UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

Detección de genes Avr y Ecp en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke en tomate de riñón del cantón Patate.

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

AUTOR:

Danny Javier Saquinga Galora

TUTOR:

Dr. Michel Leiva Mora, PhD.

CEVALLOS, 2025

Detección de genes Avr y Ecp en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke en tomate riñón del cantón Patate

REVISADO POR:

.....

Ing. Leiva Mora Michel, PhD.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

.....

FECHA
22-07-2025

Ing. Pomboza Tamaquiza Pedro Pablo, PhD

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

.....
22-07-2025

BQF. Mg. López Villacís Isabel Cristina

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

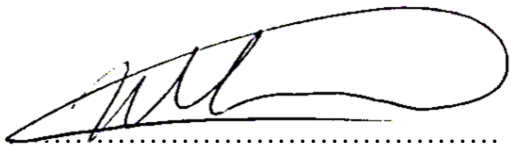
.....
22-07-2025

Ing. Artieda Rojas Jorge Rodrigo, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

Detección de genes Avr y Ecp en aislados de *Cladosporium fulvum* Cooke en tomate de riñón del cantón Patate.

REVISADO POR:



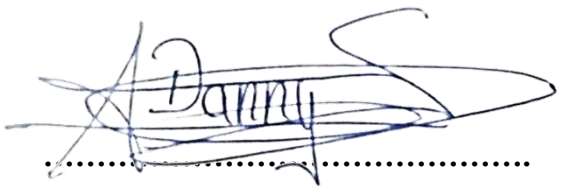
.....

Dr. Michel Leiva Mora, PhD.

TUTOR

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **DANNY JAVIER SAQUINGA GALORA**, portador de cédula de ciudadanía número: **1850346550**, 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 en tomate de riñón del cantón Patate**" 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.



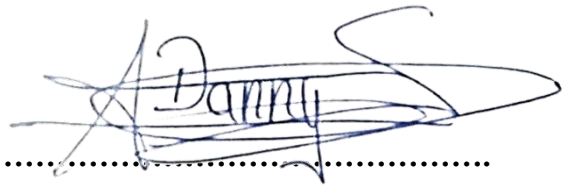
Danny Javier Saquinga Galora

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 en tomate de riñón del cantón Patate**" 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.



Danny Javier Saquinga Galora

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada primeramente a Dios y a San Antoñito por brindarme la salud y guiarme cada día desde que comenzó mi vida universitaria.

A mi madre Cecilia Galora quien, ha sido padre y madre para mí, le dedico este logro por siempre apoyarme y guiarme por un buen camino, por siempre darme no lo que yo quería si no lo que yo necesitaba, desde pequeño me ha enseñado a esforzarme por lo que quiero, gracias a esa valiente mujer soy lo que soy y estoy a un paso de cumplir mi sueño de graduarme en la carrera que siempre quise.

A mi hermano Gilmar, por ser un apoyo enorme en mi carrera universitaria, por sus consejos, sus regaños, su compañía y sobre todo por ser un buen hermano, amigo y confidente.

A mis abuelitos Alfonso y María, los cuales han sido un gran apoyo en toda mi vida, ellos me inculcaron valores como el respeto, la honestidad y sobre todo el amor por el campo, el amor por la agronomía, con sus enseñanzas he logrado muchas cosas positivas, siempre han estado para mí en los mejores y peores momentos de mi vida. Mi abuelito Alfonso es mi padre porque el me crío y me enseño muchas cosas sobre todo de la agronomía y mi abuelita María es mi segunda Madre ella es mi amor incondicional, ella me enseñó a ser perseverante, no rendirme y luchar por lo que quiero.

A mis amigos e ingenieros que han estado en todo este proceso universitario, siempre han sido un apoyo para mí, de una u otra forma me han apoyado y han sido un pilar fundamental durante todo este camino.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por todas sus bendiciones, por guiarme por un buen camino, por brindarme las fuerzas y la sabiduría para poder convertirme en un profesional.

Mis sinceros agradecimientos a la Universidad Técnica de Ambato, principalmente a la facultad de ciencias agropecuarias, carrera de agronomía, por brindarme todas las herramientas y espacios necesarios para llevar a cabo mis estudios universitarios.

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.

Mis agradecimientos a mi tutor de tesis el PhD. Michel Leiva Mora, por apoyarme y compartirme todos los conocimientos esenciales para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Agradezco a mis compañeros y amigos de tesis que me han apoyado en todo este proceso, de una u otra forma han sido importantes en todo este tiempo.

Finalmente, agradezco a mi mejor amiga Yalitza Pujos por estar siempre a mi lado y ser un apoyo para mí, le agradezco por estar en los mejores y peores momentos desde que la conocí, le agradezco por todos los momentos de risas y por todas las aventuras vividas.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I 1

INTRODUCCIÓN 1

MARCO TEÓRICO 3

1.1 Antecedentes investigativos 5

1.2 Categorías fundamentales 8

1.2.1 Características del tomate (*S. lycopersicum*) 8

1.2.2 Clasificación taxonómica 9

1.2.3 Descripción botánica 9

1.2.4 Condiciones agroecológicas 10

1.2.5 Caracterización de *C. fulvum* 11

1.2.6 Importancia del estudio de *C. fulvum* 11

1.2.7 Taxonomía de *C. fulvum* 12

1.2.8 Biología de *C. fulvum* 13

1.2.9 Contextualización del patógeno *C. fulvum* y su alto impacto en el cultivo de tomate 13

1.2.10 Interacción gen a gen entre *C. fulvum* y tomate: genes Avr y genes de resistencia Cf 14

1.2.11 El modelo gen por gen y los genes Cf en tomate 14

1.2.12 Genes de avirulencia (Avr) 15

1.2.13 Genes Ecp: proteínas efectoras extracelulares y su rol en la patogenicidad 16

1.2.14 Variabilidad genética y evolución de *C. fulvum* 17

1.2.15 Técnicas moleculares para la detección y caracterización de genes Avr y Ecp en *C. fulvum* 18

1.2.16 Implicaciones para el mejoramiento genético y manejo integrado 19

1.2.17 Avances en ingeniería genética y edición génica 20

1.3 Objetivos 21

CAPÍTULO II 22

METODOLOGÍA 22

2.1 Ubicación del estudio 22

2.2 **Caracterización de lugar** 23

2.3 **Tipo de investigación** 23

2.4 Materiales y equipos 23

2.4.1 Equipos 23

2.4.2 Materiales 24

2.4.3 Reactivos 25

2.5 Factores de estudio 25

2.5.1 Factor N°1. Procedencia de los aislados 25

2.5.2 Factor N°2. Genes de avirulencia en el genoma de los aislados 26

2.6 Manejo del experimento 26

2.6.1 Estandarización del proceso y las condiciones para amplificar los genes referencia de *C. fulvum* 29

2.7 Variable respuesta 33

2.8 Diseño experimental 33

CAPÍTULO III 34

RESULTADOS Y DISCUSIONES 34

3.1 Extracción del ADN genómico de los aislados de *C. fulvum.* 34

3.2 **Identificación de los genes de avirulencia Avr en los asilados de *C. fulvum.*** ... 36

Avr2 36

Avr4 37

Avr4E 38

Avr9 39

3.3 **Amplificar los genes de proteínas extracelulares Ecp en los aislados de *C. fulvum.*** 41

Ecp1 41

Ecp2 43

Ecp4 44

Ecp5 46

CAPÍTULO IV 48

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 48

4.1 Conclusiones 48

4.2 Recomendaciones 49

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

ANEXOS 57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del tomate 9

Tabla 2 Taxonomía de C. fulvum 12

Tabla 3 Aislados del cantón Patate 25

Tabla 4 Proteínas de avirulencia y extracelulares 26

Tabla 5 Códigos colección de C. fulvum 26

Tabla 6 Cebadores específicos para el estudio de determinación de genes Avr y Ecp de *C. fulvum.* 30

Tabla 7 Condiciones de amplificación para proteínas de avirulencia de *C. fulvum*..... 31

Tabla 8 Condiciones de amplificación para proteínas extracelulares de *C. fulvum.* 31

Tabla 9 Concentración y pureza del ADN extraído de *C. fulvum.* 35

Tabla 10 Genes Avr 41

Tabla 11 Genes Ecp 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - UTA 22

Figura 2: Visualización de los productos de amplificación del gen Avr2 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 36

Figura 3: Visualización de los productos de amplificación del gen Avr4 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 37

Figura 4: Visualización de los productos de amplificación del gen Avr4E de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 38

Figura 5: Visualización de los productos de amplificación del gen Avr9 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 40

Figura 6: Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp1 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 42

Figura 7: Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp2 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 43

Figura 8: Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp4 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 45

Figura 9: Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp5 de *C. fulvum* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 46

RESUMEN

En el estudio se realizó la extracción y análisis molecular del ADN genómico de aislados de *C. fulvum* del cantón Patate, obteniendo material genético de alta calidad apto para PCR. Se investigó la presencia de genes de avirulencia (Avr) y proteínas extracelulares (Ecp), elementos clave en la interacción entre el patógeno y el tomate (*S. lycopersicum*) y en la virulencia del hongo. Los resultados indicaron que el gen Avr2 no estuvo presente en la totalidad de los aislamientos, demostrando su perdida en la población estudiada, en contraste, los genes Avr4 y Avr9 se detectaron en un 50% de los aislamientos, y Avr4E solo en un 30%, evidenciando variabilidad genética aun entre aislados de una misma localidad. Por otra parte, el gen Ecp1 fue amplificado exitosamente en todas las muestras, mientras que los genes Ecp2 y Ecp4 amplificaron en un 40% y el gen Ecp 5 solo se mostró en un 20%, confirmando su expresión y relevancia en el proceso patogénico. La especificidad y confiabilidad de las amplificaciones fueron validadas mediante controles negativos y positivos que se incluyeron en los ensayos. Estos hallazgos subrayan la necesidad de monitorear la diversidad genética de *C. fulvum* para desarrollar estrategias integradas de manejo, que incluyan la selección de variedades resistentes y prácticas agrícolas apropiadas. Además, el estudio de los genes Avr y Ecp aporta nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares que utiliza *C. fulvum* para evadir la respuesta defensiva del cultivo de tomate. Estos resultados permiten sugerir a los mejoradores genéticos los genes de resistencia Cf que se requieren introducir en los genotipos de tomate que se deseen cultivar en el cantón Patate.

PALABRAS CLAVE: AVIRULENCIA, AVR, ECP, GENES, PATATE, PCR, PROTEÍNAS.

ABSTRACT

The study involved the extraction and molecular analysis of genomic DNA from *C. fulvum* isolates from the Patate canton, obtaining high-quality genetic material suitable for PCR. The presence of avirulence genes (Avr) and extracellular proteins (Ecp) was investigated, as these are key elements in the interaction between the pathogen and tomato (*S. lycopersicum*) and in the virulence of the fungus. The results indicated that the Avr2 gene was not present in all isolates, demonstrating its loss in the studied population. In contrast, the Avr4 and Avr9 genes were detected in 50% of the isolates, and Avr4E in only 30%, evidencing genetic variability even among isolates from the same locality. On the other hand, the Ecp1 gene was successfully amplified in all samples, while the Ecp2 and Ecp4 genes were amplified in 40% and the Ecp 5 gene was only found in 20%, confirming their expression and relevance in the pathogenic process. The specificity and reliability of the amplifications were validated by negative and positive controls included in the assays. These findings underscore the need to monitor the genetic diversity of *C. fulvum* to develop integrated management strategies, including the selection of resistant varieties and appropriate agricultural practices. In addition, the study of Avr and Ecp genes provides new insights into the molecular mechanisms used by *C. fulvum* to evade the defensive response of tomato crops. These results allow genetic breeders to suggest the Cf resistance genes that need to be introduced into the tomato genotypes to be grown in the Patate canton.

