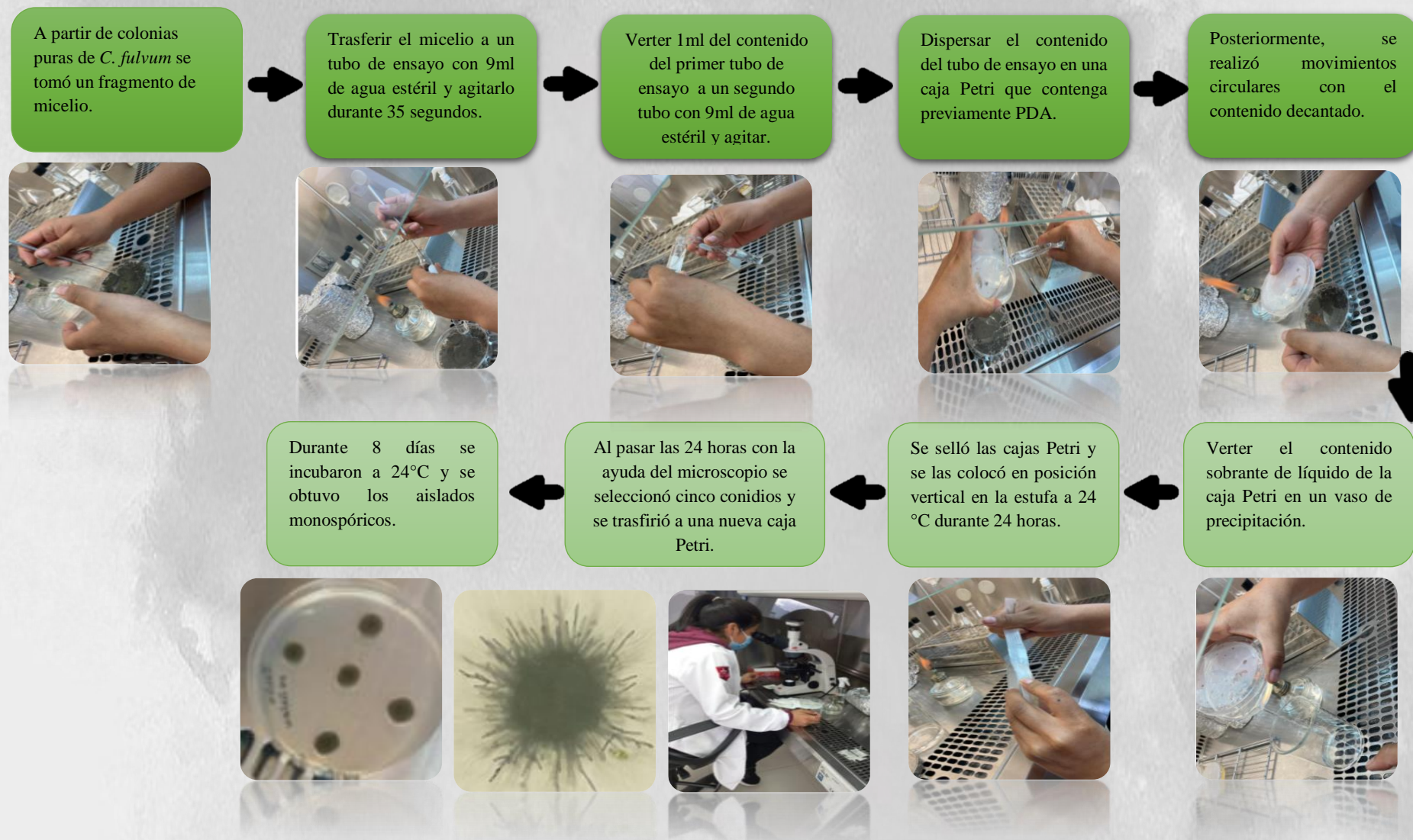
Factor 1. Influencia de la localidad en la eficiencia en las características morfológicas de los aislados de *C. fulvum*.

2.5. Diseño experimental

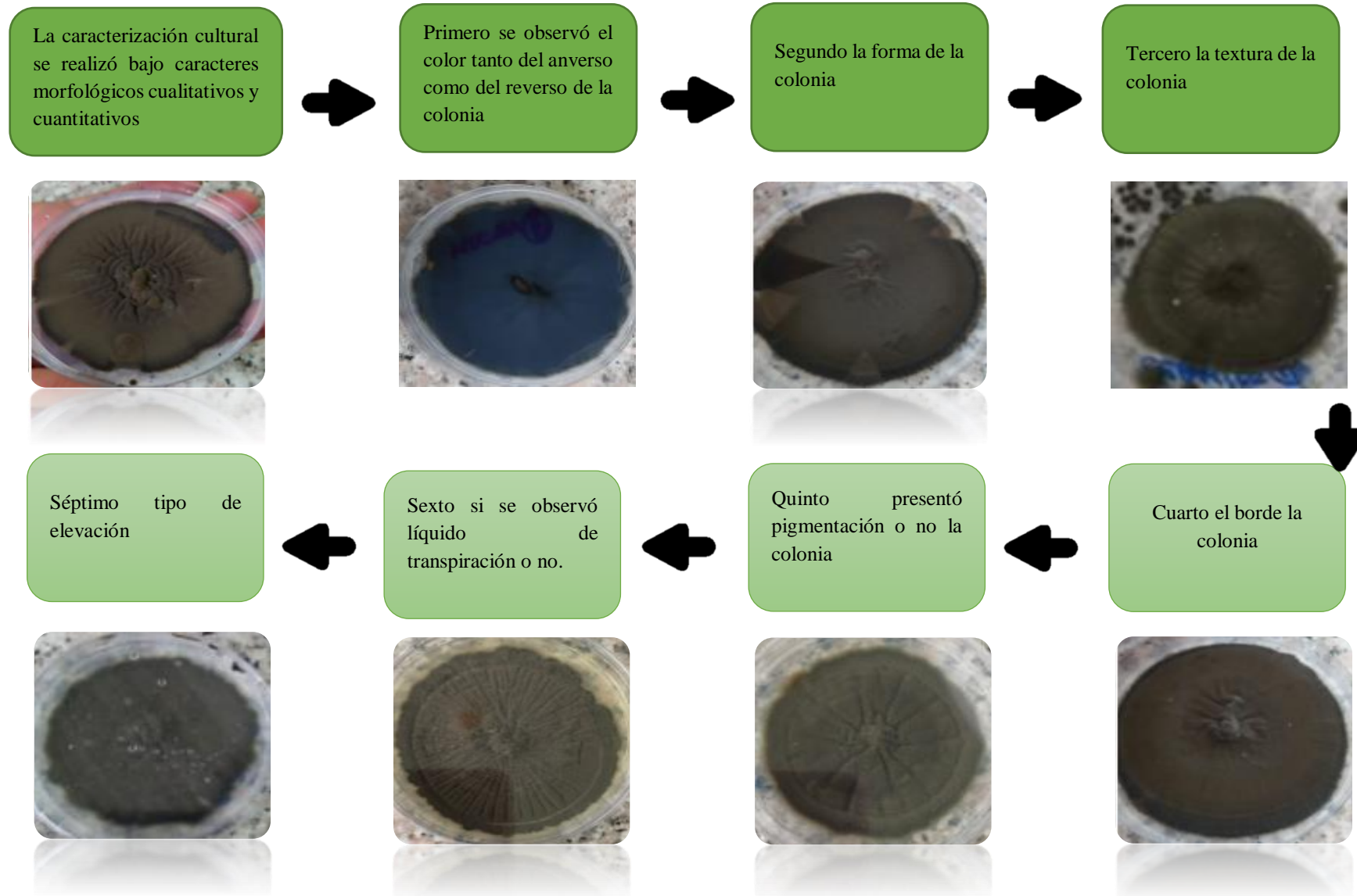
Para la caracterización cultural y morfológica, se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

