



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN NUTRICIÓN
VEGETAL.

TEMA: “Aislamiento, caracterización cultural, morfológica, patogénica
e identificación de genes AVR en *Cladosporium fulvum* Cooke.”

Trabajo de investigación, previo a la obtención del Grado Académico de
Magister en Agronomía Mención Nutrición Vegetal

AUTOR: Ingeniero Aldo Martin Sánchez Ortiz

DIRECTOR: Doctor Michel Leiva Mora

AMBATO – ECUADOR

2023

A la Unidad Académica de Titulación de la Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias. El Tribunal receptor del Trabajo de Investigación, presidido por el PhD. Carlos Vasquez, Mg. Jorge Dobronski designados por la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Titulación con el tema: “Aislamiento, caracterización cultural morfológica, patogénica e identificación de genes AVR en *Cladosporium fulvum* Cooke.”, aprobado por la Unidad Académica de Titulación, elaborado y presentado por el señor Ingeniero Aldo Martin Sánchez Ortiz, para optar por el Grado Académico de Magister en Agronomía Mención Nutrición Vegetal; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Investigación, el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.

.....

Presidente tribunal

.....

Evaluador principal

PhD. Carlos Vásquez

.....

Evaluador principal

Mg. Jorge Dobronski

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el trabajo de investigación, presentado con el tema: “Aislamiento, caracterización cultural morfológica, patogénica e identificación de genes AVR en *Cladosporium fulvum* Cooke.”, le corresponde exclusivamente a: Ingeniero Aldo Martin Sánchez Ortiz, Autor bajo la Dirección del Doctor Michel Leiva Mora. Director del Trabajo de Investigación, y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



.....
Ing. Aldo Martin Sánchez Ortiz
C.C. 1804358230

AUTOR

.....
Ing. Michel Leiva Mora PhD

C.C 1759139627

DIRECTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Investigación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad.



.....
Ing. Aldo Martin Sánchez Ortiz

C.C. 1804358230

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres Patricio y Olga, por ser mi apoyo,
porque sin ustedes este trabajo no hubiera sido
posible.

A mi querido hermano Alexis porque a pesar de
todo fue un apoyo en las peores circunstancias
por ser mi inspiración para lograr este objetivo
gracias por estar siempre presente,
acompañándome.

A Wendy por apoyarme con su cariño amor y
confianza a lo largo de mi instrucción
profesional.

A todas aquellas personas que con sus consejos
supieron guiarme dándome aliento para seguir
adelante y crecer en la vida como un profesional en toda la palabra.

AGRADECIMIENTO

En el presente trabajo quiero agradecer a mis padres por su apoyo, económico.

A la Universidad Técnica de Ambato que me ha dado la oportunidad de formarme académicamente.

También quiero expresar mi fraterno agradecimiento a mi Tutor PhD. Michel Leiva Mora por su contribución a lo largo de mi carrera, por su apoyo y las facilidades para poder culminar mi proyecto de investigación.

Aldo Martin Sánchez Ortiz

ÍNDICE

<i>CAPÍTULO I</i>	4
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	4
1.1. Introducción	4
1.2. Objetivos de la investigación	6
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos	6
<i>CAPÍTULO II</i>	7
2.1. Antecedentes investigativos	7
2.2. Categorías fundamentales o marco conceptual	8
2.2.1. Cultivo de Tomate (<i>S. lycopersicum</i>).....	9
Historia e importancia	9
Clasificación taxonómica del tomate	9
Descripción botánica del tomate	10
Condiciones agroecológicas del cultivo.....	10
Etapas fenológicas.....	11
Plagas y Enfermedades	11
2.2.2. El moho de la hoja de tomate (<i>C. fulvum</i>).....	14
Importancia	14
Sintomatología	15
Ciclo infectivo.....	15
.....	15
<i>Taxonomía</i>	16
<i>Aislamiento en medios de cultivo PDA</i>	16
<i>Caracterización cultural del cultivo</i>	17
Identificación morfológica	17
Técnicas moleculares	18
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	18
Cebadores específicos de <i>C. fulvum</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>CAPÍTULO III</i>	19
MARCO METODOLÓGICO	19

3.1. Descripción del sitio de investigación	19
3.1.1. Ubicación política	19
3.1.2. Ubicación Geográfica	19
3.2. Materiales y Equipos.....	19
3.2.1. Equipos.....	19
3.2.2. Materiales	20
3.3. Tipo de investigación.....	20
3.4. Metodología	21
3.5. Variables Respuestas.....	25
3.6. Procesamiento de la información y análisis estadístico	25
CAPÍTULO IV.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. Caracterización cultural de los aislados de <i>C. fulvum</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).....	26
4.2. Caracterización morfológica de los aislado de <i>C. fulvum</i> mediante microcultivos en la provincia de Tungurahua.....	38
4.3. Caracterización patogénica: grados de afectación acorde a la escala de evaluación desde 0-1- 2- 3- 4- 5	41
4.4. Presencia o ausencia de AVRS en la provincia de Tungurahua	48
CAPÍTULO V.....	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1. CONCLUSIONES	56
5.2. RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	61
.....	61
.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del tomate.....	10;Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Etapas fenológicas del tomate.	11
Tabla 3. Plagas	12
Tabla 4. Enfermedades	12
Tabla 5. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Ambato.....	26
Tabla 6. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Baños.....	27
Tabla 7. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Cevallos.....	29
Tabla 8. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Mocha.....	30
Tabla 9. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Patate.....	31
Tabla 10. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Pelileo.....	33
Tabla 11. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Píllaro.....	35
Tabla 12. Caracterización cultural de las colonias de aislados de <i>C. fulvum</i> en el cantón Tisaleo.....	37
Tabla 13. Caracterización morfológica de los aislados de <i>C. fulvum</i> en los cantones de la provincia de Tungurahua.....	39
Tabla 14. Escala de evaluación de la severidad de <i>C. fulvum</i> en <i>S. lycopersicum</i> en base a la magnitud de los signos observados.	41
Tabla 15. Caracterización Patogénica de <i>C. fulvum</i> en los diferentes cultivares de los cantones de la provincia de Tungurahua.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso <i>C. fulvum</i> en el cultivo de tomate	15
Figura 7. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Avr2 en gel de agarosa al 1%.....	48
Figura 8. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Avr4 en gel de agarosa al 1%.....	49
Figura 9. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Avr4e en gel de agarosa al 1%.....	50
Figura 10. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Avr9 en gel de agarosa al %.....	51
Figura 11. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Ecp1 en gel de agarosa al 1%.....	52
Figura 12. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Ecp2 en gel de agarosa al 1%.....	53
Figura 13. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Ecp4 en gel de agarosa 1%.....	54
Figura 14. Visualización de los productos amplificados en PCR de <i>C. fulvum</i> del gen Ecp5 en gel de agarosa 1%.....	55

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS/ DIRECCIÓN DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN NUTRICIÓN
VEGETAL

Tema: “Aislamiento, caracterización cultural, morfológica, patogénica e identificación de genes AVR en *Cladosporium fulvum* Cooke.”

Autor: Ing. Aldo Martin Sánchez Ortiz

Director: PhD. Michel Leiva

Fecha: 17/11/2023

RESUMEN EJECUTIVO

El moho gris causado por *Cladosporium fulvum* fue descrito por Cooke en el año 1883, el cual se desarrolla en solanáceas, específicamente en el cultivo de tomate, ocasionando daños desde sus hojas más jóvenes hasta llegar a la parte superior de la planta. En la presente investigación se tuvo como objetivo “Aislar y caracterizar cultural, morfológica y patogénicamente aislados monospóricos de *Cladosporium fulvum*” obtenidos a partir de signos de moho gris en hojas de *Solanum lycopersicum* para identificar la presencia o ausencia de genes Avr en los cantones de la provincia de Tungurahua (Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro, Tisaleo). Para el aislamiento se aplicó el método de impresión de hoja en medio de cultivo papa dextrosa (PDA) con sulfato de gentamicina, para describir las características culturales y morfológicas, se utilizó el método de microcultivo acompañado de la observación de estructuras fúngicas bajo un microscopio óptico de luz transmitida. En la caracterización patogénica se activó los aislados de *C. fulvum* el conteo de los conidios se realizó en la cámara de Neubauer de los cultivares diferenciales previamente sembrados en sustratos y el inóculo se aplicó con un aspersor manual, para la amplificación se realizó la extracción y liofilización de ADN de cada uno de los aislados previo al desarrollo de la PCR convencional con dos desnaturalizaciones a 94°C con diferentes ciclos y una hibridación a 55°C y 34 ciclos con una extensión final de 72°C. Obteniendo que en los 8 cantones de la provincia de Tungurahua mostraron todos colores verdes oliváceos en el anverso, mientras que en reverso fue de color negro, con una elevación

superficial, textura afelpada y forma irregular, bordes lobulados y en algunos aislados se presentó pigmentación y líquido de transpiración, el crecimiento micelial en las colonias se obtuvo un largo de 5,93 μm , ancho 2,8 μm , hifas 5,37 μm y conidióforos 32,97 μm valores promedios. En la caracterización patogénica se evidenció que el grado de afectación 1 representó entre 1 al 5 % de la superficie de hojas con signos de *C. fulvum*, mientras que 2 varió en 6 al 20 % en los cultivares diferenciales (Cf0-Cf2-Cf4-Cf5-Cf6), finalmente en la detección de la presencia o ausencia de genes se observó la presencia de los genes Avr2, Avr4e, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 y total ausencia de los genes Avr4, Avr9 y Ecp1. Con base en los resultados y las pruebas realizadas, se logró crear bases para la selección de genes de resistencia para la producción de híbridos de *S. lycopersicum* en la provincia de Tungurahua.

Palabras claves: avirulencia, hemibiotrófico, moho gris, *Solanum lycopersicum*

Abstract

Gray mold caused by *Cladosporium fulvum* was described by Cooke in 1883, which develops in nightshades, specifically in tomato crops, causing damage from the youngest leaves to the top of the plant. The objective of this research was to "Isolate and characterize culturally, morphologically and pathogenically monosporic isolates of *Cladosporium fulvum*" obtained from signs of gray mold on *Solanum lycopersicum* leaves to identify the presence or absence of Avr genes in the cantons of the province of Tungurahua (Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro, Tisaleo). For isolation, the leaf printing method was applied in potato dextrose (PDA) culture medium with gentamicin sulfate, to describe the cultural and morphological characteristics, the microculture method was used accompanied by the observation of fungal structures under an optical microscope. of transmitted light. In the pathogenic characterization, the isolates of *C. fulvum* were activated. The conidia were counted in the Neubauer chamber of the differential cultivars previously sown on substrates and the inoculum was applied with a manual sprayer. For amplification, DNA extraction and lyophilization of each of the isolates was carried out prior to development. of conventional PCR with two denaturations at 94°C with different cycles and an annealing at 55°C and 34 cycles with a final extension of 72°C. Obtaining that in the 8 cantons of the province of Tungurahua they all showed olive green colors on the obverse, while on the back it was black, with a superficial elevation, plush texture and irregular shape, lobed edges and in some isolates there was pigmentation and perspiration liquid, the mycelial growth in the colonies was obtained with a length of 5.93 µm, width 2.8 µm, hyphae 5.37 µm and conidiophores 32.97 µm average values. In the pathogenic characterization it was evident that the degree of affectation 1 represented between 1 to 5% of the surface of leaves with signs of *C. fulvum*, while 2 varied from 6 to 20% in the differential cultivars (Cf0-Cf2-Cf4- Cf5-Cf6), finally in the detection of the presence or absence of genes, the presence of the genes Avr2, Avr4e, Ecp2, Ecp4 and Ecp5 and total absence of the genes Avr4, Avr9 and Ecp1 were observed. Based on the results and the tests carried out, it was possible to create bases for the selection of resistance genes for the production of *S. lycopersicum* hybrids in the province of Tungurahua.

Keywords: avirulence, hemibiotrophic, gray mold, *Solanum lycopersicum*

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) originario de los Andes, es considerado como uno de los cultivos de mayor consumo a nivel mundial, siendo un cultivo modelo, debido a su alto valor económico, comercio y producción, este producto se caracteriza por ser rico en licopeno, flavonoides, betacaroteno y vitamina C, en la actualidad es uno de los productos agrícolas de mayor impacto en cuanto se refiere a comercialización en el mercado tanto nacional como internacional, cuyo consumo alcanza alrededor de 211 (tm), generando aproximadamente 25 millones de dólares (Córdoba et al., 2018).

