

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“Caracterización molecular de genes de avirulencia 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

DIANA CAROLINA FLORES YANCHALIQUIN

TUTOR

Ing. MsC. Olguer León

CEVALLOS - ECUADOR

2021-2022

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La suscrita, FLORES YANCHALIQUN DIANA CAROLINA, portadora de cedula de identidad número: 1805359815, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “Caracterización molecular de genes de avirulencia del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum* L en la provincia de Tungurahua” es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



.....

Diana Carolina Flores Yanchaliquin

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES DE AVIRULENCIA 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 Ingeniera Agrónoma, 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 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, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o parte de él”



.....
Diana Carolina Flores Yanchaliquin

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES DE AVIRULENCIA DEL AGENTE CAUSAL DEL MOHO GRIS DE LA HOJA DE *Solanum lycopersicum* L EN LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA”

REVISADO POR:



Firmado electrónicamente por:
**OLGUER ALFREDO
LEON GORDON**

.....

Ing. MsC. Olguer León

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

FECHA



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

.....

**PhD. MARCO PÉREZ
PRESIDENTE TRIBUNAL**

18/07/2022



Firmado electrónicamente por:
MICHEL LEIVA MORA

.....

**PhD. MICHEL LEIVA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

15/07/2022



Firmado electrónicamente por:
**JORGE ENRIQUE
DOBRONSKI ARCOS**

.....

**Ing. Mg. JORGE DOBRONSKY
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

15/07/2022

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a Dios quien me ha bendecido día a día otorgándome sabiduría e inteligencia para poder cumplir mis objetivos.

A mis padres Andrés y Gladys que con su ejemplo de lucha, humildad y trabajo constante han sido y serán el pilar fundamental de mi vida apoyándome en cada uno de mis sueños, por corregirme con amor y paciencia para que cada día sea una mejor persona.

A mi hermano, Víctor, por alentarme en todo este duro camino e impulsarme día a día a culminar este gran objetivo. A mis tías Yolanda y Ximena que siempre han estado ahí con sus consejos y apoyo con el propósito de que cumpla mis sueños. A mis abuelitos Víctor e Ignacio que a pesar de no estar a mi lado este logro para ustedes en el cielo.

A mi querido Ing. Esteban López por haberme brindado su confianza y apoyo incondicional en este largo camino, enseñándome que jamás debo darme por vencida.

Al Doctor Michel Leiva por compartir sus conocimientos conmigo, por llenarme de perseverancia y dedicación para concluir esta meta.

A todos mis compañeros y profesores por haberme brindado su amistad en todos estos años de formación.

AGRADECIMIENTO

Mi eterna gratitud a Dios por brindarme su compañía en todo este tiempo, también agradezco a mi familia por su esfuerzo y cariño para culminar mi carrera.

A mi querida Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica por haberme brindado las herramientas necesarias para llegar a ser una gran profesional.

Mi agradecimiento eterno a mi tutor de tesis Ing. Olguer León, por compartir sus conocimientos y contribuir en mi formación profesional culminando con éxito la presente investigación.

Agradezco a mis calificadores Ing. Jorge Dobronski y Doctor Michel Leiva por sus recomendaciones y ayuda en el tema de investigación.

Agradezco al Ing. Marco Pérez por su apoyo en la ejecución de la investigación.

A mi querida Abg. Soña Muñoz, por su valiosa amistad por los innumerables consejos, que los llevaré en mi mente y en mi corazón.

Agradezco a Diana Paredes querida amiga, por brindarme apoyo en los buenos y malos momentos.

Diana Carolina Flores Yanchaliquin

ÍNDICE

Introducción	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1 Antecedentes Investigativos	3
1.2 Categorías fundamentales o Marco Conceptual	6
1.2.1 Taxonomía de <i>C. fulvum</i>	6
Reino Fungi	6
1.2.2 Phylum Ascomycota	7
1.2.3 Género <i>Cladosporium</i>	8
1.3 Moho de la hoja del tomate (<i>Cladosporium fulvum</i>).....	9
1.3.1 Importancia.....	9
1.3.2 Taxonomía.....	9
1.3.3 Ciclo de la enfermedad.....	10
1.4 Interacción compatible e incompatible gen a gen.....	11
1.5 Técnicas moleculares.....	12
1.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
1.5.2 Cebadores específicos <i>C. fulvum</i>	13
1.6 Unidad de análisis.....	15
1.6.1 Cultivo de tomate (<i>Solanum Lycopersicum</i> L).....	15
1.6.2 Clasificación taxonómica	15
1.6.3 Descripción botánica del tomate	16
1.6.4 Requerimientos edafoclimáticos del tomate.....	16
1.7 Etapas fenológicas del cultivo	17
1.8 Enfermedades y plagas del cultivo de tomate	17

1.9 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
1.9.1 HIPÓTESIS	21
1.9.2 OBJETIVOS.....	21
• Objetivo general	21
• Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO II.....	22
2.1 Enfoque de la investigación	22
2.2 Modalidad	22
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.3.1 Ubicación del experimento.....	23
2.3.2 Características del lugar	23
2.4 EQUIPOS Y MATERIALES.....	24
2.4.1 Equipos.....	24
2.4.2 Materiales	24
2.4.3 Reactivos	26
2.5 FACTORES DE ESTUDIO.....	26
2.5.1 Factor N°1. Procedencia de los aislados.....	26
2.5.2 Factor N°2. Genes de avirulencia en el genoma de los aislados.....	27
2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	27
2.7 MANEJO DEL EXPERIMENTO	28
2.7.1. Objetivo 1. Estandarización del protocolo para obtener ADN fúngico de moho gris <i>C. fulvum</i>	28
2.7.2. Estandarización del proceso y las condiciones para amplificar los genes referencia de <i>C. fulvum</i>	29
2.7.3 Amplificación de los genes de avirulencia presentes en los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i>	32
2.8 VARIABLES RESPUESTA.....	34

CAPÍTULO III	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1 Análisis de la presencia/ausencia de genes de avirulencia de <i>C. fulvum</i>	35
3.2 Presencia/ausencia de genes que codifican para proteínas extracelulares de <i>C. fulvum</i>	39
CAPÍTULO IV	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
4.1 Conclusiones.....	44
4.2 Recomendaciones	44
Bibliografía	45
Anexos	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Taxonomía del tomate.....	15
Tabla N°2. Fenología del cultivo de tomate	17
Tabla N°3. Cebadores específicos de <i>C. fulvum</i>	25
Tabla N°4. Cantones de la provincia de Tungurahua	26
Tabla N°5. Proteínas de avirulencia y extracelulares	27
Tabla N°6. Códigos colección de <i>C. fulvum</i>	28
Tabla N°7. Cebadores específicos utilizados en el estudio de determinación de genes de avirulencia (<i>Avr</i>) de <i>C. fulvum</i>	30
Tabla N°8. Condiciones de amplificación para proteínas de avirulencia	31
Tabla N°9. Cebadores específicos utilizados en el estudio de determinación de genes de proteínas extracelulares (<i>Ecp</i>) de <i>C. fulvum</i>	31
Tabla N°10. Condiciones de amplificación para proteínas extracelulares.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación taxonómica	10
Figura 2. Ciclo infeccioso <i>C. fulvum</i> en el cultivo de tomate. A) Conidios en reposo en condiciones favorables. B) Fijación del conidio en la hoja. C. Germinación de los conidios y crecimiento del tubo germinativo. D) Penetración del micelio en la cámara subestomática. E) Conidióforo emergiendo a través del estoma soportando conidios en sus ramas laterales.....	11
Figura 3. Triángulo de la enfermedad. a. huésped: planta; b. patógeno: agente causal; ambiente: entorno físico químico.....	18
Figura 4. Ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - UTA.....	23
Figura 5. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen <i>Avr2</i> en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....	36
Figura 6. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen <i>Avr4</i> en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....	37
Figura 7. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen <i>Avr4E</i> en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> de 8 cantones de la provincia de Tungurahua	38
Figura 8. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen <i>Avr9</i> en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....	39
Figura 9. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen <i>Ecp1</i> en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....	40

Figura 10. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp* 2 en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....41

Figura 11. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp* 4 en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....42

Figura 12. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp* 5 en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.....43

RESUMEN

Cladosporium fulvum o moho de la hoja es un patógeno descrito por Cooke en el año de 1883, desarrollándose en el cultivo de tomate con gran facilidad debido a condiciones favorables de temperatura y humedad. Para la presente investigación se tuvo como objetivo “Caracterizar molecularmente genes de avirulencia del agente causal del moho de las hojas de *Solanum lycopersicum* L en la provincia de Tungurahua”. Para la caracterización molecular de genes se procedió con la extracción del ADN fúngico de cada cantón (Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo) que consistió en liofilizar el micelio, triturar y colocarlos respectivos tampones (Tampón A Naoh + Tween 20 y Tampón B Tris Hcl + Edta) y se conservó el ADN extraído a -20°C. Para la amplificación mediante el PCR convencional se estandarizaron las condiciones de amplificación para cada *Avr* y *Ecp* y su proceso en el que se utilizó dNTPs, Taq DNA Polymerase, primers forwad- reverse, agua ultrapura teniendo 25 µl de reacción. Para la visualización se realizaron geles al 1% de agarosa con el buffer de corrida TAE 1X y se utilizó un marcador molecular de 100bp (Invitogen). Teniendo como resultados la presencia del gen de avirulencia *Avr2* y *Avr4E* constatando así también la ausencia del *Avr4* y *Avr9*, mientras que para las proteínas extracelulares se presenta el *Ecp2*, *Ecp4* y *Ecp5* de modo que para *Ecp1* no reconoce presencia del gen.

Palabras claves: avirulencia, amplificación, gen, *Avr*, *Ecp*

SUMMARY

Cladosporium fulvum or leaf mold is a pathogen described by Cooke in 1883 that develops easily in tomato crops due to favorable temperature and humidity conditions. For the present investigation, the objective was to "Molecularly characterize avirulence genes of the causal agent of the mold of the leaves of *Solanum lycopersicum* L in the province of Tungurahua". For the molecular characterization of genes, fungal DNA was extracted from each canton (Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro, Tisaleo), which consisted of lyophilizing the mycelium, crushing and placing the respective buffers (Buffer A Naoh + Tween 20 and Buffer B Tris Hcl + Edta) and the extracted DNA was stored at -20°C. For amplification using conventional PCR, the amplification conditions for each *Avr* and *Ecp* and their process were standardized, using dNTPs, Taq DNA Polymerase, forward-reverse primers, and ultrapure water with 25 µl of reaction. For visualization, 1% agarose gels were made with the running buffer TAE 1X and a 100bp molecular marker (Invitogen) was used. Having as results the presence of the *Avr2* and *Avr4E* avirulence gene, thus also verifying the absence of *Avr4* and *Avr9*, while for extracellular proteins *Ecp2*, *Ecp4* and *Ecp5* are presented so that for *Ecp1* it does not recognize the presence of the gene.

Keywords: avirulence, amplification, gene, *Avr*, *Ecp*

Introducción

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es originaria de los Andes y posteriormente fue introducido a Europa en el siglo XVI, fue considerada al principio como una planta ornamental; sin embargo, en la actualidad se encuentra distribuido en todo el mundo convirtiéndose en un cultivo modelo que representa un alto valor económico debido a su gran demanda de producción y comercio (Paduchuri *et al.*, 2010). Este cultivo se caracteriza por ser un alimento protector rico en licopeno, flavonoides, betacaroteno, vitamina C y derivados del ácido hidroxicinámico (FAOSAT, 2011). En Ecuador existen 3 333 hectáreas de tomate, considerado como uno de los principales países productores en la región andina, con una producción de 61426 toneladas al año. Entre las principales provincias que mayor producción obtienen se destacan Tungurahua y Pichincha con un rendimiento de 140 y 180 toneladas por hectárea en cada ciclo, respectivamente, utilizando para su producción semillas certificadas con sistemas de producción bajo invernadero que permite producir en cualquier época del año mientras exista una fertilización, riego e infraestructura adecuada (MAG, 2019).

Se puede indicar que entre las enfermedades fúngicas de importancia del cultivo de tomate está el “moho de las hojas” cuyo agente causal es el hongo *Cladosporium fulvum* (Cooke, 1883). Este hongo afecta las plantas de tomate cuando se encuentra con alta humedad por lo que es muy común bajo invernadero, los síntomas se observan solo en las hojas más viejas y progresivamente se extiende a la parte superior de planta ocasionando necrosis.

El patógeno comienza a esporular en las hojas más viejas sobre el envés, llegando a sobrevivir como saprófito en restos de cosecha y a nivel de campo; sin embargo, pueden existir semillas contaminadas y volverse una fuente de inóculo convirtiéndose en un vehículo de distribución del hongo (INIA, 2010).

Se considera que uno de los métodos de control de la enfermedad que se utiliza en la actualidad a nivel mundial es el uso de productos químicos en el que se recomienda aplicaciones semanales con fungicidas, ya sean sistémicos o de contacto con el objetivo de garantizar un alto porcentaje de protección en el cultivo (MINAGRI, 2006). Así también mediante estudios del agente patógeno se ha mejorado las medidas de control, mediante mejoramiento y desarrollo de variedades (McDonald y Linde, 2002).

