UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

PORTADA

CARRERA DE AGRONOMÍA

“Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke. del cantón Tisaleo”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR:

Juan Diego Pasti Secaira

TUTOR:

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

CEVALLOS, 2025

Detección de genes AVR y ECP en aislados de ***Cladosporium fulvum*** **Cooke.** del cantón Tisaleo.

REVISADO POR

.....

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

TUTOR

APROBADOS POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

Fecha

..... 22/07/2025.

Ing. Pedro Pablo Pomboza Tamaquiza, PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

..... 22/07/2025.

Ing. Carlos Luis Vásquez Freytez PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

..... 22/07/2025.

Ing. Marco Oswaldo Pérez Salinas Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, Juan Diego Pasti Secaira, portador de cédula de ciudadanía número: 1850592906, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "**Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke. del cantón Tisaleo".** Es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



Juan Diego Pasti Secaira

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "**Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke. del cantón Tisaleo.**" Como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

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

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

.....

Juan Diego Pasti Secaira

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, Gloria Secaira, cuyo apoyo incondicional ha sido una fuente constante de fortaleza en mi vida. Su guía, paciencia y sabiduría me han acompañado en los momentos más difíciles, brindándome siempre palabras de aliento cuando más lo necesitaba. Gracias a su ejemplo de esfuerzo, perseverancia y amor, he podido construir los cimientos de mi formación académica y personal.

A mi hermano, Henry Mariño, por su ayuda constante y desinteresada, por estar siempre presente cuando más lo necesité y por ser un ejemplo de constancia, fortaleza y entrega. Gracias por tu apoyo incondicional, tu presencia ha sido un pilar fundamental en mi vida y en la realización de este logro.

Este trabajo es para todas aquellas personas que, movidas por la curiosidad y el deseo de aprender, buscan conocimiento. Con la esperanza de que la información contenida en estas páginas les sea de utilidad y contribuya, aunque sea en pequeña medida, a alcanzar sus objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a mi familia y amigos, de manera desinteresada, contribuyeron a mi formación académica y personal. Su orientación, apoyo y valiosos consejos han sido fundamentales en los distintos momentos de este camino, permitiéndome superar desafíos, mantenerme enfocado y avanzar con firmeza hacia el cumplimiento de mis objetivos. A cada uno de ustedes, mi más profundo reconocimiento y gratitud.

Al Ing. Michel Leiva Mora Dr.C, por compartir generosamente sus conocimientos y por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación.

A la Srta. Jennifer López, una amiga entrañable cuya compañía, empatía y ejemplo han sido una constante fuente de inspiración, motivación y aprendizaje a lo largo de este proceso. Su presencia ha significado más de lo que las palabras pueden expresar.

De igual manera, al Sr. Mario Moreno, compañero de investigación, colega comprometido y amigo leal, con quien compartí retos, ideas y logros. Su colaboración y apoyo fueron esenciales en el desarrollo de este trabajo, convirtiéndose en una pieza clave tanto en lo académico como en lo personal.

Colección de aislados monospóricos de *Cladosporium fulvum* Cooke. que afectan a *Solanum lycopersicum* L. y detección de genes de avirulencia presentes en la provincia de Tungurahua" financiado por la DIDE y coordinado por el PhD. Michel Leiva Mora. Este proyecto fue aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0296-R el 4 de octubre del 2023 y pertenece a la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

ÍNDICE DE GENERAL

PORTADA i
APROBADOS POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN ii
AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN iii
DERECHO DE AUTOR iv
DEDICATORIA v
AGRADECIMIENTOS vi
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE FIGURAS xi
ANEXOS xii
RESUMEN xiii
ABSTRACT xiv
CAPÍTULO I 1
1. Introducción 1
2. Fundamentación teórica 3
2.1. Antecedentes Investigativos 3
3. Categorías fundamentales 6
3.1. Características generales del tomate riñón 6
3.1.1. Clasificación taxonómica 6
3.1.2. Historia 7
3.1.3. Descripción botánica 7
3.1.4. Ciclo fenológico 7
3.1.5. Condiciones agroclimáticas 8
3.1.6. Variedades comerciales 8
3.1.7. Plagas 9
3.1.8. Enfermedades 10

3.2. Características del moho gris de la hoja (*C. fulvum*) 11
3.2.1. Clasificación taxonómica 11
3.2.2. Generalidades 11
3.2.3. Morfología 12
3.2.4. Genes Avr y Ecp 12
3.3. Técnicas moleculares 12
3.3.1. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) 13
3.3.2. Electroforesis 13
3.4. Objetivos 13
3.4.1. Objetivo General 13
3.4.2. Objetivos Específicos 13
CAPÍTULO II 14
4. Ubicación Del Estudio 14
5. Tipo de investigación 14
6. Equipos y Materiales 15
6.1. Equipos 15
6.2. Materiales 15
6.3. Reactivos 16
7. Factores De Estudio 16
7.1. Hipótesis 16
7.1.1. Hipótesis nula 16
7.1.2. Hipótesis alternativa 16
7.2. Variables 16
7.2.1. Variable Independiente 16
7.2.2. Variable dependiente 16
7.3. Procedencia de las muestras 17
7.4. Diseño Experimental 17

7.5. Estandarización de protocolos 18
7.5.1. Protocolo medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). 18
7.5.2. Protocolo reactivación del crecimiento de los aislados de C. fulvum. 19
7.5.3. Diseminación de suspensiones miceliales y conidiales con la espátula de Drigalsky en medio de cultivo PDA. 20
7.5.4. Protocolo extracción de ADN. 21
7.5.5. Protocolo PCR 22
7.5.6. Protocolo electroforesis 23
7.6. Primers específicos 24
7.7. Concentración PCR 25
7.8. Programas PCR 25
8. Resultados y Discusión 26
8.1. Aislamiento el ADN genómico de los aislados de *C. fulvum* 26
8.2. Detección de los genes de avirulencia AVR en los asilados de *C. fulvum* 27
8.3. Amplificación de los genes ECP en los aislados de *C. fulvum* 32
CAPTITULO IV 37
9. Conclusiones y Recomendaciones 37
9.1. Conclusiones 37
9.2. Recomendaciones 37
BIBLIOGRAFÍA 38
ANEXOS 45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 *Clasificación taxonómica del tomate riñón (S. lycopersicum).* 6
Tabla 2 *Principales plagas del tomate riñón (S. lycopersicum).* 9
Tabla 3 *Principales enfermedades del tomate riñón (S. lycopersicum)* 10
Tabla 4 *Clasificación taxonómica del moho gris de la hoja (Cladosporium fulvum).* 11
Tabla 5 *Aislados de Cladosporium fulvum del cantón Tisaleo* 17
Tabla 6 *Primers específicos usados en el estudio de determinación de genes de Avr y Ecp de C. fulvum* 24
Tabla 7 *Concentraciones usadas para realizar una PCR* 25
Tabla 8 *Condiciones de amplificación para los genes Avr y Ecp* 25
Tabla 9 *Condiciones de hibridación para los genes Avr y Ecp* 25
Tabla 10 *Análisis de la pureza y concentración de ADN obtenido* 26
Tabla 11 *Presencia de genes Avr en el cantón Tisaleo* 31
Tabla 12 *Presencia de genes Ecp en el cantón Tisaleo* 36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 *Ubicación del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias campus Querochaca* 14
Figura 2 Protocolo para la preparación de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) 18
Figura 3 Protocolo para la reactivación del crecimiento de los aislados de C. fulvum 19
Figura 4 Diseminación de suspensiones miceliales y conidiales con la espátula de Drigalsky en medio de cultivo PDA 20
Figura 5 Protocolo para la extracción de ADN 21
Figura 6 Protocolo par PCR 22
Figura 7 Protocolo para electroforesis 23
Figura 8 *Amplificación del gen Avr2 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 27
Figura 9 *Amplificación del gen Avr4 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 28
Figura 10 *Amplificación del gen Avr4E de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 29
Figura 11 *Amplificación del gen Avr9 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 30
Figura 12 *Amplificación del gen Ecp1 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 32
Figura 13 *Amplificación del Ecp2 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 33
Figura 14 *Amplificación del Ecp4 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 34
Figura 15 *Amplificación del Ecp5 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%* 35

ANEXOS

Anexo 1 Preparación de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar PDA. 45
Anexo 2 Reactivación del crecimiento de Cladosporium fulvum. 46
Anexo 3 Diseminación de suspensiones miceliales y conidiales con la espátula de Drigalsky en medio de cultivo PDA. 47
Anexo 4 Placas Petri con colonias de los aislados de C. fulvum. 48
Anexo 5 Extracción de ADN..... 50
Anexo 6 Análisis de pureza y concentración del ADN. 50
Anexo 7 Técnica molecular de PCR tiempo final. 51
Anexo 8 Corrida de electroforesis..... 51

RESUMEN

El moho gris de la hoja es una enfermedad causada por el hongo biotrófico *Cladosporium fulvum* Cooke. en el cultivo del tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.), el tomate posee genes de resistencia R que al detectar un gen de avirulencia (Avr) o genes de proteínas extracelulares (Ecp) de *C. fulvum* manda una respuesta de hipersensibilidad (HR). El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia o ausencia de los genes Avr y Ecp en 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo mediante la estandarización de los protocolos para la reactivación del crecimiento del micelio, extracción de ADN y PCR tiempo final usando las siguientes condiciones de anillamiento 58°C, 61°C, 64°C, 59°C, 63°C, 60°C, 58°C y 55°C para los genes Avr2, Avr4, Avr4-E, Avr9, Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 en ese orden. El producto amplificado se colocó en un gel de agarosa al 1% y se sometió a electroforesis a 100V por 45 minutos, se visualizó los resultados en un transiluminador mediante luz UV. Se determinó que los aislados pertenecientes al cantón Tisaleo tienen la presencia única del gen Avr2 y de los genes Ecp1 y Ecp2. Este trabajo constituye el primer informe sobre la presencia de genes Avr y Ecp en aislados de *C. fulvum* en el cantón Tisaleo de la provincia de Tungurahua.

***Palabras claves*:** Avirulencia, PCR, *C. fulvum*, Tomate riñón

ABSTRACT

Leaf mold is a disease caused by the biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* Cooke in kidney tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crops. Tomato plants possess resistance (R) genes that trigger a hypersensitive response (HR) upon detecting an avirulence (*Avr*) gene or extracellular protein (*Ecp*) gene from *C. fulvum*. The objective of this study was to detect the presence or absence of *Avr* and *Ecp* genes in 10 monosporic isolates from Tisaleo Canton by standardizing protocols for mycelial reactivation, DNA extraction, and endpoint PCR. The following annealing temperatures were used: 58°C, 61°C, 64°C, 59°C, 63°C, 60°C, 58°C, and 55°C for the genes *Avr2*, *Avr4*, Avr4-E, *Avr9*, *Ecp1*, *Ecp2*, *Ecp4*, and *Ecp5*, respectively. The amplified product was loaded onto a 1% agarose gel and subjected to electrophoresis at 100V for 45 minutes. The results were visualized under UV light using a transilluminator.It was determined that all isolates from Tisaleo exclusively contained the *Avr2* gene, along with *Ecp1* and *Ecp2*. This study constitutes the first report on the presence of *Avr* and *Ecp* genes in *C. fulvum* isolates from Tisaleo, Tungurahua Province.

***Keywords*:** Avirulence, PCR, *C. fulvum*, tomato

CAPÍTULO I

1. Introducción

La producción de tomate riñón (*Solanum lycopersicum* Lineo) ha presentado un incremento importante, especialmente en las exportaciones mundiales que aumentaron un 4% anual en promedio (Montaño et al., 2021). Su incremento, según la FAO, es causada por la producción estable que presenta, con un promedio anual de 123.79 millones de toneladas, esto lo ha convertido en una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial y en América este cultivo se extiende por todo su territorio debió a sus diversos climas (Alemán et al., 2016).