2.6. Manejo del experimento

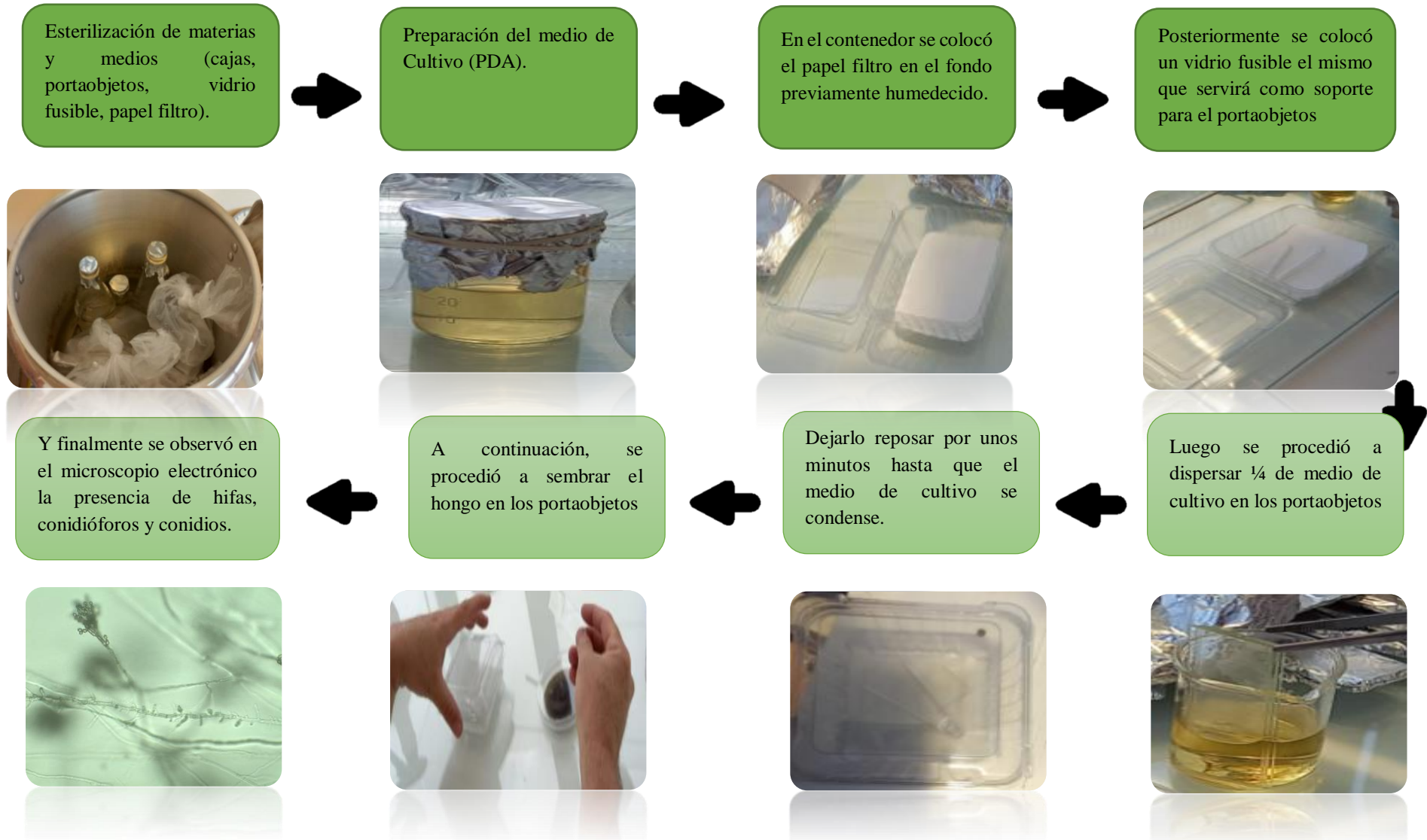
2.6.1. Objetivo 1. Obtener aislados monospóricos de *C. fulvum* a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.



2.6.2. Objetivo 2. Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).



2.6.3. Objetivo 3. Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de *C. fulvum* mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.



2.8.VARIABLES RESPUESTA

Caracterización cultural

- Color de la colonia: el color del anverso y reverso.
- Pigmentación de las colonias.
- Diámetro de las colonias.
- Textura de las colonias.
- Borde de las colonias.
- Presencia o ausencia del líquido de transpiración.
- Velocidad de crecimiento micelial (mm. día^{-1}).

Caracterización morfológica

- Medir las dimensiones de al menos 100 hifas.
- Medir las dimensiones de al menos 50 conidióforos.
- Medir las dimensiones de al menos 100 conidios.

