



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



CARRERA DE AGRONOMÍA

**“Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum*
en tomate riñón en el cantón Píllaro”**

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

AUTOR:

Juan Pablo Acurio Quezada

TUTOR:

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C

CEVALLOS-ECUADOR

2025

Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* en tomate riñón en el cantón Píllaro

REVISADO POR:



Ing. Leiva Mora Michel, PhD.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

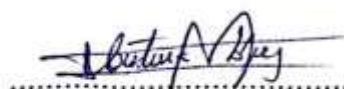


Ing. Pomboza Tamaquiza Pedro Pablo, PhD

FECHA

22/07/2025

PRESIDENTE DE TRIBUNAL



BQF. Mg. López Villacís Isabel Cristina

22/07/2025

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



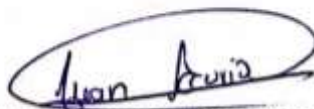
Ing. Vásquez Freytez Carlos Luis, PhD

22/07/2025

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **JUAN PABLO ACURIO QUEZADA**, portador de ciudadanía número: 1805457775, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “**Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* en tomate riñón en el cantón Píllaro**” 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.

A handwritten signature in blue ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read 'Juan Pablo Acurio'.

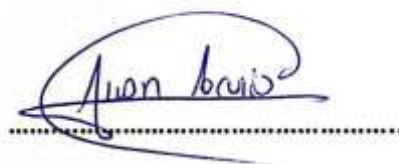
Juan Pablo Acurio Quezada

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación “**Detección de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* en tomate riñón en el cantón Píllaro**” 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 Pablo Acurio Quezada

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada en primer lugar a Dios, fuente de sabiduría, fortaleza y guía en cada paso de este camino.

A mis padres, Pablo y Gina por su amor incondicional, apoyo constante y enseñanzas que han sido el pilar fundamental en mi vida. Su sacrificio y confianza en mí me han impulsado a seguir adelante.

A mi hermana, compañera de vida y confidente, por su ánimo, comprensión y por estar siempre a mi lado en los momentos buenos y difíciles.

A toda mi familia, por ser mi refugio y mi inspiración, por brindarme un hogar lleno de amor y valores que me han formado como persona.

Al Doctor Michel Leiva por compartir sus conocimientos y ser una fuente de apoyo durante todo el transcurso.

A mis amigos y compañeros de clase, por su amistad, apoyo y por compartir conmigo esta etapa de aprendizaje y crecimiento. Gracias por los momentos de alegría, colaboración y motivación que hicieron más llevadero este proceso.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy gracias a Dios, por ser mi guía y fortaleza durante todo este proceso, por brindarme salud, sabiduría y perseverancia para alcanzar esta meta.

A mi Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por ofrecerme las herramientas académicas y el espacio propicio para mi formación profesional.

A mi tutor de tesis, Doctor Michel Leiva, por su valioso apoyo, orientación constante, paciencia y dedicación, que fueron fundamentales para la realización y culminación exitosa de este trabajo.

Agradezco al proyecto de investigación “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.

Juan Pablo Acurio Quezada

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I	14
1.1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.2. Marco Teórico	16
1.2.1 Taxonomía del tomate riñón (<i>S. lycopersicum</i>)	16
1.2.2 Importancia del tomate en el Ecuador	17
1.2.3. <i>C. fulvum</i>	17
1.3. Antecedentes investigativos	18
1.4. Categorías fundamentales.....	19
1.4.1. GEN AVR2	20
1.4.2. GEN AVR4	20
1.4.3. GEN AVR4E.....	20
1.4.4. GEN AVR9	21
1.4.5. GEN ECP1.....	21
1.4.6. GEN ECP2.....	21
1.4.7. GEN ECP4.....	22
1.4.8. GEN ECP5.....	22
1.4.9. Técnicas moleculares.....	22
1.4.9.1. PCR punto final o convencional	23
1.4.9.2. PCR con cebadores específicos para genes AVR y ECP	23
1.4.9.3. PCR arbitraria o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	23
1.4.9.4. Multiplex PCR	23
1.4.9.5. Secuenciación de productos amplificados	24

1.5. Objetivos.....	24
CAPÍTULO II.....	25
2.1. Ubicación del estudio	25
2.2 . Caracterización del lugar	25
2.3. Equipos y Materiales	26
2.3.1. Equipos	26
2.3.2. Materiales.....	26
2.3.3. Reactivos.....	27
2.4. Factores de estudio	27
2.4.1. Factor 1. Procedencia de los aislados	27
2.4.2. Factor 2. Genes de avirulencia en el genoma de los aislados	28
2.5. Manejo del experimento	28
2.5.1 Estandarización del proceso y las condiciones para amplificar los genes referencia de <i>C. fulvum</i>	32
2.6. Variables respuesta.....	36
2.7. Diseño experimental.....	36
CAPÍTULO III.....	37
3.1. RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
3.1.1. Resultado de objetivo 1	37
3.1.2. Resultado de objetivo 2	42
CAPÍTULO IV	47
4.1. Conclusiones.....	47
4.2. Recomendaciones	47
Anexos	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía del tomate riñón	16
Tabla 2 Taxonomía de <i>C. fulvum</i>	17
Tabla 3 Lugar de estudio.....	27
Tabla 4 Genes de avirulencia y proteínas extracelulares	28
Tabla 5 Códigos de colección de <i>C. fulvum</i>	28
Tabla 6 Cebadores específicos para el estudio de determinación de genes AVR y ECP de <i>C. fulvum</i>	32
Tabla 7 Condiciones de amplificación para proteínas de avirulencia de <i>C. fulvum</i>	33
Tabla 8 Condiciones de amplificación para proteínas extracelulares de <i>C. fulvum</i>	34
Tabla 9 Genes Avr.....	41
Tabla 10 Genes Ecp.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Facultad de Ciencias Agropecuarias Cevallos-Ecuador	25
Figura 2 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Avr2 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	38
Figura 3 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Avr4 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	39
Figura 4 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Avr4E en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro	40
Figura 5 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Avr9 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	40
Figura 6 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Ecp1 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	42
Figura 7 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Ecp2 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	43
Figura 8 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Ecp4 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	44
Figura 9 Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen Ecp5 en gel de agarosa al 1% de 10 asilados de <i>C. fulvum</i> procedentes del cantón Píllaro.....	45

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo detectar la presencia de genes AVR y ECP en aislados de *Cladosporium fulvum* provenientes de tomate riñón cultivado en el cantón Píllaro, una enfermedad destructiva sobre todo a los cultivos de tomate bajo cubierta. Esta investigación buscó detectar los genes AVR y ECP de 10 aislados de *C. fulvum*. Para este trabajo se reactivó el crecimiento micelial de las cepas de *C. fulvum* en un medio PDA, para luego una vez crecidas realizar el medio uniforme con los protocolos ya establecidos. Posteriormente se procedió a realizar la extracción de ADN, se tomaron 4 µl de la muestra para realizar la amplificación, donde en tubos PCR se colocó 25 µl de reacción dividida en diferentes reactivos, la electroforesis se realizó con un gel de agarosa al 1%, se colocaron las muestras en los pocillos y se la conectó a la fuente de poder con sus respectivos tiempos. Finalmente, la visualización se la hizo por medio de un transiluminador, Se empleó una técnica molecular para la detección de los genes AVR2, AVR4 y AVR9, así como de los genes ECP1, ECP2, ECP4 y ECP5. Los resultados evidenciaron que el gen AVR2 se amplificó en un 70% de los aislados analizados, el gen AVR4 en un 20% y el gen AVR9 en un 90%. En cuanto a los genes ECP, el gen ECP1 se detectó en un 80%, mientras que los genes ECP2, ECP4 y ECP5 estuvieron presentes en el 100% de las muestras evaluadas. Este trabajo constituye el primer informe de la presencia de genes AVR y ECP en aislados de *C. fulvum* en el cantón Píllaro de la provincia de Tungurahua.

PALABRAS CLAVE: AVIRULENCIA, *C. FULVUM*, PCR, TOMATE RIÑÓN

ABSTRACT

The objective of this research was to detect the presence of AVR and ECP genes in isolates of *Cladosporium fulvum* from kidney tomato grown in Píllaro, a destructive disease especially to tomato crops under cover. This research sought to detect the AVR and ECP genes of 10 isolates of *C. fulvum*. For this work, the mycelial growth of *C. fulvum* strains was reactivated in PDA medium, and then, once grown, the uniform medium was made with the already established protocols. Subsequently, DNA extraction was performed, 4 µl of the sample were taken for amplification, where 25 µl of reaction divided into different reagents were placed in PCR tubes, the electrophoresis was performed with a 1% agarose gel, the samples were placed in the wells and connected to the power source with their respective times. Finally, visualization was done by means of a transilluminator. A molecular technique was used to detect the AVR2, AVR4 and AVR9 genes, as well as the ECP1, ECP2, ECP4 and ECP5 genes. The results showed that the AVR2 gene was amplified in 70% of the isolates analyzed, the AVR4 gene in 20% and the AVR9 gene in 90%. As for the ECP genes, the ECP1 gene was detected in 80%, while the ECP2, ECP4 and ECP5 genes were present in 100% of the samples evaluated. This work is the first report of the presence of AVR and ECP genes in isolates of *C. fulvum* in the Píllaro canton of Tungurahua province.