En Ecuador, según datos del INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos), en el 2023, existían 1.417 hectáreas de cultivo, donde señalaron que la región Sierra posee la mayor cantidad de superficie cultivada con 1.399 hectáreas, de las cuales 147 pertenece a la provincia de Tungurahua, donde generaron 5.145 toneladas de producción (ESPAC, 2025).

De acuerdo con Otero & Meoño (2016) en la actualidad los cambios que se han producidos en los sistemas agroalimentarios generan un acortamiento entre el productor y el consumidor, lo que exigen una mayor respuesta para satisfacer la demanda con características deseables. Para Caguana (2003), la producción del tomate aumento por las diversas características agronómicas deseable (alta rentabilidad y producción), del mismo modo ha sido para los consumidores, principalmente el contenido nutricional y por ser parte de la dieta diaria.

Para Evelyn (2021) el conocer los ciclos biológicos (fenología y fisiología) y el conocimiento de la diversidad genética ayuda a plantear estrategias para adaptarse a distintos cambios climáticos y epidemiológicos. El cultivo de tomate, por su amplia distribución, se ve expuesto frecuentemente a diversas plagas y enfermedades lo que refuerza la necesidad de dichas estrategias.

El moho gris de la hoja del tomate causado por el hongo biotrófico *C. fulvum,* es una enfermedad foliar de rápida desarrollo por causa de la alta humedad, una condición presente en los invernaderos (Enya et al., 2009). El micelio del hongo coloniza las

hojas, especialmente las más viejas, también puede afectar en ocasiones los tallos, flores, peciolos y en casos raros los frutos (Lucentini et al., 2017).

Según López (2017) los síntomas empiezan con lesiones de un tono verde claro o amarillamiento en el envés de la hoja y al progresar en porciones de las hojas se vuelven amarillas, esta va acompañada de la formación de una masa fúngica semejante al terciopelo de color verde olivo. A través de las estomas abiertos logran infectar al huésped y en etapas avanzadas los bloquea restringiendo la respiración celular provocando el amarillamiento de las hojas, defoliación parcial o pronunciada. También se caracteriza colonizar el espacio apoplástico (Thomma et al., 2005). Debido a los avances científicos se han demostrado que *C. fulvum* secreta proteínas efectoras para colonizar exitosamente los tejidos foliares internos (Esse et al., 2008).

Tavera et al. (2019) indicaron que el desarrollo de la agricultura 4.0 integra diferentes conocimientos en sistemas, modelos matemáticos y agrobiotecnología para la innovación. La aplicación de la biología molecular para conocer la variabilidad genética de *C. fulvum* lograría identificar su potencial virulento al identificar la presencia de genes de avirulencia en los aislados de una región o país.

C. fulvum secreta proteínas efectoras de avirulencia (Avr) y proteínas extracelulares (Ecp) que al ser detectadas por el tomate los genes codifican proteínas receptoras Cf presente en el genoma del cultivo generando una respuesta de resistencia. Los rasgos de resistencia son heredados como caracteres homólogos dominantes. Los genes de resistencia Cf restringidos al género *Lycopersicum* generalmente reconocen a los productos de los genes Avr y Ecp del patógeno.

La colección de 80 asilados monospóricos de diferentes cultivos de tomate en la provincia de Tungurahua – Ecuador, de 8 cantones (Ambato, Baños, Cevallos, Mocha, Patate, Pelileo, Píllaro y Tisaleo) confeccionada por Jácome (2022) impulsaría el desarrollo de trabajos de investigación con la finalidad de realizar una caracterización de los genes Avr y Ecp que se puedan encontrar en estos aislados para identificar la presencia o ausencia de estos en cada cantón de la provincia de Tungurahua.

Conocer la presencia de los genes Avr y Ecp que puedan existir en los aislados de *C. fulvum* de una región dada permitirá saber que genes de resistencia deben tener

la variedad de tomate que se desea cultivar en dicha en dicha región, esto contribuiría significativamente al agricultor en aspectos económicos al reducir parcial o totalmente el uso de fungicidas químicos para el control de esta enfermedad reduciendo el riesgo hacia la salud del agricultor y la del consumidor, también permitiría a los mejoradores genéticos introducir genes de resistencia que requiere la provincia de Tungurahua en base a la presencia de los genes de avirulencia presentes en cada cantón.

2. Fundamentación teórica

2.1. Antecedentes Investigativos

Morocho (2023) menciona que la relación entre los avances científicos y la agricultura se refleja en los procesos para mejorar la calidad, la producción, la rentabilidad y en cierta medida la reducción al impacto ambiental, sin embargo, en Ecuador este desarrollo no es frecuente por la ausencia de estudios moleculares de la interacción *C. fulvum* – tomate y la dependencia de químicos presente en la agricultura por su uso practico. Algunos de los factores que compromete la producción agrícola van desde situaciones sociales precarias, las situaciones económicas, la baja calidad del germoplasma, las condiciones ambientales, así como el azote de plagas y enfermedades (Madriz, 2002).

Bernal et al. (2020) señala que la interacción de *C. fulvum* con el tomate ha sido estudiada durante varias décadas con el fin de establecer un mecanismo molecular que permita la compresión de las relaciones planta-patógeno. Debido a que el método químico es el más empleado para el control de *C. fulvum*, elevando los costos económico y daños al medio ambiente al ser nocivos, incluso comprometiendo la salud de quienes manipulan estos químicos (Morocho, 2023).

En el caso de las enfermedades, la aplicación de la biología molecular permite un diseño alternativo al método químico por brindar herramientas eficaces para la investigación y comprensión de los mecanismos moleculares de la planta para defenderse y contrarrestar el ataque de los patógenos (Madriz, 2002). La identificación de la población de algún patógeno es útil para determinar rasgos fisiológicos del hongo formando bases para recomendaciones a fitomejoradores, avances epifitiologicos, la creación de variedades con una utilidad más larga.

Para Pérez et al. (2012) la identificación de las especies de plantas o animales solo por el fenotipo (forma, tamaño o apariencia) es un método con una fiabilidad baja, lo mismo pasa en microorganismos, pero la genética molecular permite su identificación basándose en su propio ADN con el uso del método PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La hipótesis gen por gen se basa en estudios genéticos y la investigación que empezó en los años 40 realizada por Flor (1971) evidenció que las plantas poseen ciertos genes que dan resistencia a ciertas razas de un patógeno. Esto consiste que por cada gen de resistencia (R) del hospedante hay un gen correspondiente de Avr del patógeno, los productos de los genes R (Cf en tomate) reconocen los productos de los genes AVR, activando una respuesta de resistencia hipersensible o HR (Wit, 1997).

La interacción de *C. fulvum –S. lycopersicum* que mencionaron Karimi-Jashni et al. (2022) se basa en el modelo de interacción "gen por gen". Durante la infección de *C. fulvum*, este genera elicitores (en este caso proteínas) en el apoplasto, siendo factores de virulencia (Avr). Debido a La presencia genes R de la mayoría de cultivares de tomate silvestre pueden codificar proteínas receptoras Cf (Wit et al., 2012).

Los genes Cf producen proteínas transmembranales (repeticiones ricas en leucina en el dominio extracelular), con el fin de realizar reconocimientos extracelulares como un centinela (Madriz, 2002) y las proteínas de los genes Avr se encargan de proteger el micelio colonizador de *C. fulvum* o inhibir la inmunidad del tomate (Yoshida et al., 2021).

La clonación de los genes de resistencia Cf han dado lugar al descubrimiento (CF-2.1/CF-2.2, CF4, CF-4E, CF-5, y CF-9), estos genes codifican proteínas que reconocen a factores Avr de *C. fulvum* (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5 y Avr9). Además, Stergiopoulos et al. (2010) señalaron la caracterización de un conjunto de 6 proteínas extracelulares conocidos como Ecp (Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp6 y Ecp7).

Por ejemplo, el péptido producido por el gen Avr 9 de *C. fulvum* es reconocido en los genotipos de tomate que poseen el gen Cf-9 lo cual conducirá a la activación de una respuesta defensiva del tipo HR (Snoeijers et al., 2003).

Zhao et al. (2022) mencionaron que la activación de la defensa se da en tres etapas, (etapa temprana, etapa media y etapa tardía), también se menciona que toda vía

de resistencia incluye una respuesta hipersensible (HR), fosforilación y la acumulación de ROS (especies reactivas de oxígeno) del dominio interno de las proteínas Cf.

Como se menciona los genes de resistencia Cf provocan una respuesta HR y según Madriz (2002) esto provoca lesiones necróticas controladas en el lugar de la infección probablemente influye en la acumulación de fitoalexinas, lignina, suberina, proteínas ricas en hidroxiprolina y la síntesis de proteínas PR (Pathogenesis-related) asociadas con la resistencia sistémica adquirida (SAR).

Como los genes de resistencia ofrecen una característica agronómica deseable, los fitomejoradores introducen estos genes de especies silvestres de tomate (Zhao et al., 2022), por ser una fuente de genes útiles para mejorar el cultivo y claves para el desarrollo de una agricultura sostenibles, desde los 70, la mayoría de las variedades comerciales resistentes a enfermedades se han derivado de especies silvestres, se han introducidos varios genes (Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9), donde Cf-9 (Originario de *L. pimpinellifolium*) ha sido el más eficaz contra varias razas de *C. fulvum* (Foolad, 2007; Kruijt et al., 2004; Truong et al., 2011), la introducción de este gen en varios cultivares proporciona una resistencia por la codificación de 5 proteínas parálogos, donde dos de ellas (Cf-9C) lo protege en todas las etapas del cultivo (de la Rosa et al., 2024) pero esta resistencia se rompe con la aparición de nuevas razas (Truong et al., 2011).

En Cuba, Bernal (2007) realizó la caracterización cultural y genética de *Passalora fulva* provenientes de diferentes regiones del país mediante protocolos estandarizados que incluyeron el aislamiento de conidios en agar PDA, la extracciones del ADN genómico, la amplificación mediante PCR y electroforesis. Demostrando la presencia de 4 razas, entre las cuales las razas 2, 4 y 2.4 presentaron los genes Avr2, Avr4 y Avr4E, así como genes de proteínas extracelulares Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5.

Medina et al. (2015) llevaron a cabo un análisis mediante PCR multiplex con el objetivo de caracterizar genéticamente diferentes aislados de Cladosporium fulvum. Los resultados permitieron identificar que cinco de los aislados correspondían a la raza 0, los cuales presentaban de manera simultánea los genes Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9. Por otro lado, siete aislados fueron clasificados como pertenecientes a la raza 2, los cuales se caracterizaron por la ausencia del gen Avr2.

Lucentini et al. (2021) señalaron que los cultivos de Argentina se ven afectados por dos razas (0 y 2) que sufren un proceso evolutivo causado probablemente por labores culturales o condiciones ambientales. Se recolectaron 8 asilados y por medio de una amplificación PCR se demostró la existencia de los genes Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9.

Yoshida et al. (2021) señalaron que la secuenciación de los genes Avr y su amplificación por PCR, empleadas para determinar las razas y relaciones genéticas, permitió la identificación de la población de *C. fulvum*, descubriéndose 2 nuevas razas (2.4 y 2.4.9) en la prefectura de Nara, Japón. La raza 2.4.9 tiene un cambio que supera la resistencia de Cf-4 por la pérdida de Avr4E, presentando una mutación lo que provoca el cambio de cisteína por serina.

Rosa et al. (2024) en su colección cepas mundial reveló que la resistencia de Cf-9 es superada por delecciones del Avr9 en cepas antiguas y se observó delecciones y mutaciones de Avr9 y Avr9B.

3. Categorías fundamentales

3.1.Características generales del tomate riñón

3.1.1. Clasificación taxonómica

Para López (2016) la clasificación taxonómica del tomate es:

Tabla 1

Clasificación taxonómica del tomate riñón (S. lycopersicum).