El tomate riñón, a nivel nacional, se cultiva en todas las regiones debido a que este se adapta con facilidad a diferentes condiciones y a cualquier tipo de suelo. El área de cultivo a nivel nacional supera las 1970 ha aproximadamente, obteniendo así una producción total de tomate de 62.675 (t/m), con un promedio estimado de 33 (t/ha) al año. (Gorini, 2018) Las provincias de Tungurahua y Pichincha se caracterizan por tener grandes extensiones de este cultivo, con un rendimiento aproximado de entre 140 y 180 tn/ha por cada ciclo, mediante la utilización de semillas certificadas y libres de patógenos, bajo invernadero con lo cual es posible tener una producción todo el año (Juárez et al., 2015).

El cultivo de tomate riñón en la provincia de Tungurahua tiene una gran importancia económica en los agricultores, obteniendo una producción que representa el 70%, el sistema de producción más utilizado para este cultivo se realiza bajo cubierta, debido a la calidad del fruto y a los altos rendimientos obtenidos. Este fruto, a lo largo del tiempo se ha establecido como una hortaliza importante en el consumo diario en todo el mundo por su valor nutricional (Guzmán et al., 2018).

Entre las enfermedades fúngicas de mayor importancia del cultivo de tomate se puede señalar al “moho gris de las hojas” con su agente causal el *Cladosporium fulvum* (Cooke, 1883). Debido a la alta humedad presente bajo cubierta protegida es que *C. fulvum* logra ocasionar síntomas y signos, por lo que es muy común observarlo en condiciones de invernadero, sus primeros síntomas se observan en las hojas viejas y gradualmente se extiende hacia la parte superior de planta ocasionando necrosis siendo la enfermedad con mayor frecuencia en nuestro país (Chirinos et al., 2020).

El patógeno comienza a esporular sobre el envés de las hojas adultas, sobreviviendo como saprófito a nivel campo y en los restos de las cosechas, también pueden estar presente en semillas contaminadas y volverse una fuente de infección (Bernal et al., 2020).

El hongo *C. fulvum* se caracteriza por poseer una reproducción asexual, los principales síntomas de *C. fulvum* son manchas amarillentas en el haz, mientras que en el envés aparece un crecimiento filamentosos cubierto de los conidios con color pardo oliváceo o gris del hongo, causando daños en la superficie foliar, evitando realizar el proceso de fotosíntesis, por lo tanto, el rendimiento y calidad del fruto se ven afectados (Franco, 2019)

El tomate al ser infectado con *C. fulvum* se produce una relación gen-gen en la cual por cada gen de avirulencia puede existir un gen de resistencia en el hospedante, el mismo que es reconocido por una proteína emisora codificada por un gen de resistencia del huésped dominante oportuno (Torres et al., 2008).

Para el control de esta enfermedad se pueden utilizar medidas agronómicas como mantener una buena ventilación en los invernaderos, adecuada fertilización, óptima temperatura, correcta humedad, adecuada densidad de siembra y sobre todo controlar que no se forme una película de agua en las hojas (Ruíz et al., 2011).

1.2. Objetivos de la investigación

1.2.1. Objetivo general

- Aislar y caracterizar cultural, morfológica y patogénicamente aislados monospóricos de *Cladosporium fulvum* obtenidos a partir de signos de moho gris en hoja de *Solanum lycopersicum* para identificar la presencia o ausencia de genes AVR.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar *C. fulvum* a partir de signos en hojas de tomate.
- Caracterizar las colonias y morfología de hifas, conidióforos y conidios de los aislados monospóricos de *C. fulvum*.
- Evaluar la patogenicidad de los aislados de *C. fulvum*.
- Identificar la presencia /ausencia de genes AVR en los aislados de *C. fulvum*.

CAPÍTULO II

2.1. Antecedentes investigativos

Bernal et al., (2020) mencionan que la interrelación entre *S. lycopersicum* y *C. fulvum* en condiciones de invernadero en Cuba , los llevo a realizar una caracterización cultural, patogénica y molecular de al menos 36 aislados de *C.fulvum* de diversas localidades demostrando en los resultados que los aislados compartían características culturales y detectando el origen de nuevas razas del patógeno , además de tuvo la presencia del gen de resistencia Cf9 que determina ser el causante de las mutaciones de las secuencias genéticas de los Avrs ya reconocidos.

Lucentini et al., (2021) en su investigación titulada “*Fulvia fulva* las razas en Argentina están evolucionando a través de cambios genéticos que portan secuencias de genes polimórficos avr y ecp”, en el que se estableció el siguiente objetivo de ampliar el análisis de *C. fulvum*, y evaluó la expresión de genes de avirulencia lo que demuestra que el potencial para evaluar la evolución de los mecanismos es crucial para el manejo del moho gris de la hoja en los cultivos de tomate.

Cabrera et al., (2006) en su artículo científico titulado “El efecto fungicida del extracto de canela y el sulfato de cobre frente a *Passarola 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 también 1,5 ml/l y 3 ml/l del antibiótico polioxina-B. Determinaron que el extracto de canela y el sulfato de cobre inhibieron en la germinación de los conidios en su totalidad considerándose extractos efectivos en cuanto a este control, además se presentó que en condiciones *in vitro* las concentraciones de 4 ml/l y 1 ml/l de sulfato de cobre y el extracto de canela, respectivamente fueron totalmente letales para *P. fulva*.

Yuichiro et al., (2015) y sus colaboradores menciona en su investigación titulada “Novel Mutations Detected in Avirulence Genes Overcoming Tomato Cf Resistance Genes in Isolates of a Japanese Population of *Cladosporium fulvum*”, indicaron que su objetivo demostrar las variaciones moleculares aplicando varios métodos para el aislamiento y posteriormente la extracción de la secuencia de ADN, obteniendo como resultados las secuencias del Avr4E, Avr4 y Avr9 superando así a las proteínas mutantes presentes de

las diversas razas de japon siendo genes inestables.

(Ramos & Meza, 2018), en su investigación, determinaron que la influencia meteorológica del hongo *C. fulvum* mediante la utilización de un equipo de impacto volumétrico de una etapa y tipo Andersen, muestran conidios de *Cladosporium* en la atmósfera dependiendo del viento y los rayos UV teniendo concentraciones altas en los meses de marzo y septiembre por lo que concluyo que el factor clima influye tanto para la liberación de conidios como su reproducción.

Lucentini et al., (2017) en su investigación señalaron que la interrelación entre *S. lycopersicum* y *C. fulvum* en condiciones de cultivo de tipo protegido en Cuba, permitiendo realizar una caracterización patogénica, cultural y molecular de una determinada población conformada por 36 aislamientos de *C. fulvum* procedentes de distintas localidades del país, obteniendo así aislamientos del hongo con características culturales similares además se logró detectar por una vez la raza 9 de *C. fulvum* y manifestando así que los hallazgos encontrados apuntaron que los híbridos de tomate empleados en las localidades cubanas carecían de la presencia del gen de resistencia Cf-9.

(Peteira et al., 2011) y sus colaboradores en su artículo titulado “Caracterización molecular de aislamientos de *cladosporium fulvum* cooke provenientes de tomate en condiciones de cultivo protegido” se caracterizó molecularmente alrededor de 37 aislados de diferentes localidades de Cuba amplificando los productos de patogenicidad de los genes Avr (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr9, Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5) mostrando total ausencia en la amplificación el Avr9 , obteniendo como resultado el análisis de los productos de avirulencia por proteínas receptoras de la planta que acumulan (ROS) activando la quinasa que produce cambios en la génica desencadenando respuestas de hipersensibilidad (HR).

2.2. Categorías fundamentales o marco conceptual

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

Historia e importancia económica

El cultivo de tomate es originario de la región Andina, se lo puede encontrar en Chile, Perú y Ecuador, sin embargo, estudios demuestran que su domesticación se inició en la ciudad de Guatemala y el sur de México. En el siglo XVI el cultivo de tomate fue ingresado en Asia y Europa, sin embargo, durante siglo XIX su producción y comercialización se extendió a nivel mundial, generando buenos resultados en cuanto a su productividad y rentabilidad, siendo una fuente de ingreso para los agricultores (Alvarado et al., 2011).

El tomate en la actualidad es reconocido como una fuente rica en minerales como fósforo, magnesio, potasio, zinc, cobre, hierro y sodio, además de ciertas vitaminas como A1, B1, B2, B6, C y E brindando así un importante valor nutricional. El tomate es rico en licopeno, pigmento que se encarga de la coloración rojiza característica del tomate. El licopeno es considerado como uno de los antioxidantes más importantes debido a que esta sustancia se encarga de combatir y prevenir enfermedades cardiovasculares (Coronado et al., 2015).

El tomate es la hortaliza con mayor difusión a nivel mundial, con un alto valor económico debido a su producción, demanda y comercialización. En los últimos años, el aumento de la rentabilidad del cultivo ha permitido que los agricultores y sus familias generen mejores fuentes, atribuyendo un rubro significativo para su economía debido a su alto rendimiento (Guevara & Delgado, 2014).

Clasificación taxonómica del tomate

Tabla 1. *Taxonomía del tomate*

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

Rodríguez et al., (2001)

Descripción botánica del tomate

El presente cultivo se caracteriza por pertenecer al género *Solanum*, familia de las Solanáceas, cuyo orden es el Solanales, cultivado anualmente y con un ciclo perenne. Este tipo de cultivo se caracteriza porque su producción se da en cualquier época del año, tomando en cuenta los requerimientos necesarios para su crecimiento. Posee una raíz superficial, corta y raíces secundarias muy potentes y numerosas. Su tallo es cilíndrico, semileñoso y pubescente, alcanza longitudes de hasta 2,5 m de acuerdo con la variedad; hojas son compuestas con 7 a 9 folíolos, con peciolo lobulados y de borde dentado. Sus flores son perfectas, compuestas por cinco sépalos y pétalos cuya coloración es amarillenta, su pedúnculo es corto con un cáliz gamosépalo con 5 a 10. Su fruto es una baya subesférica, que presenta un color verde en estado inmaduro y de color rojo en estado maduro, alcanzando hasta 600 gramo (Escobar et al., 2009).

Condiciones agroecológicas del cultivo

El tomate se adapta fácilmente tanto en invernadero como a campo abierto, las zonas óptimas para el correcto desarrollo son zonas tropicales y andinas. Además, el suelo idóneo para este tipo de cultivo debe ser un suelo permeable, de textura media (franco – arcilloso), con buena cantidad de materia orgánica y pH de 5,8 a 6,8. Requiere temperaturas que oscilan, entre 20 y 30°C en el día, mientras que en la noche requiere de temperaturas entre 1 a 17°C, la humedad relativa óptima del suelo debe oscilar entre 60% y 80% generando así un correcto

desarrollo de la planta. En cuanto al factor luz, el cultivo necesita entre 6 horas diarias de luz, facilitando así sus procesos de floración y fructificación, garantizando productos de calidad. La precipitación anual es de 7 500 mm aproximadamente (Guevara & Delgado, 2014).

Etapas fenológicas

La fenología del cultivo de tomate consta de etapas que comprenden su ciclo de vida (Júarez et al., 2015).

Tabla 2. Etapas fenológicas del tomate

Días	Fase
(0-15 días)	Germinación
(15-30 días)	Trasplante
(1-30 días)	Desarrollo vegetativo
(28-36 días)	Floración
(55 -60 días)	Cuajado de frutos
(85-90 días)	Cosecha

Plagas y Enfermedades

Tabla 3. Plagas

Plagas	Nombre científico	Afección
Mosca blanca	<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	Provoca un amarillamiento y debilidad en la planta, así como también otras afecciones como manchas en frutos que retrasan el desarrollo adecuado de las plantas y su propagación de virus.
Gusano del fruto	<i>Helicoverpa</i> sp.	Daños presentes en las hojas formando galerías. Además de un daño en la yema apical del tallo.
Minador en hojas	<i>Liriomyza trifolii</i> , Mik	Las larvas se localizan al interior de las hojas produciendo minas y necrosis lenta de las hojas.
Pulgón verde	<i>Myzus persicae</i> , Sultzer	Alojados en el envés de las hojas, extraen la savia provocando una debilitación a la planta y transmisión de diversos virus.
Trips	<i>Frankliniella occidentalis</i> , Pergande	Los daños se producen directamente en las hojas presentando deformaciones o enrollamientos hacia arriba, retrasando la maduración de la planta.

Fuente: Ruiz et al., (2011)

Tabla 4. Enfermedades

Enfermedades	Nombre científico	Afección
---------------------	--------------------------	-----------------

Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary 1876	Se desarrolla con facilidad en temperaturas entre 10°C y 25°C y una humedad relativa mayor al 90%, atacan principalmente a los tejidos vegetales como hojas, tallos y frutos, fácil diseminación.
Tizón temprano	<i>Alternaria solani</i> Sorauer 1896	Se desarrolla con facilidad en zonas donde el calor y la lluvia son frecuentes, de fácil diseminación, una vez infectado el tejido vegetal se observan manchas irregulares con anillos de color café en las hojas, tallo y frutos.
Mal del talluelo	<i>Fusarium</i> sp. <i>Pythium</i> sp. <i>Sclerotium</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp.	Conocida también como el mal del semillero produce una pudrición de la raíz y cuello de la planta, es de fácil diseminación.
Antracnosis o podredumbre negra	<i>Colletotrichum</i>	Se desarrolla con facilidad en temperaturas de 20°C a 24°C y con una humedad libre, provocando manchas a manera de quemaduras en hojas y frutos, no afectando a toda la planta.
Fusariosis	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici Sacc.	Presenta una marchitez, provocando la caída de las hojas superiores y los peciolo, además presentan un amarillamiento en las hojas inferiores causando así la muerte de la planta.
Podredumbre gris	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	La enfermedad afecta principalmente al tallo de manera muy agresiva, provocando la muerte de la planta.