2.9. Procesamiento de la información

La caracterización cultural y morfológica de los aislados *C. fulvum* fueron evaluados y registrados en una base de datos en Excel.


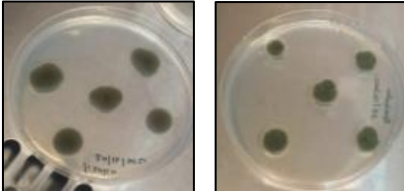
CAPÍTULO III

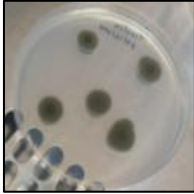
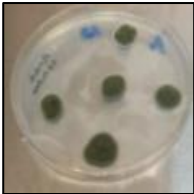
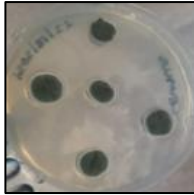
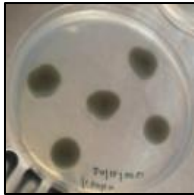
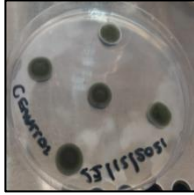
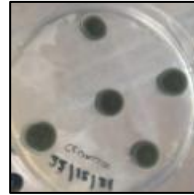
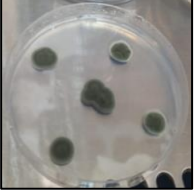
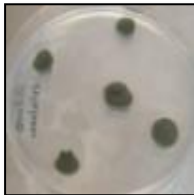
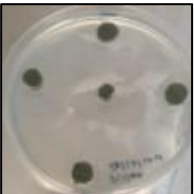
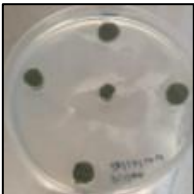
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

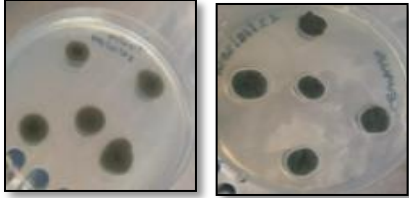
3.1. Obtención de aislados monospóricos de *C. fulvum* a partir de hojas de tomate con signos del moho gris.

Se obtuvieron 10 aislados monospóricos de cada cantón (Tisaleo, Baños, Patate, Ambato, Cevallos, Píllaro, Mocha y Pelileo) dándonos un total de 80 aislados de la provincia Tungurahua (Tabla N°5).

Tabla 5. Crecimiento de colonias de *C. fulvum* a partir de un solo conidio germinado.

Cantón	N° de Aislados	Correspondencia visual
Tisaleo	10	
Baños	10	

Patate	10		
Ambato	10		
Cevallos	10		
Píllaro	10		
Mocha	10		

Pelileo	10	
---------	----	---

Como se puede apreciar en la tabla 5, se obtuvieron 10 aislados monospóricos de cada cantón, sumando un total de 80 aislados monospóricos de *C. fulvum* de toda la provincia de Tungurahua, siendo la primera colección. Estos aislados no muestran variaciones con respecto a las observaciones realizadas por **Bernal (2007)** en su estudio, donde obtuvo aislados con colonias de color gris – gris oliváceo, textura afelpada, bordes irregulares, color del reverso negro, concluyendo que las características morfológicas de los aislados obtenidos de *C. fulvum* son homogéneas lo que no permite hacer una relación patológica del cultivo. Por su parte **Medina (2011)**, manifiesta que las características morfológicas y culturales de los aislados de *C. fulvum* son elementos fundamentales para su clasificación.

En esta investigación se obtuvo resultados similares a los obtenidos en este estudio, pero ciertos aislados son mayormente verde oliváceo y más regular en sus bordes. Estos aislados, al provenir de lugares en condiciones controladas, y tomando en cuenta que las condiciones agro meteorológicas de las diferentes localidades de la provincia son relativamente similares, al ser una provincia pequeña, además el cultivo de tomate riñón bajo invernadero es muy común en todos los cantones que fueron objetivo de este estudio; por estas razones, los aislados de *C. fulvum* resultaron bastante uniformes y no presentan complicaciones de aislamiento.

3.2. Descripción de las características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

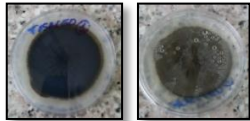
En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Tisaleo.

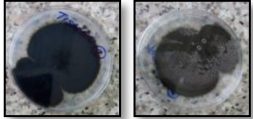

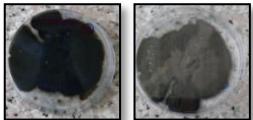
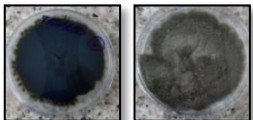
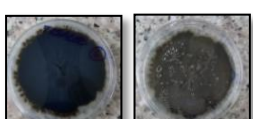
Como se observa en la Tabla N°6 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.

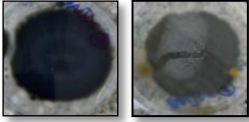
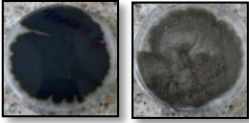
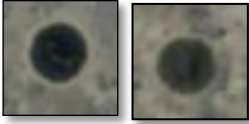
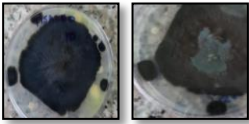
Los aislados 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9,10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que en el 5 mostró bordes regulares.

Ningún aislado pigmentó el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°6).

Tabla 6. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Tisaleo.

TISALEO									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

2	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
4	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

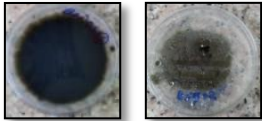
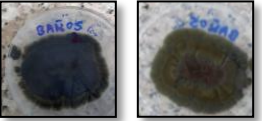

7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
9	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Circular	

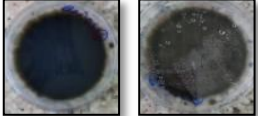
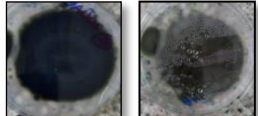
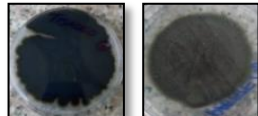
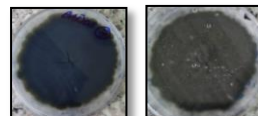
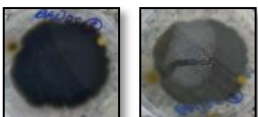
En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Baños.