KEY WORDS: AVIRULENCE, *C. FULVUM*, PCR, KIDNEY TOMATO.

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.) corresponde a la familia de las solanáceas, tiene una amplia historia la cual data de diversos años atrás, indagaciones acerca de este cultivo mencionan que el tomate tiene un origen en América del sur específicamente en la región Andina, las culturas precolombinas lograron domesticarlo y se convirtió en uno de sus alimentos más recurrentes en su diario vivir (**Velasco, 2022**).

Este cultivo es reconocido a nivel mundial gracias a la llegada de los españoles a América los cuales introdujeron el tomate primero a Europa y después se convirtió en una de las hortalizas de mayor valor comercial nacional e internacional. Dentro de los países con mayor producción está en primer lugar México (2.9 millones de toneladas), seguido de España (1.5 millones de toneladas) y en tercer lugar Estados Unidos (683 000 toneladas) (**Velasco, 2022**).

El tomate riñón en nuestro país se cultiva en todas las regiones del Ecuador en virtud de que es un cultivo que se adapta a diferentes condiciones climáticas y no es exigente en cuanto al tipo de suelo, a nivel nacional se estima que el tomate sobrepasa las 1970 ha. Las provincias que tienen mayor cantidad de extensión son las de Tungurahua y Pichincha obteniendo una productividad de entre 140 y 180 tn/ha en cada ciclo que en su mayoría se lo cultiva bajo cubierta (**Sanchez, 2023**) .

A pesar de su alto valor económico el cultivo de tomate riñón se ve afectado por varias plagas y enfermedades, donde destacan principalmente hongos y bacterias, uno de los hongos más conocidos que perjudica a la calidad de este cultivo es el *C. fulvum* el cual puede llegar a ser tan letal que es capaz de terminar con grandes plantaciones (**Caiza, 2024**).

El hongo *C. fulvum* es el agente causal de la enfermedad conocida como moho gris de la hoja del tomate riñón, el ambiente en el que se desarrolla es de alta temperatura y humedad, los síntomas se manifiestan las hojas más viejas como manchas de color gris, un no control de esta enfermedad causa la necrosis de la planta **(Wit, 2016)**. *C. fulvum* se describió en 1883 en América del sur **(Ogórek et al., 2012)**.

(Stergiopoulos et al., 2007) mencionó que la modificación en los nucleótidos de las proteínas extracelulares (ECP) se daba en menor repetición que en los genes de avirulencia (AVR) además que serían modificaciones silenciosas lo que explica que no se han introducido proteínas extracelulares (ECP) en variedades comerciales de tomate riñón.

El hongo *C. fulvum* no es de gran importancia en nuestro país por lo que no se tiene mucha información acerca de este patógeno, sin embargo, el cultivo de tomate riñón es de gran valor económico por lo que los agricultores se ven en la obligación de usar pesticidas para combatir a este hongo, esto no solo resulta costoso para las personas que aplican dichos productos, sino que también ponen en riesgo su salud y la de sus consumidores **(Castillo & Castillo, 2021)**.

En el año de 1975, Sanger expone una técnica para la creación de secuencias de ADN que van de la mano con pequeñas secuencias de oligonucleótidos que se ejecutan como cebadores, la síntesis de ADN se la realiza en tres fases: la primera que es la de desnaturalización, que es donde a una temperatura promedio de 93°C el hidrógeno se descompone, la segunda donde se produce un emparejamiento entre los cebadores y las hebras de ADN y la temperatura baja, finalmente se recopila una nueva hebra de acuerdo al tamaño del cebador y a la secuencia a una temperatura de 70-72 °C aproximadamente para que se desempeñe bien la taq polimerasa que es la encargada de la realizar copias de ADN **(Sanchez, 2023)** .

Considerando lo antes mencionado, en la presente investigación se realizó la detección de presencia o ausencia de genes AVR y ECP en aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro en el cultivo de tomate riñón, mediante un protocolo para la extracción del ADN y para la realización de pruebas PCR.

1.2. Marco Teórico

El tomate riñón (*S. lycopersicum* L.) es un cultivo muy relevante a nivel mundial, tiene su origen en Sudamérica, pero a lo largo del tiempo se expandió por todo el planeta llegando así a Europa en el siglo XV donde rápidamente se hizo popular y se exportó a todo el mundo. Por un largo periodo el tomate se lo conocía con el nombre de *Lycopersicum esculentum*, sin embargo, con el pasar de los años trabajos han demostrado que el tomate pertenece al género *Solanum*, así como lo dijo Linneo cuando descubrió la especie por primera vez.

Este vegetal se lo puede consumir de diferentes formas una de las más comunes es en ensaladas o como bebida, esta baya es una gran fuente de licopeno y es beneficiosa para la salud. Las plantas de tomate por lo general miden entre 1 a 3 metros de altura y poseen un tallo débil, la mayoría de estos cultivares producen frutos de color rojo, sin embargo, existen muchas variedades con frutos naranjas, verdes, amarillos, etc. (Jawaharlal et al., 2009).

1.2.1 Taxonomía del tomate riñón (*S. lycopersicum*)

Según la investigación de (Vega, 2022) la clasificación taxonómica del tomate riñón es la siguiente:

Tabla 1

Taxonomía del tomate riñón

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	Solanum
Especie	Lycopersicum

1.2.2 Importancia del tomate en el Ecuador

El cultivo de tomate riñón es un cultivo fundamental en el cantón Píllaro, tanto por su importante valor económico como por su influencia en la seguridad alimentaria de la zona. De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el tomate riñón se encuentra entre las hortalizas más cultivadas en nuestro país y su producción juega un rol crucial en los ingresos de algunas familias agricultoras (Jácome, 2022).

Sin embargo, este cultivo enfrenta serios desafíos, siendo uno de los más destacados el impacto de enfermedades ocasionadas por patógenos como *C. fulvum*. Este tipo de enfermedades disminuyen tanto el rendimiento como la calidad del producto final, lo que influye en la competitividad de los agricultores locales en el mercado (Jácome, 2022).

1.2.3. *C. fulvum*

Este hongo ha tenido varias clasificaciones en toda su historia, la primera fue en 1883 por Cooke con el nombre de *C. fulvum*, después en 1954 Ciferri la describió con el nombre de *Fulvia fulva*, como *Mycovellosiella fulva* por von Arx en 1983, hasta que a principios del año 2000 retornó a su nombre inicial de *C. fulvum* (Thomma et al., 2005).

Varios estudios demostraron que *C. fulvum* pertenece a la familia Mycosphaerellaceae, por lo que este hongo ha sufrido cambios en su clasificación taxonómica ubicándose últimamente en el género anamorfo de *Passalora* como *P. fulva*. A todo esto (Thomma et al., 2005) en su investigación sitúa a *C. fulvum* de la siguiente manera:

Tabla 2

Taxonomía de C. fulvum

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Capnodiales
Familia	Mycosphaerellaceae

Genero	Passalora
Especie	Fulva

1.3. Antecedentes investigativos

Diversos estudios han abordado la identificación de los genes AVR y ECP en aislados de *C. fulvum* en tomate, aportando información clave sobre la diversidad genética y el comportamiento patogénico de este hongo.

En Ecuador, **(Flores, 2022)** llevó a cabo un análisis molecular de genes de avirulencia en aislados de *C. fulvum* de la provincia de Tungurahua. En su investigación, se encontraron los genes AVR2 y AVR4E, mientras que AVR4 y AVR9 no se detectaron. En cuanto a los genes ECP, se identificaron ECP2, ECP4 y ECP5, pero no ECP1. Este estudio evidenció la diversidad genética del patógeno en la zona y resaltó la importancia de realizar un seguimiento molecular para controlar la enfermedad.

En el contexto internacional, **(Peteira et al., 2011)** examinaron 37 aislados de *C. fulvum* en Cuba, detectando los genes AVR2, AVR4, AVR4E, ECP1, ECP2, ECP4 y ECP5, aunque no se encontró el gen AVR9. Se observó una considerable variabilidad genética sin una relación clara con la ubicación geográfica, y se concluyó que la virulencia de algunas razas estaba más relacionada con la presencia de ECP2 que con ECP1. Este trabajo destaca la relevancia de la caracterización molecular para diseñar estrategias de resistencia en tomate.