En la interacción del tomate con *C. fulvum* cumple con la relación gen-gen en la que cada avirulencia de patógeno (*avr*), su producto génico es reconocido por una proteína receptora codificada por un gen de resistencia del huésped dominante correspondiente (Stergiopoulos y De Wit, 2009). Las proteínas *Avr* cumplen funciones duales, en ausencia de una proteína receptora coincidente en la planta, estas contribuyen a la virulencia y sirven como proteínas efectoras que facilitan la colonización apoplásica de las hojas (interacción compatible). Sin embargo, en las plantas de tomate que llevan receptores, las proteínas efectoras coincidentes se reconocen y desencadenan una respuesta de resistencia mediada por una interacción incompatible. Esto generalmente se asocia con una respuesta hipersensible (HR) y por la acumulación de calosa que es la acumulación de glucosa unida entre sí, fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Heath, 2000).

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, en la presente investigación se realizó la caracterización molecular de genes de avirulencia del agente causal del moho gris de la hoja de *S. lycopersicum* L, mediante la utilización de un protocolo para obtener ADN y de cebadores específicos (*Avrs*) para *C. fulvum*, los resultados de esta investigación se mostrarán en la expresión presencia/ausencia de los genes de *C. fulvum*.

CAPÍTULO I

1.1 Antecedentes Investigativos

De acuerdo con Lucenti *et al.* (2021) en el artículo científico sobre *Fulvia fulva* las razas en Argentina están evolucionando a través de cambios genéticos que portan secuencias de genes polimórficos avr y ecp”, plantea el objetivo de ampliar el análisis de *C. fulvum*, con el propósito de evaluar la expresión de genes de avirulencia de tal manera que se pueda valorar el potencial desarrollo de mecanismos para el manejo del moho de la hoja en el cultivo de tomate.

Mientras, Peteira (2011) en su investigación titulada “Caracterización de aislados de *Passalora fulva* provenientes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de cultivo protegido”, menciona como objetivo caracterizar aspectos culturales, fisiológicos, genéticos y patogénicos de aislados de *P. fulva*. En la metodología se encuentran los métodos y materiales como es la toma de muestras, identificación y aislamiento, purificación de los aislados, caracterización cultural, variabilidad patogénica y la determinación de genes de avirulencia y genes codificantes para las proteínas de *P. fulva*. Este autor determinó la presencia de razas fisiológicas en Cuba lo cual es vital para diseñar programas de mejoramiento genético para obtener cultivares resistentes.

Los estudios publicados por Bernal *et al.* (2020), en su investigación titulada “El patosistema *Solanum lycopersicum* – *C. fulvum* en las condiciones de cultivo protegido tropical en Cuba” mencionó como objetivo la caracterización cultural, patogénica y molecular de 36 aislados de *C. fulvum*. Dentro de la metodología encontramos aislados en medio de cultivo PDA a una temperatura de 25° C, reacciones PCR en la que se usó una desnaturalización a 94°C durante 5 minutos y continuamente por 30 segundos. Los resultados obtenidos fueron que los aislados

mantuvieron características homogéneas que no tienen relación con la variabilidad patogénica es decir no se encontró variabilidad cultural, mostrando que algunas cepas de *C.fulvum* pueden dominar al gen de resistencia Cf9 mediante una prueba de amplificación del gen Avr9.

Así también, Novack *et al.* (2021), en el artículo titulado “Caracterización del patógeno del moho de la hoja del tomate, *P. fulva*, en Croacia”, indica en su objetivo establecer medidas de control sostenibles ante la presencia de *P.fulva*. Dentro de la metodología se halla la recolección de 17 muestras, aislamiento e inoculación en cultivares con diversos genes de resistencia y sin genes de resistencia. Los resultados alcanzados fueron la presencia de síntomas en 11 aislados de raza 2 y dos aislados de raza 5 en el cual se mostró una inserción de adenina en comparación con la secuencia del Avr2. Se concluye que la patogenicidad de este hongo pone a prueba una vez más los niveles de polimorfismo.

Mesarich (2016), en su artículo titulado “Nuevas mutaciones detectadas en genes de avirulencia que superan los genes de resistencia a *Cf* del tomate en aislamientos de una población japonesa de *C. fulvum*”, mencionó en su objetivo demostrar las variaciones moleculares de genes en cultivares de tomate mediante aislados. Dentro de la metodología se encuentra materiales y métodos como utilización de aislamientos de hongos y ensayos de virulencia, manipulación y secuenciación de ADN, expresión mediada por PVX de Avr genes en plantas de tomate que se realizara con el fin de confirmar modificaciones en su ADN. Los resultados obtenidos mostraron modificaciones en el ADN y en la secuencia de los genes Avr4, Avr4E y Avr9 superando la actividad inductora de nuevas proteínas mutantes desarrolladas en las nuevas razas japonesas. Se concluyó que debido a ciertas modificaciones codificaron los genes de avirulencia por lo que se presentaron Avrs inestables.

En la investigación realizada por McGilp (2018), titulada “Caracterización de *P. fulva* y hongos asociados con el moho de la hoja del tomate en túneles altos de Minnesota y el manejo de enfermedades comunes del tomate de túnel alto”, planteo el objetivo de evaluar mediante técnicas moleculares y funcionales del moho de las hojas de tomate. Dentro de la metodología se utilizó una colección de 93 *P. fulva* evaluados con técnicas específicas secuenciando el ADN obteniendo como resultados mutaciones en el *Avr2* lo que produjo una proteína no funcional conjuntamente con el *Avr4E* y *Avr9*. Se concluyó que la prevalencia de este patógeno en los cultivares de tomate se debió a la humedad alta y a la presencia de diversas mutaciones en las secuencias de genes.

Mientras que, Rivas y Thomas (2005), en el artículo titulado “Interacciones moleculares entre el tomate y el patógeno del moho de la hoja *C. fulvum*”, mencionó que la interacción entre el tomate y el patógeno es mediada mediante la relación entre los productos de los genes R de la planta y los productos de los genes Avr de los aislados de *C. fulvum*. Esta relación se establece bajo el modelo gen por gen el cual forma parte de la base molecular en el reconocimiento de proteínas que registran péptidos de avirulencia (Avr) que son secretados durante la infección de la hoja. Dando como resultado la percepción de los productos Avrs por las proteínas receptoras de la planta que conlleva a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) llegando a activar la proteína quinasa que produce cambios de expresión génica desencadenando respuestas de hipersensibilidad (HR).

Finalmente, Lucentini *et al.* (2017) en el artículo científico titulado “Identificación de razas de *C. fulvum* amplificando Avrs”, tuvo como finalidad conocer profundamente la diversidad de las poblaciones del patógeno es así que con este fin como metodología se realizaron aislamientos del moho gris de la hoja mediante cultivos monospóricos en el que se tomaron pequeñas muestras del material para la extracción del ADN genómico en el que se amplificaron en cada uno de los *Avr2*,

Avr4, *Avr4E* y *Avr9*. Por lo que gracias a estas pruebas se puede constatar como resultados que los genes de avirulencia corresponden a la raza 0 y 2. Se concluye que los niveles de polimorfismo de estos aislados aún restan por estudiar debido a la prevalencia de varias poblaciones de *C. fulvum*.

1.2 Categorías fundamentales o Marco Conceptual

1.2.1 Taxonomía de *C. fulvum*

Reino Fungi

Este reino se encuentra compuesto por al menos 144.000 especies de diferentes hongos, forma parte conjuntamente con el reino Plantae, reino Animalia, reino Protista, reino Monera denominados reinos taxonómicos de la evolución biológica que abarca todas las formas de vida existentes en nuestro planeta tierra, pertenecen a los organismos eucariotas su diversidad de modos de vida y estructuras que resaltan la biodiversidad denominándolos hongos verdaderos en este grupo se incluyen cinco entidades: Filum *Chytridiomycota*, Phylum *Zygomycota*, Filum *Glomeromycota*, phylum *Ascomycota* y Filum *Basidiomycota* (Kuhar, 2013).

La mayoría de hongos son heterótrofos descomponedores debido a que su alimentación está basada en restos orgánicos ocasionando un efecto positivo en el reciclado de la materia y liberación de nutrientes como son los sulfatos, nitratos, fosfatos poniendo en un estado de disponibilidad para la absorción de las plantas (Madigan, 2015). Su metabolismo puede ser primario que influye en el crecimiento de los hongos, actuando en la estructura celular o interactuando en el metabolismo energético debido a que posee ácidos grasos, aminoácidos, nucleótidos; en el metabolismo secundario corresponde a la biosíntesis originados de compuestos poliquétidos, péptidos, terpenos y alcaloides que necesitan de dos o más enzimas-proteicas que están relacionadas en su ruta metabólica (Cepero, 2012).

Pudiendo indicar, que estos organismos están distribuidos en un amplio rango de hábitats con ambientes como zonas salinas, desiertos, fondos marinos, radiación ionizante poseen una resistencia en la pared celular compuesta por quitina la cual actúa como una capa protectora, existe una diversidad de formas, tamaños y colores sin embargo carecen de un sistema eficaz en cuanto se refiere al transporte de sustancias debido a que no posee fases móviles, su cuerpo se lo denomina como micelio que consiste en filamentos largos conocidos como hifas dando así paso a su reproducción que puede ser sexual o asexual también sus metabolitos secundarios son en cierto porcentaje idénticos o semejantes al reino vegetal (Vaupotic, 2008).

En todo caso, se tiene una estrecha relación con los hongos y forman parte de nuestro diario vivir ya que los utilizamos para la obtención de alimentos y bebidas aprovechando no solo al máximo sus propiedades bioquímicas y metabólicas sino también su consumo puede realizarse de manera directa como es el caso de setas y hongos comestibles por otro lado cumplen un papel fundamental en la industria de los fármacos debido a que poseen la cualidad de tener inmunosupresoras y anti-epidémicas.

1.2.2 Phylum Ascomycota

Es considerado como uno de los filums más numerosos, caracterizado generalmente por la presencia en su ciclo de vida una célula ascógena, llamada asco que produce endógenamente ascosporas este a su vez puede adquirir diversas formas ya sea de forma redondeada y copa, mantienen una gran importancia ecológica debido a que colonizan de forma muy rápida diferentes hábitats de manera que degradan la materia orgánica así como también moléculas biológicas resistentes, además algunos de estos hongos actúan como parásitos causando pérdidas económicas muy graves en el sector agrícola (Raghukumar, 2017).

1.2.3 Género *Cladosporium*

Es considerado como un grupo de mohos interiores y exteriores que generalmente se caracterizan por tener colonias de color verde olivo y en algunos casos marrón sus conidios mantienen una forma de cadenas ramificadas o simples con esporas muy frágiles, sin embargo se encuentran relacionados con el orden *Dothideales* por ser hongos filamentosos, además poseen la capacidad de crecer fácilmente en medios de glucosa o NaCl al 12-17% (Dugan *et al.*, 2004) .

1.2.3.1 Tipos de ascas

Las ascas poseen un alto número de ascosporas generalmente ocho estas tienen formas variadas como globosas, rectangulares que cuando llegan a su estado de madurez estas salen al exterior de manera protunicadas considerada la pared más frágil y delgada que se rasga al dispersar esporas; unitunicadas ya sea por poros y bitunicadas posee dos capas la cual una sale al echar las ascosporas (García, 2005).

1.2.3.2 Reproducción

Este tipo de hongos pueden ser unicelulares como pluricelulares debido a que presentan estructuras filamentosas o denominadas hifas la cual forman un micelio o filamentos cortos de manera que parezca un cuerpo vegetativo de un hongo; los ascomicetos pueden reproducirse de manera sexual o teleomorfo como también asexual o anamorfo dependiendo de las condiciones ambientales; sin embargo prevalece la reproducción asexual ya sea por gemación o simple fisión de manera que actúa de forma efectiva y útil en condiciones favorables, considerados como heterótrofos debido a que no son capaces de generar su propio alimento (Cepero, 2012).

1.3 Moho de la hoja del tomate (*Cladosporium fulvum*)

El patógeno fue descrito por primera vez en el año de 1883 por Cooke en Inglaterra, mediante unas muestras de hojas enviadas desde Estados Unidos (Cooke, 1883). El cultivo de tomate fue llevado a Europa desde Centroamérica en el siglo XVI, por lo que la enfermedad era absolutamente desconocida y fue descrita rápidamente, se estima que las condiciones como humedades altas se previniera la enfermedad; sin embargo, el cultivo intensivo bajo cubiertas crea ambientes que facilitan la diseminación del patógeno (Makemson, 2008). En este artículo científico se informa que *C. fulvum* en condiciones favorables como es la temperatura y la humedad en el cultivo de tomate en invernaderos la infección sea rápida.

1.3.1 Importancia

Según Thomma *et al.*, 2005 mencionó que el moho de la hoja del tomate es causado por *C. fulvum* (*sin. F. fulva, P. fulva*) considerada como una enfermedad destructora que se encuentra con frecuencia, además de encontrarse distribuida a nivel mundial se la catalogó como uno de los patógenos relevantes debido a su aparición en condiciones de alta humedad relativa de 90% con temperaturas medias de 24 °C, aunque puede presentarse también en temperaturas entre 10°C y 32°C, sin embargo, no se presentan en humedades inferiores al 85%.