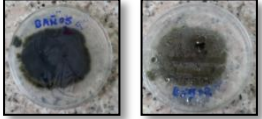
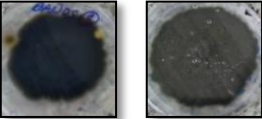
Como se observa en la Tabla N°7 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.

Los aislados 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que, en el 1, 3,4 mostraron bordes regulares. Ningún aislado pigmentó el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°7).

Tabla 7. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Baños.

Baños									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
2	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	

4	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	

9	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	

En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Patate.

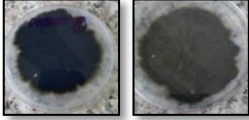
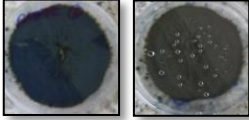
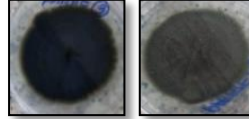
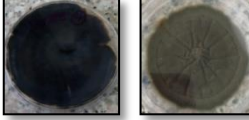
Como se observa en la Tabla N°8 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.

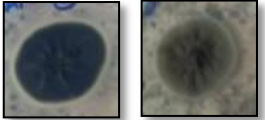
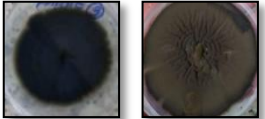
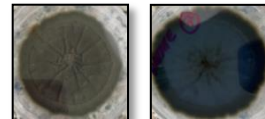

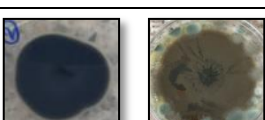
Los aislados 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias ,mientras que en el 1 mostró bordes regulares .


Ningún aislado pigmento el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°8).

Tabla 8. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Patate.

Patate

Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
2	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
4	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	

5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
9	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	

10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpado	Irregular	
----	----------------	-------	----------	----	----	-------------	----------	-----------	---


En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Ambato.

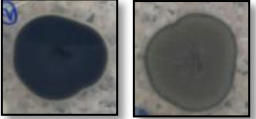
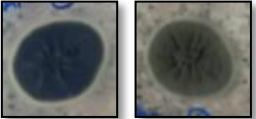
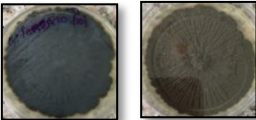
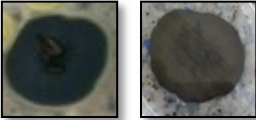
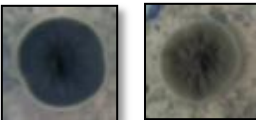
Como se observa en la Tabla N°9 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.



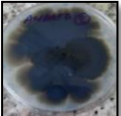
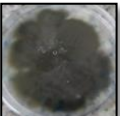



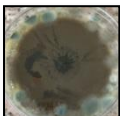
Los aislados 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que en el 9 mostró bordes regulares.

Ningún aislado pigmento el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°9).

Tabla 9. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Ambato.

Ambato									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

2	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
4	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Elevada	Afelpada	Irregular	 
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	 
9	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	 
10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	 


En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Cevallos.

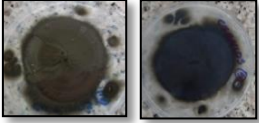
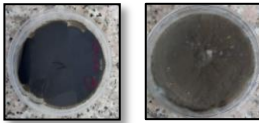
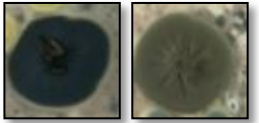
Como se observa en la Tabla N°10 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.

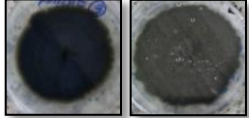
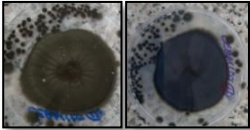
Los aislados 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9,10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que en el 3, 4 mostró bordes regulares.

Ningún aislado pigmento el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N° 10).

Tabla 10. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Cevallos.

Cevallos									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
2	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

4	Verde Oliváceo	Negro	Entero	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

9	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

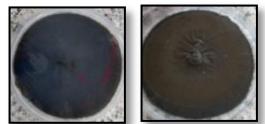
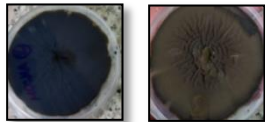
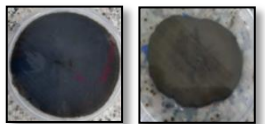
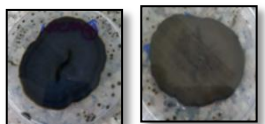
En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Mocha


Como se observa en la Tabla N°11 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.

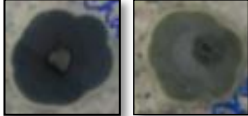
Los aislados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que, en el 8, 9 mostró bordes regulares.

Ningún aislado pigmento el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°11).

Tabla 11. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Mocha.

Mocha									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
2	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
4	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
9	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
----	----------------	-------	----------	----	----	-------------	----------	-----------	---

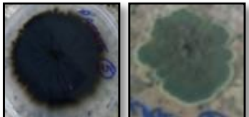
En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Píllaro.

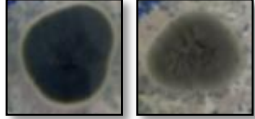
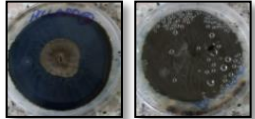
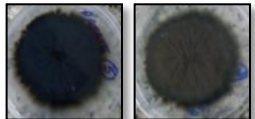
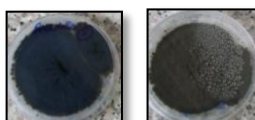
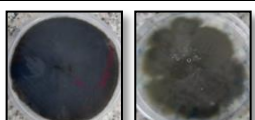
Como se observa en la Tabla N°12 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.