KEYWORDS: AVIRULENCE, AVR, ECP, GENES, PATATE, PCR, PROTEINS.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Bernal-Cabrera et al, (2020) señalaron que el *C. fulvum* o moho gris de la hoja es una enfermedad fúngica que causa grandes pérdidas económicas en cultivos de tomate bajo invernadero, la interacción *S. lycopersicum – C. fulvum* fue estudiada durante décadas para considerar implementar un modelo de un sistema de fitopatología molecular para comprender las relaciones de la resistencia del hospedero con la virulencia del patógeno.

Lucentini et al., (2010) señalaron que "el moho gris de la hoja del tomate ataca principalmente en las hojas más viejas y en ocasiones tallos, flores y en pocas ocasiones frutos, el factor de virulencia del *C. fulvum* es por medio de la síntesis de un conjunto de proteínas que serán secretadas en el espacio apoplástico de las hojas. Los genes Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5 son el resultado de la identificación en el genoma del hongo de las secuencias que codifican estas proteínas extracelulares.

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. Conocer la presencia de los genes Avr y Ecp en los aislados de *C. fulvum* de una región dada permitirá saber que genes de resistencia deben tener una variedad de tomate que se desea cultivar en dicha región (de Wit et al., 2012).

Stergiopoulos et al., (2010) señalaron que esta enfermedad fúngica secreta proteínas de efecto de avirulencia, (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5 y Avr9) que pueden ser reconocidos por los correspondientes genes de resistencia (Cf-2, Cf-4, Cf-4E, Cf-5 y Cf-9). La hipótesis de Lakovidis et al., (2020) denominada "interacción gen por gen" expone que cada gen de resistencia perteneciente al hospedero tiene un gen de patogenicidad proveniente del patógeno. Se denomina a los genes de resistencia (Cf en tomate) y en los patógenos genes de avirulencia (Avr).

Stergiopoulos et al., (2010) analizó la variación alélica de los genes de Avr y proteínas extracelulares Ecp donde observó que los genes Avr sufrían polimorfismo causado mayormente por deleciones, mutaciones puntuales como inserción especialmente entre Avr2 y Avr4, demostrando una evolución adaptativa mientras que los genes Ecp sufrieron un polimorfismo en un número limitado. Los hongos fitopatógenos tienen relaciones complejas con los huéspedes con quienes coevolucionan, los cultivares en Argentina se ven afectados por dos razas que sufren deleciones o inserciones en los genes Avr y Ecp (Lucentini, 2021)

Un estudio de Lucentini, (2021) sobre las proteínas extracelulares (Ecp) de la Cladosporiosis en el tomate, centrándose particularmente en su impacto en la producción de tomate en Argentina. Se descubrió que las Ecp desempeñan un papel fundamental en

la relación entre el patógeno y la planta, afectando la colonización del hongo y la respuesta inmune de la planta huésped.

Lucentini et al., (2021) mencionaron en base a la teoría gen por gen describe la relación entre los genes de resistencia de un hospedero al reconocer un gen de avirulencia, ocurriendo una reacción de incompatibilidad evitando que el hospedero se enferme. La relación *C. fulvum* – tomate se ajusta a esta teoría debido a que *C. fulvum* interactúa con el espacio apoplásticos de las hojas del tomate por medio de la síntesis de proteínas que son factores de avirulencia.

Lucentini et al (2021) señalaron que en la actualidad se ha logrado aislar he identificar 5 genes que codifican proteínas de avirulencia Avr (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5 y Avr9) como 6 genes que codifican proteínas extracelulares Ecp (Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp6). La patogenicidad es una función de proteínas que se expresan durante la invasión y colonización de la planta cada una teniendo diferentes funciones, pero todas relacionas con la avirulencia. Las funciones de Avr2, Avr4 y Ecp6 han sido descritas comprobando que unas funciones necesarias para la avirulencia por lo que el resto de los Avr también son fundamentales, aunque sus funciones aún son desconocidas. El Avr 2 participa en la inhibición de proteasa cistenasas y el Ecp 6 se une a la quinasa de la pared celular (Lucentini, 2021).

MARCO TEÓRICO

La interacción entre *C. fulvum* y el tomate está regida por el modelo gen a gen, donde los genes de avirulencia (AVR) del hongo y los genes de resistencia (R) de la planta determinan el resultado de la infección. Los genes AVR codifican proteínas efectoras que

pueden ser reconocidas por los receptores de la planta, desencadenando una respuesta de defensa conocida como respuesta hipersensible (HR). Por otro lado, los genes Ecp (Extracellular Protein) codifican proteínas extracelulares que también participan en la virulencia y adaptación del hongo al hospedero (de Wit et al., 2012).

C. fulvum es un hongo patógeno responsable del moho foliar en el cultivo de tomate (*S. lycopersicum*), una enfermedad que prospera bajo condiciones ambientales favorables de temperatura y humedad. Este organismo fue identificado por primera vez por Cooke en 1883. La interacción entre este patógeno y su planta hospedera se fundamenta en el modelo gen por gen, en el cual los genes de avirulencia (Avr) del hongo codifican proteínas efectoras que son detectadas por receptores específicos en la planta. Esta detección desencadena mecanismos de defensa, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de proteínas quinasa, que regulan la expresión de genes para limitar la infección (De & Agronómica, n.d.).

Entre los genes Avr más investigados en *C. fulvum* se encuentran Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9, mientras que los genes que codifican proteínas extracelulares (Ecp), como Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5, también desempeñan un rol importante en la virulencia del hongo. La aplicación de técnicas moleculares como la PCR ha permitido detectar la presencia o ausencia de estos genes en distintos aislados, revelando una considerable variabilidad genética. Por ejemplo, en aislados provenientes de la provincia de Tungurahua se identificaron los genes Avr2 y Avr4E, mientras que Avr4 y Avr9 no fueron detectados; en cuanto a las proteínas Ecp, se encontraron Ecp2, Ecp4 y Ecp5, pero no Ecp1 (Dixon et al., 2000).

La existencia de diversidad genética y polimorfismos en los genes Avr y Ecp ha sido ampliamente reportada, lo que explica la aparición de diversas razas fisiológicas de *C. fulvum* con diferentes capacidades para evadir los mecanismos de resistencia genética del tomate. Investigaciones moleculares realizadas en aislados de distintas regiones del mundo han evidenciado una alta variabilidad en estos genes, lo que confirma la identidad del patógeno y su evolución constante para superar las defensas del hospedero (Bento et al., 2017).

El conocimiento profundo de los genes Avr y Ecp resulta esencial para el manejo integrado del moho de la hoja y para el mejoramiento genético del tomate. La caracterización molecular de estos genes facilita la selección de variedades resistentes y el diseño de estrategias de control más efectivas, anticipando la posible aparición de nuevas razas del patógeno. Además, el monitoreo continuo de la variabilidad genética en poblaciones locales es fundamental para conservar la eficacia de los genes de resistencia en cultivares comerciales (Bento et al., 2017).

1.1 Antecedentes investigativos

Estudios transcriptómicos han revelado que muchos genes Avr y Ecp se expresan exclusivamente durante la infección y no en cultivo axénico. Esto refuerza su papel como efectores específicos de biotrofía. Utilizando herramientas como RNA-seq y qRT-PCR, se han identificado perfiles de expresión temporales que indican funciones especializadas en etapas tempranas o tardías de la infección. El análisis de la región promotora de estos genes ha mostrado motivos conservados asociados a la regulación inducida por contacto con el hospedero (de Wit et al., 1997).

En un estudio realizado en Cuba, se caracterizaron molecularmente aislamientos de *C. fulvum* mediante la amplificación por PCR de genes Avr (Avr2, Avr4, Avr4E) y se encontró que la mayoría de los aislamientos amplificaron estos genes con alta frecuencia (72% para Avr2 y más del 80% para Avr4 *y* Avr4E), lo que se relacionó con la variabilidad patogénica observada en las razas del hongo (raza 0, 2, 4 y combinaciones).

Este estudio también confirmó la identidad de los aislamientos como *C. fulvum* mediante amplificación de la región 28S del ARNr y mostró que los genes Avr son útiles para clasificar las razas del patógeno (Shabab et al., 2008).

C. fulvum es un hongo fitopatógeno que afecta al cultivo de tomate causando la enfermedad conocida como moho de la hoja. La interacción entre el hongo y la planta hospedera se basa en el modelo gen por gen, donde los genes de avirulencia (Avr) del patógeno codifican proteínas efectoras que pueden ser reconocidas por genes de resistencia en la planta, desencadenando respuestas defensivas. En estudios moleculares se han caracterizado hasta diez proteínas efectoras de *C. fulvum*, cuatro de las cuales corresponden a genes Avr (Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9) y seis a proteínas extracelulares (Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp6 y Ecp7), siendo la mayoría de estos genes clonados y analizados en diferentes aislados (Luderer et al., 2001).

En Ecuador, una tesis de 2022 caracterizó molecularmente genes de avirulencia y proteínas extracelulares (Ecp) en aislamientos de *C. fulvum* de la provincia de Tungurahua. Se detectaron los genes Avr2 y Avr4E, mientras que Avr4 y Avr9 no se encontraron en estos aislamientos. En cuanto a los genes Ecp, se identificaron Ecp2,

Ecp4 y Ecp5, pero no Ecp. Este trabajo utilizó técnicas de extracción de ADN, PCR convencional y análisis en geles de agarosa para la detección de estos genes.

La diversidad genética de *C. fulvum* ha sido analizada mediante la identificación de polimorfismos en los genes de avirulencia (Avr) y proteínas extracelulares (Ecp). Un estudio realizado en Argentina documentó la evolución de dos razas principales, denominadas 0 y 2, y reportó por primera vez variaciones en las proteínas Ecp. Además, se confirmó que el hongo produce melanina-DHN, un pigmento vinculado con su capacidad de virulencia. Estos descubrimientos son fundamentales para diseñar estrategias de control basadas en la resistencia genética del tomate (Kohler et al., 2016).

La producción de melanina en *C. fulvum* está relacionada con la expresión del gen pks1, que codifica una poliquinona sintasa esencial en la biosíntesis de pigmentos oscuros. Esta melanina protege al hongo frente a condiciones ambientales adversas y puede favorecer su potencial infectivo. Asimismo, el perfil de metabolitos secundarios y compuestos orgánicos volátiles que sintetiza *C. fulvum* presenta diferencias notables respecto a otros patógenos del tomate, lo cual influye en la interacción con la planta hospedera (de Wit & Spikman, 1982).

Por otro lado, investigaciones genómicas han permitido identificar y caracterizar genes que codifican proteínas efectoras secretadas por *C. fulvum*, tales como Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5, así como genes de avirulencia como Avr2, Avr4 y Avr9. Estas proteínas efectoras son liberadas en el espacio apoplástico durante la infección y desempeñan un papel clave en la virulencia del hongo y en la evasión de las respuestas defensivas de la planta. La identificación de estos genes ha impulsado el avance en la comprensión

molecular de la patogénesis y ha facilitado el desarrollo de variedades de tomate resistentes (Mesarich et al., 2018).