(Lucentini, 2020) en Argentina estudió la evolución de razas de *F. fulva*, evidenciando cambios genéticos en los genes AVR y ECP. Su investigación resaltó la presencia de secuencias polimórficas y la necesidad de monitorear la variabilidad genética del patógeno para mejorar el manejo de la enfermedad

Desde el punto de vista metodológico, **(Lucentini, 2020)** en Cuba caracterizaron 36 aislados de *C. fulvum* mediante técnicas moleculares, detectando la amplificación de los genes de avirulencia y demostrando que algunas cepas pueden superar la resistencia conferida por el gen Cf9 a través del gen AVR9

1.4. Categorías fundamentales

También conocido como *Passalora fulva*, este hongo es el agente causal del moho gris en el tomate, esta enfermedad fue descrita por Cooke por primera vez en 1883. Por lo general esta enfermedad ataca a las hojas de la planta, aunque puede atacar también tallos, flores y frutos, pero no de manera regular, para que el hongo infecte a la hoja los conidios deben asentarse del lado del envés, aquí germinan y posteriormente ingresan a través de los estomas (**Thomma et al., 2005**).

El patógeno se desarrolla a una humedad relativa igual o superior a 85% y se propaga fácilmente a través del viento o de salpicaduras de agua. Este hongo puede sobrevivir en restos vegetales infectados y se alimenta de materia orgánica muerta por lo que se considera un hongo saprófito (**Agrotech, 1883**).

Esta especie de hongo es de reproducción asexual, el género *Cladosporium* es muy variado, existen alrededor de 700 especies y 20 géneros diferentes que en su mayoría aún no han sido descritos. Las colonias de *C. fulvum* crecen de manera lenta y toman un color verde a negro, el micelio superficial radica en hifas septadas y bien ramificadas por lo que se está bien desarrollado, además sus paredes celulares están compuestas en su mayoría por polisacáridos de glucano y quitina (**Thomma et al., 2005**).

De acuerdo a la investigación realizada por (**Leiva-Mora et al., 2023**) se realizó la obtención de aislados monospóricos en la provincia de Tungurahua a partir de hojas de tomate, se tomaron muestras de ocho cantones y se obtuvieron 80 aislados que fueron identificados cultural y morfológicamente. Esta es una de las pocas investigaciones que se han hecho en el país y en la provincia.

A lo largo de la historia se han identificado muchas proteínas que han sido secretadas por *C. fulvum*, estas proteínas se dividen en proteínas de avirulencia (AVRs), las cuales se dice que son específicas de la raza, mientras las proteínas extracelulares (ECPs) se rumora que algunas de estas proteínas son producidas por todas las cepas (**Thomma et al., 2005**).

En la actualidad todos los genes AVR y ECP que se conocen se encuentran muy manifestados en la planta, sacando la conclusión de que estas proteínas juegan un papel fundamental en la constitución de una enfermedad y todas estas ya han sido identificadas por algunos genotipos de plantas de tomate (**Thomma et al., 2005**).

Últimamente se han estudiado muchas proteínas de avirulencia donde destacan como principales (AVR2, AVR4, AVR4E, y AVR9), al igual que proteínas extracelulares (ECP1, ECP2, ECP4 y ECP5). Además, como fundamento del conocimiento acerca de las secuencias de los genes que compilan las proteínas efectoras, se puede identificar los genes de avirulencia del hongo mediante técnicas moleculares (**Lucentini, 2020**).

1.4.1. GEN AVR2

La proteína AVR2 es una de las más comunes la cual está compuesta por 58 aminoácidos con 8 residuos de cisteína que intervienen en la composición de 4 puentes disulfuro que ayudan a que la proteína sea más estable, varios estudios concluyeron que esta proteína es un método de defensa de la planta contra la enfermedad *Phytophthora infestans* y también contra otras enfermedades conocidas (**Lucentini, 2020**).

1.4.2. GEN AVR4

En su forma madura AVR4 posee 86 aminoácidos, es una proteína que se une a los carbohidratos específicamente a la quitina, protegiendo así las paredes celulares fúngicas de las quitinasas vegetales, es decir la función principal de esta proteína es la de brindar defensas en la etapa de infección del hongo, provocando que la virulencia del hongo disminuya (**Van Den Burg et al., 2006**).

1.4.3. GEN AVR4E

El gen AVR4E codifica una proteína rica en cisteínas de 101 aminoácidos que es secretada por *C. fulvum* durante la colonización del espacio apoplástico de las hojas de tomate. Esta proteína actúa como un determinante de avirulencia específico de raza, reconocido por el gen de resistencia homólogo Hcr9-4E presente en ciertas líneas de tomate transgénicas (**Van Den Burg et al., 2006**).

AVR4E es uno de varios genes de avirulencia en *C. fulvum* que corresponden a diferentes genes Cf en tomate. A diferencia de AVR4, que codifica una proteína que protege la pared celular del hongo contra la degradación por quitinasas de la planta y tiene un papel dual en virulencia y avirulencia, AVR4E parece funcionar principalmente como determinante de avirulencia específico, sin evidencia clara de función en virulencia (**Westerink, 2003**).

1.4.4. GEN AVR9

El gen AVR9 codifica una proteína pequeña de 63 aminoácidos, secretada por *C. fulvum* durante la infección de tomate. Esta proteína es un efector clave que induce una respuesta de hipersensibilidad (HR) en plantas que portan el gen de resistencia Cf-9. La estructura tridimensional de AVR9 presenta similitud con inhibidores de proteasas, aunque no se ha demostrado actividad enzimática específica (van Kan et al., 1991).

1.4.5. GEN ECP1

Estudios han demostrado que ECP1 es un factor de virulencia esencial para *C. fulvum*. Su silenciamiento o disrupción compromete significativamente la capacidad del hongo para colonizar el tejido foliar del tomate. La proteína ECP1 contribuye principalmente a la invasión del tejido foliar, facilitando la penetración y el establecimiento del hongo en el hospedero (**Bolton et al., 2008**).

El gen ECP1 se encuentra altamente conservado entre aislados de *C. fulvum* de diversas regiones geográficas, lo que indica su importancia funcional y la presión selectiva para mantener su secuencia. Sin embargo, algunos estudios han reportado aislados que carecen de amplificación para ECP1, sugiriendo la existencia de variabilidad genética y posibles pérdidas o mutaciones en ciertas cepas (**Bolton et al., 2008**).

1.4.6. GEN ECP2

Estudios han demostrado que ECP2 es un efector ampliamente conservado en poblaciones de *C. fulvum* a nivel mundial, con muy poca variabilidad genética en su secuencia. Por ejemplo, análisis de 37 aislados cubanos mostraron que la presencia de ECP2 fue del 100% en los aislados de razas 2, 4 y 2.4, lo que indica que este gen está

altamente conservado y asociado a una mayor virulencia en estos grupos. A nivel global, la mayoría de los aislados de *C. fulvum* presentan el gen ECP2, y las mutaciones en este efector son mucho menos frecuentes que en genes de avirulencia como AVR4 o AVR9 (Peteira et al., 2011).

1.4.7. GEN ECP4

Aunque la función específica de ECP4 no está completamente caracterizada, se sabe que estas proteínas contienen múltiples residuos de cisteína que probablemente estabilizan su estructura mediante puentes disulfuro, lo que es común en efectores extracelulares que deben resistir condiciones ambientales hostiles en el apoplasto. La conservación del gen ECP4 y su reconocimiento por genes de resistencia en tomate hacen de este efector un blanco importante para programas de mejoramiento genético. Sin embargo, la posible variabilidad genética y la evolución del patógeno requieren un monitoreo constante para detectar cambios que puedan comprometer la eficacia de la resistencia (van Kan et al., 1991).

1.4.8. GEN ECP5

Aunque ECP5 es generalmente conservado en la mayoría de los aislados, se han detectado polimorfismos y ausencia del gen en algunos aislamientos específicos (por ejemplo, aislado 22 raza 4 no amplificó para ECP5), lo que indica que existe una diversidad genética dentro de las poblaciones de *C. fulvum*. Esta variabilidad puede estar relacionada con la evolución del patógeno para evadir la respuesta inmune del tomate, ya que la presencia o ausencia de ciertos efectores puede influir en la capacidad del hongo para superar genes de resistencia específicos (Peteira et al., 2011).

1.4.9. Técnicas moleculares

La amplificación de genes es una herramienta fundamental en la caracterización molecular de organismos como *C. fulvum*. Las técnicas más utilizadas se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes, que permiten obtener copias específicas de fragmentos de ADN para su análisis posterior.

1.4.9.1. PCR punto final o convencional

Principio: La PCR utiliza cebadores específicos que se unen a secuencias complementarias del ADN molde, un ADN polimerasa termoestable (como Taq polimerasa), nucleótidos libres (dNTPs) y ciclos térmicos que incluyen desnaturalización, hibridación y extensión para amplificar la región objetivo.

1.4.9.2. PCR con cebadores específicos para genes AVR y ECP

Se diseñan cebadores basados en secuencias conocidas para genes de avirulencia (AVR2, AVR4, AVR4E, AVR9) y proteínas extracelulares (ECP1, ECP2, ECP4, ECP5).

La amplificación permite detectar presencia/ausencia y variabilidad genética en aislados.