Oidium polvoroso o cenicilla	<i>Oidium neolycopersici</i> Lanzhou.	Las hojas presentan en su haz colores café y en algunos casos amarillentas con su respectivo micelio.
Moho de la hoja	<i>Cladosporium fulvum</i> Cooke.	Provoca la caída de los frutos tiñéndose de color oscuro, envés de las hojas con micelio color grisáceo.

Fuente: Alvarado et al., (2011)

3

2.2.2. El moho de la hoja de tomate (*C. fulvum*)

El presente patógeno fue definido en el año de 1883 por primera vez por M.C. Cooke botánico proveniente de Inglaterra, dicha observación fue descrita mediante muestras de hojas procedentes de EEUU, cabe recalcar que dicha enfermedad fue reconocida después de 300 años, por lo que su incidencia en su inicio era totalmente desconocida. Según Salazar (2019) mencionó que *C. fulvum* presenta una rápida infección sobre el cultivo de tomate en invernadero, ya que en condiciones de humedad y temperatura alta facilitan su propagación.

Importancia

Esta enfermedad se caracteriza por ocasionar múltiples daños en el cultivo, causando grandes pérdidas económicas, reconocida por su alto índice de propagación, la cual se encuentra distribuida a nivel de todo el mundo. Las condiciones para su óptimo desarrollo son niveles de humedad y temperaturas altas. Estos daños se dan principalmente en invernaderos que no tienen un adecuado manejo de ventilación (Romero et al., 2020).

Sintomatología

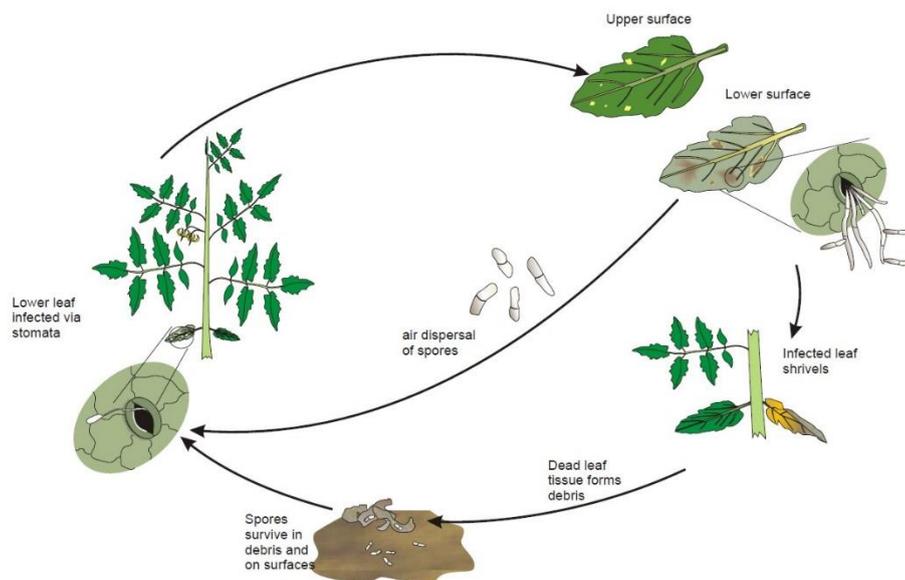
Por lo general, en el cultivo de tomate el tejido afectado es el follaje, aunque en algunos casos también se presentan daños en flores, tallos, peciolo y muy pocas veces en frutos; sin embargo; se considera como primer síntoma el aclaramiento de la hoja a un verde amarillento por el haz de las hojas mientras que al mismo tiempo en el envés de la hoja el hongo va desarrollando conidios de color marrón. Cuando la enfermedad se encuentra en un estado avanzado, los estomas dejan de funcionar, es decir, la respiración de la planta es afectada drásticamente presentando defoliación, marchitamiento, por lo que los conidióforos aumentarán de manera progresiva utilizando orificios para salir y liberar conidios para infectar plantas sanas (Lucentini et al., 2017).

Ciclo infectivo

- A) Conidios en reposo.
- B) Adherencia del conidio en la hoja.
- C) Crecimiento de los conidios y del tubo germinativo.
- D) Introducción del micelio en la cámara sub estomática.
- E) Conidióforo emergiendo a través del estoma soportando conidios en sus ramas laterales.

(Figura 1)

Figura 1. Ciclo infectivo *C. fulvum* en el cultivo de tomate

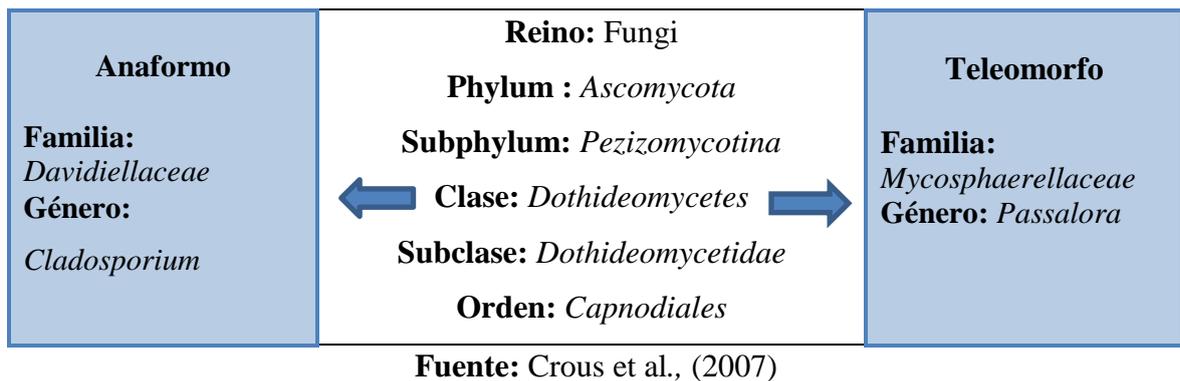


Fuente: (Peteira et al., 2011)

Taxonomía

C. fulvum, mediante su filogenia y morfología, es clasificada por el reino Fungi en el filum Ascomycota que es considerado uno de los filums grande y numeroso, se caracterizan por poseer un ciclo de una célula ascógena o también denominada ascas, además pertenece clase *Dothideomycetes*, en el orden *Capnodiales*, y en la familia *Mycosphaerellaceae* presentando una estructura de conidióforos con dilataciones nudosas con ramas laterales cortas de 15-40 x 5,0-7,0 µm sus conidios de color verde oliváceo (Figura 2) (Crous et al., 2007).

Figura 2. Ubicación taxonómica



Aislamiento en medios de cultivo PDA

Para la esporulación y el crecimiento micelial, los mejores resultados se obtienen mediante la utilización de medios de cultivo PDA (Papa-Destrosa-Agar) con una temperatura promedio de 21 y 25°C, también el crecimiento se realiza en cajas de Petri utilizando diferentes medios de agar como agente gelificante con diferentes requerimientos nutricionales para su adecuado desarrollo; sin embargo, para tener aislados de mohos gris en tomate es necesario tomar pequeñas muestras de 1 cm² con signos y síntomas de la enfermedad bajo invernadero, en la cabina de flujo laminar se realiza la impresión de hojas en PDA con algún desinfectante comercial para evitar la contaminación como es la estreptomycin, sellar adecuadamente e incubar durante 7 días a 21°C en oscuridad. A partir de este proceso se selecciona un fragmento de colonia pura aislada con el objetivo de

transferir conidios en tubos de ensayo con agua desionizada estéril y agitar 25 segundos y pasar el contenido del tubo de ensayo a una caja de Petri con PDA incubar durante 12 horas a 21°C a oscuridad (Romero et al., 2020).

Caracterización cultural del cultivo

Frey, Oldfield, & Bridger (1979), *C. fulvum* presentó características culturales cualitativas y cuantitativas ya descritas como: una elevación plana o umbilicada de un diámetro de 10 colonias en el lapso de 15 a 21 días, además presentan un color oliváceo, verde, gris y en el reverso de los aislados presentan un color oscuro uniforme y en algunos casos negro así también muestran una textura afelpada, lobulados, rizoidal con diversas pigmentaciones en colores claros y oscuros con presencia de transpiración en algunos aislados. Se estima que el crecimiento de *C. fulvum* alcanza entre 3,22 mm/día a los 7 días y 5,75 mm /día a los 14 días en medio PDA (Cabrera et al., 2006).

Identificación morfológica

Cabrera et al., (2006), mencionan que es posible visualizar los conidios, conidióforos originarios de tallos, hojas, ramas, con signos y síntomas del patógeno en el microscopio, por lo que es necesario tener fragmentos de 0,2 mm con el propósito de realizar la medición de la estructura del hongo como el largo y ancho estableciendo así las características morfológicas presentadas, un cuerpo vegetativo microscópico con diversas formas unicelulares y filamentosas o también llamadas hifas las mismas que pueden alcanzar un tamaño de 2,2-2,5 μm de grosor con un alargamiento notorio en el ápice que se ramifica y se denomina micelio dando estructuras somáticas que son transportadoras de varias esporas.

Cedeño & Carrero (2018) consideraron que los conidióforos poseen más o menos una longitud de 200 μm , aunque se han documentado longitudes de 100 μm o menos, con lados rectos o elevados, lo que da como resultado ramas laterales cortas. Los conidios también tienen una forma muy variable y pueden ser subesféricos, ovoides, elípticos, fusiformes, subcilíndricos o cilíndricos, y tienen una base truncada o ligeramente curvada que no está elevada, no está abovedada o es de color verde claro, con borde marrón oliva. Su tamaño varía y se puede encontrar entre 20,1 y 23,2 x 4,6 y 5,1 μm .

Técnicas moleculares

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

En 1975, basándose en su conocimiento de la replicación del ADN, Sanger desarrolló un método para crear secuencias de ADN *in vitro* utilizando secuencias de oligonucleótidos cortas que actúan como cebadores. Pueden generarse aleatoriamente, pero siempre encontrarán una región de homología en los extremos 5'-3' de ADN, verificando la abundancia de 13 oligonucleótidos y nucleótidos, y debido a que se encuentra ADN polimerasas y replicación, la cadena de inicio, permite no solo sintetizar el fragmento, sino también más rápido, esta técnica está basada en la reacción de la cadena polimerasa se la denomina como PCR así como el descubrimiento de la Taq polimerasa (Díaz et al., 2008).

La síntesis de ADN ocurre en tres fases: una desnaturalización, que es cuando el hidrógeno se descompone a 92-95°C, se produce el emparejamiento, una los cebadores a las hebras de ADN y la temperatura desciende significativamente, se sintetiza una nueva hebra de acuerdo con la secuencia y el tamaño del cebador a una temperatura de 70-72°C para que funcione la taq polimerasa en la que se harán copias de ADN (Mas et al., 2016).

Proteínas efectoras ECP: Estas proteínas efectoras identificadas en el fluido apoplasto de hojas de cultivo de tomate con presencia de *C. fulvum* son Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 y otras; sin embargo, no han sido científicamente caracterizados funcionalmente, pero los estudios han demostrado que esto está presente en todos los *C. fulvum* jugando un papel importante en la avirulencia y al mismo tiempo en la actividad metabólica del hongo (Stergiopoulos et al., 2009).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Descripción del sitio de investigación

La investigación se realizó en los laboratorios e invernaderos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, en el cantón Cevallos.