1.3.2 Taxonomía

C. fulvum, según la filogenia y morfología del reino Fungi se la clasificó en el filum Ascomycota, clase *Dothideomycetes*, en el orden *Capnodiales*, y en la familia *Mycosphaerellaceae*; su morfología presenta conidióforos con dilataciones nudosas en un lado por lo que se desarrollan ramas laterales cortas, sus conidios son elipsoides

o cilíndricos con superficies curva, lisa o recta de al menos 16-40 x 5-7 μm generalmente de color verde pardo u oliva (Crous, 2007). Se ha descubierto que de acuerdo al genoma que posee *C. fulvum* se encuentra relacionado con algunos patógenos como son los del género *Mycosphaerella*, además su morfología tiene una interacción similar ya que se comporta como un patógeno biotrófico, que ingresa por las hojas colonizando específicamente las células del mesófilo (Beveraggi *et al.*, 2015).

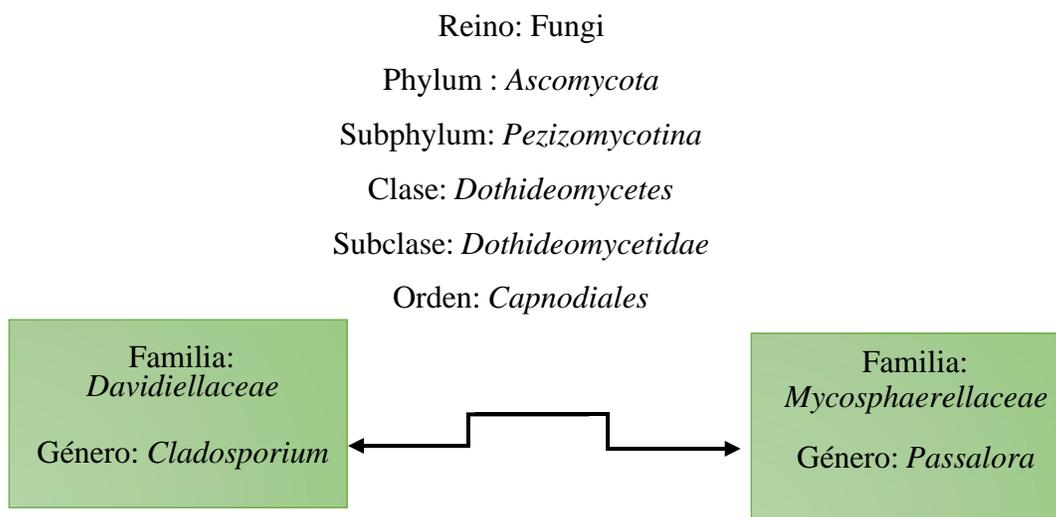


Figura 1. Ubicación taxonómica **Fuente:** (Crous,2007)

1.3.3 Ciclo de la enfermedad

Este patógeno causante del moho gris de la hoja del tomate es capaz de sobrevivir a temperaturas muy bajas de manera saprófita ya sea sobre los despojos del cultivo en suelo durante un año; generándose así condiciones favorables para su desarrollo el cual dará origen a los conidios por lo que se le considera como el principal agente de infección estos se fijan en la superficie de las hojas produciendo hifas, la cual ingresaran por estomas abiertos que colonizaran la célula , los síntomas principales aparecerán en los primeros 10 días después de la inoculación por lo que su propagación entre plantas es totalmente rápida mediante liberación de conidios que

se suspenden aéreamente, también pueden dispersarse mediante sistema de riego, herramientas agrícolas, viento, insectos y la ropa de los jornaleros infectado tanto hojas nuevas como viejas (Franco, 2019).

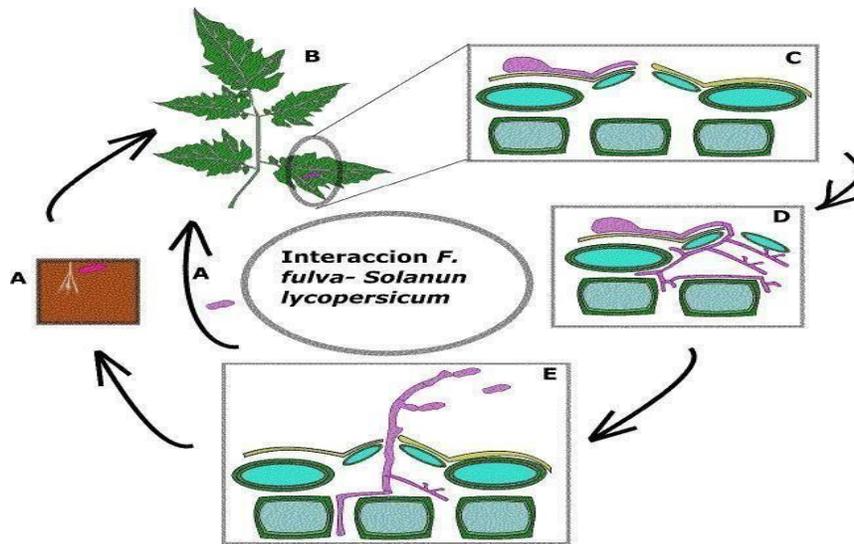


Figura 2. Ciclo infeccioso *C.fulvum* en el cultivo de tomate. A) Conidios en reposo en condiciones favorables. B) Fijación del conidio en la hoja. C. Germinación de los conidios y crecimiento del tubo germinativo. D) Penetración del micelio en la cámara subestomática. E) Conidióforo emergiendo a través del estoma soportando conidios en sus ramas laterales. **Fuente:** (Franco, 2019)

1.4 Interacción compatible e incompatible gen a gen

Según (Laugué *et al.*, 2000) denomina interacción compatible a la infección de plantas de tomate de carácter susceptible al patógeno con cepas virulentas de *C. fulvum*. Una vez que el hongo se encuentra al interior de la hoja las hifas comienzan a incrementar su biomasa, se extiende el crecimiento filamentoso, se engrosa y da origen a hifas secundarias que colonizan los espacios intercelulares del parénquima mesofílico. La pared celular vegetal que tiene contacto directo con la hifa, muestra

una degradación debido a la producción de enzimas secretadas como la melanina por el patógeno, por lo que la biomasa fúngica se agrupa al contorno del tejido vascular seguramente debido a que en el floema hay una gran concentración de sacarosa. *C. fulvum* produce una invertasa en el líquido apoplástico que hidroliza la sacarosa, convirtiéndola en fructosa y glucosa; que se transforma y es absorbido por el manitol deshidrogenasa (MDH) fúngica la cual es un carbohidrato que no es asimilado por la planta (Thomma, 2005).

Considerando que, una vez que los cultivares de tomate son resistentes a la enfermedad al momento de la infección los conidios de *C. fulvum* reaccionan de manera incompatible por lo que las plantas no logran enfermarse, mientras que las hifas que están en contacto con el mesófilo del huésped en su gran mayoría colapsan por la presencia de una acumulación de fitoalexinas y proteínas que están estrechamente ligadas con la patogénesis, teniendo como característica principal de esta interacción incompatible es la hipersensibilidad (HR) logrando que se detenga el crecimiento del hongo que la infección fracase ya que desencadena una serie de respuestas de defensa (Cai *et al.*, 2007).

1.5 Técnicas moleculares

1.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el año de 1975 Sanger, de acuerdo a su conocimiento en la replicación de ADN, diseñó un método con el propósito de generar secuencias de ADN *in vitro* mediante el uso de secuencias cortas de oligonucleótidos que desempeñan el rol de iniciadores o también denominados primers con secuencias conocidas; sin embargo, pueden ser elaborados al azar, pero siempre se encontrará una zona homóloga en el extremo 5' y 3' de la cadena de ADN, comprobándose la exuberancia de nucleótidos y

oligonucleótidos y gracias a la presencia de la enzima ADN polimerasa y replicando escenarios para la iniciación de hebras, fue posible no solo sintetizar un fragmento sino hacerlo de manera más rápida lo cual provocó un impacto de esta tecnología conocida generalmente como PCR conjuntamente con el descubrimiento de taq polimerasa (Mas *et al.*, 2016).

Esta síntesis de ADN posee tres etapas la desnaturalización que consiste en el rompimiento de los hidrógenos a una temperatura de 92° -95° C, el apareamiento se unen los primers con las hebras del ADN con un notorio descenso de temperatura dependiendo de la secuencia y el tamaño del primer, síntesis de las hebras nuevas con una temperatura de 72° C con el propósito que la taq polimerasa realice su función se tendrá como resultado una copia de ADN (Díaz *et al.*, 2014).

1.5.2 Cebadores específicos *C.fulvum*

(Stergiopoulos *et al.*, 2009) menciona que la patogenicidad de *C.fulvum* es un conjunto de proteínas que se muestran durante la invasión y colonización del cultivo de tomate estas a su vez forman parte de los factores que actúan al interactuar con los efectores *Avr2, Avr4, AvrE* y *Avr9* o denominadas proteínas de avirulencia con sus respectivas proteínas extracelulares *Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5* estos cebadores son conocidos actualmente, por lo que se expresan en plantas y no en cultivares axénicos. Sin embargo, estos efectores poseen diferentes funciones que están estrechamente relacionadas con la avirulencia del tomate, así se tiene:

Avr2: Es considerada como una proteína madura que contiene 58 aminoácidos y ocho porciones de cisteína la cual participan en la formación de cuatro puentes de disulfuro (Luderer *et al.*, 2002). El efector *Avr2* es considerado un factor de avirulencia que es secretado en el apoplasto, debido a su alto contenido de enzimas hidrolíticas, la cual influyen en la estabilidad de la proteína mejorando el potencial para inhibir diversas

proteasas cisteínicas extracelulares propia de la planta de tomate (Van Esse *et al.*, 2008).

Avr4: El gen Avr4 codifica una pre-proteína de 135 aminoácidos también considerado como una lectina de unión hacia la quitina llegando a proteger la pared celular fúngica cumpliendo un rol importante de defensa durante la infección, una vez que se encuentra en su forma madura posee 86 aminoácidos y ocho porciones de cisteína la cual se incluye en la formación del puente de disulfuro (Van den Burg *et al.*, 2006).

Avr4E: El gen Avr4E codifica una proteína rica en cisteína la cual está compuesta en su forma madura por 101 aminoácidos, sin embargo, su función específica aún no se ha descrito (Westerink, 2004).

Avr9: Este gen codifica una proteína que contiene 63 aminoácidos, la cual al llegar a su estado de madurez es secretada y procesada en un péptido de 28 aminoácidos que tiene seis porciones de cisteína los cuales forman puentes de disulfuro dando origen a una estructura de nudo de cistina, donde la quinasa interactúa con el dominio citoplasmático (Nekrasov *et al.*, 2006).

Proteínas efectoras ECP: Las proteínas efectoras que se han identificado en los fluidos apoplásticos de las hojas de tomate con *C. fulvum* son Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 científicamente no se encuentran caracterizadas funcionalmente; sin embargo, existen estudios de su presencia en todas las razas de *C. fulvum* cumpliendo un rol fundamental en su avirulencia y seguramente en la actividad metabólica del hongo (Stergiopoulos *et al.*, 2010).

1.6 Unidad de análisis

1.6.1 Cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum L.*)

El tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) es originario de los Andes de América del sur, rápidamente se importó a Europa en el siglo XVI, cultivándose en la actualidad en todo el mundo se le considera como una de las hortalizas de mayor importancia económica debido a su alta distribución (Raiola, 2014). Debido a su alto valor nutricional como licopeno, vitamina C, flavonoides, β -caroteno entre otros derivados del ácido hidroxicinámico, su alta demanda se debe a que posee propiedades anticancerígenas y antioxidantes este descubrimiento dio paso al estudio en la ingeniería genética y la biotecnología vegetal que ha permitido a los productores aumentar producción, llegando a ocupar el séptimo lugar (Guzmán *et al.*, 2017).

1.6.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo con (Esquinas *et al.*, 2001), el tomate se clasifica taxonómicamente en:

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

Tabla N°1. Taxonomía del tomate

1.6.3 Descripción botánica del tomate

La planta de tomate pertenece al género *solanum* de la familia solanaceae, alcanzando una altura de 20-80 pulgadas, formado por un tallo principal y varios tallos secundarios mostrándose inicialmente como rastrero o erecto (López, 2016). Suracimo floral tiene su formación hasta después de tener 10 hojas teniendo al menos de 2 a 12 flores hermafroditas abriéndose sucesivamente esta flor posee un diámetro de $\frac{3}{4}$ de pulgada que posee un cáliz verde con seis lóbulos, corola amarilla con seis pétalos y seis sépalos, como segunda etapa abarca el cuajo de los frutos el cual se convierte en uno de los principales receptores de los alimentos fotosintatos. conjuntamente con su etapa de producción, una vez que estos frutos maduren serán una baya camosa, fraccionada en dos con 18 lóculos, variando su tamaño con una superficie lisa de forma globosa, su color está influenciado con su estado de madurez además se tendrá la presencia de nuevas hojas con sus respectivos racimos florales llegando a una etapa final donde la planta detiene su crecimiento y desarrollo ya sea de manera natural o inducción (Escobar, 2009).