Rango Taxonómico	Taxonomía
Reino	*Plantae*
División	*Magnoliophyta*
Clase	*Magnoliopsida*
Subclase	*Asteridae*
Orden	*Solanales*
Familia	*Solanaceae*
Género	*Solanum*
Especie	*Solanum lycopersicum*

Fuente: López (2016)

3.1.2. Historia

El tomate cuyo nombre científico es *S. lycopersicum* es una hortaliza con orígenes en Sudamérica, en la región de los Andes donde llegaría a México y empezaría su proceso se domesticación para convertirse en el foco de difusión (Vergani, 2002). Este fruto originario de Perú era de un tamaño pequeño, sin embargo, los agricultores mexicanos fueron los que desarrollaron el fruto que hoy en día se consume (Cabieses & Lozano, 2009). En Ecuador el tomate es uno de los alimentos más consumidos en la dieta diaria de la población en diferentes recetas, tradicionales como en ensaladas y sándwiches o en platos Gourmets (Romero-Estévez et al., 2020)

López (2017) mencionó que la difusión de este cultivo y la presencia de enfermedades abióticas como fisiológicas se presentan de manera independiente de la región y condiciones agroecológicas presentes del país. Una de las enfermedades más extendidas y común relacionadas a este cultivo es el moho de la hoja (*C. fulvum*) especialmente en cultivos en invernaderos. Oliver et al. (2000) consideraron que la descripción de esta enfermedad fúngica por M.C. Cooke en 1883, resaltaron su mayor incidencia en cultivos intensivos producidos bajo invernaderos.

3.1.3. Descripción botánica

La descripción de Paredes (2009) mencionó que es una planta arbustiva que puede crecer de manera rastrera, semirrecta o erecta dependiendo del cultivo. Su sistema radicular presenta una raíz principal corta y débil, pero raíces secundarias robustas y raíces adventicias. El tallo tiene un grosor de 2 a 4 cm. Las hojas están compuestas por foliolos peciolados, lobulados con bordes dentados, cubiertos de pelos glandulares y dispuestos de forma alterna en el tallo. Las flores son pentámeras, con sépalos amarillos en igual número. El fruto es una baya, compuesta por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas.

3.1.4. Ciclo fenológico

La fenología del tomate, como cualquier otro cultivo, dependerá de las necesidades hídricas, requerimientos nutricionales, factores climáticos y la susceptibilidad de plagas y enfermedades. En el ciclo de la vida del tomate se observa tres etapas, la primera empieza con la germinación de las semillas mediante la absorción de grandes cantidades de oxígeno y con temperaturas ideales de 20 a 25°C,

la segunda etapa comienza después de 21 días de la germinación, donde las necesidades nutricionales aumentan por el crecimiento y expansión de las hojas y ramas. En última etapa el crecimiento se detiene y los nutrientes empieza a ser absorbidos para la fructificación (Espina, 2009).

3.1.5. Condiciones agroclimáticas

Este cultivar requiere de entre 8 y 16 horas de luz al día, con temperaturas diurnas que oscilan entre los 28 y 30 °C, y temperaturas nocturnas que varían entre los 15 y 18 °C. La humedad relativa ideal para su crecimiento se sitúa entre el 65 y el 70%. Además, necesita un suelo productivo que cumpla con sus necesidades básicas, preferiblemente suelos franco-arenosos, arcillo-arenosos u orgánicos, con un pH que oscile entre 5.9 y 6.5 para una óptima absorción de nutrientes (Chemonics International Inc., 2008).

3.1.6. Variedades comerciales

La descripción de variedad según (Vaca et al., 2013) consiste en una cierta población que se puede distinguir de otra población de la misma especie debido a que posee un genotipo homogéneo y características agronómicas deseables como transmitibles a la siguiente generación de forma sexual o asexual. El cultivo de tomate riñón es de gran importancia en Ecuador, las variedades más populares son Cita, Dominique, Fortuna, Michaela, Nemo, Neta y Pietro (Yauli, 2020).

Para el control de enfermedades se establece programas para minimizar daños al medioambiente como con la economía, las BPA recomiendan usar semillas de variedades sanas libres de patógenos y en caso de desconocer el estado, debe ser desinfectada para asegurar el 50% del éxito del negocio (Jaramillo et al., 2007). La superficie cultivada por tipo de semilla varía entre la común con 885 ha, semilla certificada con 219 ha y el uso de híbridos internacionales con 105 ha (ESPAC, 2025).

3.1.7. Plagas

Tabla 2

Principales plagas del tomate riñón (S. lycopersicum).

Nombre común	Nombre científico	Síntomas	Referencias
Mosquita blanca	*Trialeudores vaporariorum*	Su población es alta, deseca la hojas al absorber los jugos celulares	(Pichisaca, 2003)
Minador de la hoja	*Liriomiza* sp.	Larva de color verdoso de 4 a 6 mm, forma galerías en la parte superior de la hoja.	(Pichisaca, 2003)
Áfidos	*Aphis gossypii*	Plagas que viven en el envés de la hoja alimentados de la savia y secretando saliva toxica	(Jaramillo N. et al., 2007)
Gallina ciega	*Phyllophaga* sp.	Dañan el sistema radicular generalmente en los meses de mayo junio	(Jaramillo N. et al., 2007)

3.1.8. Enfermedades

Tabla 3

Principales enfermedades del tomate riñón (S. lycopersicum)

Nombre común	Nombre Científico	Características	Referencias
Tizón temprano	*Alternaria solani*	El patógeno se disemina por la lluvia y el viento	(Jaramillo N. et al., 2007)
Fusarium	*Fusarium oxysporum*	Una de las enfermedades más comunes en suelos ácidos además de diseminarse por semillas de tomate y suelos contaminados	(Jaramillo N. et al., 2007)
Moho gris de la hoja	*Cladosporium fulvum*	Saprofito efectivo cuyo color es verde olivo a café, infecta hojas, flores y frutos	(López, 2016)
Moho gris	*Botrytis cinerea*	Se identifica por la aparición de anillos concéntricos cuyo desarrollo se ve beneficiado en una humedad relativa del 95%	(Pichisaca, 2003)
Cenicilla	*Oidium* sp.	La aparición de pústulas blanquecinas en hojas y tallos, los periodos secos favorecen su dispersión	(Pichisaca, 2003)

3.2.Características del moho gris de la hoja (*C. fulvum*)

3.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 4

Clasificación taxonómica del moho gris de la hoja (Cladosporium fulvum).

Rango Taxonómico	Taxonomía
Reino	*Fungi*
Phylum	*Ascomycota*
Subphylum	*Pezizomycotina*
Clase	*Dothideomycetes*
Subclase	*Dothideomycetidae*
Orden	*Capnodiales*
Familia	*Davidiellaceae*
Género	*Cladosporium*

Fuente: Crous et al. (2007)

3.2.2. Generalidades

La enfermedad del moho gris de la hoja causada por *C. fulvum* (Wit, 1997) probablemente se originó en el sur de América, donde el primer caso registrado fue en EE. UU. en el estado de Carolina del Sur a finales del siglo XX. Es una de las enfermedades foliares que más perdidas ha causado por su rápido crecimiento como capacidad de invadir todo tipo de hojas, tallos, flores y en algunos casos llegando a colonizar el fruto (Crous et al., 2007).

El moho gris de la hoja del tomate es uno de los principales problemas fitosanitarios del cultivo del tomate afectando a pequeños agricultores como a las agroindustrias, reduciendo la disponibilidad de productos saludables y de calidad (Bernal et al., 2020). Los síntomas de esta enfermedad comienzan con la aparición de manchas blancas, amarillentas o verdes comenzando en la parte inferior hasta la superior (Enya et al., 2009).

De manera simultánea comienza con la producción de conidios en el envés de la hoja de una tonalidad verde olivo con una textura terciopelada (Bernal, 2007), al colonizar la superficie de la hoja reduce la fotosíntesis y en etapas más avanzados

también afecta los estomas limitando la respiración celular y la transpiración estomática (Torres et al., 2008).

3.2.3. Morfología

C. fulvum empieza la colonización con la germinación de las esporas que penetrarán los estomas y el espacio apoplástico con el fin de secretar proteínas efectoras, cuando hayan entrado las hifas a dentro estas aumentarán de tamaño y producirán hifas secundarias (Medina, 2011). Según Leiva-Mora et al. (2023) la velocidad de crecimiento es de 0.63 mm/día^{-1} pueden alcanzar un tamaño promedio de 5.4 µm mientras los conidióforos varían de 82 µm a 110 µm.

3.2.4. Genes Avr y Ecp

Diferentes patólogos en 1908 identifican la existencia de líneas resientes de tomate a *C. fulvum*, pero a su vez, estas no eran resistentes a todas las razas debido a que muestran una "especialización fisiológica". La nomenclatura de las razas se guía en la interacción de la raza con el cultivar de tomate y que es consistente a la hipótesis del "gen por gen", de manera tal que la raza se define por la cantidad de genes de avirulencia (Avr) que posee un aislado en una interacción con los genes (Cf) presentes en el genoma del tomate (Oliver et al., 2000).

Un virus necesita de genes de patogenicidad para sobrevivir, con el fin de evitar la resistencia del hospedero el virus cambia los productos de estos genes sin que afecte a la patogenicidad (Wit, 1997), la relación de *C. fulvum-S. lycopersicum* se basa en una relación gen por gen debido a que el hongo secreta proteínas efectoras (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr9) que son reconocidas por proteínas de resistencia correspondientes al hospedante (Cf2, Cf4, Cf4E, Cf9) (Stergiopoulos et al., 2010).

(Stergiopoulos et al., 2010) mencionaron que también se han caracterizado seis genes que codifican para la producción de proteínas extracelulares Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp6 y Ecp7.

3.3.Técnicas moleculares

En la biología se encuentra el área de la biología molecular, que se basa en conocimientos aportados por la bioquímica, la biología celular y la genética con el objetivo de tener un punto de vista molecular de los seres vivos (Reinoso et al., 2023).

3.3.1. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de cadena de la polimerasa o PCR (Por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) consiste en una herramienta de manipulación y análisis del material genético, esta metodología permite la síntesis de millones de copias de un segmento de ADN en específico (Pedrosa, 1999).

El uso de enzimas restrictivas o marcadores moleculares para diferenciar partes o secuencias de ADN permite seleccionar características agronómicas deseables en cultivos de gran importancia comercial, lo que sería imposibles por métodos tradicionales, como la selecciones de genes de resistencia a plagas y enfermedades (Carrer et al., 2010).

3.3.2. Electroforesis

La electroforesis es una herramienta destinada a separar fragmentos de diversos tamaños de ADN o ARN con geles de agarosa o poliacrilamida que son expuestas a una corriente eléctrica, las moléculas de mayor tamaño emigrarán de manera lenta mientras que las moléculas de menor tamaño serán más rápidas, al final serán visualizadas con una simple tinción y ayudado con un marcador de peso molecular estándar se puede estimar su tamaño (Pedrosa, 1999).

3.4.Objetivos

3.4.1. Objetivo General

Detectar los genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke. del cantón Tisaleo

3.4.2. Objetivos Específicos

Aislar el ADN genómico de los aislados de *Cladosporium fulvum*.

Detectar los genes de avirulencia AVR en los aislados de *Cladosporium fulvum*.

Amplificar los genes de proteínas extracelulares ECP en los aislados de *Cladosporium fulvum*.

CAPÍTULO II

4. Ubicación Del Estudio

La Investigación se realizó en la provincia de Tungurahua, en el cantón de Cevallos en los laboratorios de investigación de la facultad de Ciencias Agropecuarias. Coordenadas: -1.3687324897243578, -78.60776207672338 (Google Maps, 2025).



Figura 1

Ubicación del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias campus Querochaca

Fuente: Google Maps (2025)

5. Tipo de investigación

La presente investigación se realizó con un enfoque cualitativo mediante el uso de procesos empíricos, sistemáticos como críticos mediante la recolección de información científica relacionada con el tema que se seleccionó con el fin de recolectar y analizar los datos de manera clara. Se determinó la presencia o ausencia

de genes mediante PCR y visualización de bandas correspondientes a los genes amplificados.