3.1.1. Ubicación política

Provincia: Tungurahua

Cantón: Cevallos

Sector: Querochaca

3.1.2. Ubicación Geográfica

Latitud: 01° 24' 27"

Longitud: 78° 35' 00"

Altura: 2800 msnm

3.2. Materiales y Equipos

3.2.1. Equipos

- Agitador vortex (Thermo Scientific, 88882009)
- Autoclave (Midmark, M11®)
- Balanza de precisión (Ohaus®, EX124)
- Bloque térmico (Thermo Scientific, 13687F720)
- Cabina de flujo laminar (Thermo Scientific, A1300)
- Destilador de agua (Thermo Scientific, Barnstead EasyPure II)
- Incubadora (Pol-Eko-Aparatura, Cln 115)
- Liofilizadora (Labconco, FreeZone 4.15)
- Microondas (Samsung, MS32J5133EM-AP)

- Micropipetas (TERMO SCIENTIFIC)
- Microscopio (MOTIC, BA210LED)
- PCR convencional (Thermo Scientific, A48141)
- pH metro (BANTE 900)
- Refrigeradora (IDUREX, A48141)
- Sistema de imagen táctil (ENDURO GDS)
- Ultracogelador (Thermo Scientific - TSX60086A)

3.2.2. Materiales

- Aguja de inoculación
- Alcohol al 70% (WEIR)
- Bisturí (STAINLESS N°4)
- Bolsas de papel Craft
- Cajas de Petri
- Cubre objeto (EUROTUBO®)
- Macetas
- Mechero de Bunsen
- Medios de cultivo PDA (SIGMA)
- Muestras de hojas de tomate con signos de la enfermedad del moho gris
- Papel aluminio (DIAMOND)
- Parafilm (NOVACHEM)
- Porta objeto (EUROTUBO®)
- Primers (Invitrogen)
- Sustrato TS4 Y TS1 (KLASMANN)
- Tijeras
- Tubos de ensayo (20 mm* 150 mm)
- Tubos eppendorf
- Vidrio fusible

3.3. Tipo de investigación

La presente investigación fue de tipo experimental debido a que el investigador manipula las

variables de estudio y propuso el sustento teórico de los resultados obtenidos (Hernández-Sampieri & Mendoza, 2020).

3.4. Metodología

Figura 3. Aislar *C. fulvum* a partir de signos en hojas de tomate

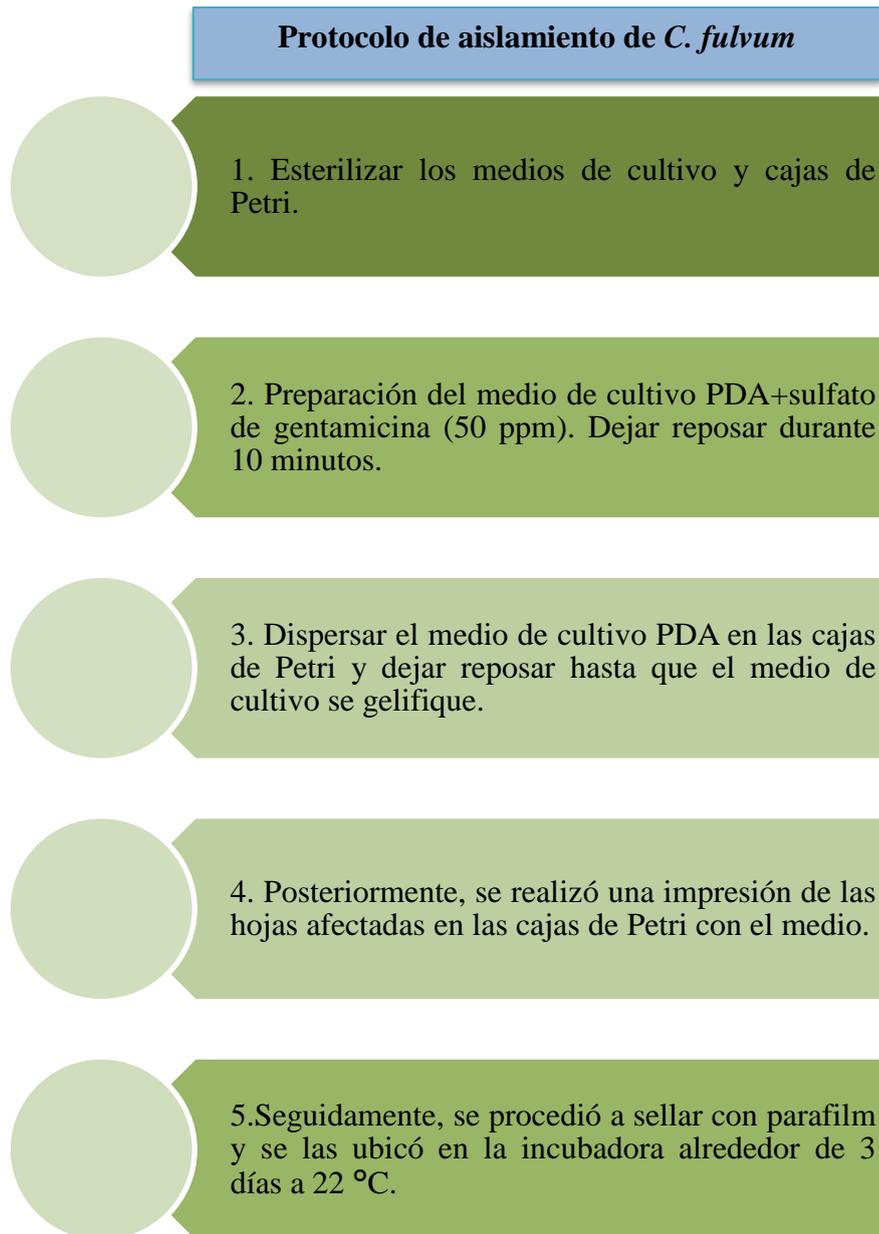


Figura 4. Caracterizar las colonias y morfología de hifas conidióforos y conidios de los

aislados monospóricos de *C. fulvum*

Protocolo de caracterización de colonias, hifas y conidióforos

1. Se esterilizaron los medios de cultivo y materiales como: cajas de Petri, porta y cubre objetos, vidrio fusible.

2. Preparación del medio de cultivo PDA. reposo durante 10 minutos.

3. Se dispersó el medio de cultivo en el porta objetos y Se dejó reposar hasta que el medio de cultivo se gelifique.

4. Posteriormente se sembró el hongo en el porta objetos y se colocó en cajas de plástico con el vidrio fusible en condiciones de humedad óptimas.

5. Finalmente, se observó en el microscopio óptico de luz transmitida (MOTIC, BA210LED) la presencia de conidióforos, hifas y conidios para su respectiva caracterización.

Figura 5. Evaluar la patogenicidad de aislados de *C. fulvum*

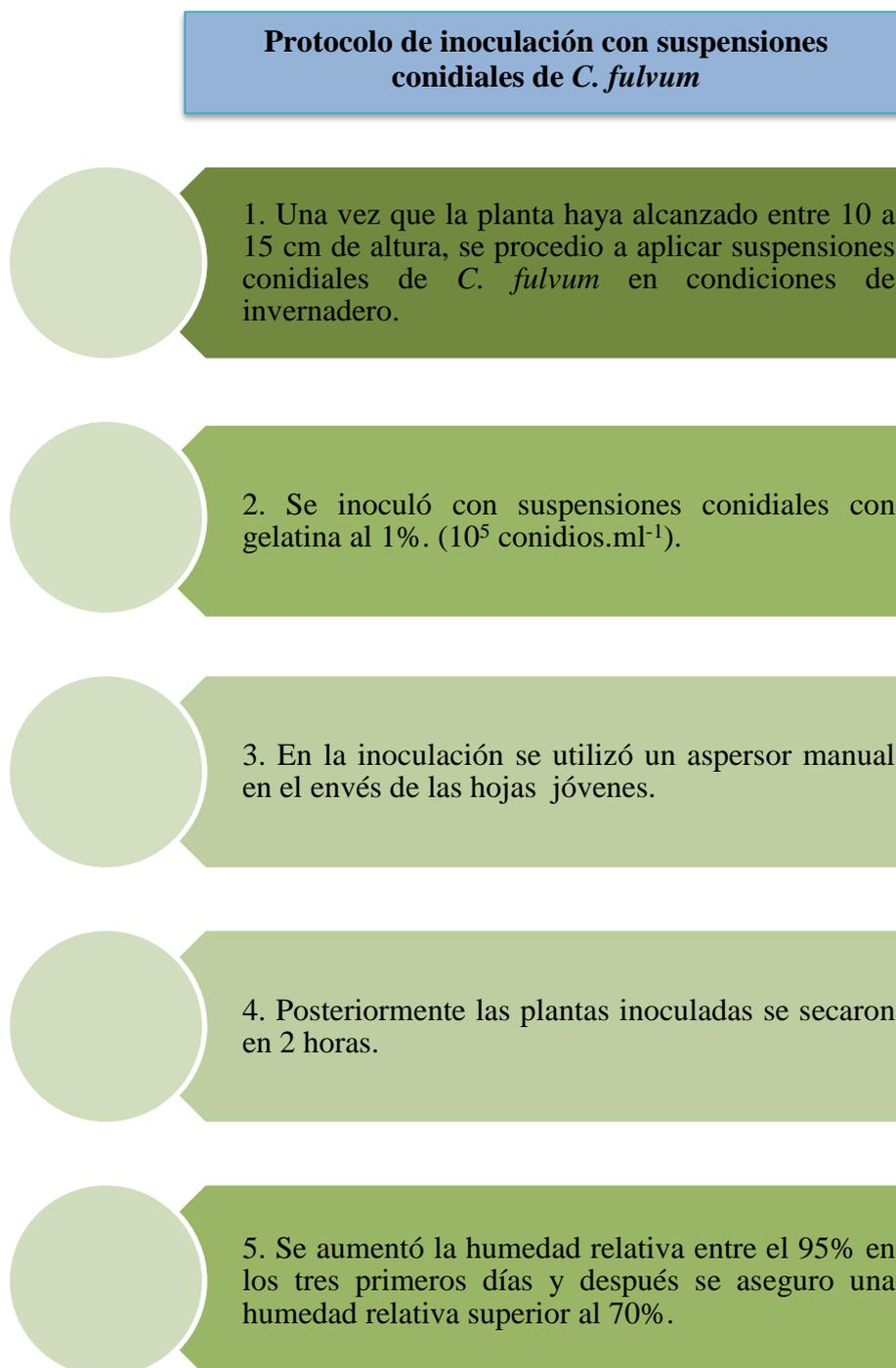
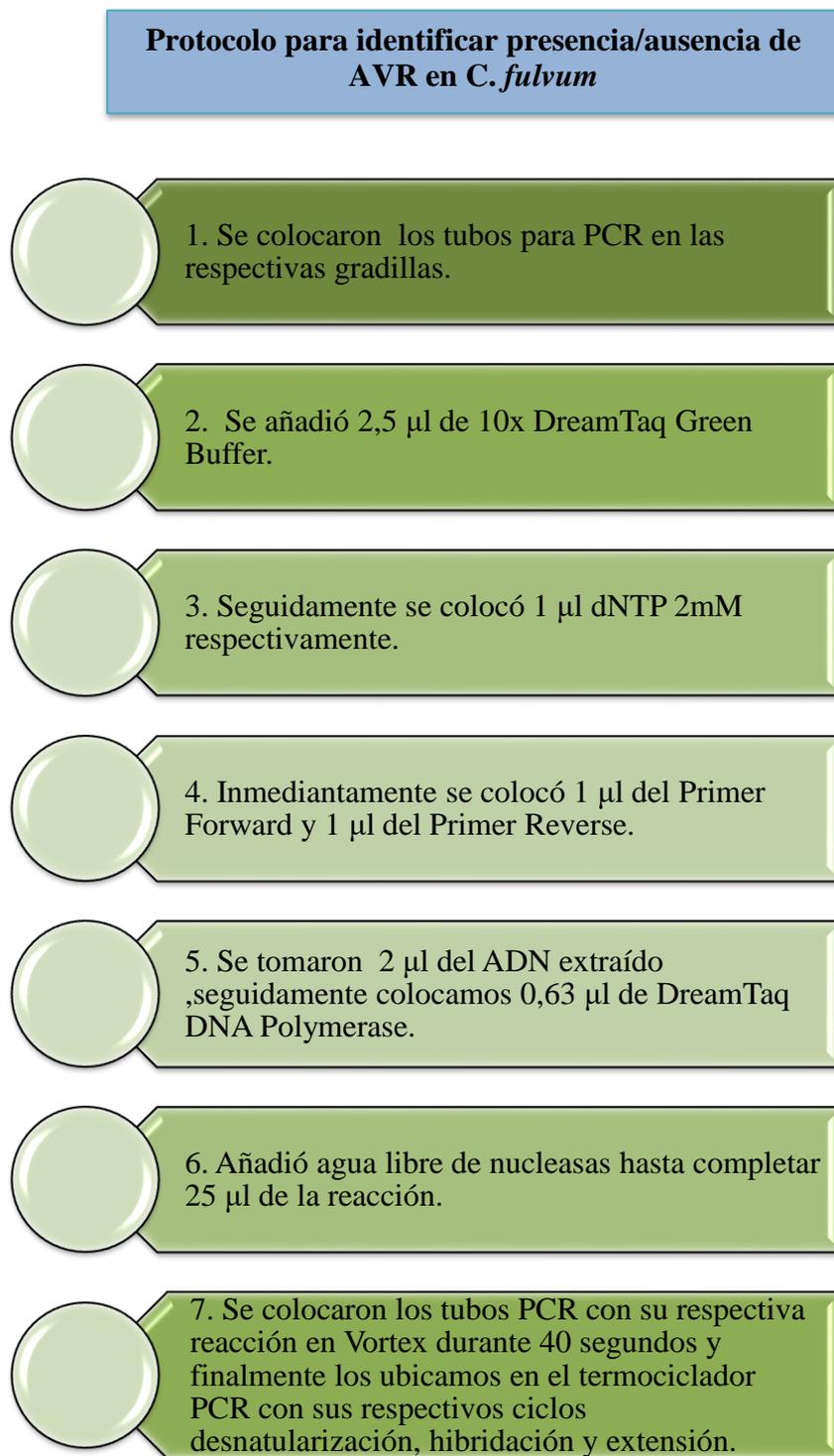


Figura 6. Identificar la presencia/ausencia de genes AVR en los aislados de *C. fulvum*



3.5. Variables Respuestas

- **Caracterización cultural:** pigmentación, diámetro, textura, borde de las colonias y presencia o ausencia del líquido de transpiración.
- **Caracterización morfológica:** medir las dimensiones de las hifas, conidióforos y conidios.
- **Caracterización patogénica:** grados de afectación acorde a la escala de evaluación desde 0-1- 2- 3- 4- 5.
- Presencia o ausencia de Avrs en la provincia de Tungurahua.