1.2 Categorías fundamentales

1.2.1 Características del tomate (*S. lycopersicum*)

El tomate (*S. lycopersicum*) es una hortaliza que pertenece a la familia de las solanáceas y cuyo origen se sitúa en la región andina de Sudamérica. Desde allí, su cultivo se extendió hacia México, donde inició un proceso de domesticación que lo convirtió en un centro de difusión, para posteriormente dispersarse a otras regiones a través de las expediciones de Hernán Cortés (Borman et al., 2008a; E Franco et al., 1900).

Evidencias arqueológicas encontradas en tumbas en Perú indican que esta solanácea ha formado parte de la alimentación humana durante aproximadamente nueve mil años, aunque en ese entonces el fruto era silvestre, pequeño y muy distinto al tomate actual. La transformación del fruto original andino se atribuye a la labor de los agricultores mexicanos, quienes mediante prácticas agrícolas lograron modificarlo y adaptarlo a nuevas condiciones (Borman et al., 2008b).

En cuanto a su producción, López Marín (2016) señala que el tomate presenta diversas enfermedades fisiológicas o abióticas que afectan los cultivos independientemente de la región o las condiciones agroecológicas del país. Entre las enfermedades foliares más comunes destaca el moho de la hoja, causado por el hongo *C. fulvum*. Oliver et al. (2000) destacan que esta enfermedad fúngica fue descrita por primera vez por M.C. Cooke en 1883, y que su estudio se intensificó con la expansión de cultivos en climas templados y el desarrollo de la producción en invernaderos.

Los frutos del tomate, al igual que los de otras especies, son un componente fundamental de la dieta humana, consumiéndose tanto frescos como en productos procesados. Su ingesta se ha asociado con beneficios para la salud, incluyendo la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, coronarias, diabetes, cáncer e hipertensión. Estos efectos positivos se atribuyen a la presencia de compuestos bioactivos como el licopeno, β-carotenos, luteína, flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros (E Franco et al., 1900).

1.2.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo con López Marín (2017), la clasificación taxonómica del tomate es:

Tabla 1

Clasificación taxonómica del tomate

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

Fuente: López Marín (2017).

1.2.3 Descripción botánica

El tomate riñón es una planta arbustiva anual que puede crecer de forma rastrera, semirrecta o erecta, con un sistema radicular compuesto por una raíz principal corta y

débil, complementada por raíces secundarias robustas y adventicias. Su tallo mide entre 2 y 4 cm de grosor, y sus hojas, dispuestas de forma alterna, están formadas por foliolos peciolados, lobulados y con bordes dentados, cubiertos de pelos glandulares. Las flores son pentámeras con sépalos amarillos, y el fruto es una baya constituida por pericarpio, tejido placentario y semillas, características que le confieren su valor agronómico y nutricional (Paredes Zambrano, 2009).

1.2.4 Condiciones agroecológicas

El desarrollo óptimo de este cultivar está condicionado por factores ambientales específicos, entre los cuales la cantidad y calidad de la luz juegan un papel fundamental. Se requiere una exposición diaria a la luz que oscile entre 8 y 16 horas para favorecer procesos fisiológicos esenciales como la fotosíntesis y el crecimiento vegetativo.

En cuanto a la temperatura, las condiciones ideales durante el día se sitúan entre 28 y 30 °C, mientras que por la noche es preferible que oscilen entre 15 y 18 °C, rangos que promueven un adecuado metabolismo y desarrollo reproductivo. Además, la humedad relativa debe mantenerse entre el 65 y 70%, ya que niveles fuera de este rango pueden afectar negativamente la transpiración y la absorción de agua, comprometiendo la salud y productividad de la planta (Mesarich et al., 2018).

En relación con el suelo, este cultivar requiere un sustrato productivo que cubra sus necesidades nutricionales básicas. Se recomienda el uso de suelos franco-arenosos, arcillo-arenosos o con alto contenido orgánico, que proporcionan una buena aireación y retención de nutrientes.

El pH del suelo debe mantenerse entre 5.9 y 6.5, condiciones que optimizan la disponibilidad y absorción de minerales esenciales para el crecimiento y la producción de frutos de calidad. Estos parámetros ambientales y edáficos son determinantes para maximizar el rendimiento y la calidad del cultivo, especialmente en sistemas de producción intensiva como los invernaderos (Saparrat et al, 2021)

1.2.5 Caracterización de *C. fulvum*

El género *Cladosporium* es uno de los más comunes y ampliamente distribuidos dentro de los hongos hifomicetos, comprendiendo más de 772 nombres registrados, lo que lo convierte en uno de los géneros más extensos y diversos (Karimi-Jashni et al., 2022).

Estudios filogenéticos recientes han demostrado que *Cladosporium* es un género altamente heterogéneo, en el cual muchas especies han sido confundidas debido a sus similitudes morfológicas, lo que ha dificultado su correcta delimitación taxonómica (Bensch et al., 2010; Crous et al., 2007).

Para superar estas dificultades, se ha utilizado el tipo de cicatriz coronada, un carácter morfológico distintivo y confiable que se caracteriza por una estructura con una parte central convexa rodeada por un borde elevado, lo que ha permitido una revisión crítica y precisa del género (David, 1997; Schubert et al., 2007).

1.2.6 Importancia del estudio de *C. fulvum*

Esta característica morfológica, junto con datos moleculares obtenidos mediante secuenciación de ADN, ha facilitado la delimitación clara de *Cladosporium* frente a géneros morfológicamente similares, y ha llevado a la reclasificación de numerosas especies en nuevos géneros relacionados (Crous et al., 2007; Braun et al., 2003). Así, la

combinación de análisis morfológicos detallados con estudios filogenéticos ha sido fundamental para entender la diversidad y evolución de este género, lo que tiene implicaciones importantes para su identificación y estudio en diferentes contextos ecológicos y patológicos (Cao & Tan, 2019).

1.2.7 Taxonomía de *C. fulvum*

Según Crous et al., (2007), los hongos hifomicetos cladosporoides se encuentran entre los más comunes y ampliamente distribuidos, conformando uno de los géneros más extensos con más de 772 nombres registrados. Estudios filogenéticos han revelado que este género es altamente heterogéneo, lo que ha provocado confusiones taxonómicas en varias especies. La utilización del tipo de cicatriz coronada como un carácter morfológico distintivo y confiable ha permitido realizar una revisión crítica y precisa de este grupo, facilitando su correcta delimitación taxonómica.

Tabla 2

Taxonomía de C. fulvum

Reino		**Fungi**	
Filum		*Ascomycota*	
Subfilum		*Pezizomycotina*	
Clase		*Dothideomycetes*	
Subclase		*Dothideomycetidae*	
Orden		*Capnodiales*	
Fase anamorfa		**Fase teleomorfa**	
Familia	*Davidiellaceae*	Familia	*Mycosphaerellaceae*
Género	*Cladosporium*	Género	*Passalora*

Fuente: Crous et al., (2007).

1.2.8 Biología de *C. fulvum*

Según Crous et al. (2007), *C. fulvum* presenta un micelio compuesto por hifas ramificadas y septadas, con paredes delgadas, lisas y de color hialino, cuyo diámetro oscila entre 2 y 3 µm. Los conidióforos son erectos, solitarios y miden aproximadamente 6 µm de ancho por 60 µm de largo. En las hojas afectadas, se observan inicialmente pequeñas manchas pálidas o amarillentas en el haz, las cuales se tornan marrones conforme la infección avanza; en el envés, el hongo desarrolla una esporulación de tonalidad gris o café oscuro con una textura aterciopelada.

Este patógeno afecta también tallos, pedúnculos y botones florales, y su dispersión ocurre principalmente por medio del viento y el contacto con la ropa de los trabajadores en invernaderos. Para su desarrollo, requiere condiciones de alta humedad relativa, superior al 80%, y temperaturas comprendidas entre 18 °C y 27 °C, siendo las plantas en etapa de floración las más susceptibles a la infección. En ambientes protegidos, es frecuente encontrar el hongo en tejidos necrosados, especialmente en hojas, donde puede coexistir con el tizón tardío durante períodos de clima frío (Reyes, 2017).

1.2.9 Contextualización del patógeno *C. fulvum* y su alto impacto en el cultivo de tomate

C. fulvum Cooke (*Fulvia fulva*) es un hongo patógeno foliar que causa la enfermedad conocida como moho de la hoja en tomate (*S. lycopersicum*), incluyendo variedades como el tomate de riñón. Esta enfermedad es una de las más importantes en la producción de tomate a nivel mundial, debido a su capacidad para reducir la superficie foliar y afectar la fotosíntesis, lo que disminuye el rendimiento y la calidad del fruto. El

hongo se desarrolla principalmente en condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas, y puede sobrevivir como saprófito en restos vegetales, facilitando su persistencia en el ambiente. Debido a su especificidad con el tomate, *C. fulvum* se ha convertido en un modelo para estudiar interacciones patógeno-hospedero (de Wit & Spikman, 1982).

1.2.10 Interacción gen a gen entre *C. fulvum* y tomate: genes Avr y genes de resistencia Cf

La relación entre *C. fulvum* y el tomate se explica por el modelo clásico de interacción gen a gen, donde la resistencia del hospedero depende del reconocimiento específico de proteínas efectoras (productos de genes Avr) secretadas por el patógeno. Estas proteínas son detectadas por receptores codificados por genes de resistencia dominantes Cf en el tomate, lo que desencadena una respuesta inmune local (hipersensibilidad) que impide la infección.

Los genes Avr (avirulencia) codifican para proteínas efectoras que, cuando son reconocidas por el hospedero, activan la defensa. La ausencia o mutación de estos genes permite al hongo evadir la detección y causar enfermedad. Por otro lado, las proteínas Ecp (extracelulares) son efectores secretados en el apoplasto que contribuyen a la virulencia, ayudando a suprimir la respuesta inmune del tomate y facilitar la colonización (de Wit & Spikman, 1982).

1.2.11 El modelo gen por gen y los genes Cf en tomate

La interacción entre *C. fulvum* y el tomate se rige por el modelo 'gen por gen', donde genes de resistencia (Cf) en el hospedero reconocen productos de genes de

avirulencia (Avr) del patógeno. Esta interacción desencadena una respuesta hipersensible (HR) caracterizada por muerte celular localizada. Los genes Cf, como Cf-2, Cf-4, Cf-5 y Cf-9, codifican proteínas tipo receptores de resistencia que detectan efectores específicos secretados por el patógeno (Joosten & De Wit, 1999).

1.2.12 Genes de avirulencia (Avr)

Los genes Avr y Ecp de *C. fulvum* codifican proteínas efectoras que son secretadas al espacio apoplástico durante la infección. Estas proteínas desempeñan un doble papel: promueven la colonización y suprimen la inmunidad basal, pero también pueden ser reconocidas por receptores Cf en la planta, desencadenando HR. Por ejemplo, Avr2 inhibe proteasas de cisteína, mientras que Avr4 protege la pared celular del hongo contra la degradación por quitinasas vegetales (Van den Burg et al., 2004; Rooney et al., 2005). Ecp6, por otro lado, secuestra oligómeros de quitina para evitar la detección por receptores de la planta (Bolton et al., 2008).