1.6.4 Requerimientos edafoclimáticos del tomate

El tomate es muy exigente en cuanto al tipo de suelo por lo que se recomienda tener un pH de 5 a 6.8 por lo que tolera la acidez de al menos 6400 ppm, requiere de texturas medianas y permeables. Se adapta a climas templados sin embargo en algunas zonas son cultivados bajo cubiertas con el propósito de crear el ambiente propicio (Infoagro Systems, 2016).

Este cultivo requiere de una temperatura óptima de 20 a 30 °C en el día mientras que en la noche se necesita de 1 a 17°C, por lo que al tener temperaturas

superiores o inferiores a las indicadas se tendrían problemas en las plantas. Su humedad relativa se encuentra entre 60% y 80% garantizando un buen desarrollo tanto en la polinización como en la producción sin embargo el exceso de humedad da origen a presencia de enfermedades y desordenes fisiológicos, de igual manera es necesario tener una luminosidad reducida por lo que puede llegar a afectar en el proceso de fecundación (Díaz, 2007).

1.7 Etapas fenológicas del cultivo

Según (Cordoba *et al.*, 2018) indica que las etapas del cultivo de tomate son:

Fase	Días
Producción de la plántula	0 - 15
Trasplante	15- 30
Desarrollo vegetativo	1 - 30
Floración	28-36
Cuajo de frutos	55 - 60
Cosecha	85 - 90

Tabla N°2. Fenología del cultivo de tomate

1.8 Enfermedades y plagas del cultivo de tomate

1.8.1 Enfermedades

El tomate como todos los cultivos se ven afectados por un conjunto de plagas y enfermedades, estas presentan síntomas visibles e invisibles en los tejidos vegetales provocando necrosis parcial en hojas o la muerte en la planta perdiendo la

productividad y calidad del cultivo (Agrios, 2005). Sin embargo, estas patologías están influenciadas por tres factores como son:

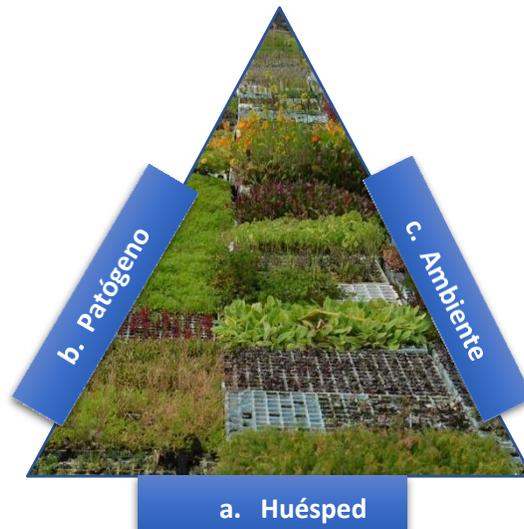


Figura 3. Triángulo de la enfermedad. **a.** huésped: planta; **b.** patógeno: agente causal; **c.** ambiente: entorno físico químico

Las enfermedades de las plantas presentan síntomas que causan manchas foliares, marchitez de la planta, podredumbre en raíz y tallos, de acuerdo a su etiología pueden dividirse en enfermedades de origen biótico que son provocadas por varios organismos que se encuentran relacionados con la planta ya que vive a expensas de esta; origen abiótico está ligada con los factores ambientales como son la temperatura, humedad, luz por lo cual la planta de tomate desarrolla rápidamente síntomas necróticos, parasitarias estas son originadas por hongos, virus, viroides, nematodos, bacterias, protozoos y plantas superiores parasitarias (Jones *et al.*, 2014).

Mal del talluelo esta enfermedad se presenta generalmente en los semilleros y puede ser causada por *Fusarium sp*, *Pythium sp*, *Sclerotium sp* y *Rizoctonia sp* este hongo ocasiona la pudrición de la raíz y el cuello de la planta su diseminación es rápida por lo que esta enfermedad es considerada una de las más importantes, por lo

que se recomienda realizar una adecuada desinfección en sustratos, bandejas, agua de riego y una aplicación de fungicidas cuando las plantas hayan emergido (Godoy *et al.*, 2018).

Tizón temprano su agente causal es *Alternaria solani* se desarrolla en zonas donde la lluvia y el calor son frecuentes este patógeno es capaz de sobrevivir en el suelo por lo que puede propagarse mediante semilla, y dispersarse con la ayuda del viento facilitando su penetración mediante heridas o lesiones de la planta provocadas por labranza ,una vez infectado el tejido vegetal se observaran en las hojas manchas irregulares con anillos de color café sin embargo la infección puede avanzar al pecíolo, tallo y frutos ocasionando que se forme hifas de color negro como hollín (Guzmán *et al.*, 2017).

Tizón tardío o también llamado mildiu, quemazón causada por el agente causal *Phytophthora infestans* Mill. se desarrolla con facilidad en temperaturas altas durante el día y temperaturas bajas en las noches generalmente los tejidos vegetales atacados son hojas, tallos y frutos su diseminación es rápida por el viento y es capaz de acabar con el cultivo en 1 o 2 semanas (Vasicek, 2015).

Oidio o cenicilla es considerada como una de las enfermedades de importancia en cultivos de invernadero debido a que a temperaturas altas y una baja humedad son condiciones favorables para su óptimo desarrollo su agente causal es *Oidium lycopersic* generalmente se manifiesta en hojas y tallos un polvo color blanco para su control es necesario eliminar la fuente de la enfermedad realizando un control de malezas y una aplicación de fungicidas (Godoy *et al.*, 2018).

1.8.2 Plagas

Minador proviene de *Liriomyza trifoli* Burgues que forman galerías en el haz de las hojas y se alimentan de estas hasta ocasionar picaduras por lo que estos daños ocasionan la reducción de la fotosíntesis de la planta además propician el ingreso de otros organismos como bacterias y hongos, es recomendable colocar trampas cromotrópicas de color amarillo (Gorini, 2018).

Mosca blanca es un insecto chupador de la especie *Bemisia tabaco* considerada una de las dañinas debido a que son portadoras de virus poseen un alto sistema de resistencia a los insecticidas además hoy en día se puede controlar con organismos biológicos como: *Nesidiocoris tenuis*, *Eretmocerus* spp, *Encarsia Formosa* sin embargo es necesario utilizar trampas, eliminación de malas hierbas y realizar podas constantemente (Gorini, 2018).

Pulgón verde, considerado un áfido de la especie *Myzus persicae* Sultzer son atraídos por colores de onda larga generalmente verde o amarillo se sitúan y se alimentan en el envés de las hojas debido a que extraen la savia ocasionando la debilitación de la planta hasta incluso puede ocurrir la transmisión de virus (Olivares, 2017).

Trips, provienen de *Frankliniella occidentalis* Pergande sus principales daños son de forma directa debido que forman picaduras y succionan el contenido de la célula vegetal, indirecta al ser transportador de virus perdiendo la planta su color, deformándose y llegar a la destrucción total del cultivo además posee una alta capacidad de dispersión y resistencia a insecticidas por lo que su manejo es considerado un reto (Vasicek, 2015).

1.9 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.9.1 HIPÓTESIS

Mediante el conocimiento de los genes de avirulencia en las poblaciones del agente causal del moho gris de las hojas de *S. lycopersicum* L en la provincia de Tungurahua, permitirá predecir la respuesta defensiva de cultivares de tomate con importancia comercial.

1.9.2 OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar molecularmente genes de avirulencia del agente causal del moho de las hojas de *Solanum lycopersicum* L en la provincia de Tungurahua.

Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo para obtener ADN fúngico de moho gris *C. fulvum*.
- Estandarizar el proceso de las condiciones para amplificar genes de referencia de *C. fulvum*.
- Amplificar los genes de avirulencia presentes en los aislados monospóricos de *C. fulvum*.

CAPÍTULO II

2.1 Enfoque de la investigación

El enfoque de la investigación fue cuali-cuantitativo. Para Hernández *et al.*, (2018), este enfoque vincula un conjunto de procesos empíricos, sistémicos y críticos que abarcan la recolección y análisis de datos con el fin de integrar y realizar inferencias del tema de estudio. Para ello se realizó una amplia búsqueda de información científica relacionada con la temática escogida, lo cual sirve de sustento bibliográfico de cada una de las variables de estudio, con la finalidad que el lector tenga una idea o juicio claro sobre la temática abordada.

2.2 Modalidad

En la presente investigación se utilizó la investigación bibliográfica-documental. Según (Tancara 2003) es un conjunto de métodos y técnicas de búsqueda que se encuentran sustentadas en investigaciones ya realizadas con el propósito de continuar con investigaciones interrumpidas. El sustento teórico se recopiló utilizando medios tecnológicos como el internet, bibliotecas y libros virtuales, así como textos, folletos, artículos científicos, entre otros.

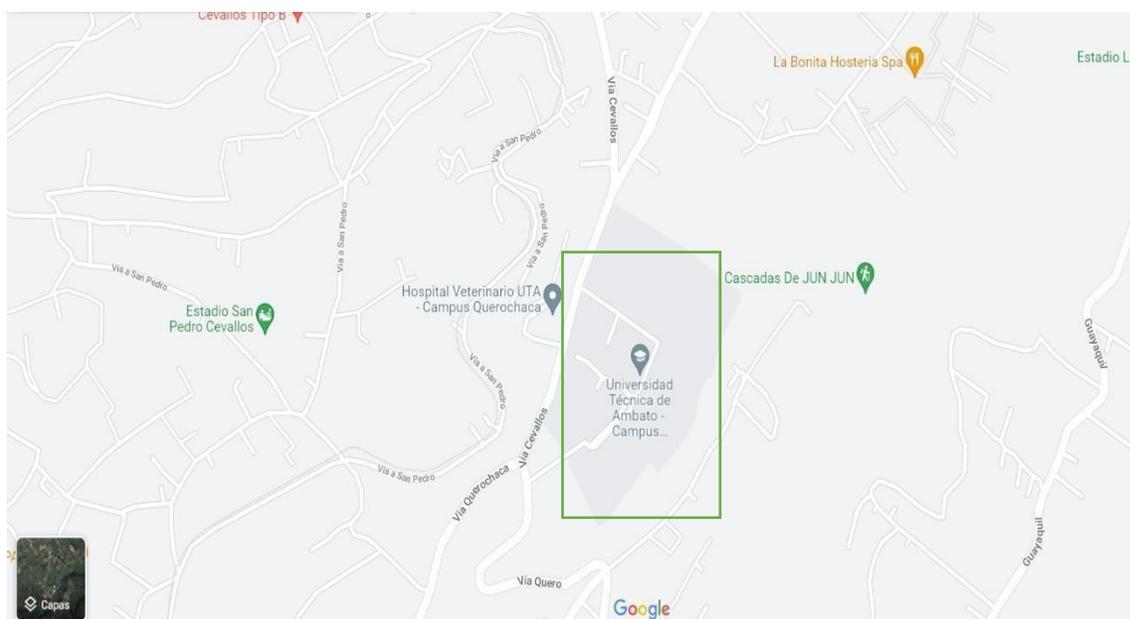
También se empleó la investigación experimental debido a que la investigadora manipula las variables de estudio, tomando el control tanto en aumento y disminución de las variables esperando observar el efecto en la variable dependiente (Murillo, 2011). En la investigación se conoció la presencia o ausencia de Avrs en los aislados del cultivo de tomate mediante pruebas PCR con la ayuda de muestras provenientes de la provincia de Tungurahua.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el cantón Cevallos en la provincia de Tungurahua en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en los laboratorios de investigación.

Figura 4. Ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - UTA



2.3.2 Características del lugar

La Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, en el cantón Cevallos se localiza a una altitud de 2800 msnm, en sus coordenadas geográficas son $01^{\circ} 24' 27''$ de latitud Sur y $78^{\circ} 35' 00''$ de longitud al Oeste, ubicado al Sureste de Ambato a 19.31 km.