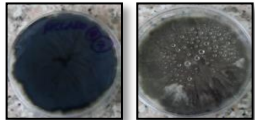
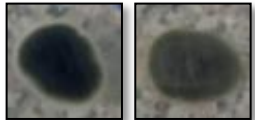
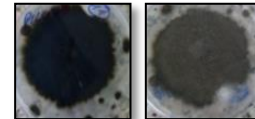
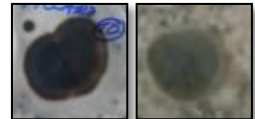
Los aislados 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que, en el 1, 2, 3 mostró bordes regulares.

Ningún aislado pigmento el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°12)

Tabla 12. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro.

Píllaro									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	L. Transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

2	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
4	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
5	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
9	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

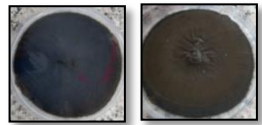
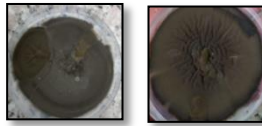
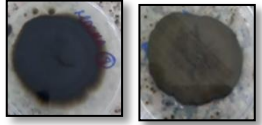
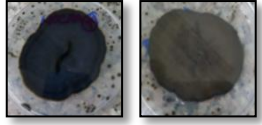
En la presente investigación se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Pelileo

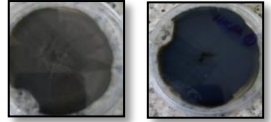

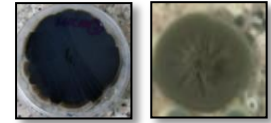
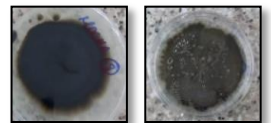
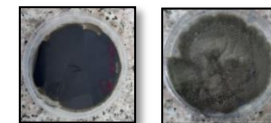
Como se observa en la Tabla N°13 todos los aislados de *C. fulvum* mostraron un color verde oliváceo en el anverso, mientras que en reverso se observó un color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular.



Los aislados 1, 3, 4, 6, 7,8, 9, 10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que en el 2, 5 mostró bordes regulares.

Ningún aislado pigmento el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración (Tabla N°13).

Tabla 13. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* del cantón Pelileo

Pelileo									
Aislado	Color Anverso	Color Reverso	Borde	Pigmentación	Líquido de transpiración	Elevación	Textura	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
2	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
3	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
4	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

5	Verde Oliváceo	Negro	Regular	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
6	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
7	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
8	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	
9	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	

10	Verde Oliváceo	Negro	Lobulado	No	No	Superficial	Afelpada	Irregular	 
----	----------------	-------	----------	----	----	-------------	----------	-----------	---

Dentro de las características descritas para las colonias de aislados monospóricos de *C. fulvum* son: Color anverso, color reverso, borde, pigmentación, líquidos de traspiración, elevación, textura y forma. Como se pudo apreciar en los resultados obtenidos, estos caracteres muestran alta uniformidad, por vez primera en el Ecuador se obtienen aislados monospóricos de *C. fulvum*. **Lucentini C. (2018)** manifestó que existe un nivel considerable de diversidad en la población de *C. fulvum*, resultante de cambios a nivel genético que se da lugar en el genoma. En su investigación, **Bernal (2007)**, indica que las características culturales de *C. fulvum* son homogéneas, coincidiendo con nuestro estudio. Por otro lado, **Medina (2011)** considera que mucho tiene que ver el medio de cultivo utilizado para la obtención de colonias homogéneas, lo que es muy común con DPA.

En nuestro caso se puede mencionar que el cultivo de tomate bajo cubierta es muy común en la provincia de Tungurahua, y que la cepa de *C. fulvum*, está diseminada ampliamente por toda la provincia. Las condiciones bajo invernadero, estandarizan los factores climáticos como son, temperatura y humedad, lo que viene a neutralizar cualquier influencia que pueda tener la localidad y la altitud con respecto a las características de las colonias obtenidas. Se recomienda llevar a cabo estudios más profundos que conlleven técnicas de manejo genético, lo que permitirá la identificación mas profunda de cada colonia obtenida.

Tabla 14. Crecimiento micelial de los aislados m6onosporicos de *C. fulvum* .

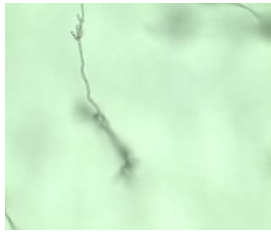
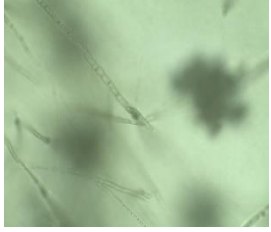


Crecimiento micelial			
Dias evaluados	Velocidad Minima	Velocidad Maxima	Media
7 d6as	0.50 mm.d6a ⁻¹	1,29 mm.d6a ⁻¹	0.93 mm.d6a ⁻¹
14 d6as	0,95 mm.d6a ⁻¹	1.46 mm.d6a ⁻¹	1,23 mm.d6a ⁻¹







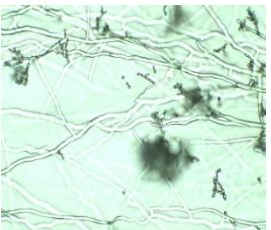

La velocidad de crecimiento micelial a los 7 d6as de los aislados de *C. fulvum* alcanzaron valores que estuvieron en el rango entre 0,50 mm.d6a⁻¹ a 1,29 mm.d6a⁻¹, siendo la velocidad promedio de 0,93 mm.d6a⁻¹. Por otra parte a los 14 d6as la velocidad del crecimiento de los aislados de *C. fulvum* alcanzaron valores que estuvieron en el rango entre 0,95 mm.d6a⁻¹ a 1,46 mm.d6a⁻¹ siendo la velocidad promedio de 1,23 mm.d6a⁻¹.







Seg6un **Bernal et al ., 2006** en su investigacion se6ala que el crecimiento micelial de *C. fulvum* puede desarrollarse con excelencia en el medio de cultivo PDA a una temperatura de 24°C, teniendo como resultado un disco de micelio puro en las que se tomaron ciertas dimensiones de crecimiento a los 7 d6as obteniendo un resultado entre 0,65 mm.d6a⁻¹ a 1,17 mm.d6a⁻¹, en bases a los resultados obtenidos en la investigaci6n (Tabla N6 14) el crecimiento se encontr6 en un rango entre 0,50 mm.d6a⁻¹ a 1,29 mm.d6a⁻¹, los cuales fueron observados a los 7 d6as por lo que los resultados concuerdan con la investigacion mencionada anteriormente .