3.6. Procesamiento de la información y análisis estadístico

Se utilizó un análisis cualitativo tanto para los estudios de caracterización cultural, morfológica y patogénicos. Para detectar la presencia/ausencia de AVR no se requirió de diseño experimental.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización cultural de los aislados de *C. fulvum* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)

Mediante la investigación realizada se identificaron un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Ambato. Como se observa en la **Tabla 5** los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como en el reverso, así como también se logró observar una elevación superficial en la mayoría de los aislados, excepto 5-6 que presentan una forma elevada, además se identificó que los aislados 1-2-4-5-7-8-9-10 presentaron un borde de tipo lobulado mientras que los aislados 3-6 presentaron un borde entero, del mismo modo todos de los aislados mostraron una textura afelpada la mayoría sin pigmentación en el medio de cultivo (PDA) a excepción del aislado 2. Cabe señalar que en el aislado 1 se observó líquido de transpiración en comparación a los demás aislados; así también presentaron una forma regular en los aislados 1-6-7-8 e irregular en los aislados 2-3-4-5-9-10.

Tabla 5. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Ambato

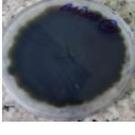
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Ambato					Gráfico
				Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma		
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Lobulado	Regular		
2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	Si	No	Superficial	Lobulado	Irregular		
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular		
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular		
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular		

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

En el cantón Baños se lograron identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum*. Como se indica en la **Tabla 6** los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así como también se logró observar una elevación superficial en casi todos los aislados excepto en los aislados 5-6-8 que son de forma elevada, además se identificó que los aislados 2-4-5-7-8-10 presentaron un borde de tipo lobulado mientras que los aislados 1-3-6-9 presentaron un borde entero. No se constató ningún tipo de pigmentación en el medio de cultivo (PDA) en ninguno de los aislados y con una textura afelpada. Cabe señalar que en el aislado 1 se obtuvo líquido de transpiración en comparación a los demás aislados; así también presentaron una forma irregular casi en todos los aislados, a diferencia de los aislados 6-8 que presentaron forma regular.

Tabla 6. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Baños

Baños								
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Entero	Irregular	
2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	

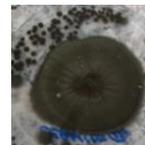
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular	
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Entero	Regular	
7	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
8	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Regular	
9	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular	
10	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	

En la investigación realizada se identificaron un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Cevallos. cómo se detalla en la **Tabla 7** los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así como también se logró observar una elevación superficial en los aislados 1-3-4-7-8-9-10 y de forma elevada en los aislados 2-5-6, además se identificó que los aislados 2-4-5-7-8-9 presentaron un borde de tipo lobulado mientras que los aislados 1-3-6-10 presentaron un borde entero, del mismo modo la mayoría de los aislados mostraron una textura afelpada sin pigmentación en el medio de cultivo (PDA). Cabe señalar que en los aislados 4-5 obtuvieron líquido de transpiración en comparación a los demás aislados; así también presentaron una forma regular en el aislado 8 e irregular en los aislados 1-2-3-4-5-6-7-9-10.

Tabla 7. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Cevallos

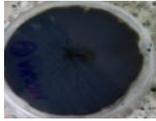
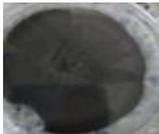
Cevallos								
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular	
2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular	
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Lobulado	Irregular	
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Elevada	Lobulado	Irregular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Entero	Irregular	
7	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
8	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
9	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	

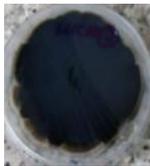
10	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular
----	-------------------------	----------	----	----	-------------	--------	-----------



En el cantón Mocha se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum*. Como se observa en la **Tabla 8** de los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así como también se logró observar una elevación superficial en todos los aislados, además se identificó que los aislados 2-4-5-7-8-9 presentaron un borde de tipo lobulado mientras que los aislados 1-3-6-10 presentaron un borde entero. No se constató ningún tipo de pigmentación en el medio de cultivo (PDA) en ninguno de los aislados y con una textura afelpada. Cabe señalar que en los aislados 1-4-5 obtuvieron líquido de transpiración en comparación a los demás aislados; así también presentaron una forma regular en los aislados 3-5 e irregular en los aislados 1-2-4-6-7-8-9-10.

Tabla 8. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Mocha

Mocha								
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Entero	Irregular	
2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Regular	
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Lobulado	Irregular	
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Lobulado	Regular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Entero	Irregular	

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

En la investigación realizada se identificaron un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Patate. Como se detalla en la **Tabla 9** los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así también se logró observar una elevación superficial en los aislados 1-3-4-6-8-9-10 y de forma elevada en los aislados 2-5-7, además se identificó un borde de tipo lobulado en todos los aislados, del mismo modo la mayoría de los aislados mostraron una textura afelpada sin pigmentación en el medio de cultivo (PDA). Cabe señalar que en el aislado 1 presento líquido de transpiración en comparación a los demás aislados; así también presentaron una forma de tipo regular en los aislados 1-2-3-6-7-8 e irregular en los aislados 4-5-9-10.

Tabla 9. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Patate

Patate								
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Lobulado	Regular	

2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Regular	
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
7	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Regular	
8	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
9	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
10	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	

En el cantón Pelileo se identificaron un total de 10 aislados de *C. fulvum*. Como se detalla en la **Tabla 10**, de los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así como también se logró observar una elevación superficial en los aislados 1-2-3-5-6-7-8-9 y de forma elevada en los aislados 4-10, además se identificó un borde de tipo lobulado en todos los aislados, del mismo modo la mayoría de los aislados mostraron una textura afelpada sin pigmentación en el medio de cultivo (PDA). Cabe señalar que en los aislados 3-4-5 obtuvieron líquido de transpiración en comparación a los demás aislados; así también presentaron una forma regular en el aislado 9 e irregular en los demás aislados.

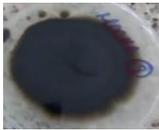
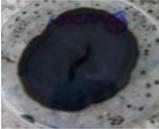
Tabla 10. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Pelileo

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

5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	Si	Superficial	Lobulado	Irregular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
7	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
8	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
9	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
10	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	

En la investigación realizada se identificaron un total de 10 aislados de *C. fulvum* en el cantón Píllaro. Como se observa en la **Tabla 11**, los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así como también se logró identificar una elevación superficial en los aislados 1-2-3-5-6-8-9-10 y de forma elevada en los aislados 4-7, además se identificó un borde de tipo lobulado en todos los aislados, del mismo modo la mayoría de los aislados mostraron una textura afelpada sin pigmentación y líquido de transpiración en el medio de cultivo (PDA); así también presentaron una forma de tipo regular en los aislados 6-9 e irregular en los aislados 1-2-3-4-5-7-8-10.

Tabla 11. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Píllaro.

Píllaro								
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
7	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
8	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	

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

En el cantón Tisaleo se logró identificar un total de 10 aislados de *C. fulvum*. Como se observa en la **Tabla 12**, los cuales presentaron un color verde oliváceo-negro tanto en el anverso como reverso, así también se logró observar una elevación superficial en los aislados 1-2-3-5-6-8-9-10 y elevada en el 4-7, además se identificó un borde de tipo lobulado en todos los aislados. No se constató ningún tipo de pigmentación y líquido de transpiración en el medio de cultivo (PDA) en ninguno de los aislados; así también presentaron una forma regular en los aislados, 6-9 e irregular en el resto de los aislados y con una textura afelpada.

En las características culturales descritas del patógeno *C. fulvum* en los cantones de la Provincia de Tungurahua presentaron un porcentaje alto de uniformidad, coincidiendo con los resultados obtenidos por Jácome (2022) quien en su investigación señala que los aislados muestran un color verde oliváceo- negro tanto en el anverso como reverso, con una textura afelpada y de forma regular e irregular en algunos aislados.

Además, se logró constatar la presencia de líquido de transpiración a diferencia de los datos obtenidos de la investigación mencionada. Bernal et al., (2020) mediante su investigación indicaron que existe una diversidad de la población de *C. fulvum* por lo que su genoma se encuentra en un constante cambio, además manifestó que las características culturales a pesar de los cambios son homogéneas, por lo que coinciden con nuestra investigación.

Así también se identificó que el medio de cultivo utilizado juega un papel fundamental para la obtención de dichas colonias homogéneas, como es el comúnmente conocido como Agar Papa Dextrosa (PDA) por lo que concuerda con nuestra investigación (Lucentini et al., 2017).

Tabla 12. Caracterización cultural de las colonias de aislados de *C. fulvum* en el cantón Tisaleo

Tisaleo								
Aislado	Color Anverso/Reverso	Textura	Pigmentación	Líquido transpiración	Elevación	Borde	Forma	Gráfico
1	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
2	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
3	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
4	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
5	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	
6	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Regular	
7	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Elevada	Lobulado	Irregular	
8	Verde Oliváceo/Negro	Afelpada	No	No	Superficial	Lobulado	Irregular	

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



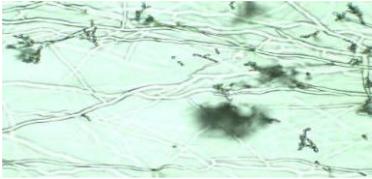
4.2. Caracterización morfológica de los aislados de *C. fulvum* mediante microcultivos en la provincia de Tungurahua

En la presente investigación se realizó la caracterización morfológica de los aislados monospóricos de *C. fulvum* como se constata en la **Tabla 13**, se observó que en los conidios existe una variación, con un largo que oscila entre 4,84 μm a 6,55 μm con un promedio de 5,93 μm , mientras que el ancho se encontró entre 2,34 μm a 3,17 μm , con un promedio de 2,8 μm . Además, se identificó que el tamaño de las hifas varía entre 5 y 5,68 μm , por otro lado, el tamaño de los conidióforos alcanzó una longitud mínima de 29,31 y una máxima de 36,50 μm .

Bernal et al., (2020) mediante su investigación mencionó que obtuvo conidios de *C. fulvum* de diversos tamaños de color gris y verde oliváceo, mostrando un rápido crecimiento de conidios con una longitud que oscila entre 20 a 23 μm y de largo y ancho entre 4 a 6 μm coincidiendo con nuestros resultados. Sin embargo, se ha demostrado que los factores como la altitud y localidad no influyen en las diferencias morfológicas de los aislados monospóricos del patógeno estudiado.

Lucentini et al., (2017) señalaron que el tamaño de los conidios está relacionado con el tiempo de crecimiento, teniendo así que mientras más lento se efectúe el crecimiento se obtendrán conidios de mayor tamaño. Además, mencionaron que las estructuras fúngicas están influenciadas por las condiciones físicas y químicas del medio de cultivo utilizado, siendo el medio de cultivo que mejores resultados obtuvieron fue el Agar extracto de malta (MEA) en comparación del medio de cultivo utilizado en nuestra investigación el cual fue el PDA.