2.4 EQUIPOS Y MATERIALES

2.4.1 Equipos

- Agitador vortex (Thermo Scientific, 88882009)
- Autoclave (Midmark, M11®)
- Balanza de precisión (Ohaus®, EX124)
- Bloque térmico (Thermo Scientific, 13687720)
- Cabina de flujo laminar (Thermo Scientific, 1300)
- Destilador de agua (Thermo Scientific, Barnstead EasyPure II)
- Incubadora (Pol-Eko-Aparatura, Cln 115)
- Liofilizadora (Labconco, FreeZone 4.5)
- Microondas (Samsung, MS32J5133EM-AP)
- Microscopio (MOTIC, BA210LED)
- PCR convencional (Thermo Scientific, A48141)
- Refrigeradora (Indurama, A48141)
- Sistema de imagen táctil ENDURO GDS
- Ultracogelador (Thermo Scientific - TSX60086A)

2.4.2 Materiales

- Hojas de tomate
- Mechero
- Medio de cultivo MS
- Micropipetas (Thermo Scientific, Finnpiptette™ F2 GLP ,0,2 a 1000 µl)
- Papel de aluminio
- Parafilm (Sigma-Aldrich)
- Primers (Invitrogen)

Cebadores específicos (5'-3')

Cebadores específicos (5'-3')

<i>Avr2</i>		<i>Ecp1</i>	
F	CAT CAG CAT ATC CTC TTC CAT CC	F	ACC AGG ATA AGT TCG CAG TC
R	CAG TAC GTT CAA AAG CAG ATA AGG	R	GCC TCC GCG ATG CTT CCT
<i>Avr4</i>		<i>Ecp2</i>	
F	ACG GTA GGT CTG TAC ACG AGC C	F	GTC CAA GGA TCG TGT CTC AAG
R	AAC GAA CTG GGT CAT GGA ATG	R	TTC TAG CAA ACC CGT CTG A
<i>Avr4E</i>		<i>Ecp4</i>	
F	GCC CGG TAT ATC GCT GTG C	F	AAC CTA ACA TCA CAA TCT TCA A
R	CGG AAC CCC TGG CTG AGA	R	TTG CTC AAG CCC AGA CAG
<i>Avr9</i>		<i>Ecp5</i>	
F	AAT ACA ACC TTG AAA CAG CTA GG	F	TAT GAA CAC TTT TAC TCT ACT C
R	GGA CTC TAC GGG GCT TGG	R	CGC GTC GCC TGA TAG AT

Tabla N°3. Cebadores específicos de *C.fulvum*

- Puntas para micropipetas (VQIR, 500PCS, 0,2µl, 20µl,1000µl)
- Racks para PCR (Sigma-Aldrich, R6901-5EA)
- Racks para tubos eppendorf (Sigma-Aldrich, R6151)
- Tubos de ensayo de 10 ml con tapa
- Tubos eppendorf (Brand,1.5 ml)

2.4.3 Reactivos

- Agarosa (Thermo Scientific, catálogo R0491)
- Agua destilada
- Agua ultrapura (Invitrogen, catálogo 1191548)
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, catálogo E1510-10ML)
- Buffer TAE (Invitrogen, catálogo 2452551)
- EDTA (Sigma-Aldrich, catálogo E9884)
- Etanol (Thermo Scientific, catálogo 64-17-5)
- NaOH (Sigma-Aldrich, catálogo MFCD00003548)
- Tampón de extracción A (Naoh + Tween 20)
- Tampón de extracción B (Tris Hcl + Edta)
- Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific, catálogo 00851647)
- Trackit 100 bp dna ladder (Thermo Scientific, catálogo 10488058)
- Tris HCl pH 8 (Invitrogen, catálogo,15568025)
- Tween 20 (Invitrogen, catálogo LL153030)

2.5 FACTORES DE ESTUDIO

2.5.1 Factor N°1. Procedencia de los aislados

Cantones
Ambato
Pelileo
Patate
Cevallos
Píllaro
Tisaleo
Baños
Quero

Tabla N°4. Cantones de la provincia de Tungurahua

2.5.2 Factor N°2. Genes de avirulencia en el genoma de los aislados

Proteínas de avirulencia	Proteínas extracelulares
<i>Avr2</i>	<i>Ecp1</i>
<i>Avr4</i>	<i>Ecp2</i>
<i>Avr4E</i>	<i>Ecp4</i>
<i>Avr9</i>	<i>Ecp5</i>

Tabla N°5. Proteínas de avirulencia y extracelulares

2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Completamente aleatorizado DCA, donde de cada aislado se verifican la presencia o ausencia de los genes de avirulencia seleccionados mediante corrida de dos geles de agarosa.

2.7 MANEJO DEL EXPERIMENTO

2.7.1. Objetivo 1. Estandarización del protocolo para obtener ADN fúngico de moho gris *C. fulvum*.

El material fúngico que se utilizó fueron los aislados monospóricos de *C. fulvum* (Tabla N°6).

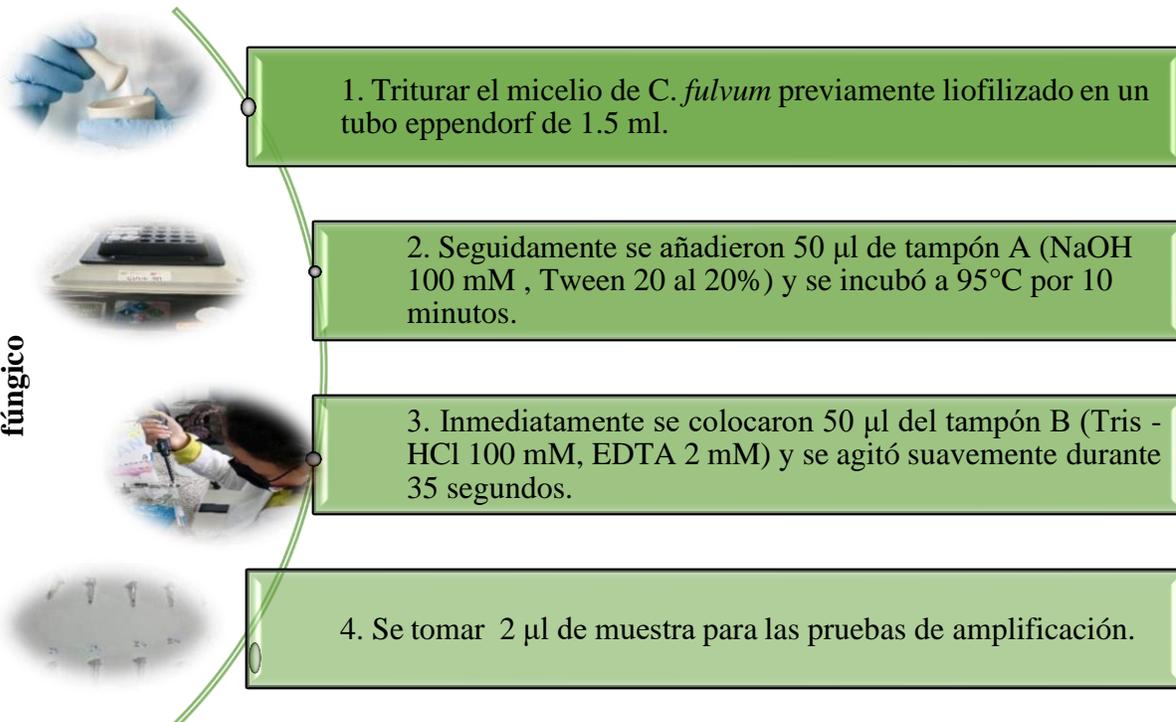
Cantón	Código
Ambato	CC-UTA-Cf-AA101
Baños	CC-UTA-Cf-FB102
Cevallos	CC-UTA-Cf-FC101
Mocha	CC-UTA-Cf-FM207
Patate	CC-UTA-Cf-AP105
Pelileo	CC-UTA-Cf-AP103
Píllaro	CC-UTA-Cf-AP207
Tisaleo	CC-UTA-Cf-FT104

Tabla N°6. Códigos colección de *C. fulvum*

Estos aislados se encuentran depositados en la colección de cultivo microbiano del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato acorde con los resultados obtenidos por (Jácome, 2022).

Para el aislamiento del ADN fúngico de los aislados seleccionados se siguió el esquema siguiente:

Protocolo de extracción de ADN
fúngico



2.7.2. Estandarización del proceso y las condiciones para amplificar los genes referencia de *C. fulvum*.

Las condiciones de amplificación para el programa PCR de los genes que codifican para las proteínas de avirulencia y las proteínas extracelulares de los aislados de *C. fulvum* acorde con lo resumido en las siguientes tablas:

Cebadores específicos (5'-3')

<i>Avr2</i>	
F	CAT CAG CAT ATC CTC TTC CAT CC
R	CAG TAC GTT CAA AAG CAG ATA AGG
<i>Avr4</i>	
F	ACG GTA GGT CTG TAC ACG AGC C
R	AAC GAA CTG GGT CAT GGA ATG

	<i>Avr4E</i>
F	GCC CGG TAT ATC GCT GTG C
R	CGG AAC CCC TGG CTG AGA
	<i>Avr9</i>
F	AAT ACA ACC TTG AAA CAG CTA GG
R	GGA CTC TAC GGG GCT TGG

Tabla N°7. Cebadores específicos utilizados en el estudio de determinación de genes de avirulencia (*Avr*) de *C.fulvum*

Avr2	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1
2	Desnaturalización	94°	30 segundos	34
3	Hibridación	54°	30 segundos	
4	Extensión	72°	1 minuto	
5	Extensión final	72°	7 minutos	1
Avr4	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1
2	Desnaturalización	94°	30 segundos	34
3	Hibridación	49°	30 segundos	
4	Extensión	72°	1 minuto	
5	Extensión final	72°	7 minutos	1
Avr4E Avr9	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1

2	Desnaturalización	94°	30 segundos	34
3	Hibridación	55°	30 segundos	
4	Extensión	72°	1 minuto	
5	Extensión final	72°	7 minutos	1

Tabla N°8. Condiciones de amplificación para proteínas de avirulencia

Cebadores específicos (5'-3')

	<i>Ecp1</i>
F	ACC AGG ATA AGT TCG CAG TC
R	GCC TCC GCG ATG CTT CCT
	<i>Ecp2</i>
F	GTC CAA GGA TCG TGT CTC AAG
R	TTC TAG CAA ACC CGT CTG A
	<i>Ecp4</i>
F	AAC CTA ACA TCA CAA TCT TCA A
R	TTG CTC AAG CCC AGA CAG
	<i>Ecp5</i>
F	TAT GAA CAC TTT TAC TCT ACT C
R	CGC GTC GCC TGA TAG AT

Tabla N°9. Cebadores específicos utilizados en el estudio de determinación de genes de proteínas extracelulares (*Ecp*) de *C.fulvum*

<i>Ecp1</i> <i>Ecp2</i>	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1

2	Desnaturalización	94°	30 segundos	34
3	Hibridación	54°	30 segundos	
4	Extensión	72°	1 minuto	
5	Extensión final	72°	7 minutos	1
<i>Epc4</i>	Segmento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>Epc5</i>		(°C)		
1	Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1
2	Desnaturalización	94°	30 segundos	34
3	Hibridación	49°	30 segundos	
4	Extensión	72°	1 minuto	
5	Extensión final	72°	7 minutos	1

Tabla N°10. Condiciones de amplificación para proteínas extracelulares

2.7.3 Amplificación de los genes de avirulencia presentes en los aislados monospóricos de *C. fulvum*.

Protocolo de amplificación para PCR



1. Colocar los tubos para PCR en las respectivas gradillas.



2. Añadir 2.5 μ l de 10X DreamTaq Green Buffer*.



3. Seguidamente colocamos 1 μ l dNTP 2mM respectivamente.



4. Inmediatamente colocamos 1 μ l del Primer Forward y 1 μ l del Primer Reverse.



5. Tomar 2 μ l del ADN extraído, seguidamente colocamos 0.63 μ l de DreamTaq DNA Polymerase.



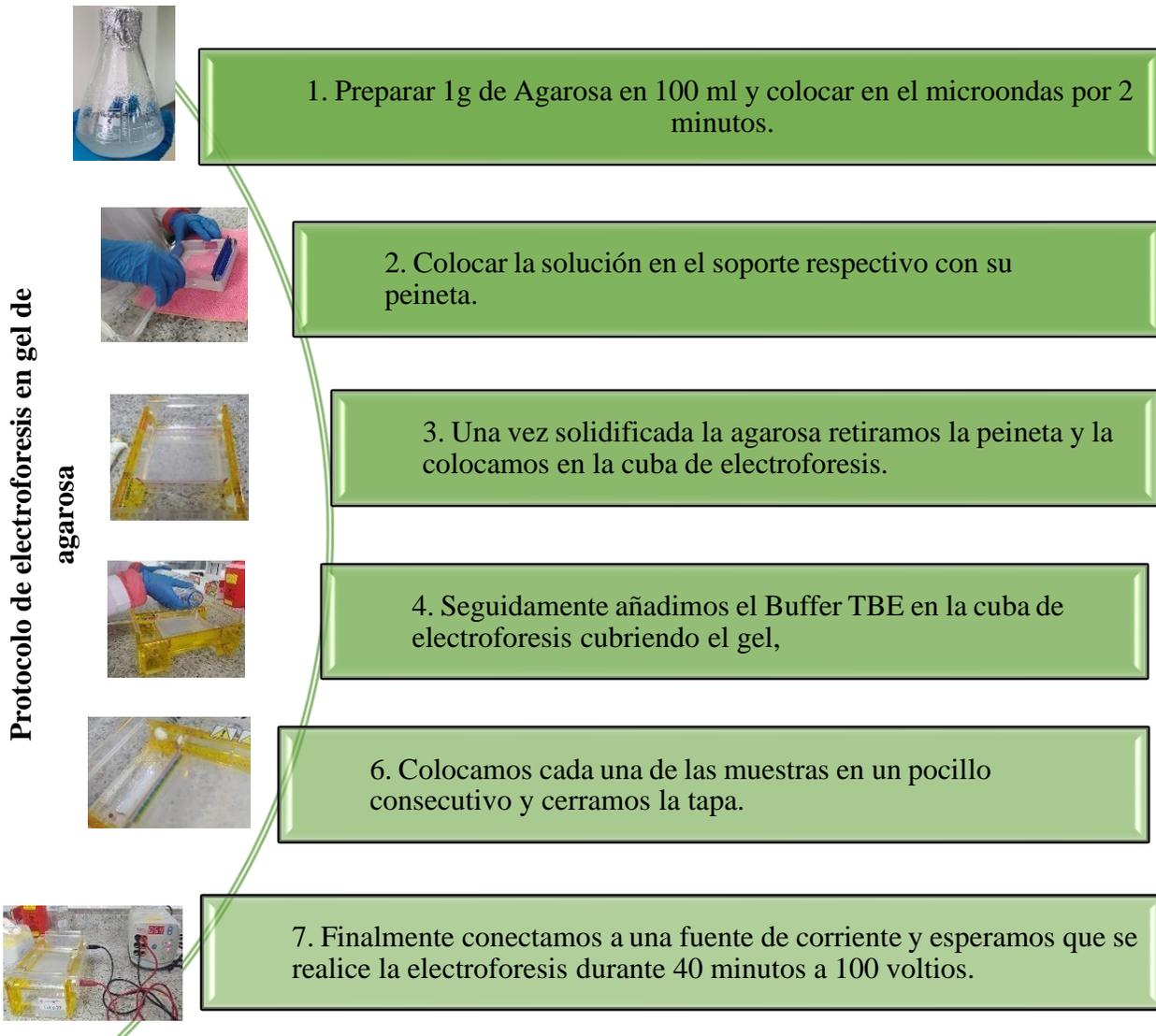
6. Añadir agua libre de nucleasas hasta completar 25 μ l de la reacción.