6. Equipos y Materiales

6.1.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 (Memmert)*
- *Microondas (Samsung, MS32J5133EM-AP)*
- *PCR convencional (Thermo Scientific, A48141)*
- *Refrigeradora (Indurama, A48141)*
- *Sistema de imagen táctil ENDURO GDS*
- *Cámara de electroforesis (Biopolo)*
- *Fotodocumentador de geles*

6.2.Materiales

- *Colección de aislado del cantón Tisaleo*
- *Mechero de alcohol*
- *Medio de cultivo MS, Papa Dextrosa Agar* (*PDA,* TM Media)
- *Micropipetas* (*Thermo Scientific, Finnpipette™ F2 GLP ,0,2 a 1000 µl*)
- *Papel de aluminio*
- *Parafilm (Sigma-Aldrich)*
- *Primers (Invitrogen)*
- *Puntas para micropipetas (VQIR, 500PCS, 0,2µl, 20µl,200µl)*
- *Racks para PCR (Sigma-Aldrich, R6901-5EA)*
- *Racks para tubos eppendorf (Sigma-Aldrich, R6151)*
- *Tubos eppendorf (Brand,1.5 ml)*

6.3.Reactivos

- *Agarosa (Thermo Scientific, catálogo R0491)*
- *Agua ultrapura (Invitrogen, catálogo 1191548)*
- *Buffer TAE (Invitrogen, catálogo 2452551)*
- *EDTA (Sigma-Aldrich, catálogo E9884)*
- *Etanol (Thermo Scientific, catálogo 64-17-5)*
- *NaOH (Sigma-Aldrich, catálogo MFCD00003548)*
- *Papa Dextrosa Agar (PDA)*
- *Streptomycin Sulfate (Phyto Technology Laboratories)*
- *Tampón de extracción A (Naoh + Tween 20)*
- *Tampón de extracción B (Tris Hcl + Edta)*
- *Taq DNA polimerasa (DreamTaq Green PCR Master Mix (2X))*
- *Trackit 100 bp dna ladder (Thermo Scientific, catálogo 10488058)* • *Tris HCl pH 8 (Invitrogen, catálogo,15568025)*
- *Tween 20 (Invitrogen, catálogo LL153030)*

7. Factores De Estudio

7.1.Hipótesis

7.1.1. Hipótesis nula

H0: No se encontrará un aislado de *Cladosporium fulvum* del cantón Tisaleo que porte en su genoma los genes Avr y Ecp.

7.1.2. Hipótesis alternativa

H1: Se encontrará al menos un aislado de *Cladosporium fulvum* del cantón Tisaleo que porte en su genoma los genes Avr y Ecp.

7.2. Variables

7.2.1. Variable Independiente

- Presencia de genes Avr o Ecp
- Ausencia de genes Avr o Ecp

7.2.2. Variable dependiente

- ADN de aislados monospóricos de *C. fulvum* del cantón Ambato

7.3.Procedencia de las muestras

Las muestras que fueron utilizadas procedían de la colección de aislados monospóricos de *C. fulvum* del cantón Tisaleo, ubicados en el laboratorio de microbiología de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Tabla 5

Aislados de Cladosporium fulvum del cantón Tisaleo

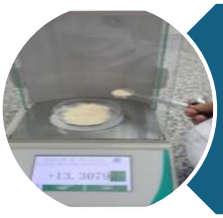
Número	Código	Número	Código
1	*FT1-04*	2	*IT701*
3	*GT3-02*	4	*JT8-07*
5	*HT5-04*	6	*JT9-03*
7	*HT5-05*	8	*IT10-09*
9	*HT6-10*	10	*JT10-10*

7.4.Diseño Experimental

El diseño que se implementó fue completamente descriptivo para determinar la presencia de genes Avr y Ecp mediante la corrida en geles de agarosa al 1%.

7.5.Estandarización de protocolos

7.5.1. Protocolo medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA).



1. Pesar 7.8 gr de *Papa Dextrose Agar en una balanza analítica.*



2. Disolver el agar en 400 ml de agua destilada mezclándola hasta que la disolución este completamente homogénea.



3. Auto clavar a una temperatura de 121° C y a 15 psi y dejar enfriar hasta que el contacto con la piel se optimo



4. En una cabina de flujo laminar previamente limpiada y expuesta a rayos UV durante 15 minutos, añadir 40 mg de antibiótico Streptomycin Sulfate, colocar 20 ml de agar en cada placa Petri flamendo la boca del envase cuando se cambie de caja.

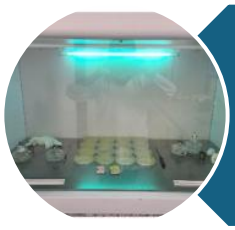


5. Cuando el agar este gelificado dar la vuelta y dejar reposar por un día completo

Figura 2

Protocolo para la preparación de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

7.5.2. Protocolo reactivación del crecimiento de los aislados de C. fulvum.



1. Limpiar la cabina de flujo laminar y materiales para exponerlos en luz UV durante 15 minutos.



2. Con el mechero de alcohol se esteriliza la asa hasta el rojo vivo y sumergir en un frasco con alcohol, calentar la asa nuevamente y dejar enfriar cerca del mechero.



3. De un aislado tomar un fragmento con la asa y colocarlo en el centro del medio de cultivo.



4. Sellar el medio de cultivo con papel Parafilm y colocar datos importantes.



5. Colocar los medios en una incubadora a 25°C para observar su crecimiento, en caso de contaminación desechar la placa.

Figura 3

Protocolo para la reactivación del crecimiento de los aislados de C. fulvum

7.5.3. Diseminación de suspensiones miceliales y conidiales con la espátula de Drigalsky en medio de cultivo PDA.



1. Tomar 500 ul de agua destilada estéril con una punta de 100 a 1000 ul recortada la punta medio centímetro.



2. Raspar el hongo con una asa y mezclar lentamente con el agua, luego reabsorber el agua con los conidios y añadir en una nueva placa Petri.



3. Con una asa Drigalsky estéril se debe extender el liquido por toda la superficie de la placa teniendo cuidado que no se rompa el medio y asegurando de cubrir los bordes



4. Sellar el medio de cultivo con papel Parafilm y colocar datos importantes (código del aislado, fecha de sembrado, etc.) e incubar a 25 °C.

Figura 4

Diseminación de suspensiones miceliales y conidiales con la espátula de Drigalsky en medio de cultivo PDA

7.5.4. Protocolo extracción de ADN.


Raspar la superficie del hongo y colocarlos en un tubo Eppendorf estéril hasta completar 100 mg.


2. Añadir 50 ul de Tampón de extracción A (Naoh + Tween 20) y mezclar en el vortex por 1 minuto.


3. Incubar la muestra a 95.5°C en un termo bloque por 20 minutos y luego refrigerar a -20°C por 30 minutos, repetir 2 veces.


4. Añadir 50 ul de *Tampón de extracción B (Tris Hcl + Edta)* y mezclar suavemente hasta homogeneizar la mezcla.


5. Centrifugar a 13.200 rpm por 7 minutos.


6. Tomar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo Eppendorf estéril.


7. Añadir 100 ul de alcohol isopropanol y refrigerar a -20°C por 30 minutos.


8. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos y luego eliminar el sobrenadante con cuidado, formara un pellet blanco en la parte inferior.


9. Añadir 500 ul de alcohol al 70% preenfriado y centrifugar a 10.000 rpm por 5 min, luego eliminar el sobrenadante y dejar secar por 12 horas para eliminar restos de alcohol.


10. Añadir 50 ul de agua libre de nucleasas y pipetear con el pellet blanco del fondo.

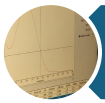
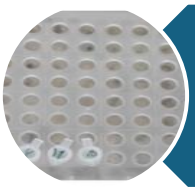

11. Tomar 2 ul y analizar la muestra en un espectrofotómetro para determinar la cantidad de ADN obtenida.

Figura 5

Protocolo para la extracción de ADN

7.5.5. Protocolo PCR



1. Preparar los tubos PCR estériles en una gradilla.



2. Añadir 12 .5 de Dream Taq Green PCR Mater Mix (2x).



3. Seguidamnete se debe colocar 1 ul de primer forward y 1 ul de primer reverse respectivo de cada gen.



4. Inmediatamente colocar 4 ul de ADN con una concentración de 200 ng/ul.



5. Aforar la solución a 25 ul con agua libre de nucleasas.



6. Poner los tubos en un vortex por 40 segundos y colocar en el termociclador PCR programando los respectivos ciclos.

Figura 6

Protocolo par PCR

7.5.6. Protocolo electroforesis



1. Mezclar 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE y calentar por 1 minuto y medio hasta que la solución se vuelva incolora.



2. Esperar que la disolución se enfrié y colocar 2,5 ul de SYBR Safe DNA y colocar en el molde y esperar hasta que gelifique.



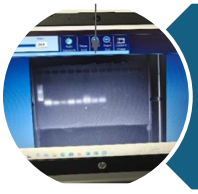
3. Colocar el gel de agarosa en la cámara de electroforesis y llenarlo con Buffer TAE 1x.



4. Colocar 5 ul de Trackit 100 bp dna Ladder y 5 ul de cada muestra en los pocillos del gel.



5. Realizamos la electroforesis a 100 voltios por 45 minutos.



6. Finalmente sacamos el gel de agarosa y lo colocamos en transiluminador.

Figura 7

Protocolo para electroforesis

7.6.Primers específicos

Tabla 6

Primers específicos usados en el estudio de determinación de genes de Avr y Ecp de C. fulvum

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Amplicon (pb)	Referencia
Avr 2	F	CATCAGCATATCCTCTTCCATCC	570	(Lucentini et al., 2017)
	R	CAGTACGTTCAAAAGCAGATAAGG		
Avr4	F	ACGGTAGGTCTGTACACGAGCC	806	(Lucentini et al., 2017)
	R	ACCGAACTGGGTCATGGAATG		
Avr 4E	F	GCCCGGTATATCGCTGTGC	640	(Lucentini et al., 2017)
	R	CGGAACCCCTGGCTGAGA		
Avr9	F	AATACAACCTTGAAACAGCTAGG	710	(Lucentini et al., 2017)
	R	GGACTCTACGGGGCTTGG		
Ecp 1	F	ACCAGGATAAGTTCGCAGTC	1327	(Stergiopoulos et al., 2007)
	R	GCCTCCGCGATGCTTCCT		
Ecp 2	F	GTCCAAGGATCGTGTCTCAAG	799	(Stergiopoulos et al., 2007)
	R	TTCTAGCAAACCCGTCTGA		
Ecp 4	F	AATTCCAACCTCCCTCCTCG	508	(Stergiopoulos et al., 2007)
	R	TTGCTCAAGCCCAGACAG		
Ecp 5	F	TATGAACACTTTTACTCTACTC	882	(Stergiopoulos et al., 2007)
	R	CGCGTCGCCTGATAGAT		

Nota: (F) Primer forward y (R) Primer Reverse

7.7.Concentración PCR

Tabla 7

Concentraciones usadas para realizar una PCR

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
DreamTaq Green 2x Master Mix	12.5	1x
Primer Forward (10 µM)	1.0	1 µM
Primer Reverse (10 µM)	1.0	1 µM
ADN molde	4.0	200ng/µL
Agua libre de nucleasas	Aforar a 25	-

Nota: Los volúmenes fueron diseñados en el laboratorio siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.8.Programas PCR

Tabla 8

Condiciones de amplificación para los genes Avr y Ecp

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	35
Hibridación	Tabla 9	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1

Nota: Se estableció en base a las indicaciones del fabricante.

Tabla 9

Condiciones de hibridación para los genes Avr y Ecp

Gen	Temperatura (°C)	Gen	Temperatura (°C)
Avr2	58	Ecp1	63
Avr4	61	Ecp2	60
Avr4E	64	Ecp4	58
Avr9	59	Ecp5	55

Nota: Se estableció en base a las indicaciones del fabricante.