Tabla 13. Caracterización morfológica de los aislados de *C. fulvum* en los cantones de la provincia de Tungurahua

Cantón	Conidios μm		D. Hifa	Conidióforo	Gráfico
	Largo	Ancho			
Ambato	5,95	2,45	5	29,31	
Baños	6,01	2,96	5,24	29,36	
Cevallos	4,84	2,82	5,18	32,75	
Mocha	6,11	2,34	5,23	33,25	
Patate	6,08	3,17	5,68	32,61	
Pelileo	6,55	3,15	5,54	36,50	
Píllaro	6,30	2,83	5,43	35,63	

Tisaleo	5,57	2,68	5,62	34,37	
\bar{X}	5,93	2,8	5,37	32,97	

4.3. Caracterización patogénica: grados de afectación acorde a la escala de evaluación desde 0-1- 2- 3- 4- 5

En la escala de los grados de afectación para el cultivar *Cf0* se observó que el mayor porcentaje de afectación se constató en el cantón Mocha, con un porcentaje del 1 al 20% de la superficie en comparación del resto de los cantones que presentaron un porcentaje entre 1 y 5% de afectación, mientras que para los cultivares *Cf2* y *Cf6* se logró determinar que el porcentaje de afectación para los cantones estudiados de la provincia de Tungurahua se mantienen en el rango de 1 a 5% de la superficie. Para el cultivar *Cf5* se determinó que el mayor porcentaje de afectación se ubica en el cantón Tisaleo con un porcentaje de 6 al 20 % de la superficie a comparación de los cultivares en estudio **Tabla 15**.

Guzmán (2018) y sus colaboradores determinaron que la incidencia de *C. fulvum* en tomate, alcanzó que el mayor porcentaje de afectación se constató a los 38 días después de la inoculación del patógeno, coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestra investigación, teniendo en cuenta que la infección ataca principalmente a la parte inferior de la planta extendiéndose de forma rápida hacia la parte superior de la planta.

Díaz (2017) mencionó que los grados de afectación se encuentran relacionados con los factores ambientales, fundamentalmente la temperatura y humedad, haciendo que el patógeno haciendo que el patógeno se disemine con facilidad en la planta.

Tabla. 14 Escala de evaluación de la severidad de *C. fulvum* en *S. lycopersicum* en base a la magnitud de los signos observados.

Grados	Signos
0	Hoja completamente sana
1	Hojas con signos de <i>C. fulvum</i> 1-5% de la superficie
2	Hojas con signos de <i>C. fulvum</i> . 6-20% de la superficie
3	Hojas con signos de <i>C. fulvum</i> . 21-50% de la superficie
4	Hojas con signos de <i>C. fulvum</i> . 51-70% de la superficie
5	Hojas con signos de <i>C. fulvum</i> . >70% de la superficie

Tabla 15. Caracterización Patogénica de *C. fulvum* en los diferentes cultivares de los cantones de la provincia de Tungurahua.

<i>Cfo</i>				
Cantones de la provincia de Tungurahua	N° DE AISLADO	SIGNOS	GRADO DE AFECTACIÓN	PORCENTAJE
Ambato	10		1.1	1% - 5%
Baños	10		1	1% - 5%
Cevallos	10		0.9	1% - 5%
Mocha	10		1.7	6% - 20%
Patate	10		1.05	1% - 5%
Pelileo	10		1.3	1% - 5%

Píllaro	10		1.15	1%-5%
Tisaleo	10		1.15	1%-5%
<i>Cf2</i>				
Ambato	10		1.3	1%-5%
Baños	10		1.1	1%-5%
Cevallos	10		1.3	1%-5%
Mocha	10		1.05	1%-5%
Patate	10		1.1	1%-5%

Pelileo	10		1.2	1%-5%
Píllaro	10		1.1	1%-5%
Tisaleo	10		1.25	1%-5%
<i>Cf4</i>				
Ambato	10		1.1	1%-5%
Baños	10		1.15	1%-5%
Cevallos	10		1.15	1%-5%
Mocha	10		1.3	1%-5%

Patate	10		1	1%-5%
Pelileo	10		1.1	1%-5%
Píllaro	10		1.65	6%-20%
Tisaleo	10		1.15	1%-5%
<i>Cf5</i>				
Ambato	10		1.3	1%-5%
Baños	10		1.35	1%-5%
Cevallos	10		1.35	1%-5%

Mocha	10		0.85	1%-5%
Patate	10		1.20	1%-5%
Pelileo	10		1.4	1%-5%
Píllaro	10		1.50	1%-5%
Tisaleo	10		1.55	6%-20%
<i>Cf6</i>				
Ambato	10		1	1%-5%

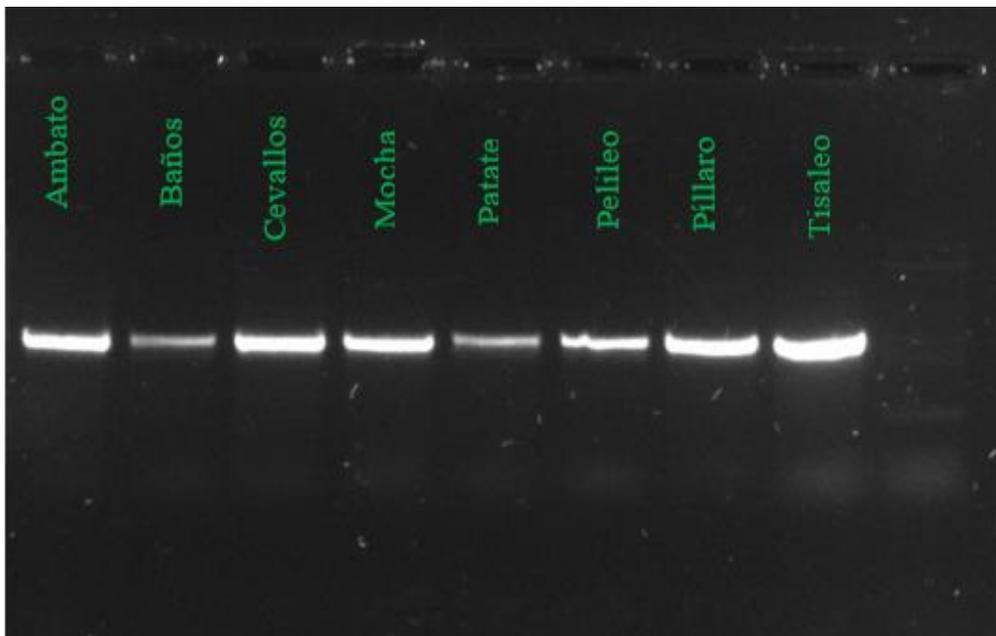
Baños	10		1.55	1%-5%
Cevallos	10		1.1	1%-5%
Mocha	10		0.9	1%-5%
Patate	10		1.05	1%-5%
Pelileo	10		1	1%-5%
Píllaro	10		1.4	1%-5%
Tisaleo	10		1.2	1%-5%

4.4. Presencia o ausencia de AVRS en la provincia de Tungurahua

Mediante la amplificación realizada se constató la presencia del gen *Avr2* de *C. fulvum* en los cantones de la provincia de Tungurahua tales como: Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro, Tisaleo (Figura 7).

Flores (2022) en su investigación realizada mencionó que realizó una amplificación similar a la nuestra, en la que incluía una desnaturalización inicial a 94°C, durante un lapso de 5 minutos y una segunda desnaturalización a 94°C por 30 segundos, con una secuencia de 40 repeticiones añadiendo una hibridación a 55°C durante un minuto, a diferencia de nuestra investigación que se realizó a 54°C en un tiempo de 30 segundos con una secuencia de 34 repeticiones y por último una extensión final a 72°C en agarosa al 1%. Por otra parte, Bernal et al., (2020) mencionaron en su investigación que es importante identificar la diversidad genética de las muestras con el propósito de no presentar alteraciones en la secuencia del gen, por lo que el *Avr2* se presentó sin problemas en su ensayo realizado en Cuba.

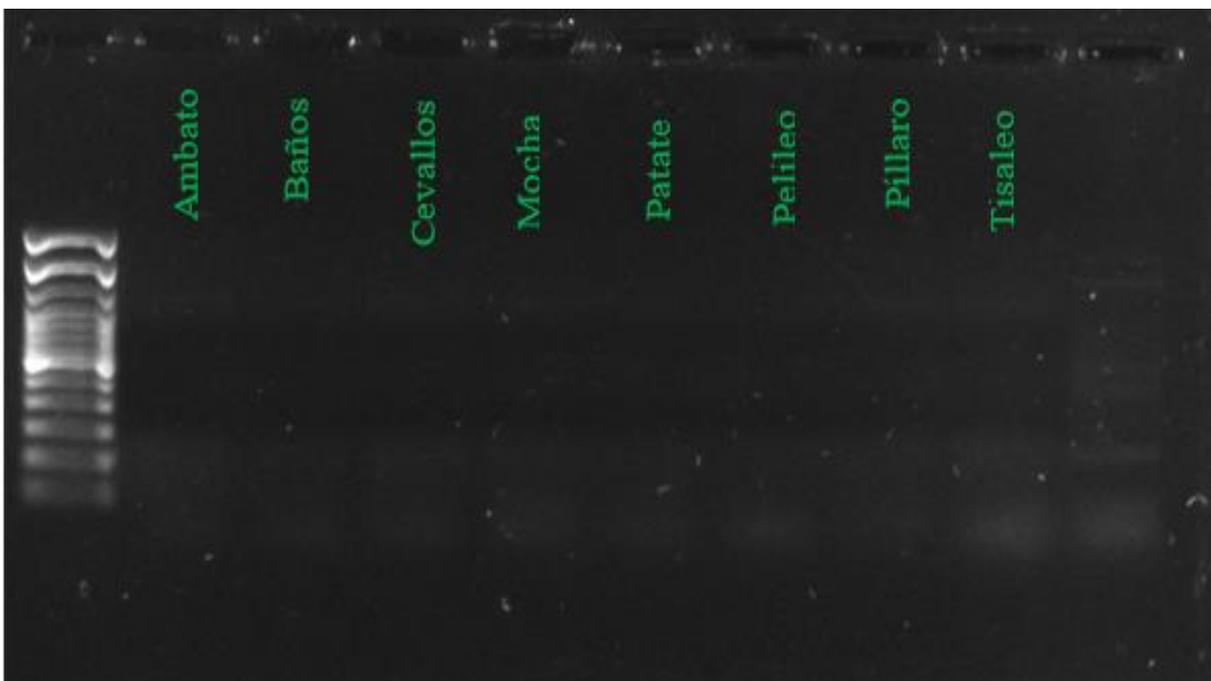
Figura 7. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen *Avr2* en gel de agarosa al 1%



De igual manera, en la amplificación realizada para el *Avr4* en los aislados de *C. fulvum* en los ocho cantones de la provincia de Tungurahua estudiados no se detectó la presencia de este (Figura 8).

Bernal et al.,(2020) en su investigación titulada “Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Cladosporium*” mencionó que la ausencia del gen puede estar influenciada por el cambio de algún residuo *Cys* el cual mantiene una estrecha relación con el puente de disulfuro dando como resultado la presencia de varios polimorfismos en la colección europea de *C. fulvum* alterando de esa manera la estructura del gen por lo que concuerdan con los datos obtenidos en la presente investigación. Además, en un estudio realizado por De Wit (2017) manifestó que en los aislados del gen *Avr4* de *C. fulvum* utilizados para su estudio no presentaron ningún tipo de amplificación de avirulencia mediante la realización de un PCR múltiple, ya que dicho gen puede reflejar resistencia del mismo o mutaciones de carácter independiente por lo que concuerdan con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

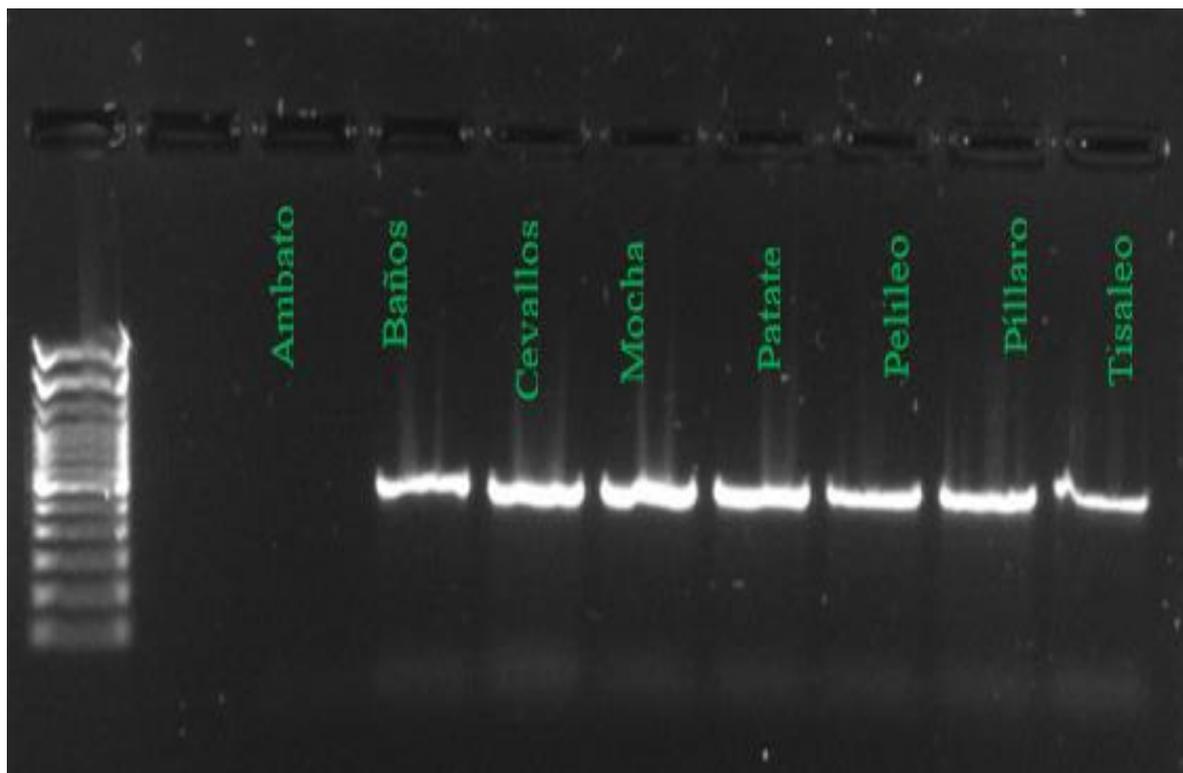
Figura 8. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen *Avr4* en gel de agarosa al 1%



En la amplificación de *Avr4e* en los aislados de *C. fulvum* en los cantones de la provincia de Tungurahua tales como: Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo se constató la presencia del gen a excepción del cantón Ambato (Figura 9).