Los genes Avr más estudiados en *C. fulvum* incluyen Avr2, Avr4, Avr4E y Avr9, cada uno codificando proteínas efectoras con características estructurales y funcionales específicas:

a) **Avr2**: Codifica una proteína madura de 58 aminoácidos con ocho residuos de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro, lo que estabiliza la estructura. Esta proteína inhibe proteasas cisteínicas extracelulares del tomate, interfiriendo con la defensa del hospedero. Es un factor clave de avirulencia y su reconocimiento por el receptor Cf-2 desencadena la respuesta inmune

b) **Avr4**: Codifica una lectina de unión a quitina, con una pre-proteína de 135 aminoácidos que madura a 86 aminoácidos con ocho cisteínas formando puentes disulfuro. Protege la pared celular fúngica de la degradación por quitinasas del tomate, facilitando la infección. Su reconocimiento por Cf-4 induce resistencia

c) **Avr4E**: Codifica una proteína rica en cisteína de 101 aminoácidos, cuya función específica aún no está completamente descrita, pero se sabe que induce resistencia mediada por Cf-4E

d) **Avr9**: Codifica una proteína pequeña de 63 aminoácidos que madura a un péptido de 28 aminoácidos con seis cisteínas formando un nudo de cistina. Interactúa con quinasas del hospedero y es reconocido por Cf-9

La variabilidad genética en estos genes es alta debido a la presión selectiva ejercida por cultivares resistentes, lo que genera mutaciones, deleciones o inserciones que permiten la evasión del reconocimiento y la aparición de nuevas razas virulentas del patógeno (Snoeijers et al., 2003).

1.2.13 Genes Ecp: proteínas efectoras extracelulares y su rol en la patogenicidad

Los genes Ecp codifican proteínas secretadas en el apoplasto que no siempre desencadenan resistencia, pero son esenciales para la virulencia y la colonización exitosa del hongo. Entre los más estudiados están Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp6 y recientemente Ecp20-2.

a) **Ecp1, Ecp2, Ecp4 y Ecp5**: Estas proteínas se encuentran en el fluido apoplástico de hojas infectadas y están presentes en todas las razas conocidas de *C. fulvum*.

Aunque su función precisa no está completamente caracterizada, se asocian con la supresión de la respuesta inmune y la modulación del metabolismo del hongo durante la infección

b) **Ecp20-2**: Identificada recientemente como una proteína secretada abundante durante la infección, su eliminación reduce significativamente la virulencia del hongo, confirmando su papel como efector necesario para la patogenicidad.

Se ha detectado polimorfismo también en genes Ecp, lo que indica que están sujetos a una presión de selección en un marco evolutivo y adaptativo, aunque con menor variabilidad que entre los genes Avr (Iida et al., 2015).

1.2.14 Variabilidad genética y evolución de *C. fulvum*

La evolución de *C. fulvum* está marcada por una alta capacidad de mutación y adaptación, principalmente en genes Avr, debido a la presión ejercida por cultivares con genes Cf. Se han descrito al menos 17 razas diferentes de *C. fulvum* que difieren en su repertorio de genes Avr y Ecp, lo que dificulta el control de la enfermedad.

Aunque el hongo se considera principalmente asexual, existen evidencias moleculares que sugieren que puede ocurrir recombinación genética, lo que contribuye a la generación de nuevas combinaciones de genes efectoras y a la aparición de razas complejas. Además, *C. fulvum* sintetiza melanina tipo DHN, importante para su supervivencia y virulencia, y el gen *pks1* está implicado en la síntesis de estos pigmentos oscuros, lo que contribuye a la resistencia del hongo a condiciones adversas (Van Esse et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado que los genes Avr y Ecp están sujetos a una presión selectiva que favorece mutaciones que eviten el reconocimiento por parte de los genes Cf. Esta variabilidad da lugar a la aparición de nuevas razas fisiológicas del patógeno. En regiones como Ecuador y Argentina se han identificado razas que han perdido genes como Avr4 y Avr9, permitiéndoles evadir la resistencia conferida por Cf-4 y Cf-9 (Rodríguez, 2023; Del Pino et al., 2018).

1.2.15 Técnicas moleculares para la detección y caracterización de genes Avr y Ecp en *C. fulvum*

La caracterización molecular de los genes Avr y Ecp en *C. fulvum* se realiza principalmente mediante:

a) **Extracción de ADN fúngico**: a partir de micelio liofilizado y triturado, usando tampones específicos para la obtención de ADN de alta calidad.
b) **PCR convencional y PCR con cebadores específicos**: para amplificar fragmentos de los genes Avr *(*Avr2, Avr4, Avr4E, Avr9*) y* Ecp *(*Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5*).* La visualización se realiza en geles de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y marcadores moleculares de 100 pb.
c) **Secuenciación y análisis de polimorfismos**: para confirmar la identidad de los genes y detectar variaciones alélicas que pueden estar asociadas con la virulencia o la evasión del reconocimiento por el hospedero.
d) **Análisis de expresión génica (RT-qPCR, transcriptómica)**: para identificar genes efectores altamente expresados durante la infección, como Ecp20-2, y comprender su función en la patogenicidad.

e) **RAPDs y otros marcadores moleculares**: para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *C. fulvum* y su relación con la virulencia y distribución geográfica.

El conocimiento sobre los genes Avr y Ecp ha sido clave para el mejoramiento genético del tomate. Se han implementado estrategias como la piramidación de genes Cf en un solo cultivar para aumentar la durabilidad de la resistencia. Además, se ha propuesto la monitorización molecular de poblaciones de *C. fulvum* para predecir la emergencia de razas virulentas (Wulff et al., 2009). Las nuevas herramientas de edición génica y selección asistida por marcadores representan un camino prometedor para mejorar la resistencia en el tomate (Luderer et al., 2001).

1.2.16 Implicaciones para el mejoramiento genético y manejo integrado

Los genes Cf en tomate se derivan de un locus complejo en el cromosoma 1 y codifican proteínas con dominios LRR (repeticiones ricas en leucina), similares a los receptores de tipo NBS-LRR ampliamente distribuidos en plantas. La evolución de estos genes ha sido dirigida por duplicaciones, conversión génica y selección positiva. Se ha observado que Cf-4 y Cf-9, aunque reconocen diferentes efectores, pueden estar presentes en el mismo haplotipo, lo cual complica su uso conjunto en programas de mejoramiento debido a interferencias genéticas (Parniske et al., 1997).

El conocimiento detallado de la diversidad genética y funcional de los genes Avr y Ecp es fundamental para:

a) **Desarrollar cultivares resistentes duraderos**: mediante la incorporación de genes Cf que reconozcan efectores conservados o esenciales para la virulencia, reduciendo la probabilidad de evasión por mutaciones
b) **Monitorear la evolución del patógeno**: para anticipar la aparición de nuevas razas virulentas y ajustar las estrategias de manejo y selección de variedades
c) **Diseñar estrategias de manejo integrado**: que combinen resistencia genética con prácticas culturales y químicas para controlar la enfermedad de manera sostenible.

Las proteínas Avr y Ecp suelen ser pequeñas (<300 aa), ricas en cisteína y carecen de homología significativa con proteínas conocidas, lo que sugiere una evolución rápida y especializada. Estas características complican su predicción bioinformática, requiriendo validación experimental mediante técnicas como la expresión transgénica, infiltración en hojas y ensayos de HR. Ecp6, por ejemplo, contiene tres dominios LysM que le permiten unirse a quitina con alta afinidad, impidiendo el reconocimiento por receptores PRR del hospedero (Shabab et al., 2008).

1.2.17 Avances en ingeniería genética y edición génica

La edición génica mediante CRISPR/Cas9 ha sido recientemente aplicada al tomate para introducir genes Cf o modificar genes de susceptibilidad. Además, se han desarrollado líneas transgénicas que expresan múltiples genes Cf para enfrentar la variabilidad genética de *C. fulvum*. Sin embargo, la aparición de razas virulentas requiere un monitoreo constante del patógeno mediante técnicas como PCR específica de efector, genotipado mediante marcador molecular tipo SNP y secuenciación genómica (Wubben et al., 1994).

La identificación y caracterización de los genes Avr y Ecp ha permitido establecer mapas genéticos y desarrollar estrategias de resistencia basadas en el reconocimiento específico de efectores por genes Cf, lo que es fundamental para el mejoramiento genético de tomate resistente al moho de la hoja. El conocimiento de la diversidad genética de los genes Avr y Ecp en poblaciones locales de *C. fulvum* es clave para diseñar programas de manejo integrado y para la selección de cultivares con resistencia duradera (Iakovidis et al., 2020b).

1.3 Objetivos

Objetivo general

- Detectar los genes Avr y Ecp en aislados de *C. fulvum* Cooke del cantón Patate.

Objetivos específicos

- Extraer el ADN genómico de los aislados de *C. fulvum.*
- Identificar los genes de avirulencia Avr en los asilados de *C. fulvum.*
- Amplificar los genes de proteínas extracelulares Ecp en los aislados de *C. fulvum.*

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del estudio

La presente investigación se llevará a cabo en la provincia de Tungurahua, específicamente en el cantón Cevallos, dentro de los laboratorios de investigación pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias. El estudio se desarrollará bajo condiciones controladas que garanticen la rigurosidad científica necesaria para la obtención de resultados confiables (Figura 1).



Fuente: (UTA - Campus Querochaca - Google Maps, 2025).

Figura 1: *Ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - UTA*

2.2 **Caracterización de 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 **Tipo de investigación**

La investigación planteada adoptará un enfoque cualitativo, cuyo propósito principal es explorar y comprender en profundidad los fenómenos relacionados con la detección de los genes Avr y Ecp en aislados de *C. fulvum* provenientes de tomate de riñón del Cantón Patate. A través de este enfoque, se buscará identificar patrones, características y posibles relaciones entre las variables bajo estudio, como los distintos aislados del hongo y la presencia o ausencia de los genes mencionados.

2.4 Materiales y equipos

2.4.1 Equipos

- Agitador vortex (Thermo Scientific, 88882009).
- Autoclave (Midmark, M11®).
- Balanza de precisión (Ohaus®, EX124).
- Bloque térmico (Thermo Scientific,13687720).
- Cabina de flujo laminar (Thermo Scientific, 1300).
- Destilador de agua (Thermo Scientific, Barnstead EasyPure II).
- Incubadora (Pol-Eko-Aparatura, Cln 115).

- Liofilizadora (Labconco, FreeZone 4.5).
- Microondas (Samsung, MS32J5133EM-AP).
- Microscopio (MOTIC, BA210LED).
- PCR convencional (Thermo Scientific, A48141).
- Refrigeradora (Indurama, A48141).
- Sistema de imagen táctil ENDURO GDS.
- Ultracogelador (Thermo Scientific - TSX60086A).
- Cámara de electroforesis (Biopolo).
- Fotodocumentador de geles.

2.4.2 Materiales

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

2.4.3 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

2.5 Factores de estudio

2.5.1 Factor N°1. Procedencia de los aislados

Tabla 3

Aislados del cantón Patate

Cantón
Patate

Nota. Lugar de donde provienen los aislados de *C. fulvum*.