CAPITULO III

8. Resultados y Discusión

8.1.Aislamiento el ADN genómico de los aislados de *C. fulvum*

El aislamiento del ADN genómico de las muestras de *C. fulvum* del cantón Tisaleo con el protocolo de extracción implementado brindó material apto para realizar estudios moleculares, la Tabla 10 muestra las relaciones 260/280 (detección de contaminación por proteínas) y 260/230 (detección de contaminantes por carbohidratos o fenol) así como la concentración de ADN que se logró obtener.

Tabla 10

Análisis de la pureza y concentración de ADN obtenido

Cantón	Código	Cantidad de ADN (ng/ µL)	260/280	260/230
Tisaleo	FT1-04	1156,0,3	1.79	2.08
Tisaleo	IT7-01	1374,9	1.98	2.04
Tisaleo	GT3-02	1818,6	2.01	2.14
Tisaleo	JT8-07	1744,8	2.08	2.03
Tisaleo	HT5-04	1116,5	1.98	2.06
Tisaleo	JT9-03	2812,5	1.87	2.11
Tisaleo	HT5-05	722,3	2.10	2.04
Tisaleo	IT10-09	1173,7	2.01	2.09
Tisaleo	HT6-10	569,3	1.95	2.06
Tisaleo	JT10-10	496,6	2.05	2.13

Para Reinoso et al. (2023) fue importante que el ADN estuviese limpio y sin contaminantes para desarrollar exitosamente la reacción en la cadena de la polimerasa o PCR. Para ello se debe cuantificar por espectrofotometría sus concentraciones e interpretar la relación 260/280 la cual debe tener valores >1.6 (ADN con una pureza aceptable). Una relación 1.8 a 2.0 se considera que es óptima. En nuestro estudio los valores obtenidos estuvieron en este rango, a excepción de cuatro aislados (GT3-02, HT5-05, IT10-09 y JT10-10) que superaron el valor de 2.

Sin embargo, Castro-Rojas et al. (2023) mencionaron que la relación ideal en una relación 260/230 es de 2.0 a 2.2, valores en que se encuentran en el análisis.

8.2. Detección de los genes de avirulencia AVR en los asilados de *C. fulvum*

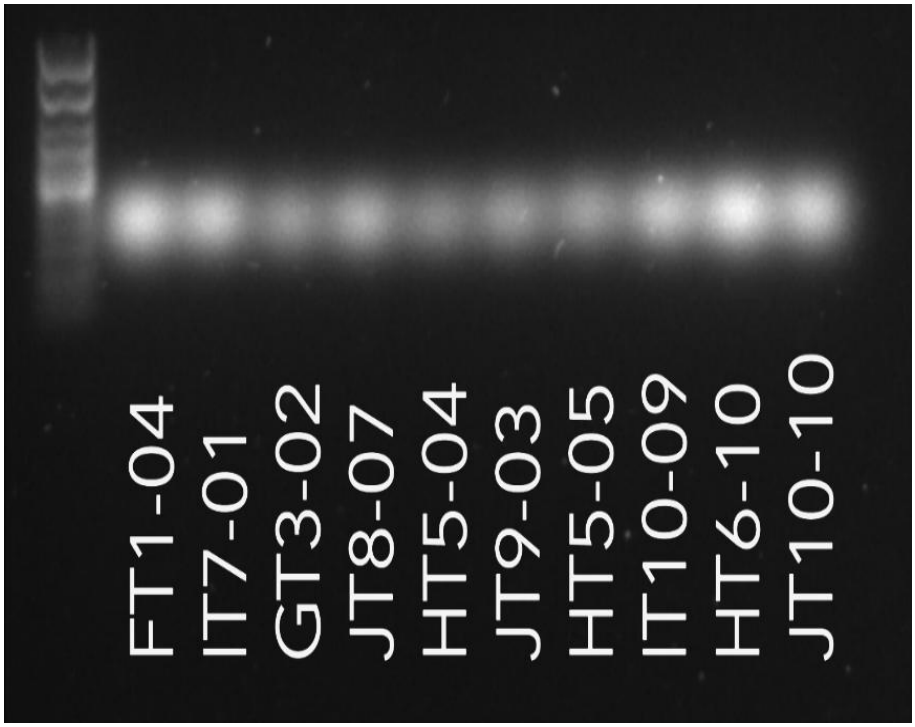


Figura 8

Amplificación del gen Avr2 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Avr2 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la presencia de este mismo gen.

Según la investigación que realizaron Lucentini et al. (2021) con la finalidad de amplificar el gen Avr2, programaron un desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguidamente por una desnaturalización a 94°C, pero con un tiempo de 30 segundos y 40 ciclos. Para la hibridación se estableció una temperatura de 63°C con 40 ciclos y por 1 minuto, finalizando con la extensión a 72°C por 1 minuto. El programa que se utilizó para esta investigación no es igual al empleado por Lucentini et al. (2021), debido a que se siguieron las condiciones que se describían en el manual de la Dream Taq Green PCR Master Mix 2x, elevando la temperatura de la inicial

hibridación a 95°C por 3 minutos, sin embargo, la temperatura para la hibridación fue menor, utilizando 58°C por 30 segundos y 35 ciclos, donde se evidencio la presencia del gen Avr2 en todos los asilados.

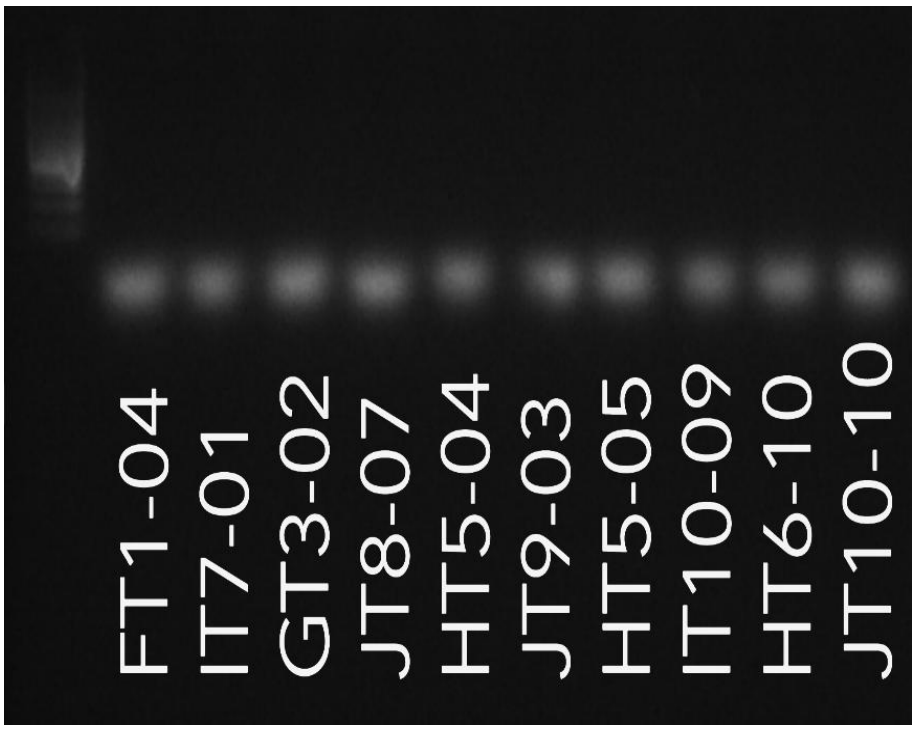


Figura 9

Amplificación del gen Avr4 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Avr4 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la ausencia de este mismo gen.

El gen Avr4 se lo encontró ausente en los aislados del cantón Tisaleo, sin embrago otros autores mencionan su presencia en diferentes países como Yoshida et al. (2021) identificando su presencia como origen en China y su aparición en la prefectura de Nara en Japón, así como la colección de Bernal (2007) donde detalló la presencia de los genes Avr4 y Avr4E en diferentes localidades en Cuba, lo que le permitió el desarrollo de diseños de cebadores específicos en aislados que se consideran los más virulentos debido a la secuenciación de este gen.

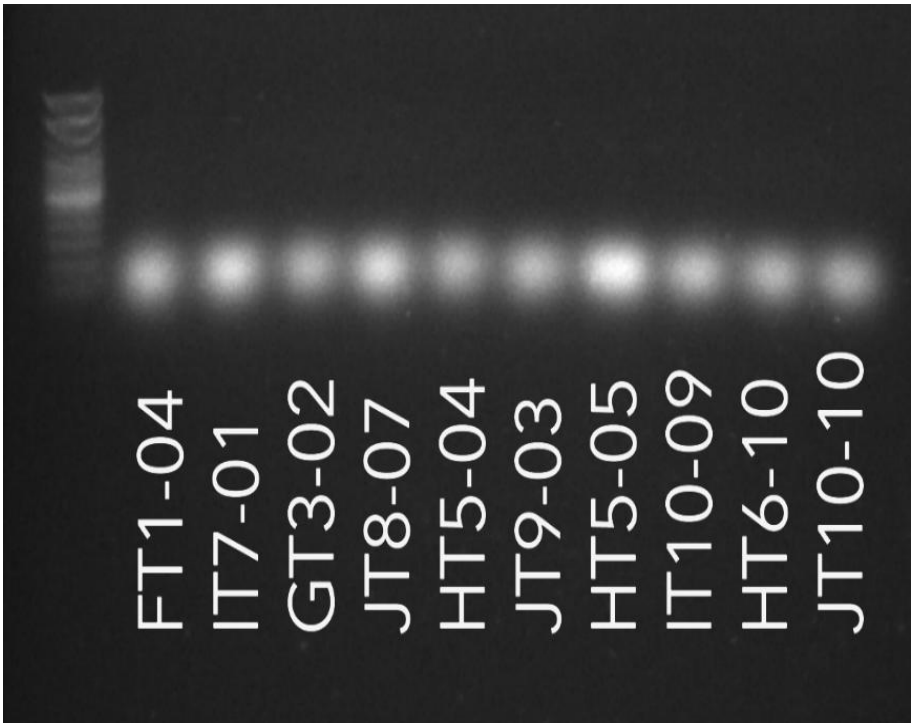


Figura 10

Amplificación del gen Avr4E de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Avr4E que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la ausencia de este mismo gen.

Bernal Cabrera, 2007) señaló que el programa que se utilizó para la amplificación fue de 94°C por 5 minutos por 34 ciclos, una hibridación de 55° C y una extensión de a 72°C por un minuto. En la hibridación que fue programada por nosotros hubo un aumento de la temperatura a 64°C.

Lucentini (2021) señalo que los aislados de *C. fulvum* de Argentina existe la presencia del gen Avr4E y esta poseía 16 polimorfismos generando una alteración en la secuencia aminoacídica de la proteína.

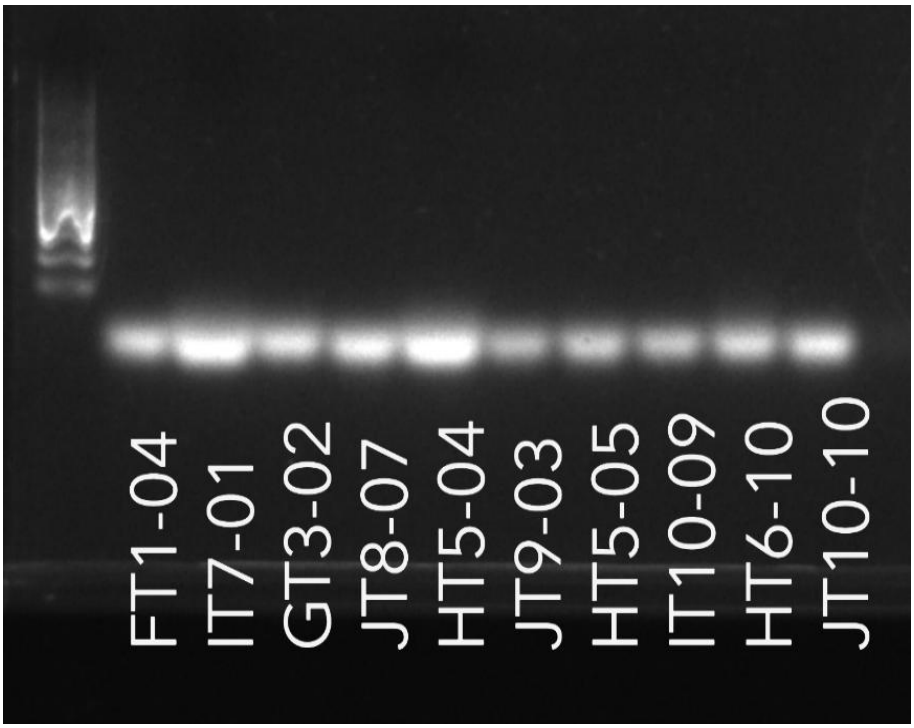


Figura 11

Amplificación del gen Avr9 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Avr9 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la ausencia de este mismo gen.