Bernal et al., (2020) en los resultados obtenidos en su investigación menciona que de ciertas localidades estudiadas de la colección de aislados de *C. fulvum* de Cuba se constató que existe la presencia de más de un 80% del gen *Avr4* y *Avr4e* de los aislados en estudio. Medina (2019) en su colección de *C. fulvum* europea señaló la total presencia del *Avr4e* en la amplificación de sus aislados por lo que concuerdan con nuestra investigación.

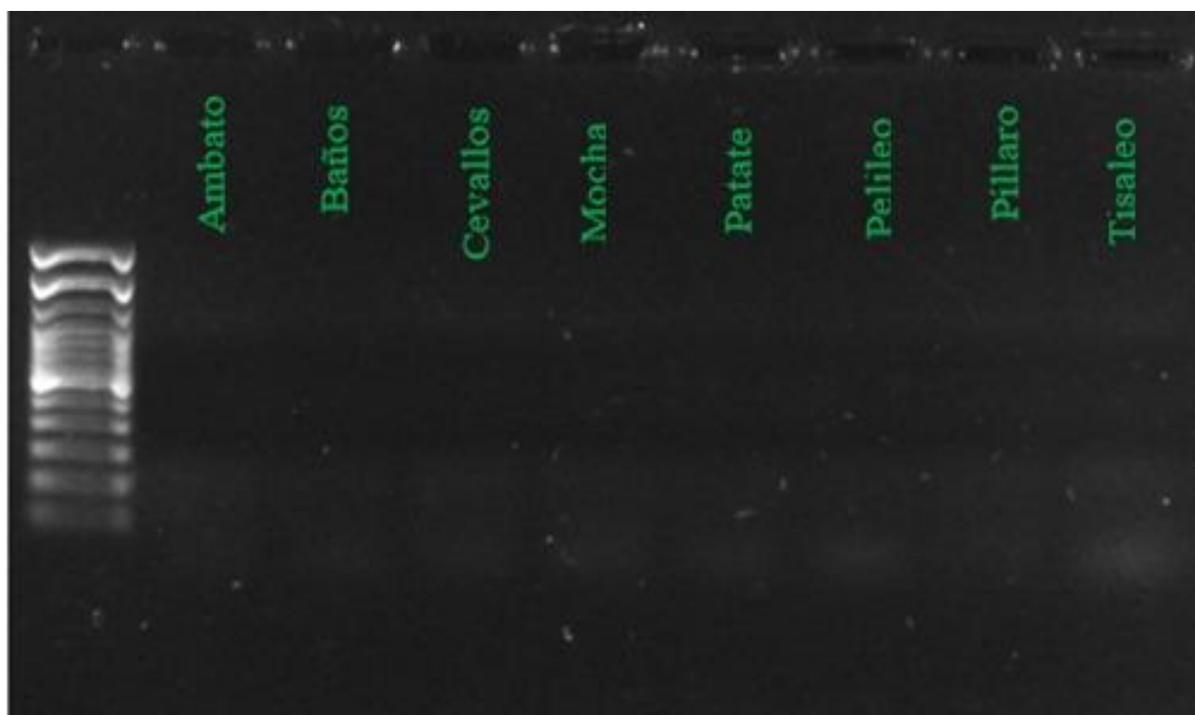
Figura 9. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen *Avr4e* en gel de agarosa al 1%



Del mismo modo en la amplificación del gen *Avr9* de los aislados de *C. fulvum* en los ocho cantones estudiados de la provincia de Tungurahua existe una total ausencia de dicho gen (Figura 10).

Lucentini et al., (2017) indicaron que este gen presenta un polimorfismo en sus secuencias codificante, por lo que diversos aislados muestran mutaciones a lo largo de su secuencia en su amplificación, sin embargo, en la colección argentina y europea analizadas en el gen se encuentra presente en todos los aislados analizados. A diferencia de los resultados obtenidos por Bernal et al., (2020) quienes demostraron la ausencia total de dicho gen en los aislados de *C. fulvum* de la colección de los aislados de las diferentes localidades de Cuba, siendo así similar a los resultados obtenidos en la provincia de Tungurahua.

Figura 10. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen Avr9 en gel de agarosa al 1%



Así también en la amplificación del gen *Ecp1* de los aislados de *C. fulvum* en los ocho cantones estudiados de la provincia de Tungurahua tales como: Ambato, Baños, Cevallos, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo, existe una total ausencia de dicho gen (Figura 11).

De Wit (2017) mencionó que dicha proteína extracelular se encuentra presente en todos los aislados estudiados debido a que cumplen un papel fundamental en la invasión del hongo a los tejidos de las pantas de *S. lycopersicum*; sin embargo, en nuestros aislados estudiados en la provincia de Tungurahua se constató una total ausencia del gen *Ecp1*.

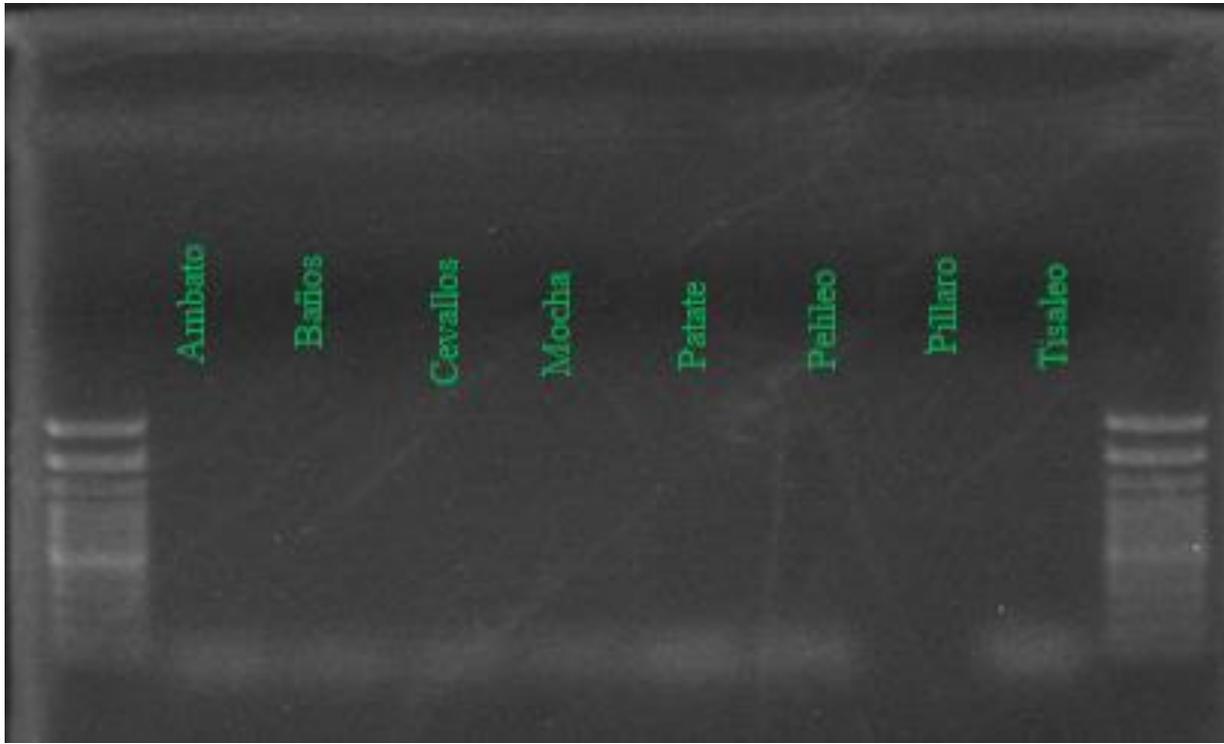
Figura 11. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen Ecp1 en gel de agarosa al 1%



Mediante la realización de la amplificación del gen *Ecp2* en los aislados de *C. fulvum* en los ocho cantones estudiados de la provincia de Tungurahua a excepción de Píllaro se constató la presencia del mismo (Figura12).

Bernal et al., (2020) indicaron mediante su investigación la presencia del gen que codifica la proteína extracelular *Ecp2* en los aislados analizados de *C. fulvum* de las diferentes localidades cubanas. De Wit (2017) indica que dicha proteína cumple un papel de suma importancia en la virulencia de dicho patógeno coincidiendo nuestros resultados con los autores antes mencionados.

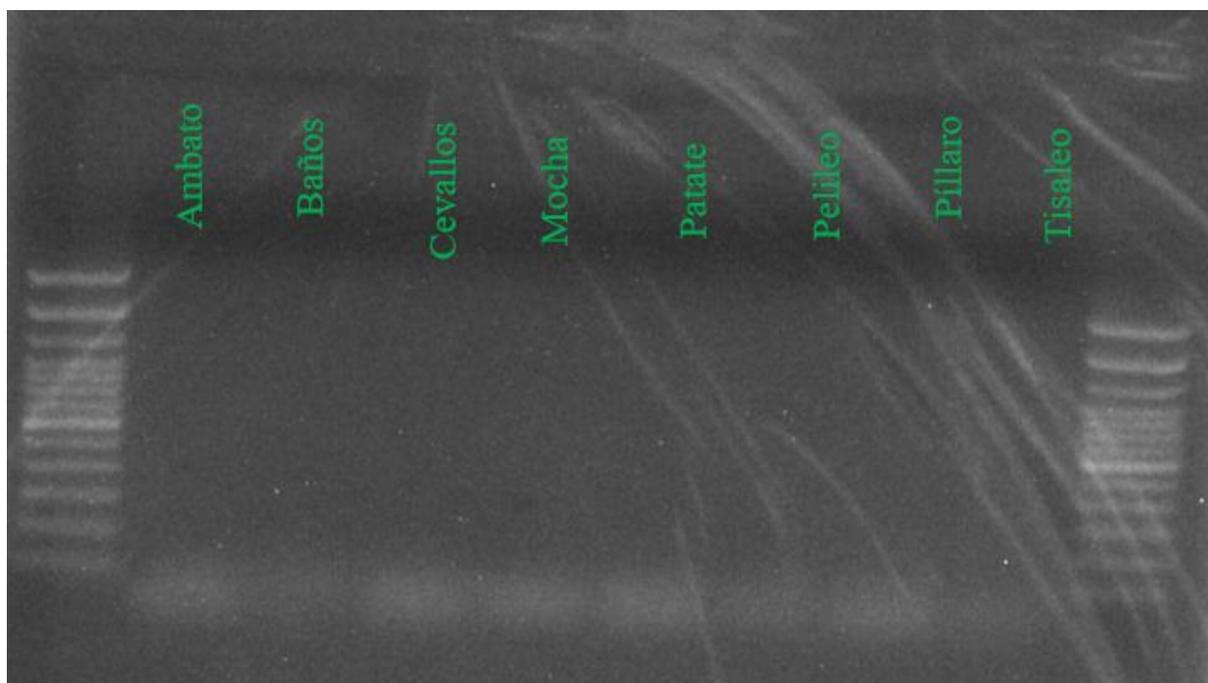
Figura 12. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen Ecp2 en gel de agarosa al 1%



Mediante la amplificación realizada para el gen Ecp4 en los aislados de *C. fulvum* se logró constatar la presencia del mismo en los ocho cantones estudiados de la provincia de Tungurahua (Figura 13).