Los productos se visualizan en geles de agarosa al 1-2%, teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz UV

1.4.9.3. PCR arbitraria o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Utiliza cebadores arbitrarios cortos para amplificar fragmentos aleatorios del ADN genómico sin conocimiento previo de secuencias.

Permite detectar polimorfismos genéticos y evaluar diversidad genética entre aislados.

Se realiza con ciclos de temperatura específicos: 45 ciclos de 94°C (1 min), 36°C (1 min) y 72°C (2 min), con una extensión final de 10 minutos a 72°C

1.4.9.4. Multiplex PCR

Variante que permite amplificar simultáneamente varios fragmentos específicos en una sola reacción usando múltiples pares de cebadores.

Utilizada para identificar rápidamente razas o perfiles genéticos de *C. fulvum*

1.4.9.5. Secuenciación de productos amplificados

Los fragmentos amplificados se purifican (por ejemplo, con PEG y centrifugación) y se secuencian mediante métodos como Sanger, utilizando secuenciadores automáticos que detectan fluorescencia.

Permite confirmar la identidad del fragmento, detectar mutaciones y realizar análisis filogenéticos.

1.5. Objetivos

Objetivo General

Detectar los genes AVR y ECP en aislados de *C. fulvum* procedentes del cantón Píllaro.

Objetivos Específicos

Identificar la presencia o ausencia de genes AVR en aislados de *C. fulvum*.

Reconocer los genes ECP en aislados de *C. fulvum* en tomate riñón.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

La investigación fue realizada en la provincia de Tungurahua, en el cantón Cevallos, precisamente en los laboratorios de investigación pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, la investigación se llevó a cabo bajo estrictas condiciones que respalden resultados concretos.



Figura 1

Facultad de Ciencias Agropecuarias Cevallos-Ecuador

Coordenadas: 1.3687324897243578, -78.60776207672338 (**Google Maps, 2025**).

2.2. Caracterización del lugar

La Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el cantón Cevallos se localiza a una altitud de 2800 msnm, en sus coordenadas geográficas son 01° 24' 27" de latitud Sur y 78° 35' 00" de longitud al Oeste, ubicado al Sureste de Ambato a 19.31 km

2.3. Equipos y Materiales

2.3.1. 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).
- Cámara de electroforesis (Biopolo).
- Fotodocumentador de geles.

2.3.2. Materiales

- Hojas de tomate con signos de moho gris.
- Mechero de alcohol.
- Medio de cultivo MS, Papa Dextrosa Agar (PDA, morea).
- Micropipetas (Thermo Scientific, Finn timer™ 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 de ensayo de 10 ml con tapa.
- Tubos eppendorf (Brand, 1.5 ml).

2.3.3. Reactivos

- Agarosa (Thermo Scientific, catálogo R0491)
- Agua libre de nucleasas.
- 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).

2.4. Factores de estudio

2.4.1. Factor 1. Procedencia de los aislados

Tabla N 3

Lugar de estudio

Cantón
Píllaro

2.4.2. Factor 2. Genes de avirulencia en el genoma de los aislados

Tabla N 4

Genes de avirulencia y proteínas extracelulares

Proteínas de avirulencia	Proteínas extracelulares
AVR2	ECP1
AVR4	ECP2
AV4E	ECP4
AVR9	ECP5

2.5. Manejo del experimento

Tabla N 5

Códigos de colección de C. fulvum

Cantón	Muestra	Código
Píllaro	1	DPL4-07
Píllaro	2	APL2-09
Píllaro	3	BPL3-06
Píllaro	4	APL2-07
Píllaro	5	DPL7-04
Píllaro	6	BPL3-04
Píllaro	7	BLP4-08
Píllaro	8	DPL1-05
Píllaro	9	APL1-03
Píllaro	10	DPL7-01

Los aislados utilizados se encuentran almacenados en el cepario que está ubicado en los laboratorios de Microbiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Para la extracción del ADN fúngico a partir de los aislados previamente seleccionados, se aplicó el siguiente protocolo

Preparación de medio uniforme

Imagen	Descripción
	Se raspó el micelio y se agregó 500 µl de agua destilada y se realizó la técnica de pipeteo
	Con la pipeta se absorbió el micelio previamente mezclado con el agua destilada y se colocó en otra caja Petri
	Con la ayuda de una pinza el micelio obtenido fue esparcido por todo el agar, de manera que crezca en toda la caja Petri
	Finalmente, las cajas fueron selladas con parafilm y se las guardó en la incubadora.

Protocolo de extracción de ADN

Imagen	Descripción
	Una vez que el micelio este crecido se raspó con la espátula hasta obtener 100 mg de micelio y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml
	Se agregó 50 μ l de Buffer A (NaOH 100mM, Tween 20 al 20%) y las muestras fueron colocadas en el termobloque a 95°
	Se agregó 50 μ l de Buffer B (Tris-HCl 100mM, EDTA 2mM), después se agitó en un vortex por 35 segundos
	Se tomó 4 μ l de la muestra para las pruebas de amplificación

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 .



3. Seguidamente se colocó 1 μ l dNTP 2mM respectivamente.



4. Inmediatamente se colocó 1 μ l del Primer Forward y 1 μ l del Primer Reverse.



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



6. Se colocó los tubos PCR con su respectiva reacción en vórtex durante 40 segundos y finalmente fueron ubicados en el termociclador PCR con sus respectivos ciclos.

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa



1. Preparar 1g de Agarosa en 100 ml y colocar en el microondas por 2 minutos.



2. Colocar la solución en el soporte respectivo con su peineta



3. Una vez solidificada la agarosa se retiró la peineta y la fue colocada en la cuba de electroforesis.



4. Seguidamente se añadió el Buffer TAE 1X en la cuba de electroforesis cubriendo el gel



6. Se colocó cada una de las muestras en un pocillo consecutivo y cerramos la tapa.



7. Finalmente se conectó a una fuente de corriente y esperamos que se realice la electroforesis durante 40 minutos a 100 voltios.

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

Las condiciones necesarias para la amplificación por PCR y la programación para los genes de avirulencia y proteínas extracelulares se muestra a continuación:

Tabla 6

Cebadores específicos para el estudio de determinación de genes AVR y ECP de C. fulvum.

Cebadores específicos (5'-3')		Cebadores específicos (5'-3')	
AVR2		ECP1	
F	CAT CAG CAT ATC CTC TTC CAT	F	ACC AGG ATA AGT TCG CAG TC
	CC		
R	CAG TAC GTT CAA AAG CAG ATA	R	GCC TCC GCG ATG CTT CCT
	AGG		
AVR4		ECP2	
F	ACG GTA GGT CTG TAC ACG AGC	F	GTC CAA GGA TCG TGT CTC
	C		AAG
R	AAC GAA CTG GGT CAT GGA ATG	R	TTCTAG CAA ACC CGT CTG A
AV4E		ECP4	
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
AVR9		ECP5	
F	AAT ACA ACC TTG AAA CAG CTA	F	TAT GAA CAC TTT TAC TCT ACT
	GG		C
R	GGA CTC TAC GGG GCT TGG	R	CGC GTC GCC TGA TAG AT

Tabla 7*Condiciones de amplificación para proteínas de avirulencia de C. fulvum*

AVR2 AVR5	Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	58	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	
5	Extensión final	72	5 min	1
AVR4	Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	61	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	
5	Extensión final	72	5 min	1
AVR4E	Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1

2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	64	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	
5	Extensión final	72	5 min	1
AVR9	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
		°C		
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	59	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	
5	Extensión final	72	5 min	1

Tabla 8

Condiciones de amplificación para proteínas extracelulares de C.fulvum.

ECP1	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
		°C		
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	63	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	

5	Extensión inicial	72	5 min	1
ECP2	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
		°C		
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	60	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	
5	Extensión inicial	72	5 min	1
ECP4	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
		°C		
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	58	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	
5	Extensión inicial	72	5 min	1
ECP5	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
		°C		
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2	Desnaturalización	95	30 seg	35
3	Anillamiento	55	30 seg	
4	Extensión	72	30 seg	

5	Extensión inicial	72	5 min	1
---	-------------------	----	-------	---

2.6. Variables respuesta

Presencia o no de los genes de avirulencia y proteínas extracelulares de los 10 aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro

2.7. Diseño experimental

Completamente aleatorizado DCA, donde de cada aislado se verifica la presencia de los genes de avirulencia seleccionados mediante corrida de geles de agarosa

CAPÍTULO III

3.1. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1.1. Resultado de objetivo 1

AVR2

Después de haber realizado la amplificación del gen AVR2 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se observó que el gen se presentó en 8 de los 10 aislados analizados (figura 2).