La presencia del gen Avr9 se encuentran presente en aislados de Argentina, Europa y Japón, de igual manera que el gen Avr4E se encuentra polimorfismo debido a transacción y transversión de un nucleótido (Lucentini, 2021).

Los aislados monospóricos de *C. fulvum* del cantón Tisaleo que fueron seleccionados y están en la Tabla 11 muestra en resumen la ausencia de la mayoría de los genes Avr exceptuando por el gen Avr2. Bernal (2007) señaló que este mismo gen posee menos mutaciones puntuales y la búsqueda de una alta variabilidad no es recomendable, sin embargo, conocer la presencia de este gen nos permite la selección de una variedad de tomate silvestres con genes de resistencia Cf o adquirir híbridos comerciales ya existentes como es el Lirio 42 o Juliet (López, 2016).

Tabla 11

Presencia de genes Avr en el cantón Tisaleo

Aislado	Avr2	Avr4	Avr4E	Avr9
FT1-04	+	-	-	-
IT7-01	+	-	-	-
GT3-02	+	-	-	-
JT8-07	+	-	-	-
HT5-04	+	-	-	-
JT9-03	+	-	-	-
HT5-05	+	-	-	-
IT10-09	+	-	-	-
HT6-10	+	-	-	-
JT10-10	+	-	-	-

Nota: Presencia (+) o ausencia (-)

8.3.Amplificación de los genes ECP en los aislados de *C. fulvum*

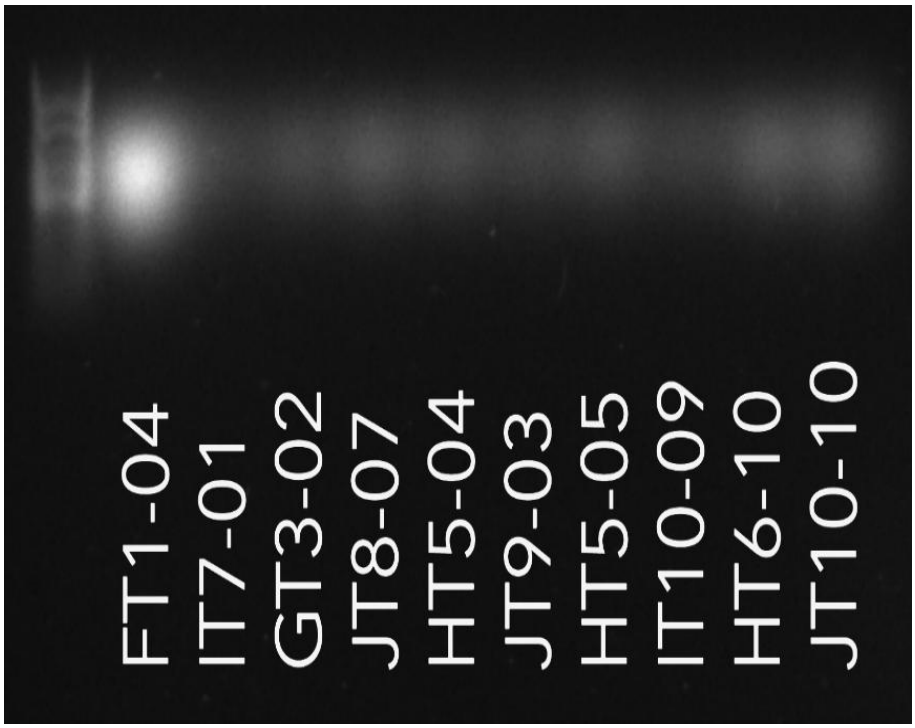


Figura 12

Amplificación del gen Ecp1 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Ecp1 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la presencia de este mismo gen.

El programa PCR que se empleó consto de una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, una hibridación por 30 segundos a 54° C con 34 ciclos y la extensión por 72°C por 1 minuto (Bernal, 2007). El programa que utilizamos en el laboratorio de microbiólogo también fue diferente para los genes Ecp, difiere de igual manera en la hibridación, debido a que la temperatura es mayor a lo que se describe, determinado la temperatura a 63°C lo que nos permitió determinar la presencia de este gen en todos los aislados.

Para Bernal (2007) mencionó que la presencia del gen Ecp1 es de gran importante para *C. fulvum* cuando este se encentra colonizando los tejidos del tomate, detallando además la presencia de este gen en aislados en Cuba.

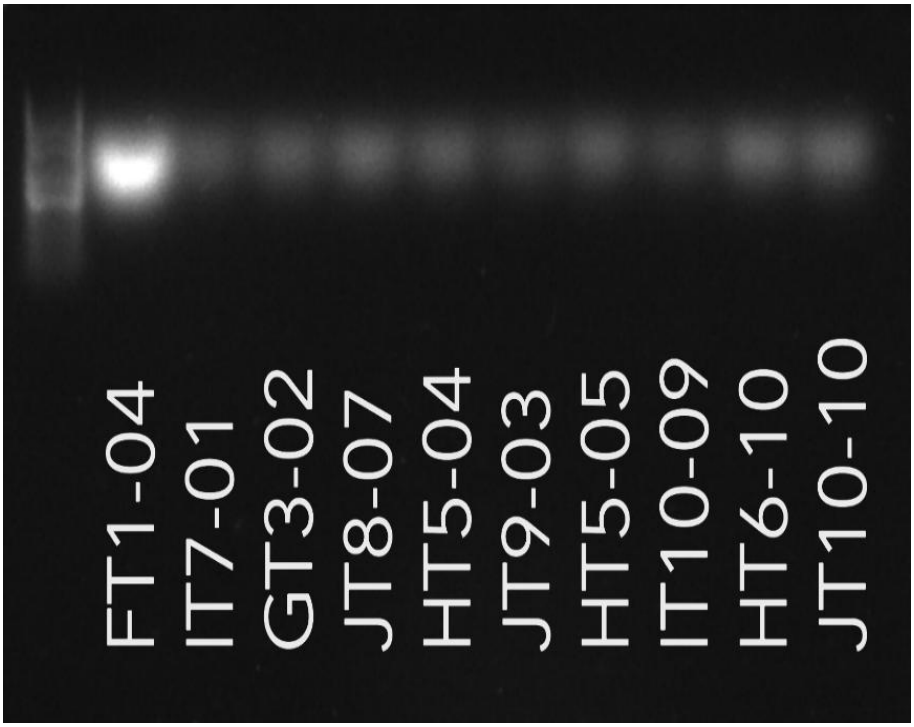


Figura 13

Amplificación del Ecp2 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Ecp2 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la presencia de este mismo gen.

Bernal (2007) señalo que la presencia de los genes Ecp1 y Ecp2 tiene una gran importancia, aunque a diferencia del Ecp1 el Ecp 2 cumple un rol vital cuando *C. fulvum* se encuentra esporulando, de igual forma se encuentra en los asilados de Cuba en un 95.8% correspondiendo a los resultados obtenidos.

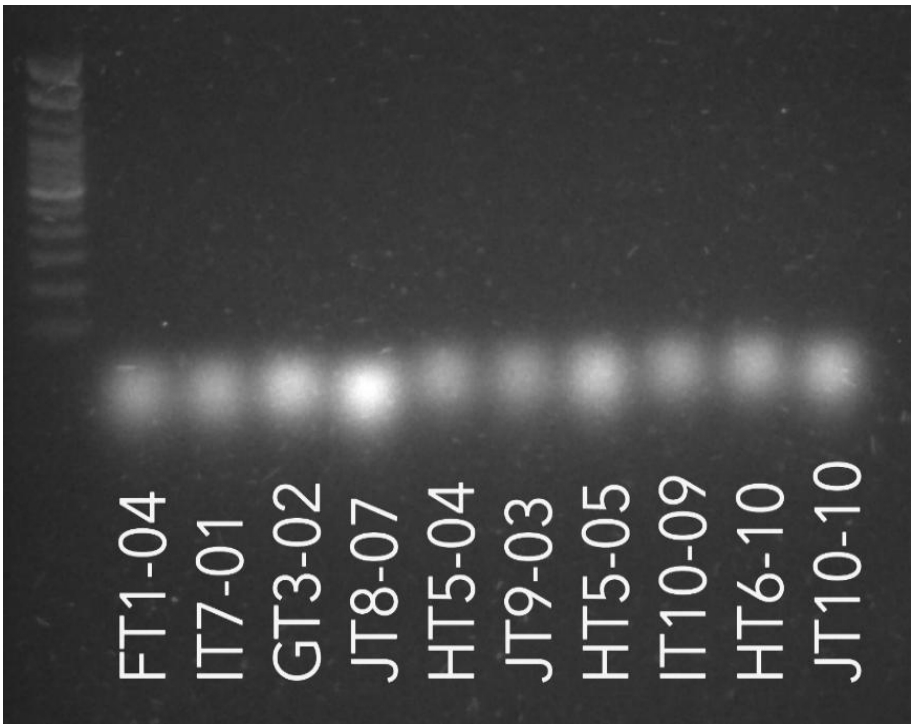


Figura 14

Amplificación del Ecp4 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Ecp4 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la ausencia de este mismo gen.

Para Bernal (2007) la presencia del gen Ecp4 de aislados de *C. fulvum* de Cuba es del 83.3%, de igual manera Lucentini (2021) señala su presencia en un aislado europeo que contiene 508 bp, sin embrago para los asilados del cantón Tisaleo de Ecuador, estos se encuentran ausentes.

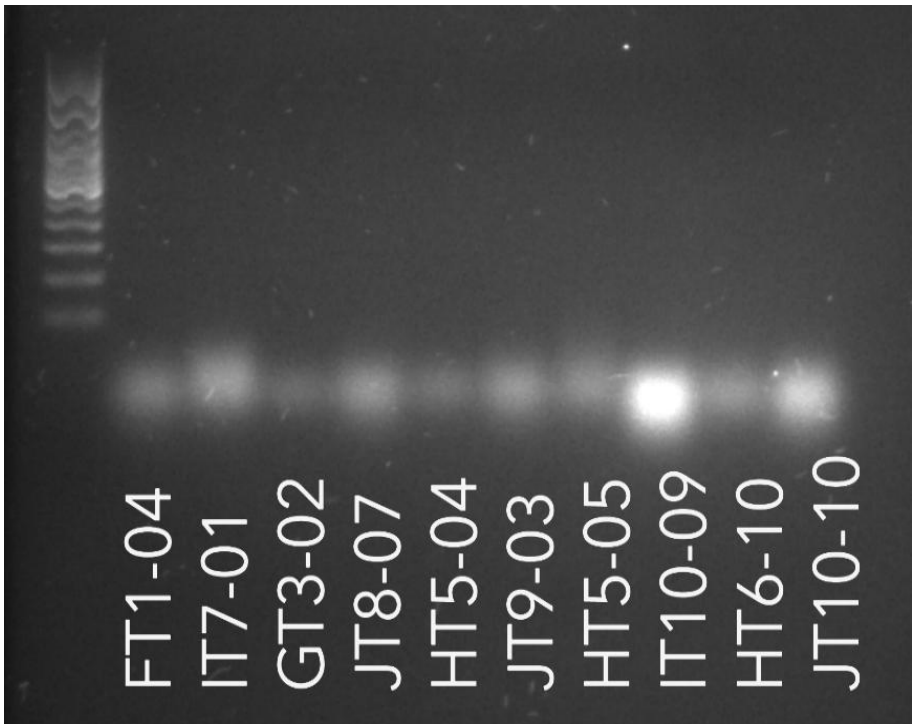


Figura 15

Amplificación del Ecp5 de 10 aislados monospóricos del cantón Tisaleo en un gel de agarosa al 1%

La amplificación del gen Ecp5 que se realizó con el objetivo de detectar la ausencia o presencia en 10 aislados monospóricos seleccionados de *C. fulvum* pertenecientes al cantón Tisaleo evidenció la ausencia de este mismo gen.