7. Colocamos los tubos PCR con su respectiva reacción en vórtex durante 40 segundos y finalmente los ubicamos en el termociclador PCR con sus respectivos ciclos.

Para los productos de amplificación PCR se analizó en geles de agarosa (1%) con TAE 1X y se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml, se realizó la electroforesis a 100 V por 45 minutos. El largo del fragmento de ADN

amplificado se estimó por una comparación con el marcador de peso molecular comercial de 100 bp y visualizado en un sistema de imagen táctil ENDURO GDS.



2.8 VARIABLES RESPUESTA

- Presencia o ausencia de genes de avirulencia en la provincia de Tungurahua.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de la presencia/ausencia de genes de avirulencia de *C. fulvum*.

Al realizar la amplificación del gen *Avr2* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo se constató la presencia del mismo.

Según Lucentini *et al.*, 2021, señalaron en su investigación que el *Avr2* se presentó en todos sus análisis realizados sin tener problemas ni cambios en la secuencia del gen, mencionando que es indispensable saber la diversidad genética de las muestras recolectadas. Además, realizaron una amplificación similar a la nuestra que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos seguidamente por desnaturalización a 94°C durante 30 segundos con 40 ciclos y una hibridación a 63° durante 1 minuto a diferencia de la nuestra que se realizó a 54° durante 30 segundos con 34 ciclos y una extensión igual de 72° C respectivamente.

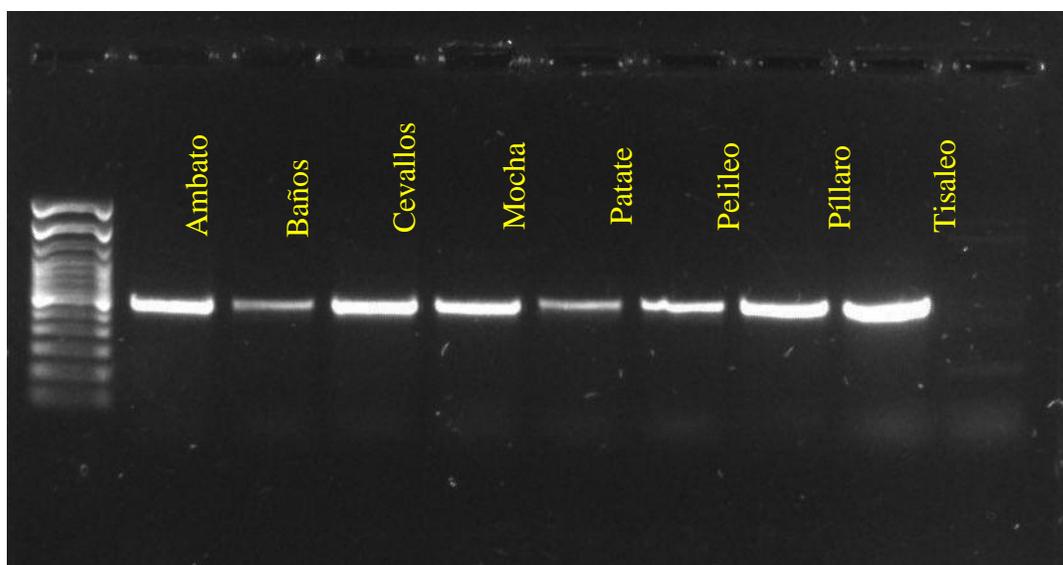


Figura 5. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Avr2* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

Para la amplificación del gen *Avr4* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Pillaro, Tisaleo se constató la ausencia del mismo en los cantones estudiados. Respecto a este gen se presentan siete polimorfismos en el *Avr4* en la colección de *C. fulvum* de Europa, loscuales forman parte de la estructura del gen, sin embargo, donde se ha detectado la sustitución de algún residuo Cys que se encuentra ligado con un puente de disulfuro (Van den Burg et al. 2003).

Medina, 2015 en su investigación detectó que nueve de sus aislados de *C. fulvum* de Argentina mediante un PCR multiplex visualizaron los productos amplificados de *Avr4*, mientras que para los otros aislados no se ha determinado una transición de avirulencia en las plantas de tomate.

En el estudio realizado por Stergiopoulos *et al.*, 2007 mencionaron que la ausencia del gen *Avr4* puede derivarse a mutaciones independientes o resistencia del mismo. Por lo que concuerdan con nuestros resultados al tener ausencia de este gen de avirulencia en los aislados de *C. fulvum* analizados.

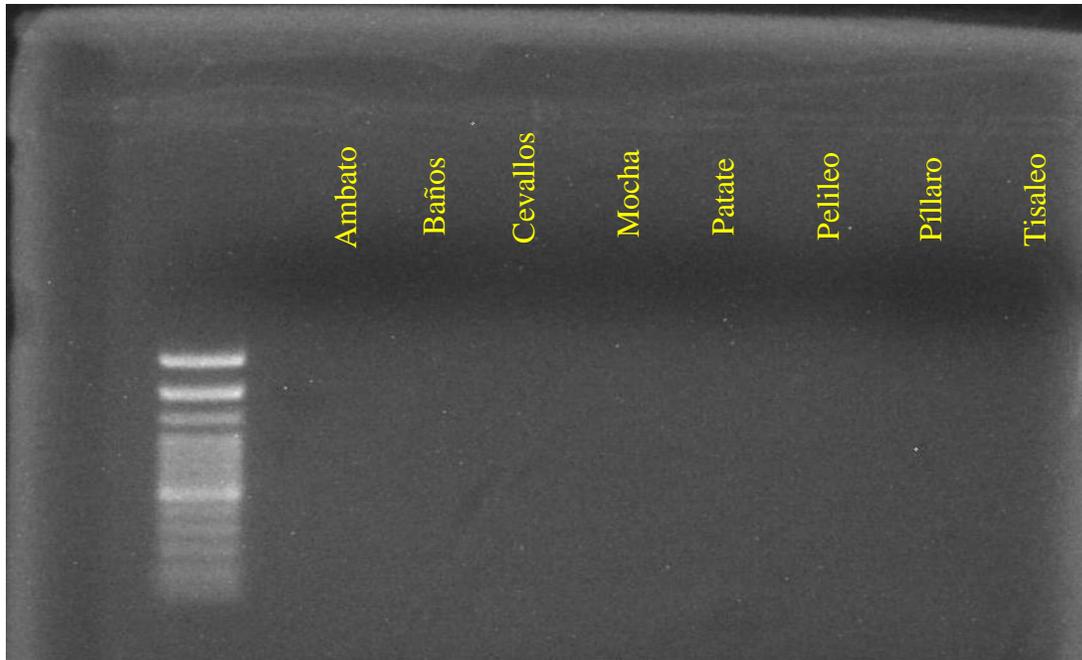


Figura 6. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Avr4* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

Mediante la amplificación del gen *Avr4E* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo se constató la presencia del mismo, sin embargo, en el aislado del cantón Ambato no estuvo presente.

Lucentini *et al.*, 2021 en su investigación sobre amplificación del *Avr4E* determinó que su secuencia se encuentra presente en los aislados de la colección europea de *C. fulvum*. Lo cual concuerdan con nuestros resultados.

De igual manera en los resultados de Bernal, 2017 en sus aislados de algunas localidades de Cuba se presentó el *Avr4* y *Avr4E* en un 80% de los aislados analizados.

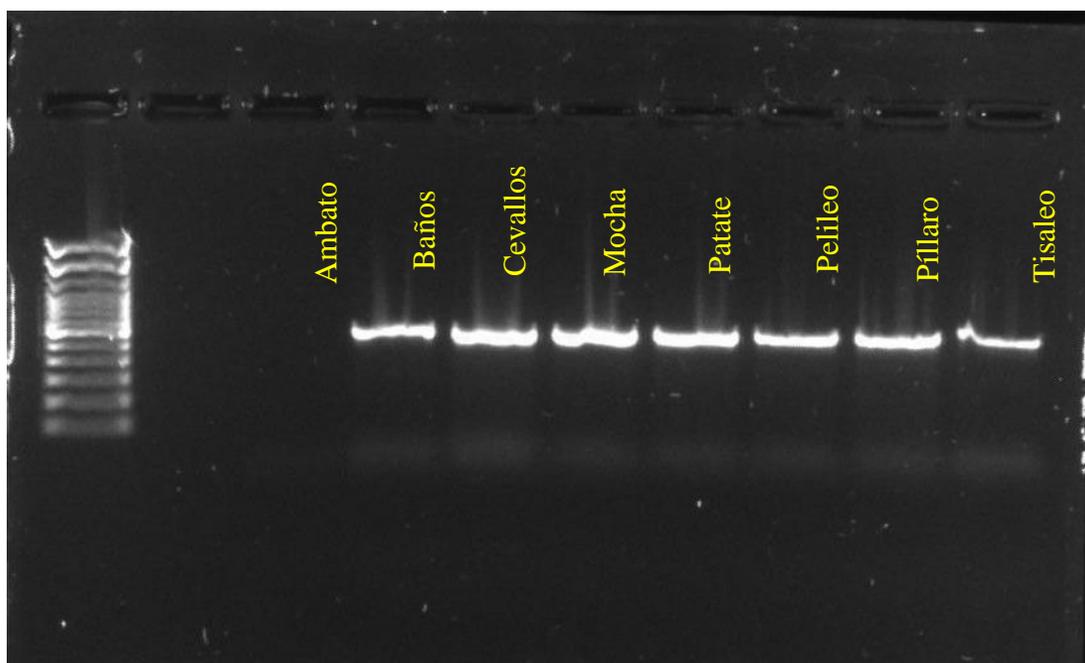


Figura 7. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Avr4E* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

De igual manera en la amplificación del gen *Avr9* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo se constató la ausencia del mismo gen en todos los cantones estudiados.

La secuencia del *Avr9* en la colección europea y argentina se encuentra presente el gen sin embargo existe un polimorfismo dentro de su secuencia no codificante debido a algunas mutaciones que han ocurrido (Lucentini *et al.*, 2021).

Para Bernal, 2017 en su investigación mostró que en ninguno de sus aislados procedentes de diferentes localidades de Cuba se constató la presencia del gen *Avr9*, demostrando similitud con los análisis realizados en el presente estudio de diferentes aislados de la provincia de Tungurahua.

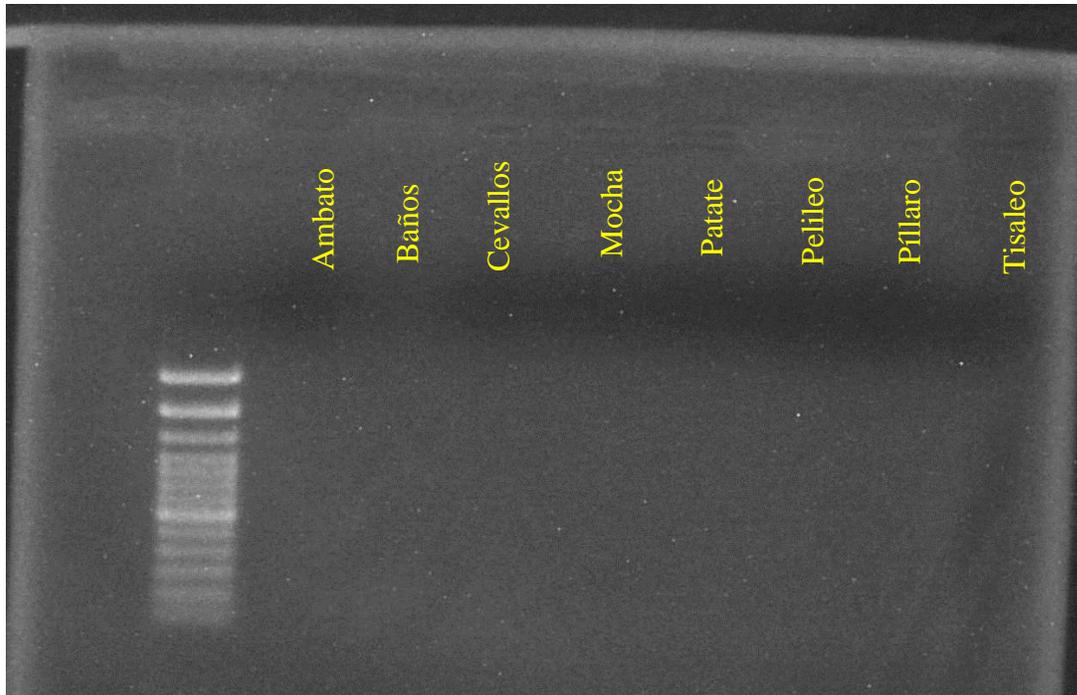


Figura 8. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Avr9* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

3.2 Presencia/ausencia de genes que codifican para proteínas extracelulares de *C. fulvum*

Del mismo modo la amplificación del gen *Ecp1* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo se constató su ausencia.