Bernal *et al.*, (2020) en sus resultados obtenidos en la amplificación de la proteína extracelular *Ecp4* de los aislados de *C. fulvum* de la colección de Cuba tuvo la presencia de un 83%. Por lo tanto, lo que se refiere a la codificación de Ecp4 en siete aislados de *C. fulvum* de la colección argentina, se mostró la ausencia de este, debido a la presencia de los residuos de Cys afectando así la secuencia genómica en la amplificación (Stergiopoulos *et al.*, 2009).

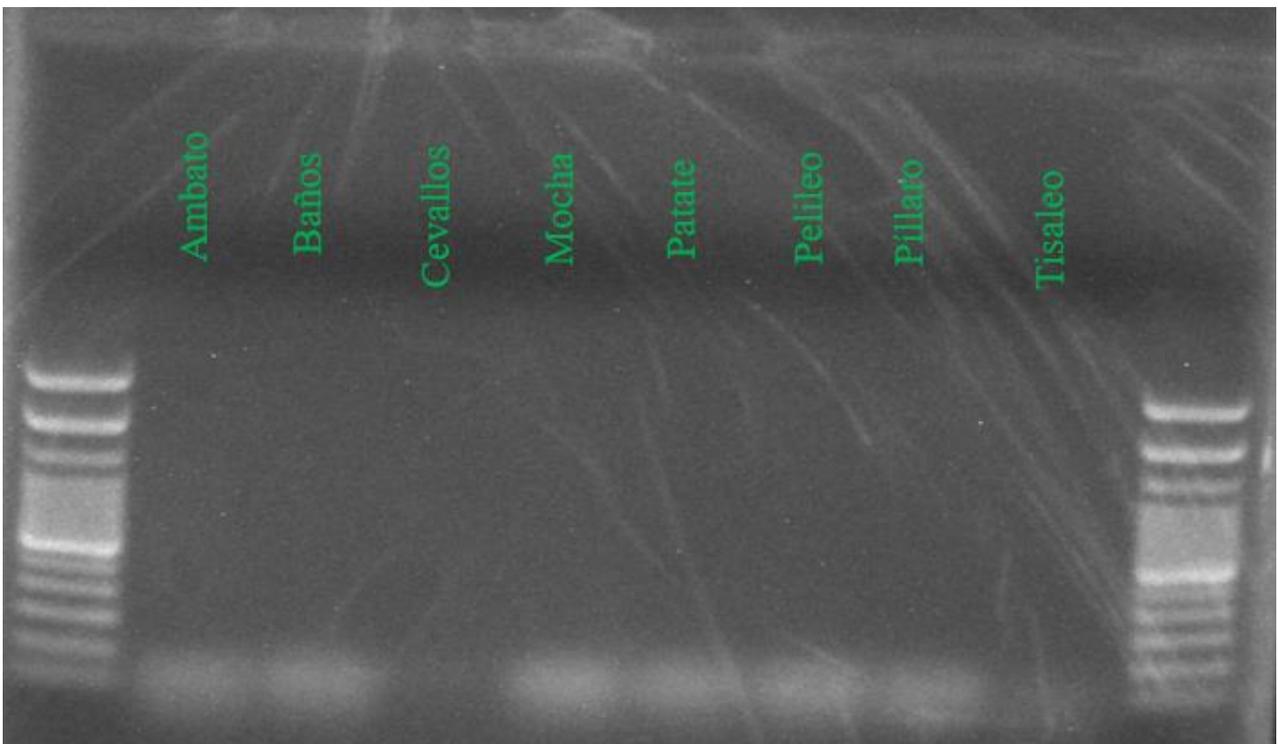
Figura 13. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen Ecp4 en gel de agarosa 1%



Por último, en la amplificación de *Ecp5* en los aislados de *C. fulvum* de los ocho cantones de la provincia de Tungurahua se detectó la presencia de *Ecp5* a excepción del cantón Cevallos (Figura 14).

Flores (2022), manifestó en su investigación que obtuvo la presencia de la proteína extracelular *Ecp5* en la mayoría de los aislados de *C. fulvum* analizados, concordando con nuestros resultados de amplificación. Sin embargo, (Bernal et al., 2020). En su investigación menciona que tuvo un 15% de la presencia de *Ecp5* en sus aislados analizados de la colección de Cuba, lo cual a comparación con nuestros resultados presentan un porcentaje inferior a lo anteriormente mencionado.

Figura 14. Visualización de los productos amplificados en PCR de *C. fulvum* del gen Ecp5 en gel de agarosa 1%.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- A partir de hojas de tomate con signos del moho gris se lograron obtener 80 aislados monospóricos de *C. fulvum*.
- Las colonias fúngicas con colores verde oliváceo en el anverso y negro en el reverso, de textura afelpada, en su mayoría sin pigmentación ni líquido de transpiración, con elevación superficial y bordes de lobulado a enteros con formas regulares e irregulares de sus márgenes prevalecieron al evaluar los aislados monospóricos de *C. fulvum*.
- En base al promedio del largo de los conidios (5,93 μm), ancho (2,80 μm), diámetro de hifa (5,37 μm) y longitud promedio de conidióforos (32,97 μm) se constató que morfológicamente los aislados caracterizados son similares a lo informado para la especie *C. fulvum*.
- Para la evaluación de la patogenicidad se pudo constatar que el mayor porcentaje de afectación se obtuvo en los cultivares Cf0-Cf5 correspondientes a los cantones de Mocha y Tisaleo, con un rango de 6 al 20 %, sin embargo, para los cultivares Cf2-Cf4 y Cf6 se determinó que el porcentaje de afectación se mantuvo entre un rango del 1 al 5% de los ocho cantones en estudio de la provincia de Tungurahua
- Se detectó la presencia de los genes Avr2, Avr4e, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 así como la ausencia de los genes Avr4, Avr9 y Ecp1 en los aislados monospóricos de *C. fulvum*, creando las bases para poder seleccionar los genes de resistencia (CfR) que deben ser introducidos en híbridos de tomate que deseen ser producidos en la provincia de Tungurahua.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar diferentes medios de cultivo para hongos con el propósito de comparar la efectividad.
- Realizar el aislamiento monospórico de *C. fulvum* en otras provincias para incrementar el número de aislados en el Ecuador.

- Se recomienda realizar la amplificación en PCR tiempo real de nuevos genes de avirulencia *Avrs* y proteínas extracelulares *Ecp* ya descritos en la literatura científica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, G., García, L., & Fernandez, S. (2011). Enfermedades del Jitomate (*Solanum lycopersicum*) Cultivado en Invernadero en la Zona Centro de. *Revista Mexicana Fitopatología*, 55-89 <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221490005.pdf>.
- Bernal, A., Herrera, L., Peteira, B., Leiva, M., & Lazo, Y. (2020). El patosistema *Solanum lycopersicum-Cladosporium fulvum* en las condiciones de cultivo protegido tropical en Cuba. *Centro Agrícola*, vol.47, pp. 88-94.
- Cabrera, A., Coca, B., Castellanos, M., Herrera, L., Yanelys, Y., & Díaz, A. (2006). Efecto de los medios de cultivo y la temperatura en el crecimiento de *cladosporium fulvum* Cooke (sin. *Passalora fulva*). 25 *Fitosanidad*, 10(1), 25–28. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116158004.pdf>
- Cedeño, L., & Carrero, C. (2018). El “Moho foliar” del tomate en los llanitos de Tabay, Estado Mérida. *Scielo*, 1-25.
- Cooke, M. (1883). *New American fungi*. Grevillea. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=65WFg9uJRDgC&oi=fnd&pg>.
- Córdoba, H., Gómez, S., & Núñez, C. (2018). Evaluación del rendimiento y fenología de tres genotipos de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(1), 113–125. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7348>
- Coronado, M., Vega, S., & Vázquez, M. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana Antioxidants: present perspective for the human health. *Rev Chil Nutr*, 42(2), 1–212. <https://doi.org/10.4067>
- Chirinos, D., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Bravo, S. P., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2020). Insecticides and agricultural pest control: The magnitude of its use in crops in some provinces of Ecuador. *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 21(1). https://doi.org/10.21930/RCTA.VOL21_NUM1_ART:1276
- Crous, P., Schubert, S., & Groenewald, J. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*, 33-56.
- De Wit, P. (2017). Nuevos efectores identificados en el apoplasto de tomate infectado con

- Cladosporium fulvum*. En el XVII Congreso Internacional de Interacciones Moleculares Planta-Microbio. *Plos one*, 15.
- Díaz, A., Rentería, L., Cortez, J., & Palacios, E. (2008). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, vol. 53.
- Escobar, H., Lee, R., & Cooman, A. (2009). *Manual de Producción de Tomate Bajo Invernadero* (ed. Escobar Hugo & R. ed. Lee, Eds.; Tadeo Lozano, Vol. 4). https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/pub_29_-_manual_produccion_de_tomate.pdf
- Franco, M. E. E. (2019). *Mancha gris de la hoja del tomate: identificación, biología y genómica del agente etiológico* [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/73593>
- Flores, D. (2022). Caracterización molecular de genes de avirulencia del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum* L en la provincia de Tungurahua” [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Universidad Técnica de Ambato <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/36063>
- Frey, D., Oldfield, R., & Bridger, R. (1979). *A colour atlas of pathogenic fungi*. Londres: Wolfe Medical Publications Ltd., Wolfe House, 3-5 Conway Street, Londres W1P 6HE.
- Gorini, F. (2018). *Guía completa del cultivo del tomate* (Vecchi, S.A.). https://books.google.com.ec/books?id=_g5dDwAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Guevara, L., & Delgado, A. (2014). Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Avances En Investigación Agropecuaria*, 18(1), 51–66.
- Guzman, T., Martínez, L., & Torres, C. (2018). Manual de cultivo de tomate al aire libre. *Revista Cuidado del Medio Ambiente*, 34-90 http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/29488/INIA_Libro_0049.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. (2020). *Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

- Jácome, D. (2022). 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. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato] <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/34298>
- Juárez, A; de Alba, K; Zermeño, A; Ramírez, H; Benavides, A;. (2015). Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6 (5), 943-954.
- Lucentini, C., Franco, M., Medina, R., Saparrat, M., & Balatti, P. (2021). *Fulvia fulva* [sin. Las razas de *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] en Argentina están evolucionando a través de cambios genéticos y portan secuencias de genes polimórficos avr y ecp. *Revista europea de patología vegetal*, 159 (3), 525-542 <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02181-9>.
- Lucentini, C., Medina, R., Troncozo, M., López, S., Franco, M., Rollán, M., & Balatti, P. (2017). Diversidad y razas de *Cladosporium fulvum*, el agente causal del moho de la hoja del tomate. *IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico- CONCYT*, 1-14.
- Mas, E., Poza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, vol. 15.
- Peteira, B., Bernal, A., Martínez, B., & Lleana, M. (2011). Caracterización molecular de aislamientos de *Cladosporium fulvum* Cooke provenientes de tomate en condiciones de cultivo protegido. *Revista de Protección Vegetal*, vol.26, pp. 5-14.
- Ramos, R., & Meza, V. (2018). Ocurrencia de *Cladosporium* en la atmósfera de la plaza San Martín de Lima (Perú) y su relación con algunos factores meteorológicos. *Ecología Aplicada*, 39-43 <https://doi.org/10.21704/rea.v17i1.1171>.
- Rodríguez, R., Tabares, J., & Medina, J. (2001). *Cultivo moderno del tomate*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Romero, D., Yáñez, G., Simbaña, K., Vélez, P., & Navarrete, H. (2020). Determination of cadmium and lead in tomato (*Solanum lycopersicum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) consumed in Quito, Ecuador. *Toxicology Reports*, 7, 893–899. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2020.07.008>
- Ruíz, N., Eleazar, R., & Guzmán José. (2011). Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa, Chiapas, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2), 129–137. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37019853004>

- Salazar, O. (2019). Mancha gris de la hoja del tomate : identificación ,biología y genómica del agente etiológico. *Universidad Nacional de la Plata*.
- Stergiopoulos, I., Kock, M., Lindhout, P., & Wit, P. (2009). Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, vol.20.
- Torres, E., Iannacone, J., & Gómez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, vol. 67,pp.169-178
https://www.redalyc.org/pdf/908/Resumenes/Resumen_90867121_1.pdf
- Yuichiro, L., Van 'T Hof, P., Beenen, H., Mesarich, C., Kubota, M., Stergiopoulos, I., Mehrabi, R., Notsu, A., Fujiwara, K., Bahkali, A., Abd-Elsalam, K., Collemare, J., & De Wit, P. J. G. M. (2015). Novel Mutations Detected in Avirulence Genes Overcoming Tomato Cf Resistance Genes in Isolates of a Japanese Population of *Cladosporium fulvum*. *PLoS ONE*, 10(4), 123271.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123271>

ANEXOS