Lucentini et al., (2021) señalaron que la presencia del gen Ecp5 genes en Argentina con 883 pb y de igual manera Bernal (2007) presentó con un porcentaje de 87.5% la expresión de estos genes en asilados de Cuba, sin embargo, en el cantón Tisaleo no se encuentra presente.

La Tabla 12 presenta la presencia los gens Ecp1 y Ecp2 y señalando la ausencia del Ecp 4 y Ecp5.

Tabla 12

Presencia de genes Ecp en el cantón Tisaleo

Aislado	Ecp1	Ecp2	Ecp4	Ecp5
FT1-04	+	+	-	-
IT7-01	+	+	-	-
GT3-02	+	+	-	-
JT8-07	+	+	-	-
HT5-04	+	+	-	-
JT9-03	+	+	-	-
HT5-05	+	+	-	-
IT10-09	+	+	-	-
HT6-10	+	+	-	-
JT10-10	+	+	-	-

Nota: Presencia (+) o ausencia (-)

La caracterización de los genes Avr y Ecp de los aislados monospóricos de *C. fulvum* del cantón Tisaleo contribuirá como bases para la implementación de técnicas moleculares y técnicas agrícolas que darán resultados positivos, de igual manera dejara un precedente para el establecimiento para el desarrollo de nuevos programas de mejoramiento genético.

CAPTITULO IV

9. Conclusiones y Recomendaciones

9.1.Conclusiones

- Se logró aislar el ADN genómico de elevada pureza libre de contaminantes *C. fulvum* apto para el desarrollo de PCR mediante la estandarización de un protocolo de extracción de ADN eficaz.
- De los genes Avr solamente se detectó el Avr2 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Tisaleo.
- Solamente se detectaron los genes correspondientes a Ecp1 y Ecp2 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Tisaleo.

9.2.Recomendaciones

- Continuar con la investigación para determinar los genes de los demás aislados para formar una base de datos más amplia con el fin de dejar un precedente y sea material de apoyo para otras localidades.
- Realizar PCR en tiempo real para determinar la expresión cuantitativa de estos genes en plantas inoculadas en invernadero.
- Secuenciar los genes Avr y Ecp presentes en los aislados estudiados para detectar posibles mutaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Alemán Pérez, R. D., Domínguez Brito, J., Rodríguez Guerra, Y., & Soria Re, S. (2016). Indicadores morfológicos y productivos del cultivo del tomate en Invernadero con manejo agroecológico en las condiciones de la Amazonía Ecuatoriana. *Centro Agrícola*, *43*(1), 71–76. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852016000100010

Bernal Cabrera, A. (2007). *Caracterización de aislados de Passalora fulva braun & crous (sin. Cladosporium fulvum Cooke) provenientes de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) En condiciones de cultivo protegido*. https://www.researchgate.net/publication/262653139_CARACTERIZACION_DE_AISLADOS_DE_Passalora_fulva_BRAUN_CROUS_SIN_*Cladosporium_fulvum*_COOKE_PROVENIENTES_DE_TOMATE_Lycopersicon_esculentum_MILL_EN_CONDICIONES_DE_CULTIVO_PROTEGIDO

Bernal Cabrera, A., Herrera Isla, L., Martínez Coca, B., Peteira Delgado, B., Leiva Mora, M., Lazo Roger, Y., Bernal Cabrera, A., Herrera Isla, L., Martínez Coca, B., Peteira Delgado, B., Leiva Mora, M., & Lazo Roger, Y. (2020). El patosistema *Solanum lycopersicum* - *Cladosporium fulvum* en las condiciones de cultivo protegido tropical en Cuba. *Centro Agrícola*, *47*, 88–94. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852020000500088&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Cabieses, F., & Lozano, N. (2009). La historia del tomate. *Científica (Descontinuada)*, *6*(2), 194–197. https://doi.org/10.21142/CIENT.V6I2.194-197

Caguana, M. (2003). *Cultivo de tomate riñón en invernadero* (1st ed., Vol. 1). https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1366&context=abya_yala

Carrer, H., Barbosa, A. L., & Ramiro, D. A. (2010). Biotecnologia na agricultura. *Estudos Avançados*, *24*(70), 149–164. https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300010

Castro-Rojas, C., Tere-Peña, C., Arias-Cortés, M., & y otros. (2023). *Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. https://inm.gov.co/wp-content/uploads/2023/11/Guia-de-PCR-final-1.pdf

Chemonics International Inc. (2008). *Programa de diversificacion horticola Proyecto de Desarrollo de la Cadena de Valor y Conglomerado Agrícola*. https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENF01CH517t.pdf

Crous, P. W., Braun, U., Schubert, K., & Groenewald, J. Z. (2007). Delimiting Cladosporium from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*, *58*, 33–56. https://doi.org/10.3114/SIM.2007.58.02

de la Rosa, S., Schol, C. R., Ramos Peregrina, Á., Winter, D. J., Hilgers, A. M., Maeda, K., Iida, Y., Tarallo, M., Jia, R., Beenen, H. G., Rocafort, M., de Wit, P. J. G. M., Bowen, J. K., Bradshaw, R. E., Joosten, M. H. A. J., Bai, Y., & Mesarich, C. H. (2024). Sequential breakdown of the Cf-9 leaf mould resistance locus in tomato by Fulvia fulva. *New Phytologist*, *243*(4), 1522–1538. https://doi.org/10.1111/NPH.19925,

De Wit, P. J. G. M. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science*, *2*(12), 452–458. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01139-4

de Wit, P. J. G. M., van der Burgt, A., Ökmen, B., Stergiopoulos, I., Abd-Elsalam, K. A., Aerts, A. L., Bahkali, A. H., Beenen, H. G., Chettri, P., Cox, M. P., Datema, E., de Vries, R. P., Dhillon, B., Ganley, A. R., Griffiths, S. A., Guo, Y., Hamelin, R. C., Henrissat, B., Kabir, M. S., … Bradshaw, R. E. (2012). The Genomes of the Fungal Plant Pathogens *Cladosporium fulvum* and Dothistroma septosporum Reveal Adaptation to Different Hosts and Lifestyles But Also Signatures of Common Ancestry. *PLOS Genetics*, *8*(11), e1003088. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003088

Enya, J., Ikeda, K., Takeuchi, T., Horikoshi, N., Higashi, T., Sakai, T., Iida, Y., Nishi, K., & Kubota, M. (2009). The first occurrence of leaf mold of tomato caused by

races 4.9 and 4.9.11 of Passalora fulva (syn. Fulvia fulva) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, *75*(1), 76–79. https://doi.org/10.1007/S10327-008-0134-0/METRICS

ESPAC. (2025). *Estadísticas Agropecuarias*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/

Espina Paz, W. L. (2009). *Material de apoyo para las capacitaciones sobre el cultivo del tomate de la Fundación FUDI*. https://glifos.unis.edu.gt/digital/tesis/2009/23904.pdf

Evelyn Thairy, A. P. (2021). *Evaluación de la relación fenotipo ambiente de seis cultivares de tomate (solanum lycopersicum l.) en el cantón machala* [Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/16536

Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, *9*(Volume 9, 1971), 275–296. https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423

Foolad, M. R. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*, *2007*, 64358. https://doi.org/10.1155/2007/64358

Google Maps. (2025). *Universidad Técnica de Ambato Campus Querochaca*. https://www.google.com/maps/@-1.3691587,-78.6068163,392m/data=!3m1!1e3?entry=ttu&g_ep=EgoyMDI1MDYwNC4wIKXMDSoASAFQAw%3D%3D

Jácome Pilco, D. E. (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.* https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/34298

Jaramillo N., J., Rodriguez, V. P., Guzman A., M., Zapata, M., & Rengifo M., T. (2007). *Producción de tomate bajo condiciones protegidas*. https://www.fao.org/4/a1374s/a1374s00.pdf#page=235.08

Karimi-Jashni, M., Maeda, K., Yazdanpanah, F., de Wit, P. J. G. M., & Iida, Y. (2022). An Integrated Omics Approach Uncovers the Novel Effector Ecp20-2 Required for Full Virulence of *Cladosporium fulvum* on Tomato. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 919809. https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.919809/BIBTEX

Kruijt, M., Brandwagt, B. F., & De Wit, P. J. G. M. (2004). Rearrangements in the Cf-9 Disease Resistance Gene Cluster of Wild Tomato Have Resulted in Three Genes That Mediate Avr9 Responsiveness. *Genetics*, *168*(3), 1655. https://doi.org/10.1534/GENETICS.104.028985

Leiva-Mora, M., Jacome, D., Pablo Páez, P., Pallo, E., & Núñez, R. (2023). 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. *Revistabionatura*. https://www.revistabionatura.com/files/2023.08.03.17.pdf

López Marín, L. M. (2016). *Manual técnico del cultivo de tomate Solanum lycopersicum*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). https://repositorio.iica.int/items/ac1c1a34-20f3-4564-83a9-0aae65452d82

Lucentini, C. G. (2021). *Los polimorfismos en los Avr de* Fulvia fulva *(*Sin: Cladosporium fulvum*) afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis del tomate con la resistencia sistémica inducida y adquirida*. https://doi.org/10.35537/10915/116403

Lucentini, C. G., Medina, R., Franco, M. E. E., Saparrat, M. C. N., & Balatti, P. A. (2021). Fulvia fulva [syn. Cladosporium fulvum, Passalora fulva] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic avr and ecp gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, *159*(3), 525–542. https://doi.org/10.1007/S10658-020-02181-9/METRICS

Lucentini, C. G., Medina, R., Troncozo, M. I., López, S. M. Y., Franco, M. E. E., Rollán, M. C., Ronco, B. L., Saparrat, M. C. N., & Balatti, P. A. (2017). *Diversidad y razas de [Cladosporium fulvum], el agente causal del moho de la hoja del tomate*. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66665

Madriz Ordeñana, K. (2002). *Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno*. https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6562

Medina, R. (2011). *Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de* Cladosporium. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/67014

Medina, R., López, S. M. Y., Franco, M. E. E., Rollan, C., Ronco, B. L., Saparrat, M. C. N., De Wit, P. J. G. M., & Balatti, P. A. (2015). A survey on occurrence of Cladosporium fulvum identifies race 0 and race 2 in tomato-growing areas of Argentina. *Plant Disease*, *99*(12), 1732–1737. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1270-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-12-14-1270-RE_F4-1449591549458.JPEG

Montaño Méndez, I. E., Valenzuela Patrón, I. N., & Villavicencio López, K. V. (2021). Competitividad del tomate rojo de México en el mercado internacional: análisis 2003-2017. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, *12*(7), 1185–1197. https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v12i7.2531

Morocho Quisay, A. J. (2023). *Sistema de fumigación para la aplicación de productos fitosanitarios sobre cultivos de tomate de carne utilizando conceptos de agricultura 4.0* [Universidad Nacional de Chimborazo]. http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/10908

Oliver, R. P., Henricot, B., & Segers, G. (2000). Cladosporium fulvum, Cause of Leaf Mould of Tomato. *Fungal Pathology*, 65–91. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9546-9_3

Otero, M., & Meoño, J. F. L. (2016). La industrialización de la agricultura: riesgos y desafíos para América Latina frente a la globalización y la apertura. *Agroalimentaria*, *5*(8), 71–77. http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/agroalimentaria/article/view/1234