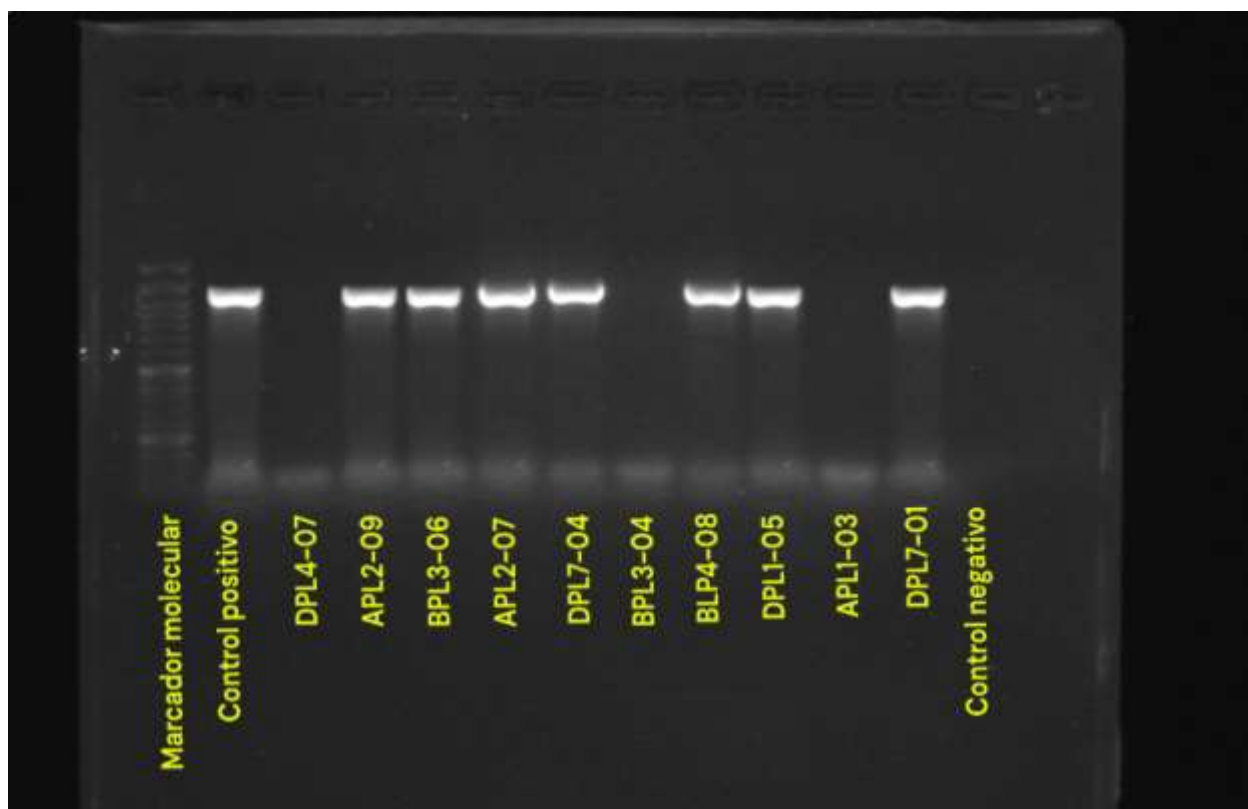


Figura 2

Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen AVR2 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de *C. fulvum* procedentes del cantón Píllaro.

(Flores, 2022) en su investigación realizada sobre caracterización molecular de genes de avirulencia del agente causal del moho gris de la hoja de *S. lycopersicum* en la provincia de Tungurahua para el gen AVR2 tuvo presencia en los ocho cantones estudiados teniendo un porcentaje del 100%, dando a entender que este gen es uno de los más comunes que existe ya que en nuestra investigación de la misma forma se obtuvo datos favorables en cuanto a presencia de este gen.

AVR4

Después de haber realizado la amplificación del gen AVR4 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se observó que de los 10 aislados analizados solo dos presentan bandas claras y los demás no presentan amplificación visible para este gen (figura 3).

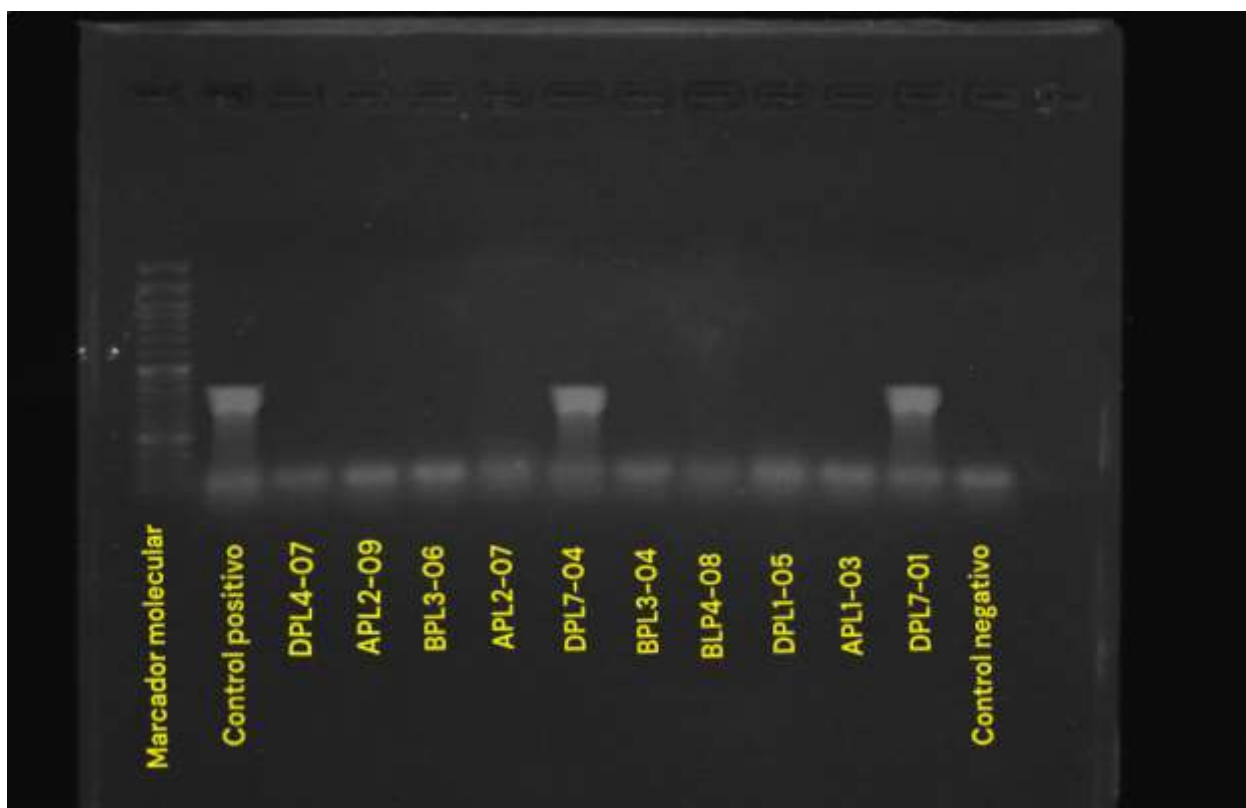


Figura 3

Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen AVR4 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de C. Fulvum procedentes del cantón Píllaro.

En nuestra investigación la baja presencia del gen AVR4 sugiere que existe poca frecuencia en la región analizada, esto debido a que tal vez en el cantón Píllaro se cultiven variedades de tomate con resistencia Cf-4. Estos hallazgos se contradicen con otras investigaciones realizadas como es la de **(De Wit, 2016)** donde mencionaron gran presencia del AVR4 en poblaciones europeas de *C. fulvum* es más frecuente. Además **(Stergiopoulos et al., 2007)** reportaron la pérdida en la variabilidad de genes AVR donde está incluido el gen AVR4 esto debido a que sería una estrategia de escape de la resistencia en plantas hospedantes que tienen el gen de resistencia mayor Cf-4.

AVR4E

Después de haber realizado la amplificación del gen AVR4E en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se comprobó la no presencia del mismo pues las bandas observadas se correspondían con los primer utilizados (figura 4).