La proteína extracelular *Ecp1* juega un papel fundamental en la invasión del hongo mostrándose presente en todos los aislados cubanos coincidiendo con algunos estudios realizados de patogenicidad (Bernal, 2007) sin embargo en los aislados analizados de la provincia Tungurahua no se encuentra presente.

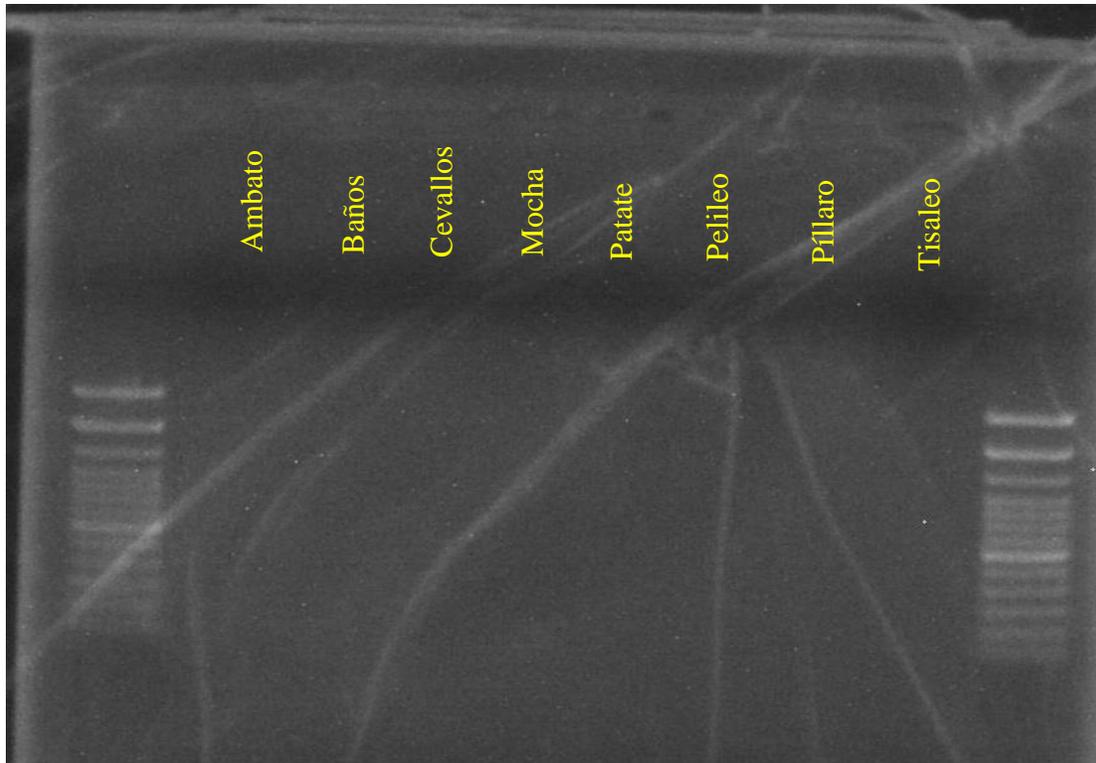


Figura 9. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp1* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

Al realizar la amplificación del gen *Ecp2* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo y Tisaleo se constató la presencia del mismo gen sin embargo en el aislado del cantón Píllaro no presenta el gen.

Bernal, 2017 en su trabajo de investigación mostró la presencia del gen que codifica para la proteína extracelular *Ecp2* en todos los aislados cubanos analizados, coincidiendo con diferentes autores que este gen tiene un papel importante en la virulencia (Joosten y Wit, 1999; Kruijt, Kock, y Rep, 2005). En base a lo anterior nuestros resultados concuerdan con los referidos por los autores antes mencionados.



Figura 10. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp 2* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

Para la amplificación del gen *Ecp4* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Pillaro y Tisaleo se constató la presencia del mismo gen en todos los cantones estudiados.

Con respecto al gen que codifica para la proteína extracelular *Ecp4* en seis aislados provenientes de la colección de Argentina no se constató el gen debido a que se encontraron residuos de Cys afectando notablemente en la agresividad de la secuencia codificante (Stergiopoulos *et al.*, 2007). Con respecto a nuestros resultados la proteína extracelular amplificada se encuentra presente en todos los cantones de la provincia de Tungurahua por lo que coinciden los resultados con Bernal, 2007 que tuvo la presencia del gen en un 83.3% en los aislados de Cuba.

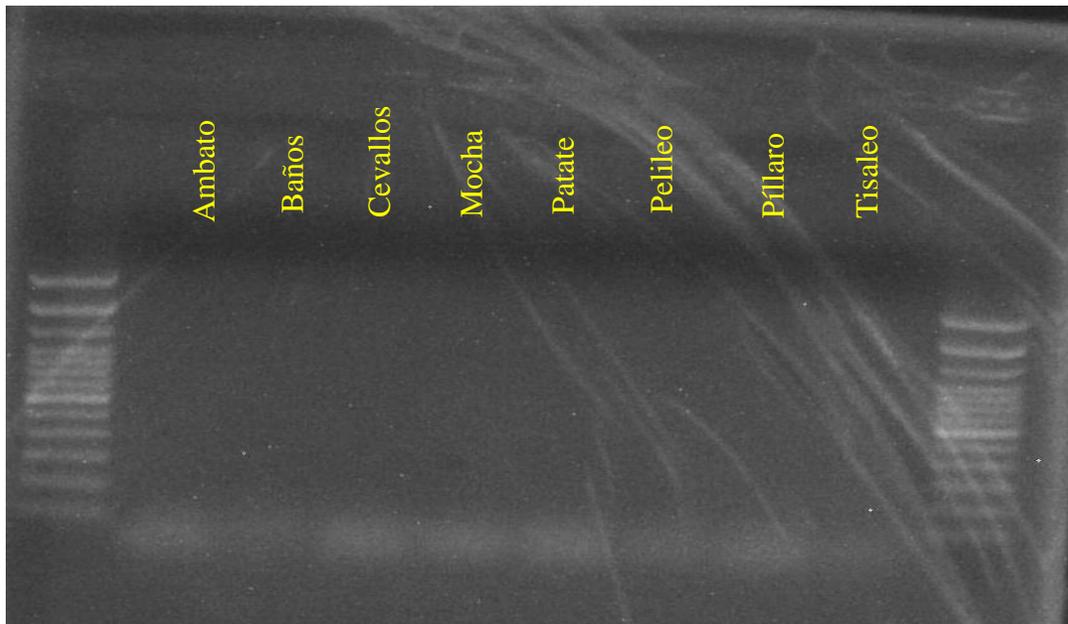


Figura 11. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp4* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

Finalmente, en la amplificación del gen *Ecp5* en los aislados de *C. fulvum* de los cantones Ambato, Baños, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo se constató la presencia del mismo, sin embargo, en el aislado del cantón Cevallos no se detectó.

Según Bernal, 2007 en su investigación realizada con los aislados de *C. fulvum* de Cuba, el gen *Ecp5* se presentó en un 15.4 % de los aislados analizados, formando base para las nuevas investigaciones con el propósito de esclarecer la no amplificación de todos los *Ecps* reconocidos en la literatura científica, lo cual a comparación con nuestros resultados esta proteína extracelular se encuentra presente en la mayoría de los cantones estudiados y en un porcentaje superior a lo informado por el autor antes mencionado.

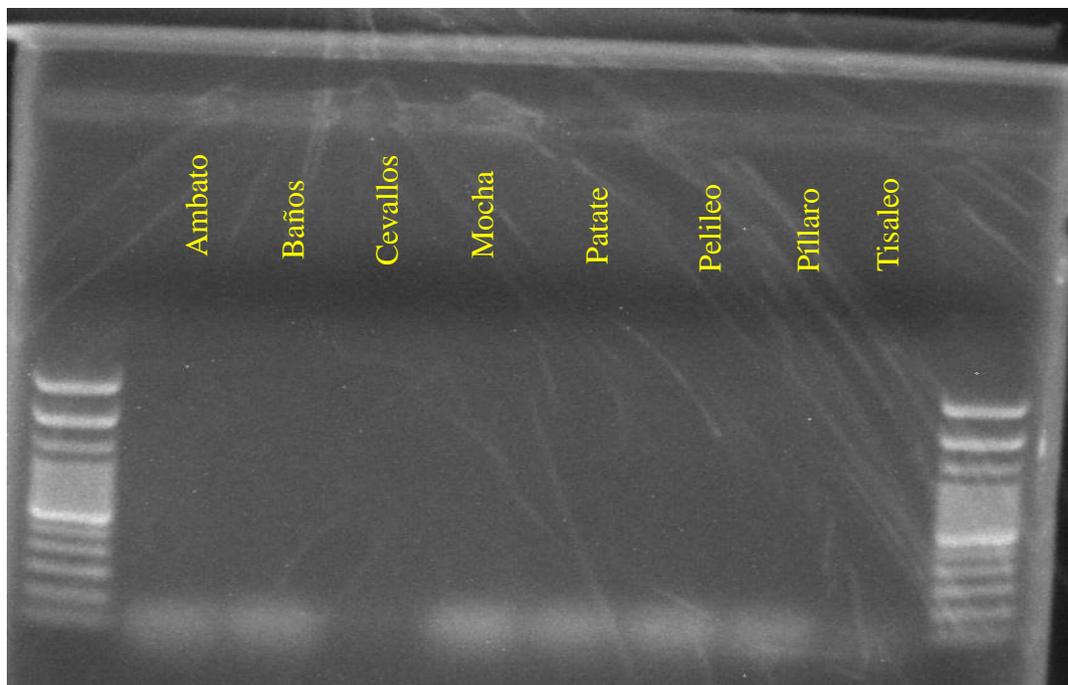


Figura 12. Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen *Ecp 5* en gel de agarosa al 1% en aislados monospóricos de *C. fulvum* de 8 cantones de la provincia de Tungurahua.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se logró estandarizar un protocolo sencillo, rápido y reproducible para la extracción del ADN genómico de los aislados monospóricos de *C. fulvum*.
- Para los genes Avr2, Avr4, Avr9, Avr4E, Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 de *C. fulvum* se estandarizaron las condiciones favorables para la amplificación de los mismos.
- De los aislados monospóricos de *C. fulvum* analizados a excepción de los genes Avr9, Avr4 y Ecp1, el resto (Avr2, Avr4E, Ecp2, Ecp4 y Ecp5) fueron detectados en la provincia de Tungurahua.

4.2 Recomendaciones

- Proseguir con el aislamiento monospórico de *C. fulvum* en cantones de otras provincias para incrementar el número de aislados de la región sierra ecuatoriana.
- Determinar la presencia o ausencia mediante PCR de los genes Avr2, Avr4, Avr9, Avr4E, Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 del resto de los aislados de la Colección de cultivo de *C. fulvum* depositada en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.
- Analizar otros genes de avirulencia de *C. fulvum*.