Paredes Zambrano, A. (2009). *Cultivo de tomate en invernadero*. 6–7. www.produmedios.org

Pedrosa Amado, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, *3*(2), 0–0.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Perez Valduciel, I., Aguilar, A., Tapia, M., Barrero, M., & Alonso, G. (2012). Era Biotecnológica: Usos y Aplicaciones de la Biología Molecular en la Tecnología de Alimentos. *MIBE*, *6*, 53–56. https://www.researchgate.net/publication/235990787_Era_Biotecnologica_Usos_y_Aplicaciones_de_la_Biologia_Molecular_en_la_Tecnologia_de_Alimentos

Pichisaca, M. (2003). *El cultivo de tomate riñón en invernadero (Lycopersicon esculentum)*. https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1366&context=abya_yala#page=7.14

Reinoso, E. B., Dieser, S. A., & Moliva, M. V. (2023). *Manual de herramientas moleculares: Conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana*. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/223282

Romero-Estévez, D., Yánez-Jácome, G. S., Simbaña-Farinango, K., Vélez-Terreros, P. Y., & 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

Snoeijers, S. S., Pérez-García, A., Goosen, T., & De Wit, P. J. G. M. (2003). Promoter analysis of the avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum in the model filamentous fungus Aspergillus nidulans. *Current Genetics*, *43*(2), 96–102. https://doi.org/10.1007/S00294-003-0374-7

Stergiopoulos, I., De Kock, M. J. D., Lindhout, P., & De Wit, P. J. G. M. (2007). Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen Cladosporium fulvum reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *20*(10), 1271–1283. https://doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1271

Stergiopoulos, I., Van Den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., Van Liere, S., Kema, G. H. J., & De Wit, P. J. G. M. (2010). Tomato Cf resistance proteins

mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(16), 7610–7615. https://doi.org/10.1073/PNAS.1002910107/SUPPL_FILE/PNAS.201002910SI.PDF

Tavera Zapata, K. P., Jaramillo Cárdenas, J. D., Posada Goez, D., & Rivera Erazo, J. E. (2019). AGRICULA AGRICULTURA 4.0. *Encuentro Internacional De Educación En Ingeniería*. https://acofipapers.org/index.php/eiei/article/view/210/204

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. *Molecular Plant Pathology*, *6*(4), 379–393. https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00292.X

Torres, E., Iannacone, J., & Gomez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate Cladosporium fulvum empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, *67*(1), 169–178. https://doi.org/10.1590/S0006-87052008000100021

Truong, H. T. H., Choi, H. S., Cho, M. C., Lee, H. E., & Kim, J. H. (2011). Use of Cf-9 gene-based markers in marker-assisted selection to screen tomato cultivars with resistance to Cladosporium fulvum. *Horticulture Environment and Biotechnology*, *52*(2), 204–210. https://doi.org/10.1007/S13580-011-0164-Y/METRICS

Vaca, I., Pilaquinga, P., Nogales, H., & Granada, D. (2013). *Buenas prácticas agrícolas PARA PAPA* (1st ed., Vol. 1). https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2022/02/Gui%CC%81a-de-BPA-para-papa.pdf

van Esse, H. P., van't Klooster, J. W., Bolton, M. D., Yadeta, K. A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P. J. G. M., & Thomma, B. P. H. J. (2008). The Cladosporium fulvum Virulence Protein Avr2 Inhibits Host Proteases Required for Basal Defense . *The Plant Cell*, *20*(7), 1948–1963. https://doi.org/10.1105/tpc.108.059394

Vergani; Rubén. (2002). Una breve historia del tomate. In *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros, ISSN 1132-2950, No 158, 2002, págs. 18-27*. Ediciones de Horticultura. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=171170

Yauli Ronquillo, D. J. (2020). *Análisis estratégico comercial para semillas de tomate riñón caso: Agrofyt*. PUCE - Ambato. https://repositorio.puce.edu.ec/handle/123456789/41573

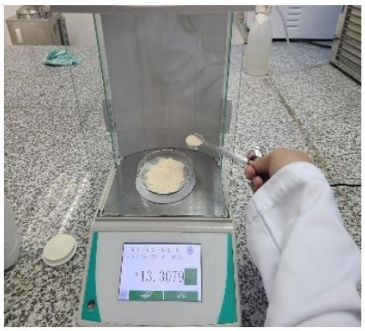
Yoshida, K., Asano, S., Sushida, H., & Iida, Y. (2021). Occurrence of tomato leaf mold caused by novel race 2.4.9 of Cladosporium fulvum in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, *87*(1), 35–38. https://doi.org/10.1007/S10327-020-00963-X/METRICS

Zhao, T., Pei, T., Jiang, J., Yang, H., Zhang, H., Li, J., & Xu, X. (2022). Understanding the mechanisms of resistance to tomato leaf mold: A review. *Horticultural Plant Journal*, *8*(6), 667–675. https://doi.org/10.1016/J.HPJ.2022.04.008

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar PDA.

 Pesar 7.5 gr de PDA.	 Mezclar con agua destilada
 Poner en un envase sellado	 Esterilización de PDA
 Exposición a rayos UV	 Poner 20 ml de PDA en cada caja Petri



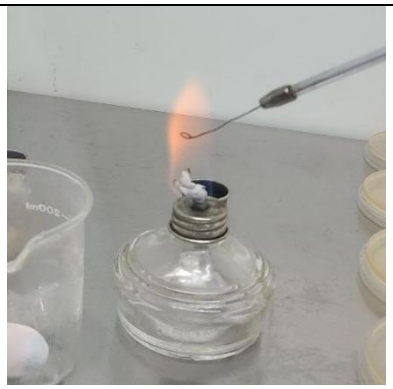
Dejar reposar por 1 día

Anexo 2

Reactivación del crecimiento de Cladosporium fulvum.



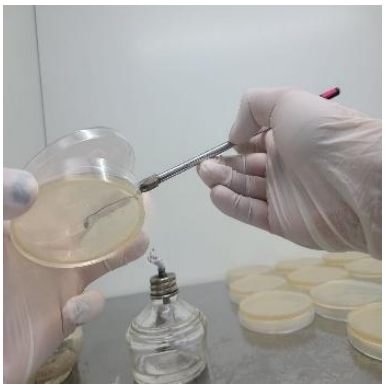
Exponer a rayos UV los materiales



Incinerar la asa bactereologica



Tomar un fragmento de micelio de *C. fulvum.*

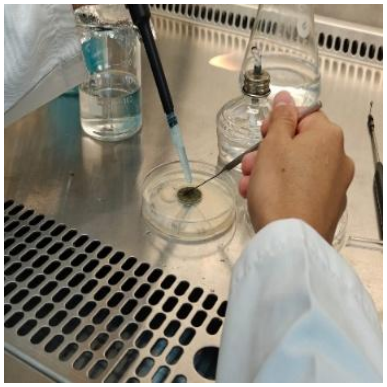


Poner ese fragmento en el centro del medio PDA.

 Etiquetar y sellar la placa con papel Parafilm	 Incubar la muestra a 25 °C

Anexo 3

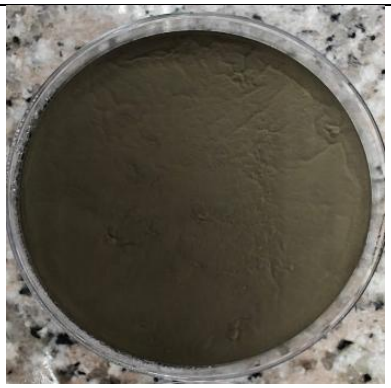
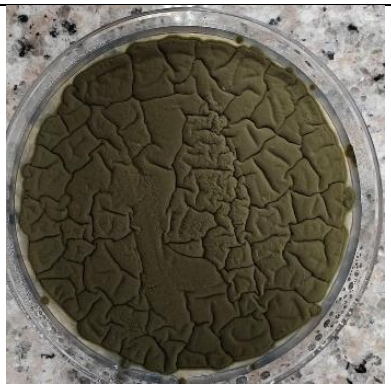
Diseminación de suspensiones miceliales y conidiales con la espátula de Drigalsky en medio de cultivo PDA.

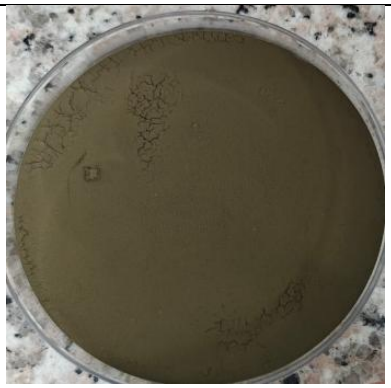
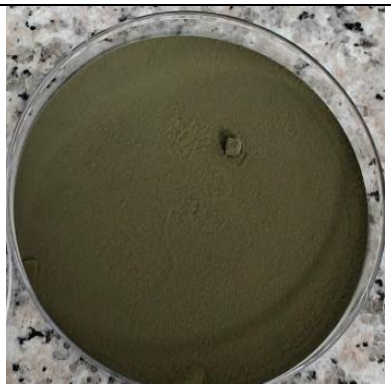
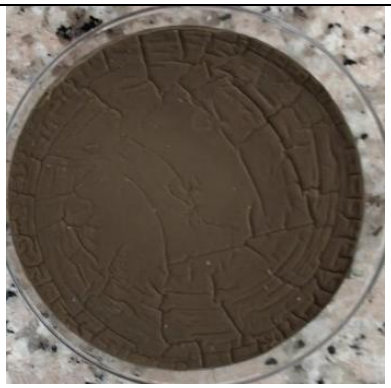
 Identificar que las muestras estuviesen sin contaminación	 Raspar el micelio y mezclarlo con agua destilada esterilizada.

 Poner el agua con micelio en medio PDA y esparcirlo por toda la superficie.	 Incubar la muestra a 25 °C

Anexo 4

Placas Petri con colonias de los aislados de C. fulvum.

 Medio con el aislado FT1-04	 Medio con el aislado JT9-03
 Medio con el aislado IT7-01	 Medio con el aislado HT5-05

 Medio con el aislado GT3-02	 Medio con el aislado IT10-09
 Medio con el aislado JT8-07	 Medio con el aislado HT6-10
 Medio con el aislado HT5-04	 Medio con el aislado JT10-10

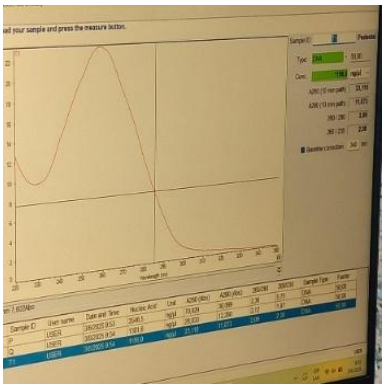
Anexo 5

Extracción de ADN.

		
Colocar el buffer A	Hacer un shock térmico con un termo bloque	Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf estéril

Anexo 6

Análisis de pureza y concentración del ADN.

	
Colocar 2 ul de ADN en un espectrofotómetro	Determinar la pureza y concentración del ADN

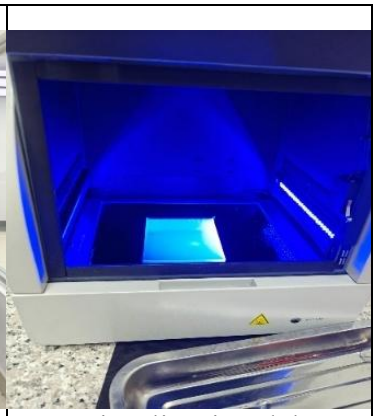
Anexo 7

Técnica molecular de PCR tiempo final.

 Preparar la mezcla PCR	 Programar el termociclador con las temperaturas adecuadas

Anexo 8

Corrida de electroforesis.

 Preparar el gel de agarosa al 1%	 Colocar el gel en una cámara de electroforesis	 Visualización del resultado en un trans iluminador