3.3. Caracterización morfológica de los aislados monospóricos de *C. fulvum* mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico.

Tabla 15. Caracterización morfológica de *C. fulvum* observada bajo microscopio.

Cantón	Conidios μm		Hifa	Conidióforo	Gráfico	
	Largo	Ancho				
Patate	6,01	3,34	5,88	32,6		
Píllaro	6,29	2,93	5,38	35,66		

Tisaleo	5,57	2,88	5,52	34,27		
Cevallos	4,94	2,92	5,28	32,75		
Ambato	6	2,5	5,23	29,61		
Baños	6,11	2,86	5,14	29,36		

Pelileo	6,45	3,18	5,52	36,49		
Mocha	6,68	2,45	5,33	33,35		
Promedio	6,01	2,88	5,41	33,01		

Como se puede apreciar en la Tabla N° 14 de la caracterización morfología de los aislados monospóricos, se observó que para conidios existe una variación del largo del conidio que oscila entre 2 μ m a 14 μ m, con un promedio de 6,01 μ m, mientras que el ancho se encontró entre 2 μ m a 7 μ m, con un promedio de 2,88 μ m. En el estudio realizado por **Bernal (2007)**, obtuvo conidios de tamaños variados con las siguientes medidas: 20,1 – 23,2 μ m x 4,6 – 5,81 μ m, de color verde y gris oliváceo. **Lucentini et al ., (2017)** menciona que, estos cultivos muestran una alta tasa de

crecimiento y conidios relativamente pequeños. La localidad no marca mayormente las diferencias morfológicas fúngicas estudiadas, ya que existe amplia variabilidad en todos los aislamientos obtenidos, sin marcar ninguna diferencia con respecto a una localidad o altitud en particular. Para **Medina (2011)**, el tamaño de los conidios tiene relación con su velocidad de crecimiento, indicando que mientras más lento es el crecimiento, más grande son los conidios.

Las hifas oscilaron en un rango de $2\ \mu\text{m}$ a $17\ \mu\text{m}$, alcanzando un promedio de $5.4\ \mu\text{m}$. De acuerdo con **Knapp. (2016)**, la diferente dimensionalidad de las estructuras fúngicas microscópicas como las hifas, se deben principalmente a las condiciones físico químicas del medio de cultivo, APG es un medio favorable para el desarrollo de cualquier colonia fúngica, pero, mejores resultados se dan con otros medios como MEA (Agar – Extracto de Malta) o SNA (Agar – Nutritivo sintético) en lo que se refiere a desarrollo de hifas.

Por último, los conidióforos en este estudio variaron en tamaños que van desde las $9\ \mu\text{m}$ hasta las $116\ \mu\text{m}$, con un promedio de $33,01\ \mu\text{m}$. **Medina (2011)**, hace referencia a la forma de los conidióforos, encontrando conidióforos más alargados y otros más redondeados, también hace referencia al color. Con respecto al tamaño, tienen relación con los conidios y las hifas como estructuras fúngicas microscópicas.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Al término de la presente investigación se obtuvieron 80 aislados monospóricos de *C. fulvum* a partir de hojas de tomate con signos del moho gris de los 8 cantones pertenecientes a la provincia de Tungurahua.
- Las colonias de los aislados de *C. fulvum* mostraron colores verdes oliváceos en el anverso de la colonia, mientras que en reverso fueron de color negro, además presentaron una elevación superficial, textura afelpada y forma irregular. Los aislados 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9,10 tuvieron bordes lobulados en sus colonias, mientras que en el 5 mostró bordes regulares. Ningún aislado pigmentó el medio de cultivo (PDA), tampoco se observó líquido de transpiración en sus colonias. Mientras que el crecimiento micelial a los 7 días estuvo en un rango entre 0,50 mm.día⁻¹ a 1,29 mm.día⁻¹, siendo la velocidad promedio de 0,93 mm.día⁻¹ y a los 14 días la alcanzaron valores que estuvieron en el rango entre 0,95mm.día⁻¹ a 1,46 mm.día⁻¹ siendo la velocidad promedio de 1,23 mm.día⁻¹.
- El valor promedio del diámetro de las hifas de los aislados de *C. fulvum* fue de 5,41µm. Los conidióforos alcanzaron un valor promedio de 33,01 µm mientras que los conidios como promedio tuvieron 6 µm. El ancho de los conidios mostró un valor promedio de 5 µm. Todas estas características coinciden con lo informado morfológicamente para la especie *C. fulvum*.

4.2. RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización patogénica y de agresividad de los aislados monospóricos de *C. fulvum* obtenidos en ensayos de inoculación bajo invernadero.
- Utilizar cultivares diferenciales de tomate para determinar la composición de razas de *C. fulvum* en los diferentes cantones de la provincia de Tungurahua.
- Utilizar herramientas moleculares para identificar la presencia de los genes Avr estándares internacionales en los aislados monospóricos de *C. fulvum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, E.2018.Cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y FORESTAL. Consultado el 22 Septiembre 2021. http://centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Centa_Tomate%202019.pdf.
- Allende, M;Salinas, L y Torres, A. 2017. Manual de cultivo del tomate bajo invernadero. Santiago, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).Consultado el 23 de septiembre del 2021.http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/29478/INIA_Libro_0048.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Bensch ,K;Groenewald, JZ; Dijksterhuis ,J;Starink,M;Andersen ,B;Summerell,BA; Shin ,HD; Dugan, FM; Schroers, HJ;Braun ,U y Crous PW. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Stud Mycol.* 2010; 67:1-94. doi: 10.3114/sim.2010.67.01. PMID: 20877444; PMCID: PMC2945380.Consultado el 25 de septiembre del 2021.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20877444/>.
- Bernal, A. (2007). *Caracterización de aislados de Passalora fulva (Cooke) U. Braun & Crous provenientes de tomate (Solanum lycopersicum L.) en condiciones de cultivo protegido*. Las Villas: Universidad Central Martha Abreu.Consultado 20 de ene. de 22.Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/262653139_CHARACTERIZACION_DE_AISLADOS_DE_Passalora_fulva_BRAUN_CROUS_SIN_Cladosporium_fulvum_COOKE_PROVENIENTES_DE_TOMATE_Lycopersicon_esculentum_MILL_EN_CONDICIONES_DE_CULTIVO_PROTEGIDO.
- Bernal, R.2010. Enfermedades de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) en Invernadero en las Zonas de Salto y Bella Unión . Montevideo, Uruguay: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA.Consultado 4 de octubre de 2021.<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429230710110412.pdf>.