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

Tabla 4

Proteínas de avirulencia y extracelulares

Proteínas de avirulencia	Proteínas extracelulares
Avr2	Ecp1
Avr4	Ecp2
Avr4E	Ecp4
Avr5	Ecp5
Avr9	Ecp6

Nota. Proteínas Avr y Ecp a detectar si están presentes o no en los aislados de *C. fulvum.*

2.6 Manejo del experimento

El material que se utilizó fueron los aislados de *C. fulvum*

Tabla 5

Códigos colección de C. fulvum

Aislados	Código
Aislado 1	CPA6-01
Aislado 2	CPA6-09
Aislado 3	BPA4-09
Aislado 4	BPA4-08
Aislado 5	CPA5-05
Aislado 6	APA1-01
Aislado 7	APA3-05
Aislado 8	APA1-04
Aislado 9	CPA6-02
Aislado 10	CPA6-08

Nota: Códigos de los aislados de C. fulvum utilizados en el estudio

Las muestras de las cepas ya se encuentran depositados en la colección de cultivo microbiano en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

A continuación, se hará una breve descripción de los protocolos que se utilizó para realizar todo el proceso de PCR:

Preparación del medio uniforme



Raspar el micelio y añadir 500 µl agua destilada (pipetear).



Posteriomente recolectar y añadir en una caja petri.



Colocar papel parafim y luego poner en la incubadora.

Nota. Protocolo para la preparación del medio uniforme de *C. fulvum*.

Protocolo de la extracción de ADN



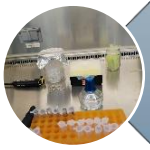
1. Raspar 100 mg del micelio de C. *fulvum* previamente liofilizado en un tubo eppendorf de 1.5ml.



2. Seguidamente se añadieron 50 µl de Buffer A (NaOH 100 mM , Tween 20 al 20%) y se incubó a 95°C por 10 minutos.



3. Inmediatamente se colocaron 50 µl de Buffer B (Tris - HCl 100 mM, EDTA 2 mM) y se agitó suavemente durante 35 segundos.



4. Se tomaron 4 µl de muestra para las pruebas de amplificación.

Nota. Protocolo para la extracción de ADN de los aislados de *C. fulvum.*

Protocolo de amplificación para PCR



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



2. Añadir 2.5 µl de 10X DreamTaq Green .



3.Seguidamente colocamos 1 µl dNTP 2mM respectivamente.



4.Inmediatamente colocamos 1 µl del Primer Forward y 1 µl del Primer Reverse.



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



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

Nota. Protocolo para el desarrollo de las pruebas PCR.

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



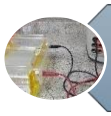
3. Una vez solidificada la agarosa retiramos la peineta y la colocamos en la cuba de electroforesis.



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



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



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

Nota. Protocolo para la electroforesis de las muestras PCR de *C. fulvum.*

2.6.1 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**
CAT CAG CAT ATC CTC TTC CAT CC	ACC AGG ATA AGT TCG CAG TC
CAG TAC GTT CAA AAG CAG ATA AGG	GCC TCC GCG ATG CTT CCT
Avr4	**Ecp2**
ACG GTA GGT CTG TAC ACG AGC C	GTC CAA GGA TCG TGT CTC AAG
AAC GAA CTG GGT CAT GGA ATG	TTCTAG CAA ACC CGT CTG A
Av4E	**Ecp4**
GCC CGG TAT ATC GCT GTG C	AAC CTA ACA TCA CAA TCT TCA A
CGG AAC CCC TGG CTG AGA	TTG CTC AAG CCC AGA CAG
Avr9	**Ecp5**
AAT ACA ACC TTG AAA CAG CTA GG	TAT GAA CAC TTT TAC TCT ACT C
GGA CTC TAC GGG GCT TGG	CGC GTC GCC TGA TAG AT

Fuente: (Jones et al., 1999).

Tabla 7

Condiciones de amplificación para proteínas de avirulencia de C. fulvum.

Avr2-Avr5	Etapa	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	**Etapa**	**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	**Etapa**	**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	**Etapa**	**Temperatura °C**	**Tiempo**	**Ciclos**
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

Fuente: (Jones et al., 1999).

Tabla 8

Condiciones de amplificación para proteínas extracelulares de C. fulvum.

Ecp1	**Etapa**	**Temperatura °C**	**Tiempo**	**Ciclos**
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	**Etapa**	**Temperatura °C**	**Tiempo**	**Ciclos**
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	**Etapa**	**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 inicial	72	5 min	1
Ecp5	**Etapa**	**Temperatura °C**	**Tiempo**	**Ciclos**
Ecp6				
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

Fuente: (Jones et al., 1999).

2.7 Variable respuesta

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

2.8 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

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Extracción del ADN genómico de los aislados de *C. fulvum.*

La extracción del ADN genómico de los aislados de *C. fulvum* permitió obtener un material apto para estudios moleculares. Las concentraciones de ADN para cada aislado se muestran con sus respectivas lecturas de las relaciones A260/280 (para determinar contaminantes de proteínas) y A260/230 (para determinar contaminación con carbohidratos) (tabla 9).

Tabla 9

Concentración y pureza del ADN extraído de C. fulvum.

Cantón	Código	Conc. (ng/µL)	A260/280	A260/230
Patate	CPA601	3.158	2.06	2.03
Patate	CPA609	32.117	2.07	2.04
Patate	BPA409	4.930	2.06	2.05
Patate	BPA408	25.433	2.07	2.03
Patate	CPA505	6.368	2.07	2.03
Patate	APA101	3.426	2.06	2.04
Patate	BPA305	3.823	2.07	2.03
Patate	APA104	3.719	2.06	2.05
Patate	CPA602	2.458	2.07	2.03
Patate	CPA608	23.955	2.07	2.05

Nota. Resultados obtenidos de las concentraciones y purezas del ADN extraído de los aislados de *C. fulvum.*

Para saber cuánto ADN se tiene, se mide su absorbancia a 260 nm, y un buen valor indica que hay suficiente material genético. Por otro lado, para asegurarse de que el ADN esté limpio y sin contaminantes, se revisan dos ratios: el 260/280, que detecta proteínas, y el 260/230, que señala la presencia de otros compuestos no deseados; los valores ideales para estos índices están entre 1.8 y 2.1, y entre 2.0 y 2.2, respectivamente. (González et al., 2020). Estos resultados confirmaron que el ADN obtenido tuvo la calidad y pureza necesarias libres de contaminantes con proteínas y carbohidratos para su uso posterior en análisis moleculares que utilicen la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2 **Identificación de los genes de avirulencia Avr en los asilados de *C. fulvum.***

Avr2

El análisis y la detección del gen Avr2 de *C. fulvum* a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa, exhibieron un patrón de bandas correspondiente a diversas muestras, que incluyen un control positivo, un control negativo y varias cepas de *C. fulvum*. La no aparición de bandas en estas muestras indicó la ausencia del gen Avr2 en los aislados analizados (Figura 2).

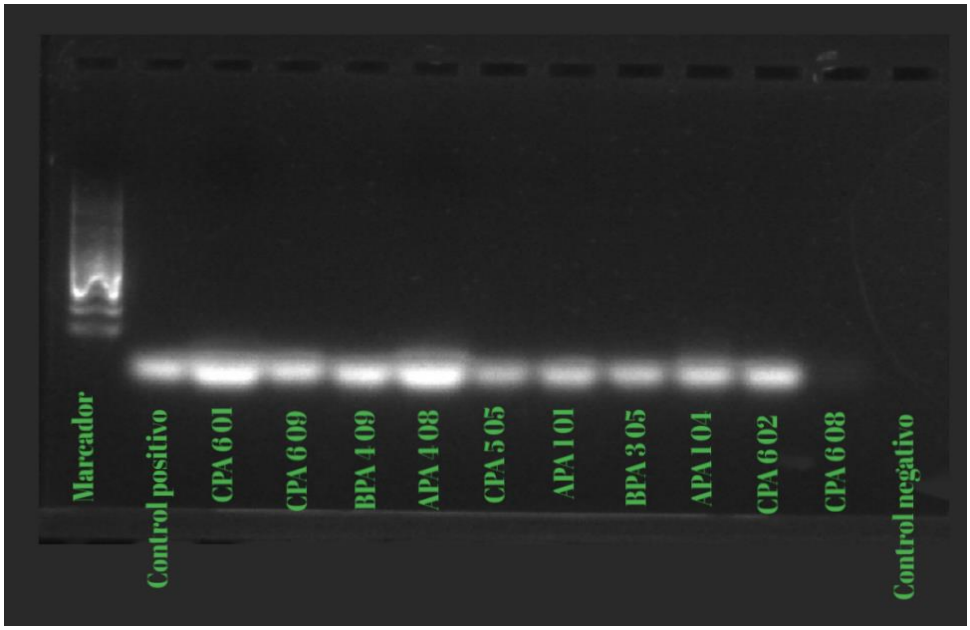


Figura 2: *Visualización de los productos de amplificación del gen Avr2 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

El gen Avr2 desempeña un papel crucial en la patogenicidad de *C. fulvum* y en su interacción con las proteínas de resistencia de la planta hospedera, específicamente en *S. lycopersicum* (Jones et al., 1999). La detección de este gen mediante electroforesis permite evaluar su expresión en diferentes estados del patógeno, información clave para el desarrollo de variedades resistentes, al identificar la presencia o ausencia de avirulencia o virulencia en las cepas analizadas.

La ausencia de bandas en las muestras sugiere la posible pérdida o mutación del gen en esas cepas, un fenómeno documentado en investigaciones previas que contribuye a la evolución del patógeno en respuesta a la presión selectiva ejercida por la resistencia en el hospedero (Jiang et al., 2022).

Avr4

La imagen mostrada presenta los resultados de un análisis de PCR orientado a la amplificación del gen Avr4 de *C. fulvum* en diversas muestras, incluyendo controles positivos y negativos. La presencia o ausencia de bandas en las diferentes muestras reflejo la existencia o expresión del gen Avr4 en los aislamientos evaluados. Los controles positivos y negativos se utilizan para corroborar la eficacia de la reacción de PCR y la especificidad de los cebadores empleados. La aparición de bandas en las muestras i

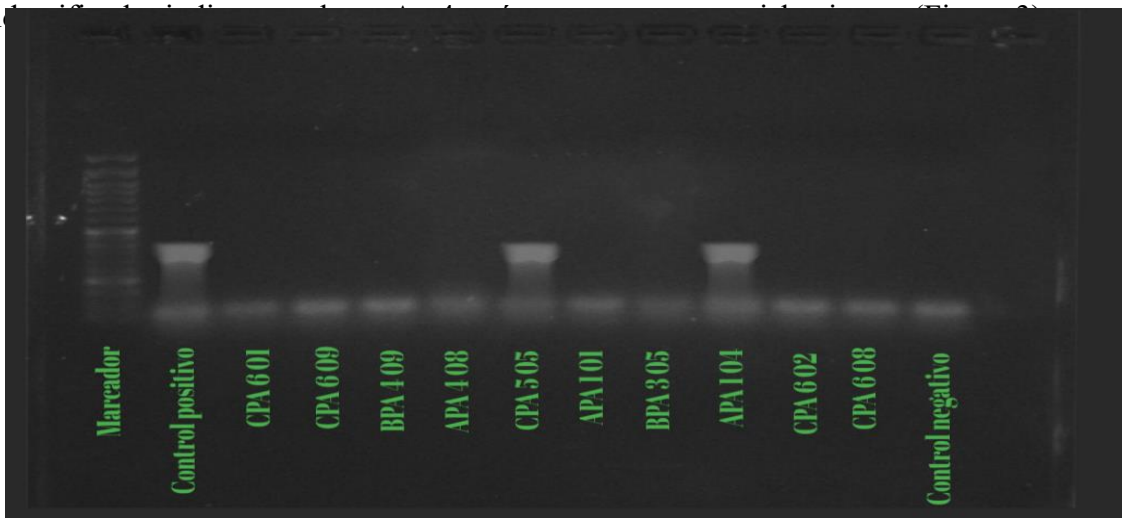


Figura 3: *Visualización de los productos de amplificación del gen Avr4 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

El gen Avr4 en *C. fulvum* es un factor de virulencia que interactúa con proteínas del hospedero, desencadenando respuestas inmunitarias en plantas resistentes (Thomma

et al., 2000). La detección de este gen en diferentes muestras evidencia su posible implicación en la patogenicidad del hongo, así como su relevancia como objetivo para el desarrollo de estrategias de control en cultivos afectados.