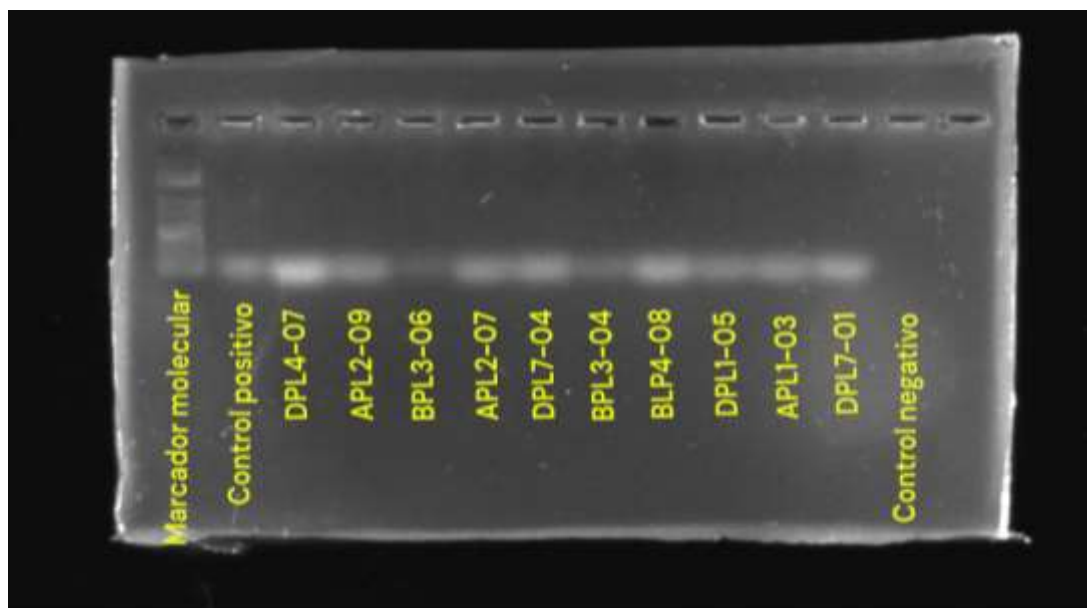


Figura 4

Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen AVR4E en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de C. fulvum procedentes del cantón Píllaro

La baja frecuencia de detección del gen AVR4E en los aislados evaluados, no coinciden con investigaciones donde este gen se encuentra ampliamente presente en poblaciones de *C. fulvum* en diferentes regiones como es el caso de Argentina, donde **(Medina et al., 2015)** en su artículo determinaron 12 aislados de *C. fulvum* de diferentes provincias de Argentina y en todos se observó la presencia del gen AVR4E lo que nos da como resultado que este gen es un marcador común en este patógeno., sin embargo, en nuestro cantón estudiado no se obtuvo resultados positivos.

AVR9

Después de haber realizado la amplificación del gen AVR9 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro, en el gel de agarosa se observó que el gen está presente en 9 de los 10 aislados, DPL7-04 no muestra una banda visible por lo que indica ausencia del gen AVR9 (figura 5).

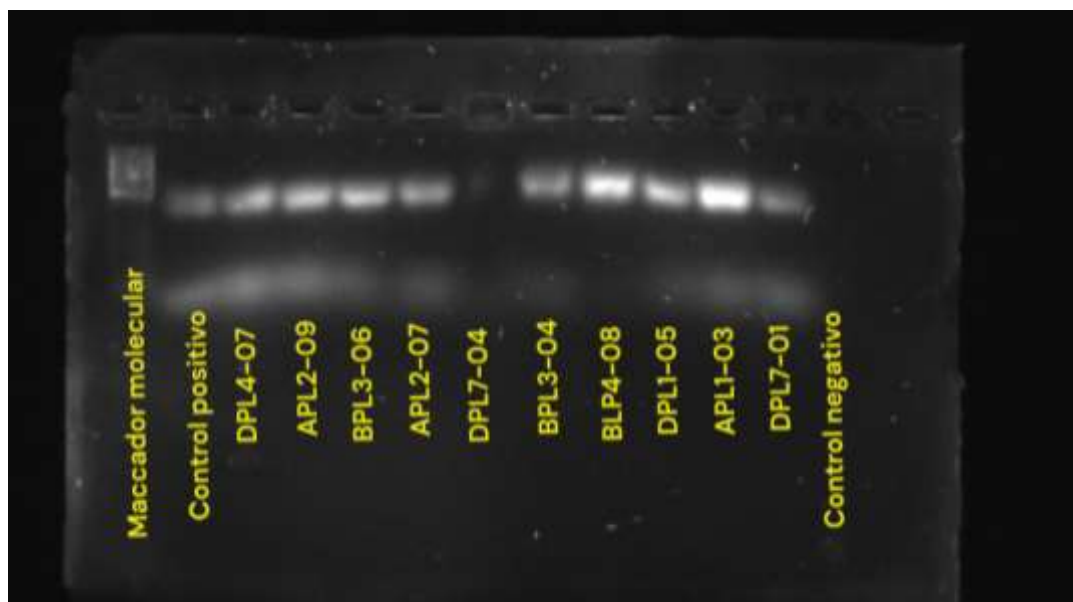


Figura 5

Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen AVR9 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de C. fulvum procedentes del cantón Píllaro

La alta presencia del gen AVR9 en varios estudios es común ya que este gen es uno de los más conocidos y que más presencia tiene, sin embargo, la ausencia en el aislado DPL7-04 es relevante, estudios como el de (**Medina et al., 2015**) explican que la ausencia de genes que anteriormente estaban presentes en casi todos los estudio se debe a la presión selectiva ejercida por el gen Cf-9 en cultivos de tomate.

Los principales resultados obtenidos para los genes AVR en el cantón Píllaro se resumen en la tabla 9.

Tabla 9

Genes AVR

Código	AVR2	AVR4	AVR4	AVR9
DPL4-07	-	-	-	+
APL2-09	+	-	-	+
BPL3-06	+	-	-	+
APL2-07	+	-	-	+
DPL7-04	+	+	-	-
BPL3-04	-	-	-	+
BPL4-08	+	-	-	+
DPL1-05	+	-	-	+
APL1-03	-	-	-	+
DPL7-01	+	+	-	+

3.1.2. Resultado de objetivo 2

ECP1

Después de haber realizado la amplificación del gen ECP1 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se identificó en el gel de agarosa que 8 de 10 aislados tienen la presencia de este gen. No se detectó en el aislado APL2-09 ni en aislado BPL3-04 (figura 6).

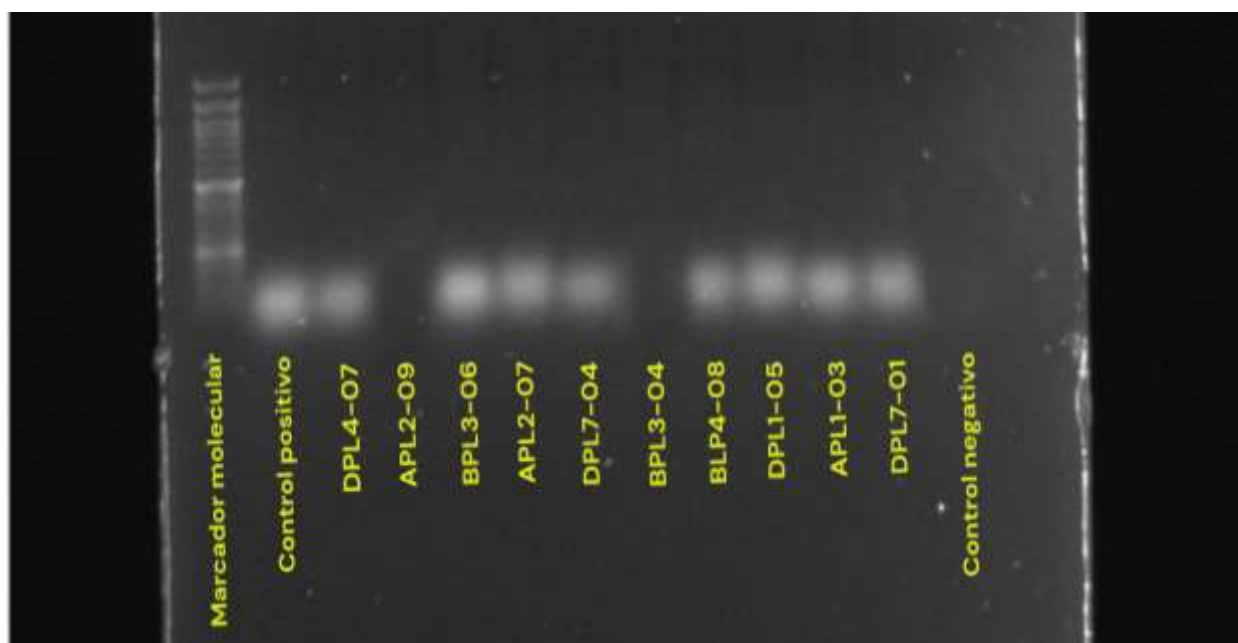


Figura 6

*Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen ECP1 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de *C. Fulvum* procedentes del cantón Píllaro*

La presencia mayoritaria del gen ECP1 coincide con estudios como el de (Stergiopoulos et al., 2007) en el cual se explicaron el papel fundamental de este gen en la virulencia de *C. fulvum* sobre el tomate. De igual manera la ausencia de este gen indica una posible variabilidad genética entre los aislados aun de una misma localidad, esto puede ser debido a la pérdida genuina del gen como mecanismo de evasión de la respuesta inmune inducida del tomate (De Wit, 2016).

ECP2

Después de haber realizado la amplificación del gen ECP2 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se identificó en el gel de agarosa que existe la presencia del gen en los 10 aislados (figura 7).