Bibliografía

- Agrios, GN. (2005). “Plant Pathology”. 5ta edición.
- Bernal, A; Herrera, L; Martín, B; Peteira, B; Leiva, M; Lazo, Y. (2020). El patosistema *Solanum lycopersicum-Cladosporium fulvum* en las condiciones de cultivo protegido tropical en Cuba. *Centro Agrícola*, 47, 88-94. Disponible en:
- Beveraggi, A; Mourichon, X, Sallé, G. (2015). Etude comparée des premières étapes de l’infection chez les bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladie des raies noires. *Canadian Journal of Botany*, 73(9), 1328-1337. Disponible en: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/b95-144>
- Burg, HA; Westerink, N; Fracoijs, KJ; Roth, R; Woestenenk, E; Boeren, S; Wit, PJ, Joosten, MH; Vervoort, J. (2003). Natural disulfide bond-disrupted mutants of Avr4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4 mediated 60 resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27340-27346. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)84447-0/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)84447-0/fulltext)
- Cai, XZ; Zhou, X; Xu, YP; Joosten, MH; de Wit, PJ. (2007). *Cladosporium fulvum* CfHNNI1 induces hypersensitive necrosis, defence gene expression and disease resistance in both host and nonhost plants. *Plant molecular biology*, 64(1-2), 89-101. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11103-007-9136-0>
- Cepero de García, MC. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes. Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=pS2RDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA48&dq=reino+fungi&ots=SVuQXGXZFZ&sig=Slcg02mfIZpSHgo_8WYECNb0_r0#v=onepage&q=reino%20fungi&f=false

- Cooke, MC (1883). New American fungi. *Grevillea*, 12, 32. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=65WFg9uJRDgC&oi=fnd&pg=PA44&dq=New+American+fungi.+Grevillea&ots=TpSHyNEQXT&sig=9pBUmQWJsUmBgbWr9DTVNq9PDOg#v=onepage&q=New%20American%20fungi.%20Grevillea&f=false>
- Cordoba, HA; Gómez, SV; Núñez, CE. (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. Disponible en: <http://orcid.org/0000-0002-2679-0456>
- Crous, PW; Braun, U; Schubert, SK; Groenewald, JZ. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology* 58: 33–56. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614601184>
- Díaz, AS; Rentería, LF; Cortez, JA; Palacios, ES. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 53. Disponible en : https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Ramirez-Salcedo/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/Microarreglos-de-DNA-Fabricacion-Proceso-y-Analisis.pdf#page=69
- Díaz, C. (2007). Caracterización Agro cadena de Tomate. Dirección Regional Central Occidental.M.A.G. Grecia, Costa Rica. 46 p. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/brock-biologia-de-los-microorganismos/oclc/966850150>
- Dugan, Frank M. Schubert, Konstanze; Braun, Uwe. (2004). «Check-list of *Cladosporium* names». *Schlechtendalia* 11: 1-119.
- Escobar, RL. (2009). Manual de producción de tomate bajo invernadero. Universidad Jorge Tadeo Lozano Bogotá: Hugo. *Evaluación de duración del*

- ciclo del cultivo de tomate*, 28. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/237497948.pdf#page=54>
- Esquinas, AJ; Nuez.VF. (2001). «Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate». En: El cultivo del tomate. F. Nuez. Mundi Prensa. España 13-42 pp.
 - Franco, ME. (2019.) *Mancha gris de la hoja del tomate: identificación, biología y genómica del agente etiológico* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata). Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/73593/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 - García, D. (2005). Taxonomía de los hongos ascomicetos del suelo (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili). Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/8747>
 - Godoy, P; Zolezzi, M; Sepúlveda, P. 2018. Principales plagas y enfermedades en lechuga, tomate y cebolla. Disponible en : http://bosques.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/29387/INIA_Libro_0037.pdf?sequence=2&isAllowed=y
 - Gorini, F. (2018). *Guía completa del cultivo del tomate*. Parkstone International. Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=_g5dDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT3&dq=plagas+y+enfermedades+del+tomate&ots=41TTwDmXSV&sig=W-2Lja0GAA2nO4Bs0P4T7PRivpg#v=onepage&q=plagas%20y%20enfermedades%20del%20tomate&f=false
 - Guzmán, A; Corradini, F; Martínez, J; Allende, M; Abarca, P; Felmer, S; Torres, A. (2017). Manual de cultivo del Tomate al aire Libre. Disponible en: http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/29488/INIA_Libro_0049.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 - Guzmán, A; Corradini, F; Martínez, JP; Torres. (2017). Manual de cultivo del tomate al aire libre. Disponible en:

http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/29488/INIA_Libro_0049.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Hernández, R; Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. *México. McGrawHill*. Disponible en: https://www.academia.edu/44382737/METODOLOG%C3%8DA_DE_LA_INVESTIGACI%C3%93N_LAS_RUTAS_CUANTITATIVA_CUALITATIVA_Y_MIXTA?auto=citations&from=cover_page
- Infoagro Systems SL. (2016). El cultivo de tomate: Parte I. (en línea). Madrid, España. s.p. Disponible en http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate_parte_i.asp
- Jones J.B; Zitter TA; Mormol, TM; Miller SA. (2014). Compendium of tomato diseases and pests, second ed., American Phytopathological Society, Saint Paul, MN, ISBN: 978-0-89054-434-1. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/9780890544341.f>
- Joosten, M. H. A. J., & De Wit, P. J. G. M. (1999): The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plantpathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 335-367
- Kruijt, M., De Kock, M. J., & De Wit, P. J. (2005): Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular plant pathology*, 6(1): 85-97.
- Kuhar, JF; Castiglia, VC; Papinutti, VL. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. Disponible en: [http://www.revistaboletinbiologica.com.ar/pdfs/N28/kuhar\(teoria28\).pdf.pdf](http://www.revistaboletinbiologica.com.ar/pdfs/N28/kuhar(teoria28).pdf.pdf)
- Laugé, R; Goodwin, P H; De Wit, PJ; Joosten, MH. (2000). Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *The Plant Journal*, 23(6), 735-745. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-313x.2000.00843.x>
- López, L.(2016). Manual técnico del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. INTA, Costa Rica.
- Lucentini, CG. Medina, R. Franco, M. Saparrat, MC. Balatti, PA. (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. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02181-9>

- Lucentini, CG. Troncozo, MI. Franco, ME. López, SM. Medina, R. Saparrat, M. Balatti, PA. (2017) Identificación de razas de *Cladosporium fulvum* amplificando AvrS. In *IX Congreso Latinoamericano de Micología* (Vol. 9). <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/8227>
- Luderer, R; Takken, FL; Wit, PJ; Joosten, MH.(2002). *Cladosporium fulvum* supera la resistencia mediada por Cf - 2 al producir proteínas inductoras de AVR2 truncadas. *Microbiología molecular*, 45 (3), 875-884. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03060.x>
- Madigan, TM. (2015). Brock. *biología de los microorganismos*. Pearson Education. ISBN 978-84-9035-280-9. OCLC 966850150
- Mas, E; Poza, J; Ciriza, J; Zaragoza, P; Osta, R; Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, (15). Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139>
- McGilp, L.(2018). Caracterización de *Passalora fulva* y hongos asociados al moho de la hoja del tomate en túneles altos de Minnesota y el manejo de enfermedades comunes del tomate de túnel alto. University of Minnesota Digital Conservancy. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11299/200124>
- Mesarich, C; Ökmen, B; Rövenich, HJ; Jashni, MK; Wang, C; Griffiths, SA; De Wit, PJGM. (2016). Nuevos efectores identificados en el apoplasto de tomate infectado con *Cladosporium fulvum*. En el XVII Congreso Internacional de Interacciones Moleculares Planta-Microbio. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123271>

- Murillo, J. (2011). Métodos de investigación de enfoque experimental. Disponible en: <https://www.academia.edu/download/55568285/Experimental.pdf>.
- Nekrasov, V; Ludwig, AA; Jones, JD. (2006) . La tiorredoxina CITRX es una supuesta proteína adaptadora que conecta Cf-9 y la proteína quinasa ACIK1 durante la respuesta de defensa inducida por Cf-9 / Avr9. *Cartas FEBS* , 580 (17), 4236-4241. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.077>
- Novak, A; Ćosić, J; Vrandečić, K; Jurković, D; Plavec, J; ,Križanac, I; Ivić, D.(2021) Caracterización del patógeno del moho de la hoja del tomate, *Passalora fulva* , en Croacia. *J Plant Dis Prot* 128, 1041-1049. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00419-6>
- Olivares, N; Morán, A; Guzmán, A. (2017). Manejo de plagas en repollo, tomate y lechuga. Disponible en: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR40758.pdf>
- Peteira, B.Cabrera, 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*, 26(1), 5-14. Disponible en : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522011000100002&lng=es&tlng=es.
- Raghukumar, S. (2017). Hongos: características y clasificación. En *Hongos en ecosistemas marinos costeros y oceánicos* (págs. 1-15). Springer, Cham.
- Raiola, A; Rigano, MM; Calafiore, R; Frusciante, L; Barone, A. (2014). Mejora de los efectos de promoción humana de la fruta de tomate para alimentos bofortificados. *Mediadores de la inflamación de Hindawi Publishing Corporation*. Disponible en: 10.1155 / 2014/139873
- Rivas, S; Thomas, CM.(2005). Interacciones moleculares entre el tomate y el patógeno del moho foliar *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* , 43 , 395-436. Disponible en:

<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140224>

- Stergiopoulos, I.; Groenewald, M.; Staats, M.; Lindhout, P.; Crous, P. W and Wit, P. J. G. M. de (2007): Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 415-429.
- Stergiopoulos, I.; Kock, M. J. D. de; Lindhout, P. and Wit, P. J. G. M. de (2007): Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 20:1271-1283.
- Stergiopoulos, I; Kock, MJ; Lindhout, P; Wit, PJ. 2009. Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 20:1271-1283. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-20-10-1271>
- Stergiopoulos, I; Van den Burg, HA; Ökmen, B; Beenen, HG; Van Liere, S; Kema, GH; de Wit, PJ. (2010). Las proteínas de resistencia de tomate Cf median en el reconocimiento de efectores homólogos afines de hongos patógenos en dicotiledóneas y monocotiledóneas. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* , 107 (16), 7610-7615. Disponible en : <https://doi.org/10.1073/pnas.1002910107>
- Tancara, QC. (2003). LA INVESTIGACION DOCUMENTAL. *Temas Sociales*, (17), 91-106. Disponible en: de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0040-29151993000100008&lng=es&tlng=es.
- Thomma B.P.H.J., Van Esse H.P., Crous P.W., De Wit P.J.G.M., (2005) *Cladosporium fulvum* (Syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic mycosphaerellaceae. *Mol. Plant Pathol.* 6 379–393. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x>.

- Thomma, BH; Esse, HP; Crous, PW; Wit, PJ. (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Molecular plant pathology*. 6 (4), 379–393. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x>
- Van den Burg, HA; Harrison, SJ; Joosten, MH; Vervoort, J; de Wit, PJ. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protege las paredes celulares de los hongos contra la hidrólisis de las quitinasas vegetales que se acumulan durante la infección. *Interacciones moleculares planta-microbio*, 19 (12), 1420-1430. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-19-1420>
- Van Esse, HP; Van't Klooster, JW; Bolton, MD; Yadeta, KA; Van Baarlen, P; Boeren, S; Thomma, BP. (2008). La proteína de virulencia de *Cladosporium fulvum*, Avr2, inhibe las proteasas del huésped necesarias para la defensa basal. *The Plant Cell*, 20 (7), 1948-1963. Disponible en: <https://academic.oup.com/plcell/article/20/7/1948/6092400?login=true>
- Vasicek, A. (2015). Sanidad vegetal. Plagas. *Cultivo en Hidroponía*, 109-127. Disponible en: <http://www.aegrochapeco.com.br/admin/up/15508619841985827152Cultivo%20hidroponia.pdf#page=110>
- Vaupotic, T; Veranic, P; Jenoe, P; Plemenitas, A. (2008). «Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*». *Fungal Genetics and Biology* 45 (6): 994-1007. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1087184508000170?via%3Dihub>
- Westerink, N. (2004). De rol van AVR4 en AVR4E proteïnen in virulentie en avirulentie van de tomaat-patogeen *Cladosporium fulvum*. *GEWASBESCHERMING*, 35 (2), 81-83. Disponible en: <https://edepot.wur.nl/180130>

Anexos

Anexo 1. Liofilización del micelio *C.fulvum*



El micelio se liofilizó durante 8 horas con una presión de 3.5.

Anexo2. Extracción de ADN fúngico



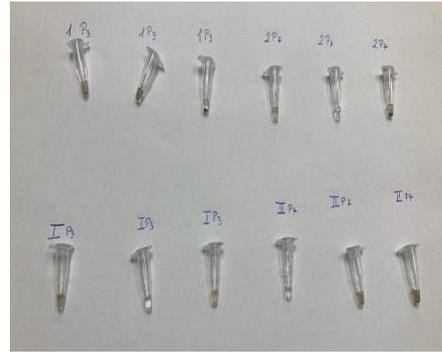
Trituración del micelio liofilizado.



Muestras con el tampón A 95°C por 10 minutos.



Reposo con el tampón B.



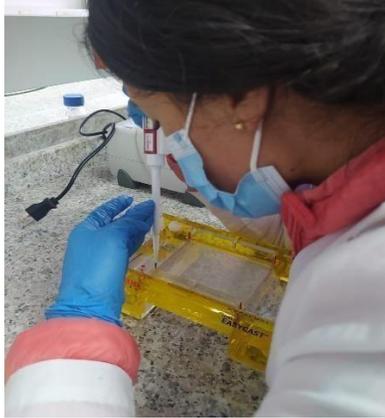
Conservación del ADN a -20° C.

Anexo 3. Amplificación en el PCR convencional

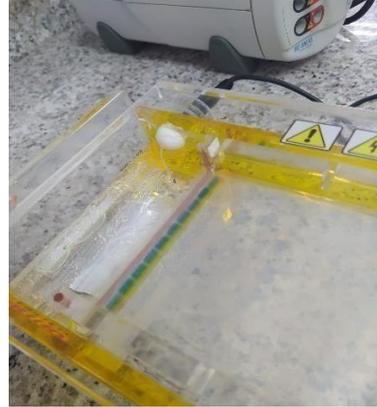


Avrs y proteínas extracelulares con sus respectivas condiciones de amplificación.

Anexo 4. Electroforecís en gel de agarosa al 1%



Cargar cada uno de los pocillos con un marcador molecular y las muestras.



Poner la fuente de poder a 100v durante 60 minutos.