- Bernal, A ;Herrera , L ; Martinez , B ; Peteira , B ; Mora, M y Lazo,Y.2020. El patosistema *Solanum lycopersicum* - *Cladosporium fulvum* en las condiciones de cultivo protegido tropical en Cuba. Centro Agrícola, 47(Supl. 1), 88-94. Consultado 11 de octubre de 2021. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S02535785202000500088&lng=es&tlng=es.
- Bernal, A; Martínez, B; Díaz, Herrera, L; Alonso, Y. 2006. EFECTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE *CLADOSPORIUM FULVUM* COOKE (SIN. *PASSALORA FULVA*). Fitosanidad, 10(1),25-28. Consulta 4 de Octubre de 2021. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116158004>
- Cedeño , L y Carrero, C. (2018). El “Moho foliar” del tomate en los llanitos de Tabay, Estado Mérida.Consultado 4 de octubre de 2021.Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/329973337_EL_MOHO_FOLIAR_DEL_TOMATE_EN_LOS_LLANITOS_DE_TABAY.
- De Cara, M; Santos, M; Palmero, D y Marín, F. 2008. Efecto fungicida del sulfato de cobre y del extracto de canela frente a *Passalora fulva*, agente causal de la Cladosporiosis del tomate.<https://www.researchgate.net/publication/235888989>.
- De Wit, P. Brandwagt, B, Van den Burg, H, Cai, X, Van der Hoorn, R. A. L., De Jong, C. F., ... & Joosten, M. 2002. The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 409-412.Consultado el 27 de septiembre 2021. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020553120889>
- Domínguez, D.; Vázquez, H.; Reyes, B; Arzaluz, I.; Martínez, A.2013. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO ECTOMICORRÍZICO *Helvella lacunosa* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales. Consultado el 27 de septiembre 2021. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93927469006.pdf>
- Fernández, F. 2019. *Cladosporium* spp., antagonico a *Cercospora coffeicola* Berk. & Cke., *Drechslera turcica* Pass. y *Phragmidium mucronatum* (Per.) Schlecht. Univeridad Nacional de Cajamarca.Pp.73.<https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/3779/T>

ESIS“Cladosporium spp. %2 Cantagónica Cercospora coffeicola Berk. %26 Cke %2 Drechsleri turcica Pass..pdf sequence=1&isAllowed=y.

González, D. 2013. Modo de acción de extractos de hojas de Citrus spp. frente a *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous 2003 y *Alternaria solani* Sor., hongos fitopatógenos de *Lycopersicon esculentum* Mill. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Pp.79. <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/1819/A0005.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Griffiths, S; Cox, R; Overdijk, E; Mesarich, C; Saccomanno, B; Lazarus, C y Collemare, J. 2018. Assignment of a dubious gene cluster to melanin biosynthesis in the tomato fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. PLoS One, 13(12), e0209600. Consultado el 26 de septiembre del 2021. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0209600>.

Guamán, A. 2019. Evaluación bajo invernadero de fuentes de fertilización química y orgánica en tomate riñón (*Solanum lycopersicum* Mill.), en Salcedo. (en línea). Quito. Universidad Central del Ecuador. Trabajo de titulación presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniera Agrónoma. Quito. Pp.98. Consultado 22 de Septiembre 2021. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18720/1/T-UCE-0004-CAG-092.pdf>.

Guevara, T; Estrella, N. 2008. DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicon esculentum*), CULTIVADO BAJO INVERNADERO EN DOCE ÁREAS DE LA CORDILLERA CENTRAL DEL ECUADOR. ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO. CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A. Consultado 22 Septiembre 2021. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2556/1/T-ESPEIASA%20I003808.pdf>

Herrera, J. 2014. EFECTO DE LA INTERACCIÓN DE LAS ENDOMICORRIZAS Y ABONOS ORGÁNICOS EN LA PRODUCCIÓN DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) BAJO CONDICIONES DE CAMPO EN LA PROVINCIA MARISCAL NIETO DE MOQUEGUA. 2014. (en línea)

- Universidad Católica de Santa María. Programa Profesional de Ingeniería Agronómica. Arequipa –Perú ,155pp .Consultado 22 de Septiembre 2021.<http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3040/4I.0252.AG.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Jaramillo, J. 2015. Evaluación agronómica del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo tres diferentes coberturas plásticas.(en línea).Universidad San Francisco de Quito. (en línea). Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Agroempresas.Quito-Ecuador.Pp.75. Consultado 22 de Septiembre 2021.<https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5339/1/122917.pdf>
- Knapp, S y Peralta, I. 2016. The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. In The tomato genome (pp. 7-21). Springer, Berlin, Heidelberg. Consultado el 13 de septiembre del 2021.https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-662-53389-5_2.
- López, L .2016. Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). (en línea). Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. San José, C.R. Pp.1-130.Consultado 22 Septiembre 2021.<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Lucentini, G. 2020. Los Polimorfismos en los Avr de *Passalora fulva* afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis del tomate con la resistencia sistémica inducida y adquirida.(en línea).Universidad de la plata. Tesis Doctoral. Buenos Aires.Pp.207.Consultado 22 de Septiembre 2021.http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/116403/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Lucentini, C; Medina, R; Troncozo, M; López, S; Franco, M; Rollán, M. C y Balatti, P. 2017. Diversidad y razas de *Cladosporium fulvum*, el agente causal del moho de la hoja del tomate. In IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico-CONCYT 2017.Consultado el 13 de septiembre del 2021.https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/6708/11746_6708.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Martínez, F; Cervantes, L; Aíl, C; Hernández, L;Sánchez, C y Rueda, E. 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. European