La variabilidad observada en la presencia del gen entre distintos aislamientos sugiere una diversidad genética que resulta fundamental para entender la dinámica de la interacción entre patógeno y hospedero, y para diseñar plantas resistentes mediante métodos biotecnológicos (Takken et al., 1998).

Avr4E

La detección del gen Avr4E de *C. fulvum* mediante análisis de electroforesis en gel de agarosa permite determinar su presencia en diversas muestras, como se evidencia en la imagen. La aparición o ausencia de bandas en las distintas muestras reflejó la existencia del gen Avr4E en estas cepas, lo cual resultó relevante para comprender la interacción entre el patógeno y el hospedero, así como la resistencia del tomate frente a la infección causada por *C. fulvum* (Figura 4).

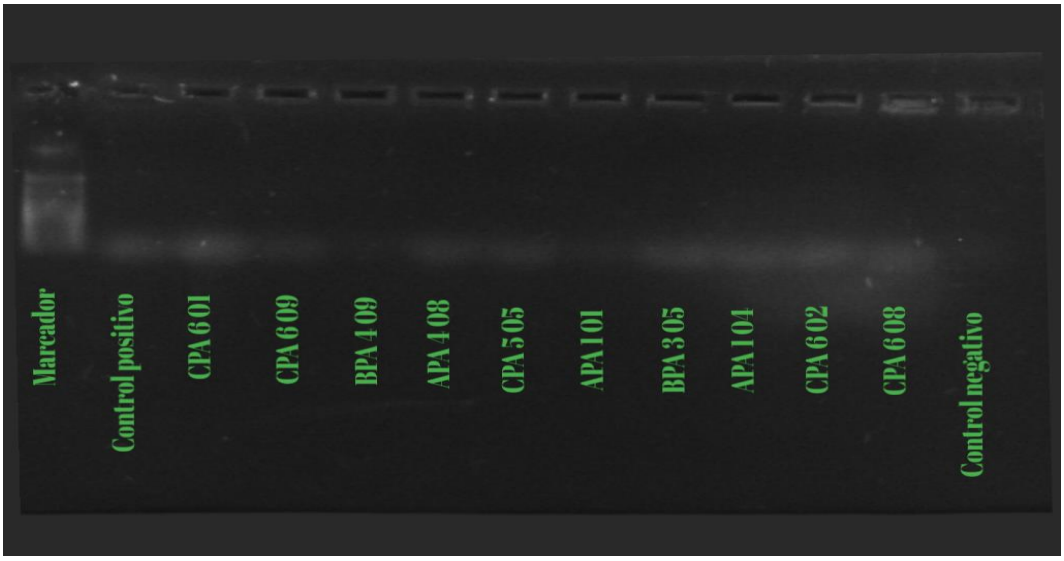


Figura 4: *Visualización de los productos de amplificación del gen Avr4E de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

El gen Avr4E pertenece a una familia de genes que codifican proteínas efectoras secretadas por *C. fulvum*, que desempeñan un papel crucial en la capacidad del hongo para evadir las defensas inmunitarias de la planta hospedera (Shabab et al., 2008). La detección de Avr4E en diferentes cepas puede indicar su función en la virulencia y en la adaptación del patógeno a distintas variedades de tomate, especialmente en aquellas que cuentan con resistencias específicas (Marmeisse et al., 1994).

Por otro lado, la ausencia de bandas en algunas muestras podría señalar la pérdida o mutación del gen Avr4E, un mecanismo que facilita la evasión de la resistencia en plantas que dependen del reconocimiento de este efector para activar su respuesta inmunitaria (Thomma et al., 2011). Esta variabilidad genética en los genes efectoras es una estrategia común en *C. fulvum* para conservar su capacidad infectiva en diferentes variedades de tomate, lo que afecta la durabilidad de las resistencias genéticas (de Wit et al., 2012).

Avr9

La imagen presentada corresponde a un gel de electroforesis de PCR utilizado para evaluar la presencia del gen Avr9 en distintos aislamientos de *C. fulvum*. Se observó que todos los aislados utilizados mostraron bandas de amplificación, lo que indica que el gen Avr9 está presente en estos aislamientos. La detección de este gen es relevante, dado que Avr9 codifica una proteína de avirulencia que puede ser reconocida por receptores de resistencia en las plantas, desencadenando respuestas inmunitarias (Figura 5).

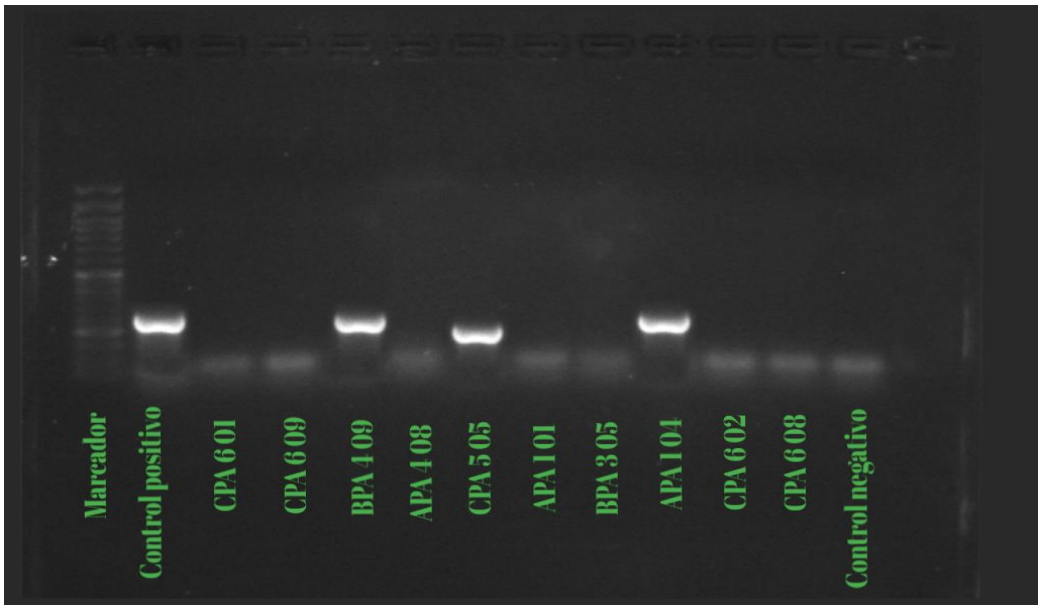


Figura 5: *Visualización de los productos de amplificación del gen Avr9 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

Los controles negativos no presentan bandas, lo que confirma la especificidad de la técnica de PCR y descarta la contaminación en las muestras analizadas. Por su parte, los controles positivos exhiben bandas claras, lo que valida la eficacia de la reacción. La variabilidad en la intensidad de las bandas observada entre las diferentes muestras podría reflejar diferencias en la cantidad de ADN o en la expresión del gen, aspectos que podrían investigarse con técnicas adicionales como qPCR o secuenciación para confirmar la presencia y funcionalidad del gen Avr9 (Van Esse et al., 2008).

La detección del gen Avr9 en múltiples aislamientos tiene importantes implicaciones para la interacción entre el patógeno y el hospedero. Este gen ha sido ampliamente estudiado por su papel en la resistencia de las plantas, especialmente en especies como el tomate, donde su reconocimiento por receptores específicos activa respuestas inmunitarias que limitan la infección (Jørgensen et al., 2002). La presencia

de Avr9 en diferentes aislamientos sugiere que este gen podría ser un factor determinante en la virulencia del hongo y en la variabilidad de la respuesta de las plantas hospedantes.

En los aislados seleccionadas se realizó la identificación de los genes de avirulencia, obteniendo como resultado que en algunos aislados se muestra presencia del gen y en otros aislados no existe presencia de dicho gen. La presencia o ausencia del gen se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Genes Avr

Código	Avr2	Avr4	Avr4E	Avr9
CPA601	-	+	+	+
CPA609	-	+	+	+
BPA409	-	+	-	+
BPA408	-	+	+	+
CPA505	-	+	+	+
APA101	-	+	-	+
BPA305	-	+	+	+
APA104	-	+	+	+
CPA602	-	+	+	+
CPA608	-	+	+	+

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

3.3 Amplificar los genes de proteínas extracelulares Ecp en los aislados de *C. fulvum.*

Ecp1

La imagen obtenida mediante electroforesis en gel de agarosa muestra el perfil de amplificación del gen Ecp1 en diversas muestras de *C. fulvum*. La presencia de bandas en

estas muestras indica que el gen Ecp1 está presente en dichas cepas, mientras que la ausencia de bandas confirma la ausencia del gen en las muestras (Figura 6).

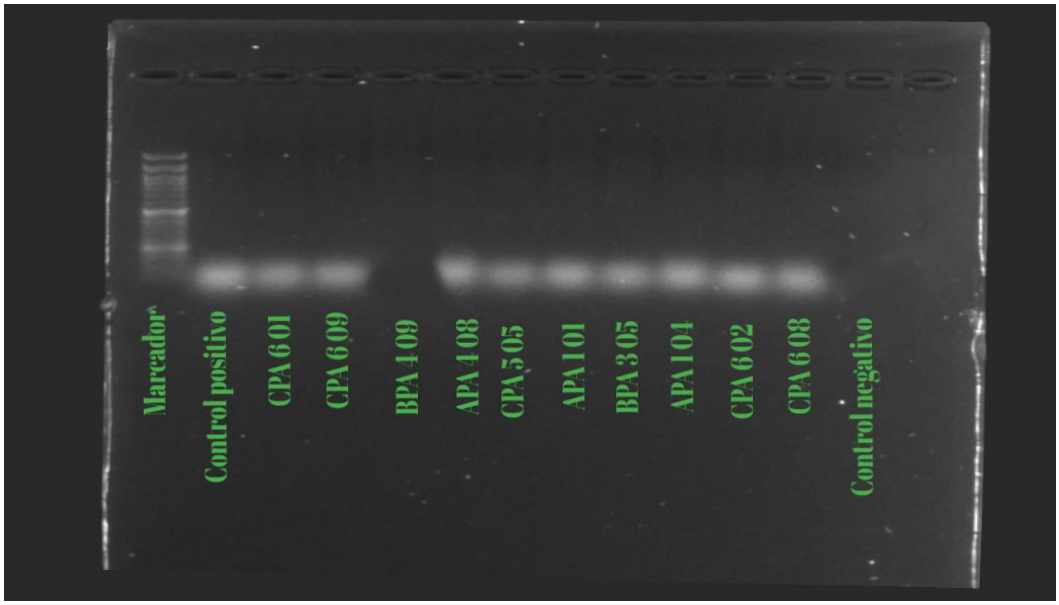


Figura 6: *Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp1 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

El gen Ecp1 codifica una proteína efectora secretada por *C. fulvum*, la cual juega un papel fundamental en la interacción con la planta hospedera, particularmente en la modulación de la respuesta inmunitaria del tomate (Van den Ackerveken et al., 1996). La detección de Ecp1 en las muestras analizadas sugiere que estas cepas pueden producir dicha proteína, la cual podría estar vinculada con su virulencia y su habilidad para evadir las defensas del hospedero (Kohler et al., 2016).