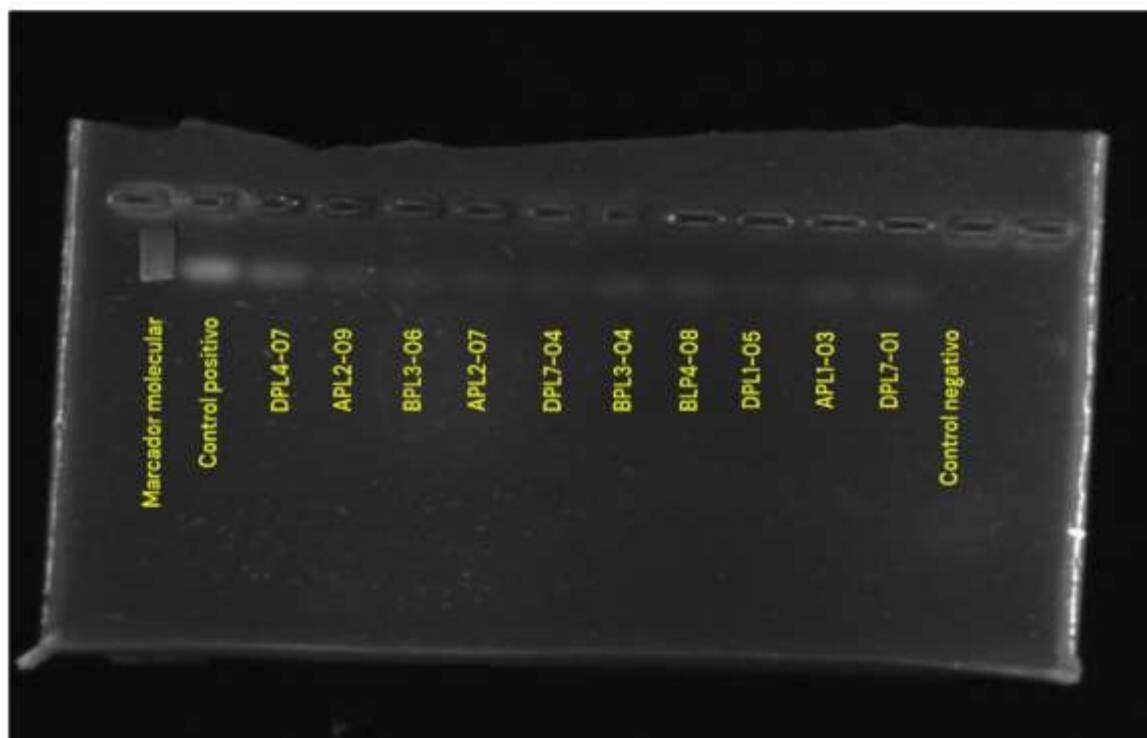


Figura 7

*Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen ECP2 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de *C. fulvum* procedentes del cantón Píllaro*

Los productos de los genes ECP son proteínas extracelulares producidas por *C. fulvum* al momento de la infección en la planta durante el proceso de colonización y han sido estudiados por su importancia en la virulencia (**De Wit, 2016**). En el estudio de (**Joosten et al., 1994**) mencionaron que encontraron que el gen ECP2 está presente en la mayoría de aislados a nivel mundial, lo cual coincide con nuestros resultados.

ECP4

Después de haber realizado la amplificación del gen ECP4 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se obtuvo como resultado que los 10 aislados estudiados tuvieron presencia de este gen (figura 8).

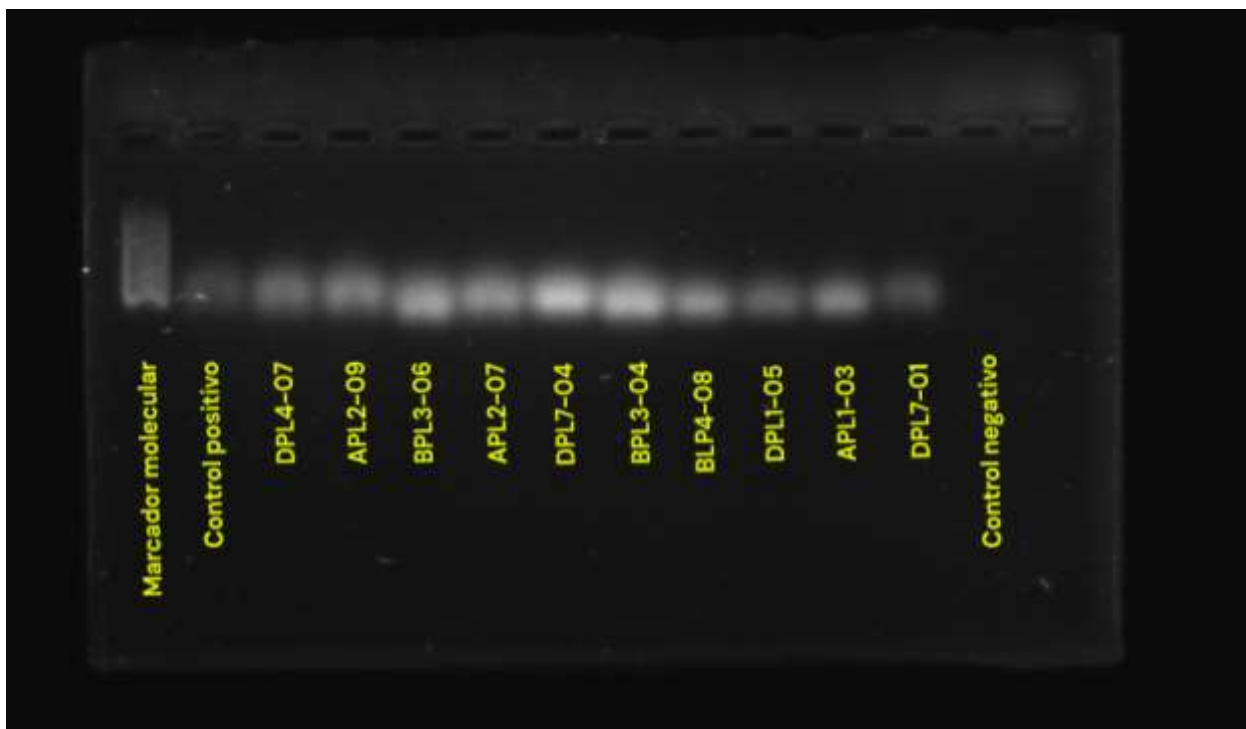


Figura 8

*Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen ECP4 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de *C. fulvum* procedentes del cantón Píllaro*

(Stergiopoulos et al., 2007) mencionaron que el gen ECP4 es muy común encontrarlo a nivel mundial, es uno de los Ecps más frecuentes en el genoma de los aislados de *C. fulvum* estudiados hasta la fecha. Esto coincide con nuestros resultados pues estuvo presente en todas las muestras analizadas.

ECP5

Después de haber realizado la amplificación del gen ECP5 en los aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro se obtuvo como resultado que los 10 aislados estudiados tuvieron presencia de este gen

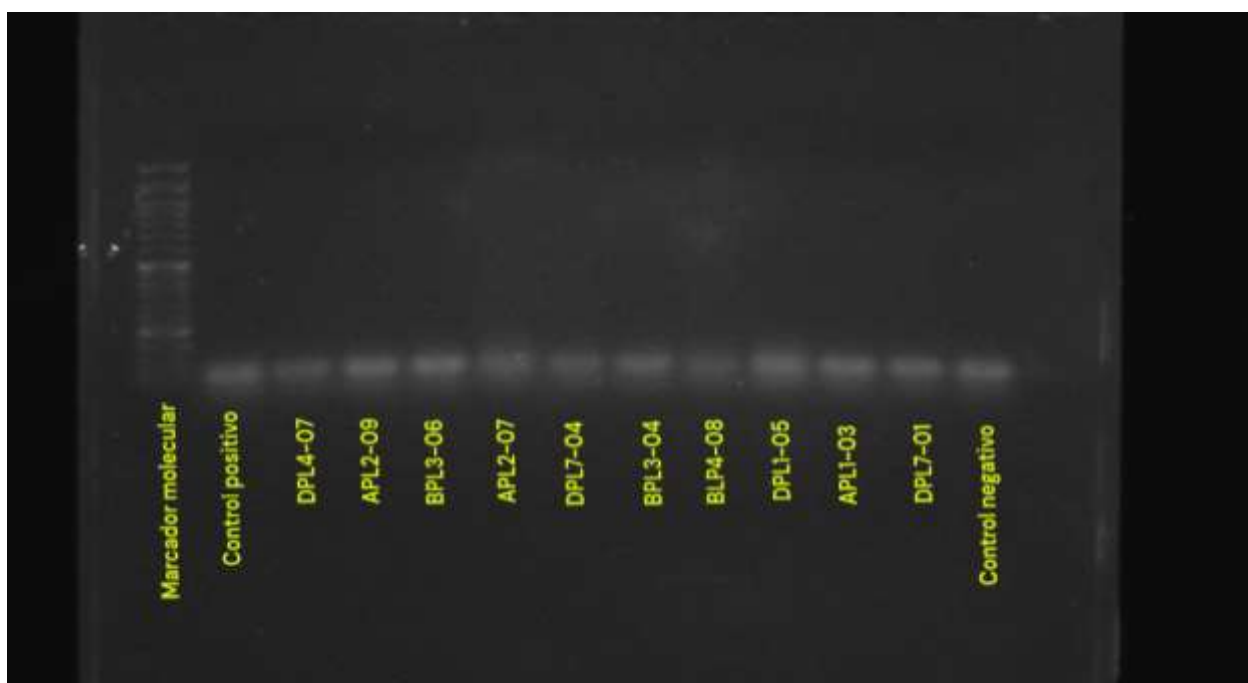


Figura 9

*Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen ECP5 en gel de agarosa al 1% de 10 aislados de *C. Fulvum* procedentes del cantón Píllaro*