- Medina, R. 2011. Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Cladosporium*. Buenos Aires, Argentina.(en línea).Universidad de la Plata.Buenos Aires.Pp.84.http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/67014/Documento_completo_.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Peteira,B; Bernal,A; Martínez,B y Miranda, I. 2011. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Cladosporium fulvum* Cooke PROVENIENTES DE TOMATE EN CONDICIONES DE CULTIVO PROTEGIDO. Protección Vegetal , 26, 5-6.<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v26n1/rpv02111.pdf>.
- Pérez, J; Hurtado,G; Aparicio,V; Argueta,Q ; Larín,M.2003.Guia Técnica del Cultivo de Tomate. Consultado el 29 de septiembre 2021.<http://www.centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Tomate.pdf>
- Ramírez, Y. 2013. Actividad antifúngica *in vivo* de extractos de *Citrus reticulata* Blanco y *Citrus aurantiifolia* (Christm.)Swingle frente a *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous . Santa Clara.(en línea). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.Santa Clara.Pp.79.https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/1817/A0_019.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Ramos, K. 2019. Daño a la membrana y respiración celular de *Passalora fulva* por extractos de hojas de *Citrus aurantiifolia*. Biotecnología Vegetal Vol. 19. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. MES, 98-102.<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/617/html>.
- Ruíz, C; Reyes, J;Hernández, L;Murillo, B y Rueda, E. 2018. Control of phytopathogenic microorganisms of post-harvest in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with the use of citrus extract. Journal of Plant Science and Phytopathology, 37-38.<https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001018>.
- Romero, D; Yáñez, G; Simbaña, K; Vélez, P y Navarrete, H. 2020. Determination of cadmium and lead in tomato (*Solanum lycopersicum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) consumed in Quito, Ecuador.(en línea). Toxicology Reports, 7, 893-899. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.008>

- Sánchez, A; Esqueda, M; Gaitám-Hernández, R; Córdova, A; Coronado, M. 2008. Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. Revista mexicana de micología. 3.p. <https://www.redalyc.org/pdf/883/88319381003.pdf>
- Santamaría, K. 2018. PRODUCCIÓN DE TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicon esculentum* Mill.) UTILIZANDO PLÁNTULAS INJERTAS EN PALO BOBO (*Nicotiana glauca* Graham.) COMO INDUCTOR DE RESISTENCIA A NEMÁTODOS. (en línea). Universidad Técnica de Ambato. DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO.Cevallos-Ecuador.Pp.57. Consultado 10 Octubre 2021.<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29141/1/Tesis-220%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20618.pdf>.
- SENASICA. 2019. Protocolo de Diagnóstico: *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous, 2003 (Moho de la hoja del tomate). Tecámac, Estado de México: SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.Pp.25.Consultado 4 de octubre de 2021..<http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/AreaDiagnostico/DocumentosReferencia/Documentos/ProtocolosFichas/Protocolos/HongosFitopatogenos/PD%20P.%20fulva%20Pub%20V.%201.pdf>.
- SYNGENTA.2018. Manual Técnico enTomate y Pimiento. Consultado 4 de octubre de 2021. Disponible en :https://www.syngenta.com.ar/sites/g/files/zhg331/f/manual_tecnico_miravis_top_en_tomate_y_pimiento2.pdf
- Torres, E.;Iannacone, J y Gomez, H. 2008. BIOCONTROL DEL MOHO FOLIAR DEL TOMATE *CLADOSPORIUM FULVUM* EMPLEANDO CUATRO HONGOS ANTAGONISTAS . Scielo , (1), 169-178.<https://www.scielo.br/j/brag/a/xZpcGk4tDBp7QFvpZqq9Mtv/?format=pdf&lang=es>.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de hojas que presenten signos y síntomas de *C.fulvum* .



Recolección de muestras con signos y síntomas de *C.fulvum* para la obtención de aislados.



Obtención de hojas con *C. fulvum*.

Anexo 2. Obtención de aislados de *C. fulvum*.



Esterilización de materiales y medios de cultivo.



Dispersar el medio en cajas Petri, y dejarle reposar por 1 hora hasta que se solidifique.



Posteriormente hacer impresión de hojas con signos de la enfermedad en medio de cultivo PDA.



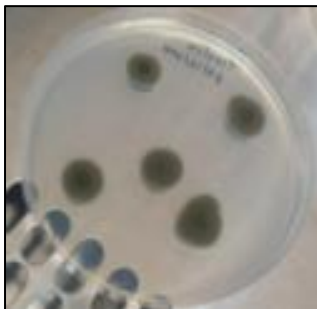
Incubar durante 10 días a 20°C y oscuridad constante.

Anexo 3. Colección de aislados monospóricos.



Obtención de aislados monospóricos.

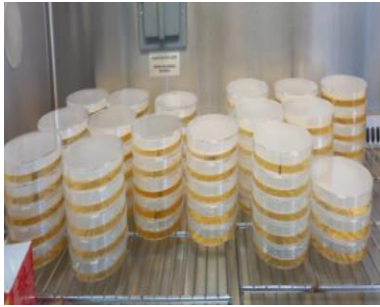
Anexo 4. Instalación de ensayo para el crecimiento micelial.



Aislados monospóricos



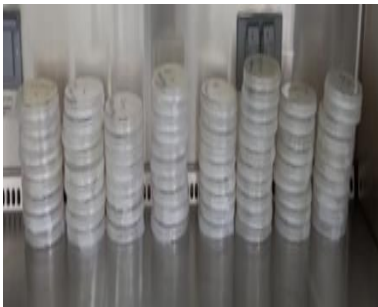
Realizar divisiones en las cajas Petri



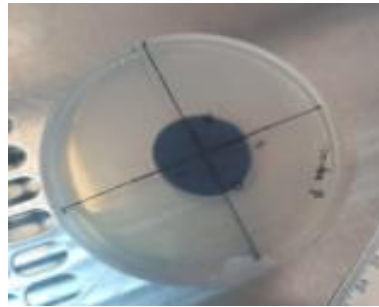
Colocar 2ml de PDA en
cada una de las cajas Petri.



En el centro de la caja Petri
colocar un disco de 10 mm
del micelio



Incubarlos a 24°C durante 8
días



Obtención del crecimiento
micelial.