El patrón de bandas observado en las muestras positivas evidencia la conservación del gen Ecp1 en estas cepas, lo que concuerda con estudios previos que reportan la presencia de genes similares en poblaciones de *C. fulvum* capaces de infectar variedades de tomate, especialmente aquellas que carecen de resistencias específicas contra estos

efectores (Dixon et al., 1996). Por otro lado, la ausencia de bandas en ciertas muestras podría señalar la pérdida o mutación del gen, un mecanismo evolutivo que podría facilitar la evasión de la detección inmunológica por parte de la planta y favorecer la supervivencia del patógeno (Snoeijers et al., 2003).

Ecp2

La imagen muestra el análisis de la expresión del gen Ecp2 de *C. fulvum*, donde se pudo observar una banda específica en el gel de electroforesis. Los marcadores moleculares indican las posiciones correspondientes a diversas construcciones genéticas y controles empleados en el experimento, incluyendo marcadores de peso molecular, controles positivos y negativos, así como distintas cepas experimentales evaluadas. El patrón de bandas detectado confirma la presencia del gen Ecp2 en las muestras analizadas, lo que coincide con estudios previos que indican que este gen se expresa de manera específica durante la colonización de las hojas de tomate por este patógeno fúngico (Figura 7).

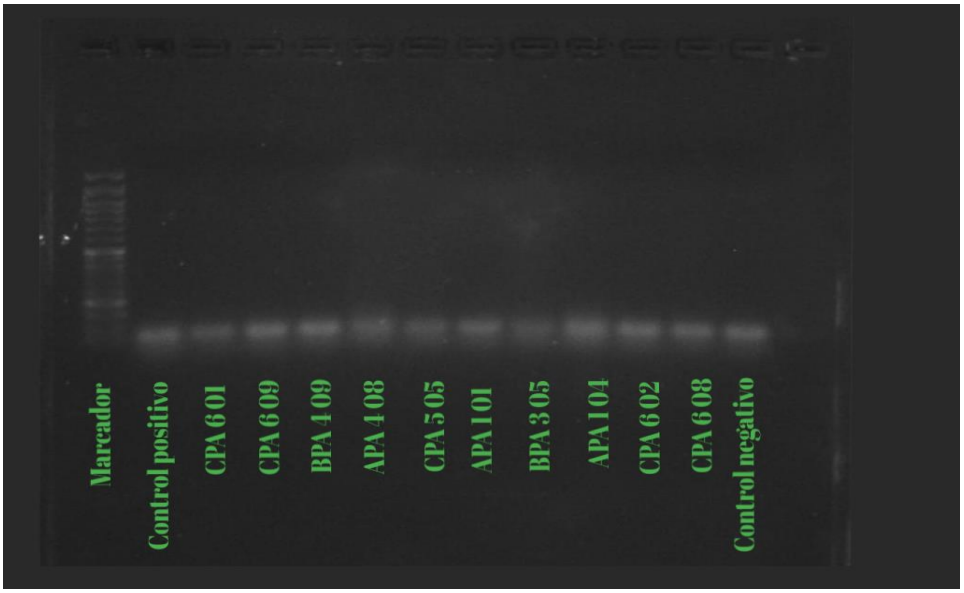


Figura 7: *Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp2 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

Según Snoeijers et al., (2003)., estas proteínas extracelulares producidas in planta contribuyen a la virulencia, ya que están involucradas en la supresión de las respuestas defensivas del hospedero. Esta capacidad de inhibir las defensas de la planta es fundamental para que el patógeno pueda establecer la infección con éxito, permitiéndole evadir o neutralizar las respuestas inmunitarias del tomate. El estudio del gen Ecp2 de *C. fulvum* reafirma su papel crucial como factor de virulencia en la interacción entre el patógeno y su hospedero.

Los datos de expresión obtenidos respaldan su función reconocida como una proteína efectora secretada durante la infección dentro de la planta. El entendimiento de este sistema sigue siendo esencial para diseñar estrategias integradas de control de enfermedades en cultivos de tomate, así como para avanzar en el conocimiento de la patología molecular vegetal.

Ecp4

En la imagen se observó un gel de electroforesis utilizado para analizar la presencia del gen Ecp4 de *C. fulvum* en diferentes muestras. Presentan bandas de intensidad y tamaño similares al control positivo, lo que indica la presencia del gen Ecp4 en todas estas muestras. Estos resultados evidencian que el gen Ecp4 está presente en todos los aislamientos analizados, lo cual es coherente con su papel reportado como efector durante la infección de *C. fulvum* en plantas de tomate (Figura 8).

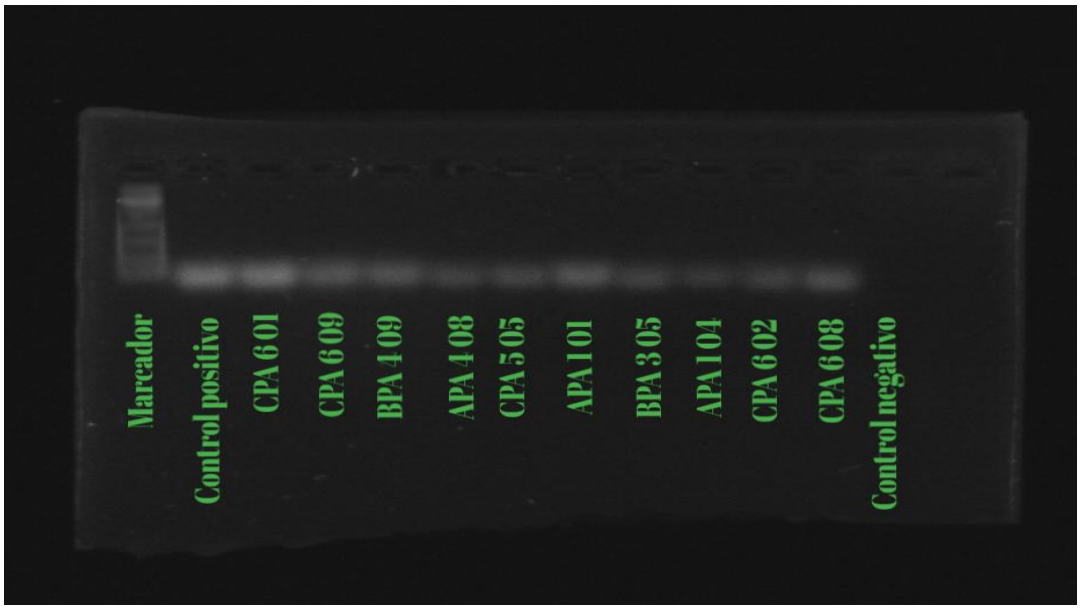


Figura 8: *Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp4 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

El gen Ecp4 es responsable de la producción de una proteína efectora que *C. fulvum* secreta durante la colonización de las hojas de tomate, desempeñando un papel crucial en la capacidad patogénica del hongo (Snoeijers et al., 2003). Similar a otros efectores, Ecp4 se expresa principalmente durante la infección en el hospedero y está involucrado en la inhibición de las respuestas inmunológicas de la planta, lo que favorece el desarrollo exitoso de la enfermedad (de Wit, 2016). La detección uniforme de este gen en todos los aislamientos sugiere que estos genotipos de *C. fulvum* poseen la capacidad de superar las defensas del tomate, en concordancia con investigaciones previas que reportan la conservación de genes efectores en poblaciones de este hongo (Stergiopoulos et al., 2010).

Ecp5

En el gel de electroforesis presentado, se evaluó la presencia del gen Ecp5 de *C. fulvum* en diferentes muestras, observándose que tanto el control positivo como todos los aislamientos analizados, muestran bandas claras y de similar intensidad, lo que confirma la amplificación exitosa del gen en cada caso. Estos hallazgos indican que el gen Ecp5 está presente en todos los genotipos evaluados, sugiriendo su potencial expresión como efector durante la infección del tomate por este patógeno (Figura 9).

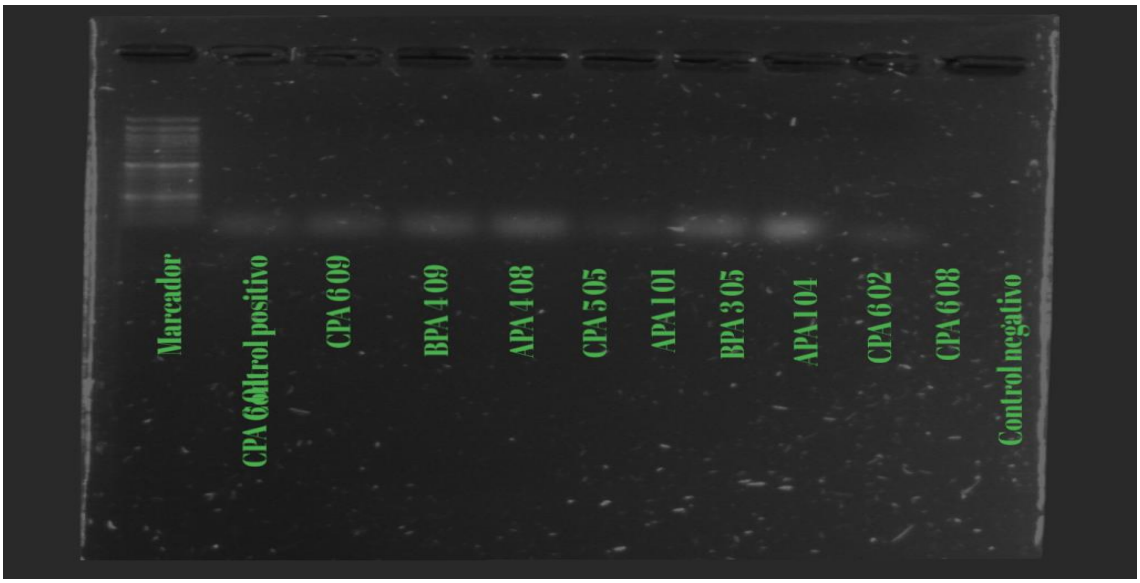


Figura 9: *Visualización de los productos de amplificación del gen Ecp5 de C. fulvum mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.*

mostró una presencia consistente en todos los genotipos analizados, lo que indica su relevancia en la patogenicidad de la especie. Por tanto, el conocimiento sobre Ecp5 resulta esencial para el desarrollo de estrategias de control y mejoramiento genético en tomate, así como para profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares de la interacción planta-patógeno. El análisis molecular evidenciado en el gel de electroforesis permitió detectar de forma precisa el gen Ecp5 en todos los aislamientos de *C. fulvum* evaluados, ya que las bandas específicas presentes en las muestras y la ausencia

de señal en el control negativo confirman la confiabilidad y especificidad del procedimiento.