En la investigación realizada por **(Peteira et al., 2011)** se evaluaron 37 aislados recogidos de diferentes partes de Cuba, sin, embargo se reportó que no se obtuvo una presencia universal en todos los aislados, específicamente en un aislado identificado como raza 22, al contrario en nuestra imagen se puede apreciar que todos los aislados tuvieron la presencia de este gen, en la investigación de **(Peteira et al., 2011)** nos podemos dar cuenta que existe una gran diversidad genética y dinámica de *C. fulvum* donde ciertos genes pueden variar en algunas cepas.

Los principales resultados obtenidos para los genes Ecp en el cantón Píllaro se resumen en la tabla 10

Tabla 10*Genes ECP*

Código	ECP1	ECP2	ECP4	ECP5
DPL4-07	+	+	+	+
APL2-09	-	+	+	+
BPL3-06	+	+	+	+
APL2-07	+	+	+	+
DPL7-04	+	+	+	+
BPL3-04	-	+	+	+
BPL4-08	+	+	+	+
DPL1-05	+	+	+	+
APL1-03	+	+	+	+
DPL7-01	+	+	+	+

(+): Presencia del gen detectada por PCR (-): No se detectó amplificación del gen

CAPÍTULO IV

4.1. Conclusiones

- Se detectaron genes AVR en aislados de *C. fulvum* del cantón Píllaro donde el gen AVR2 amplificó en un 70%, el gen AVR4 en un 20% y el gen AVR9 en un 90% de los aislados analizados.
- Se detectaron genes ECP en los aislados de *C. fulvum* en el cantón Píllaro donde el gen ECP1 se amplificó en un 80%, mientras que los genes ECP2, ECP4 y ECP5 se detectaron en el 100% de los aislados.

4.2. Recomendaciones

- Recomendar ajustar las concentraciones de ADN a valores equimolares entre las muestras para obtener bandas más uniformes.
- Utilizar termocicladores con gradientes de temperatura controlables para analizar las temperaturas de anillamiento para cada gen y optimizar las condiciones de amplificación por PCR.

BIBLIOGRAFÍA

- Agritech, C. (1883). *Tomato leaf mold* - Wikipedia.
https://en.wikipedia.org/wiki/Tomato_leaf_mold
- Bolton, M. D., Van Esse, H. P., Vossen, J. H., De Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J. E., Van Den Berg, G. C. M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H. L., De Koster, C. G., De Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J., & Thomma, B. P. H. J. (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology*, 69(1), 119–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06270.x>
- Caiza, J. (2024). *Evaluación de la capacidad antagónica de Bacillus subtilis AC01 microencapsulado frente a Cladosporium fulvum CC-FCAGP-Cf-Epi10 y Botrytis cinerea CC-FCAGP-Bc-MG001 hongos fitopatógenos del tomate riñón (Solanum lycopersicum) Informe* (Issue Table 10) [Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/f602327f-dff2-46a9-b407-5c652bb28ac1/content>
- Castillo, B., & Castillo, V. (2021). Uso de plaguicidas químicos en tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de invernadero y campo en Loja, Ecuador. *Cedamaz*, 11(1), 22–41.
<https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1034%0Ahttps://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1034>
- De Wit, P. J. G. M. (2016). *Cladosporium fulvum* Effectors: Weapons in the Arms Race with Tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 1–23.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-011516-040249>
- Flores, D. (2022). *Caracterización molecular de genes de avirulencia del agente causal del moho gris de la hoja de Solanum lycopersicum L en la provincia de Tungurahua* [Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/36063>
- Jácome, D. (2022). *Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados*

- monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de Solanum lycopersicum L. en la provincia de Tungurahua.* (Issue 8.5.2017) [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/25e92edc-c353-4b04-96e3-9a6646eced44/content>
- Jawaharlal, Krishi, N., & Vidyalaya, V. (2009). *Biology of Solanum lycopersicum (Tomato)*. ii(October 2019), 1–47.
https://www.researchgate.net/publication/336319341_Biology_of_Solanum_lycopersicum_Tomato
- Joosten, M. H. A. J., Cozijnsen, T. J., & De Wit, P. J. G. M. (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*, 367(6461), 384–386. <https://doi.org/10.1038/367384a0>
- Leiva-Mora et al., M. (2023). *revistabionatura*.
<https://www.revistabionatura.com/files/2023.08.03.17.pdf>
- Lucentini, C. G. (2020). “*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* (Issue +).
<https://www.azores.gov.pt/NR/rdonlyres/D21CF49B-EF59-4E76-88BD-5D0EEC3A2D4F/1098978/PlanoARPLAlcool.pdf>
- 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>
- Ogórek, R., Lejman, A., Pusz, W., Miłuch, A., & Miodyńska, P. (2012). Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia Lekarska*, 19(2), 80–85.
- Peteira, B., Bernal Cabrera, A., Martínez, B., & Ileana, M. (2011).
CARACTERIZACIÓN molecular de AISLAMIENTOS DE *Cladosporium fulvum* Cooke PROVENIENTES DE TOMATE EN CONDICIONES DE CULTIVO

PROTEGIDO TT - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cladosporium fulvum* Cooke ISOLATES FROM TOMATO IN SHELTERED CROP CONDITIONS. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 5–14.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522011000100002&lang=es

Sanchez, A. (2023). *Aislamiento, caracterización cultural, morfológica, patogénica e identificación de genes AVR en Cladosporium fulvum Cooke* [Univerisidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/739a7ea7-700f-4444-beff-54fefbb09f49/content>

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*, 20(10), 1271–1283. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1271>

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>

Van Den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H. A. J., Vervoort, J., & De Wit, P. J. G. M. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1420–1430. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1420>

van Kan, J. A., van den Ackerveken, G. F., & de Wit, P. J. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 4(1), 52–59. <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-052>

Vega, K. (2022). *Evaluación de dos bioestimulantes en el desarrollo vegetativo de tomate riñon (Lycopersicon esculentum) en la parroquia Eloy Alfaro, cantón Latacunga* [Universidad Técnica de Ambato].

<https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/9c385219-bed0-4630-bf42-7c09f4e95a4b/content>

Velasco, A. G. (2022). “*CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE AISLADOS DE Cladosporium fulvum Cooke. PROCEDENTES DE INVERNADERO DEL SECTOR IZAMBA CANTÓN AMBATO*” [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato].

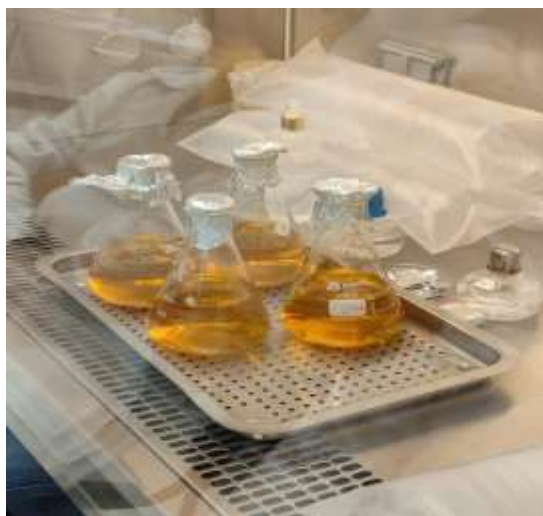
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/bitstream/123456789/39773/1/386> Ingeniería Agronómica -Velasco López Andrés Gabriel.pdf

Westerink, N. (2003). *The role of AVR4 and AVR4E proteins in virulence and avirulence of the tomato pathogen Cladosporium fulvum Nienke Westerink* [Universiteit van Utrecht]. <https://research.wur.nl/en/publications/the-role-of-avr4-and-avr4e-proteins-in-virulence-and-avirulence-o>

ANEXOS

Anexo 1.

Preparación y distribución de medio PDA en cajas petri



Anexo 2.

Siembra de cepas de *C. fulvum* y posterior elaboración del micelio uniforme



Anexo 3.

Extracción de ADN de *C. fulvum*



Anexo 4.

Amplificación por PCR



Anexo 5.

Gel de agarosa y electroforesis



Anexo 6.

Obtención de resultados a través del transiluminador