En los aislados seleccionadas se realizó la identificación del gen de las proteínas extracelulares, obteniendo como resultado que en algunos aislados se muestra presencia del gen y en otros aislados no existe presencia de dicho gen. La presencia o ausencia del gen se muestra en la tabla 11.

Tabla 11
Genes Ecp

Código	Ecp1	Ecp2	Ecp4	Ecp5
CPA601	+	+	+	+
CPA609	+	+	+	+
BPA409	-	+	+	+
BPA408	+	+	+	+
CPA505	+	+	+	+
APA101	+	+	+	+
BPA305	+	+	+	+
APA104	+	+	+	+
CPA602	+	+	+	+
CPA608	+	+	+	-

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

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

La extracción de ADN genómico de los aislados de *C. fulvum* provenientes del cantón Patate fue satisfactoria, logrando obtener material genético de alta calidad, que están libres de contaminantes como proteínas y carbohidratos, cumpliendo así con los estándares necesarios para la reacción de PCR.

La identificación de los genes de avirulencia Avr en los aislados de *C. fulvum* fue diferente entre aislados. El gen Avr2 amplificó para el 90% de las muestras, el gen Avr4 y el gen Avr9 amplificaron un 50% de las muestras, el gen Avr4E corrió bandas en el 30% de los aislados.

La amplificación de los genes de las proteínas extracelulares Ecp en los aislados de *C. fulvum* mostraron una diferente amplificación entre aislados. El gen Ecp1 amplificó para el 100% de las muestras, los genes Ecp 2 y Ecp4 mostraron bandas en el 40% de los

aislados mientras que el gen Ecp5 solo estuvo presente en el 20% de los aislados estudiados.

4.2 Recomendaciones

Investigar protocolos y técnicas utilizadas en otras investigaciones sobre genes Avr y Ecp de *C. fulvum* y acoplarlas a nuestras necesidades, así obtendremos mayores resultados concisos en menos tiempo.

Para realizar todo el proceso de la investigación hay que tener la mayor asepsia posible para no contaminar las muestras, los primers, y los reactivos utilizados.

Extender el proceso de aislamiento de esporas individuales de *C. fulvum* hacia cantones ubicados en otras provincias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agr Cesar Gustavo Lucentini, I., & Carlos Nazareno Saparrat Profesor Adjunto, M. (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

Bento, G., Routtu, J., Fields, P. D., Bourgeois, Y., Du Pasquier, L., & Ebert, D. (2017). The genetic basis of resistance and matching-allele interactions of a host-parasite system: The Daphnia magna-Pasteuria ramosa model. *PLoS Genetics*, *13*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006596

Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J., & Johnson, E. M. (2008a). Molecular identication of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(SUPPL. 1), 7–12. https://doi.org/10.1093/JAC/DKM425

Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J., & Johnson, E. M. (2008b). Molecular identication of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(SUPPL. 1), 7–12. https://doi.org/10.1093/JAC/DKM425

Cao, J., & Tan, X. (2019). Comprehensive analysis of the chitinase family genes in tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Plants*, *8*(3). https://doi.org/10.3390/PLANTS8030052

CARACTERIZACIÓN molecular de AISLAMIENTOS DE Cladosporium fulvum Cooke PROVENIENTES DE TOMATE EN CONDICIONES DE CULTIVO PROTEGIDO. (n.d.). Retrieved June 17, 2025, from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522011000100002

De, C., & Agronómica, I. (n.d.). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS*.

De Wit, P. J. G. M., Laugé, R., Honée, G., Joosten, M. H. A. J., Vossen, P., Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., & Vervoort, J. J. M. (1997). Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen Cladosporium fulvum. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *71*(1–2), 137–141. https://doi.org/10.1023/A:1000102509556

de Wit, P. J. G. M., & Spikman, G. (1982). Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of Cladosporium fulvum and tomato. *Physiological Plant Pathology*, *21*(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90002-9

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). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003088

Dixon, M. S., Golstein, C., Thomas, C. M., Van Der Biezen, E. A., & Jones, J. D. G. (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, *97*(16), 8807–8814. https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8807

E Franco, M. E., Rollan, C., & Ronco, B. L. (1900). A Survey on Occurrence of Cladosporium fulvum Identifies Race 0 and Race 2 in Tomato-Growing Areas of Argentina. *Parniske et Al*. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1270-RE

Iakovidis, M., Soumpourou, E., Anderson, E., Etherington, G., Yourstone, S., & Thomas, C. (2020a). Genes Encoding Recognition of the Cladosporium fulvum Effector Protein Ecp5 Are Encoded at Several Loci in the Tomato Genome. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *10*(5), 1753–1763. https://doi.org/10.1534/G3.120.401119

Iakovidis, M., Soumpourou, E., Anderson, E., Etherington, G., Yourstone, S., & Thomas, C. (2020b). Genes Encoding Recognition of the Cladosporium fulvum Effector Protein Ecp5 Are Encoded at Several Loci in the Tomato Genome. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *10*(5), 1753–1763. https://doi.org/10.1534/G3.120.401119

Iida, Y., Van 'T Hof, P., Beenen, H., Mesarich, C., Kubota, M., Stergiopoulos, I., Mehrabi, R., Notsu, A., Fujiwara, K., Bahkali, A., Abd-Elsalam, K., Collemare, J., & De Wit, P. J. G. M. (2015). Novel Mutations Detected in Avirulence Genes Overcoming Tomato Cf Resistance Genes in Isolates of a Japanese Population of Cladosporium fulvum. *PLoS ONE*, *10*(4), e0123271. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123271

Inicio - Cladosporium fulvum v1.0. (n.d.). Retrieved June 17, 2025, from https://mycocosm.jgi.doe.gov/Clafu1/Clafu1.home.html

Jiang, X., Li, Y., Li, R., Gao, Y., Liu, Z., Yang, H., Li, J., Jiang, J., Zhao, T., & Xu, X. (2022). Transcriptome Analysis of the Cf-13-Mediated Hypersensitive Response of Tomato to Cladosporium fulvum Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9). https://doi.org/10.3390/ijms23094844

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

Kohler, A. C., Chen, L. H., Hurlburt, N., Salvucci, A., Schwessinger, B., Fisher, A. J., & Stergiopoulos, I. (2016). Structural analysis of an Avr4 effector ortholog offers insight into chitin binding and recognition by the Cf-4 receptor. *Plant Cell*, *28*(8), 1945–1965. https://doi.org/10.1105/TPC.15.00893

López Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo del tomate Solanum lycopersicum*. https://repositorio.iica.int/handle/11324/3143

Luderer, R., Rivas, S., Nürnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H. W., Van der Hoorn, R. A. L., Romeis, T., Wehrfritz, J. M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J. D. G., De Wit, P. J. G. M., & Joosten, M. H. A. J. (2001). No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of Cladosporium fulvum. *Molecular Plant-*

Microbe Interactions, *14*(7), 867–876. https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.7.867,

Marmeisse, R., Van den Ackerveken, G. F. J. M., Goosen, T., De Wit, P. J. G. M., & Van den Broek, H. W. J. (1994). The in-planta induced ecp2 gene of the tomato pathogen Cladosporium fulvum is not essential for pathogenicity. *Current Genetics*, *26*(3), 245–250. https://doi.org/10.1007/BF00309555,

Mesarich, C. H., Ökmen, B., Rovenich, H., Griffiths, S. A., Wang, C., Jashni, M. K., Mihajlovski, A., Collemare, J., Hunziker, L., Deng, C. H., Van Der Burgt, A., Beenen, H. G., Templeton, M. D., Bradshaw, R. E., & De Wit, P. J. G. M. (2018). Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from Cladosporium fulvum in wild tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(1), 145–162. https://doi.org/10.1094/MPMI-05-17-0114-FI/ASSET/IMAGES/LARGE/MPMI-05-17-0114-FI_F5-1512416016861.JPEG

Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., & Van Der Hoorn, R. A. L. (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell*, *20*(4), 1169–1183. https://doi.org/10.1105/tpc.107.056325

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., 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

Takken, F. L. W., Schipper, D., John J Nijkamp, H., & Hille, J. (1998). Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the Cf-4 locus of tomato involved in disease resistance to Cladosporium fulvum race 5. *Plant Journal*, *14*(4), 401–411. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00135.x

Universidad Técnica de Ambato - Campus Querochaca - Google Maps. (n.d.). Retrieved June 17, 2025, from https://www.google.com/maps/place/Universidad+T%C3%A9cnica+de+Ambato+-+Campus+Querochaca/@-1.3692556,-78.6088793,17.34z/data=!4m6!3m5!1s0x91d39d092bd59aa9:0x8fb3cd6a68c0398e!8m2!3d-1.3695691!4d-78.6075475!16s%2Fg%2F11fpg1fbxr?entry=ttu&g_ep=EgoyMDI1MDYxNi4wIKXMDSoASAFQAw%3D%3D

Van Esse, H. P., Van't Klooster, J. W., Bolton, M. D., Yadeta, K. A., Van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., Dewit, 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. https://doi.org/10.1105/TPC.108.059394

Wubben, J. P., Joosten, M. H. A. J., & De Wit, P. J. G. M. (1994). Expression and localization of two in planta induced extracellular proteins of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *7*(4), 516–524. https://doi.org/10.1094/MPMI-7-0516,

ANEXOS

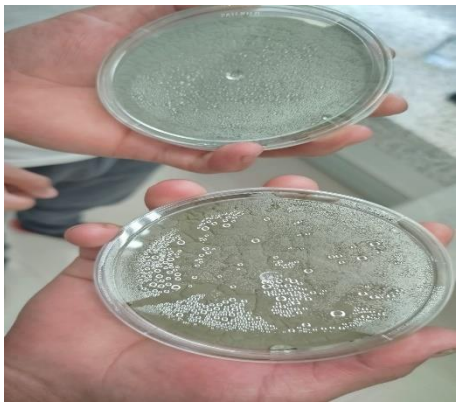


Anexo 1: Preparación de medio de cultivo para la siembra de los aislados de *C. fulvum.*



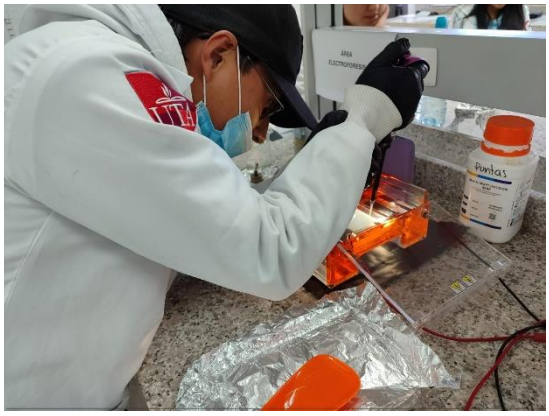


Anexo 2: Siembra de los aislados monospóricos de *C. fulvum* en las cajas Petri con medio de cultivo.





Anexo 3: Raspado del medio uniforme de los aislados de *C. fulvum* para pasar a los tubos eppendorf.



Anexo 4: Preparación para correr una electroforesis.



Anexo 5: Foto de una prueba PCR de un gen con los aislados monospóricos.