



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TÍTULO:**

**“Determinación de la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp.”**

*Trabajo de Titulación previa a la obtención del  
título de Ingeniero Agrónomo*

**AUTOR:** Luis Daniel Pacheco Atariguana  
C.I: 0105965982

**DIRECTOR:** Ing. Patricio Salvador Castro Quezada. Ph D.  
C.I: 1103411151

CUENCA-ECUADOR

6 de septiembre de 2019



## RESUMEN

El cultivo de naranjilla en Ecuador tiene un gran potencial debido a sus excelentes características organolépticas. Sin embargo, es muy susceptible al ataque del nematodo *Meloidogyne incognita*, en ocasiones causando la pérdida total del cultivo. Esta investigación se llevó a cabo bajo invernadero con objetivo de determinar la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum* sp; y, buscar marcadores moleculares RGAs y SSR asociados a la resistencia. Para el análisis fenotípico se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, y en el análisis molecular se consideró el polimorfismo basado en ausencia o presencia de productos de amplificación. El inóculo fue extraído de raíces infectadas de naranjilla, el cual fue utilizado para infectar las tres especies. Para los análisis moleculares se utilizaron primers RGAs y SSR definidos sobre regiones de homología en genes de resistencia en diferentes cultivos. Se encontró que para las variables biomasa acumulada, aumento de la población, incidencia, índice de nudosidad y severidad, los resultados mostraron diferencias altamente significativas entre *S. hirtum* y *Solanum* sp. con respecto a la especie susceptible (*S. quitoense*) a los 80 días de evaluación. En cuanto a los marcadores moleculares se encontró dos pares de primers que amplificaron en *S. hirtum* y *S. quitoense*: un RGA definido sobre un dominio LRR y un SSR definido en pimiento. No se obtuvo amplificaciones en *Solanum* sp. Además, estos primers resultaron ser polimórficos en la población segregante entre *S. quitoense* y *S. hirtum*.

**Palabras claves:** Nematodo del nudo de la raíz, Marcadores moleculares, Microsatélites, Genes de resistencia análogos.



## ABSTRACT

The naranjilla crop has a great potential in Ecuador, due to its excellent organoleptic characteristics. Nevertheless, the crop has a high susceptibility to attack of nematode *Meloydogyne incognita*, sometimes occasioning the total loss of crop. This research was carried out under greenhouse and the objectives were: determine the resistance to *Meloidogyne incognita*, in three species of the Lasiocarpa section: *S. quitoense*, *S. hirtum* and *Solanum* sp; and, find RGAs and SSR molecular markers associated with resistance. For phenotypic analysis, a completely randomized design with five repetitions was used, and for molecular analysis the polymorphism based on absence or presence of amplification products was considered. Nematode inoculum was extracted from roots infected with naranjilla. For molecular analyzes, we used RGAs and SSR primers defined on homology regions for crop resistance genes previously identified. We found that for variables: accumulated biomass, population increase, incidence, index of knotty and severity, results showed highly significant differences between *S. hirtum* and *Solanum* sp. with respect to susceptible specie (*S. quitoense*) at 80 days of evaluation. Regarding the molecular markers, we found two pairs of primers that amplified in *S. hirtum* and *S. quitoense*: an RGA defined on an LRR domain and an SSR defined in pepper. No amplifications were obtained in *Solanum* sp. Furthermore, these primers were found to be polymorphic in the segregating population between *S. quitoense* and *S. hirtum*.

**Keywords:** Root knot nematode, Molecular marker, Resistance Gene Analogs, Microsatellite.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                                   | 2  |
| ABSTRACT .....                                                                 | 3  |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS .....                                                     | 4  |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                         | 7  |
| ÍNDICE DE FOTOS .....                                                          | 8  |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....                                                          | 9  |
| ÍNDICE DE GRAFICOS. ....                                                       | 10 |
| ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA .....                                                | 11 |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                          | 14 |
| DEDICATORIA.....                                                               | 15 |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                          | 16 |
| 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....                                                 | 18 |
| Objetivo general .....                                                         | 18 |
| Objetivos específicos.....                                                     | 18 |
| HIPÓTESIS .....                                                                | 18 |
| 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....                                                | 19 |
| 3.1. Sección Lasiocarpa ( <i>Solanum</i> , Clado: <i>Leptostemonum</i> ) ..... | 19 |
| 3.1.1. Especie <i>Solanum quitoense</i> Lam. (Naranjilla).....                 | 20 |
| 3.1.1.1. Generalidades: Origen, ubicación e importancia del cultivo.....       | 20 |
| 3.1.1.2. Plagas y Enfermedades.....                                            | 21 |
| 3.1.2. Especie <i>Solanum hirtum</i> Vahl (Espinuda) .....                     | 21 |
| 3.2. <i>Meloidogyne incognita</i> (Nematodo del nudo de la raíz) .....         | 21 |
| 3.2.1. Generalidades: distribución e importancia.....                          | 21 |
| 3.2.2. Daños a nivel celular.....                                              | 22 |
| 3.2.3. Síntomas.....                                                           | 22 |
| 3.2.4. Ciclo de vida de <i>M. incognita</i> . ....                             | 23 |



|            |                                                                              |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.       | Resistencia genética de las plantas a patógenos.....                         | 24 |
| 3.3.1.     | Mecanismo de defensa y activación del sistema inmune de las plantas .....    | 25 |
| 3.4.       | Marcadores moleculares en resistencia .....                                  | 26 |
| 3.4.1.     | Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR) en la resistencia. ....  | 26 |
| 3.4.2.     | Genes de Resistencia Análogos (RGAs).....                                    | 27 |
| 4.         | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                   | 28 |
| 4.1.       | Materiales .....                                                             | 28 |
| 4.2.       | Métodos.....                                                                 | 28 |
| 4.2.1.     | El área de estudio .....                                                     | 28 |
| 4.2.2.     | Manejo del experimento. ....                                                 | 29 |
| 4.2.2.1.   | Metodología para la investigación experimental del objetivo 1 (Invernadero). | 29 |
| 4.2.2.1.1. | Obtención de material vegetal. ....                                          | 29 |
| 4.2.2.1.2. | Composición del sustrato y esterilización. ....                              | 29 |
| 4.2.2.1.3. | Obtención del patógeno. ....                                                 | 29 |
| 4.2.2.1.4. | Propagación de la especie e inoculación de M. incognita.....                 | 30 |
| 4.2.2.1.5. | Variables a ser evaluadas para determinar la resistencia a M. incognita. .   | 30 |
| 4.2.2.1.6. | Diseño experimental y análisis estadísticos.....                             | 32 |
| 4.2.2.2.   | Metodología para la investigación experimental del objetivo 2 (Laboratorio). | 33 |
| 4.2.2.2.1. | Material vegetal. ....                                                       | 33 |
| 4.2.2.2.2. | Extracción del ADN. ....                                                     | 33 |
| 4.2.2.2.3. | Cuantificación de ADN. ....                                                  | 34 |
| 4.2.2.2.4. | Caracterización molecular. ....                                              | 34 |
| 4.2.2.2.5. | Amplificación por PCR. ....                                                  | 34 |
| 5.         | RESULTADOS .....                                                             | 36 |



|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1. Análisis fenotípico de resistencia en invernadero para <i>Solanum quitoense</i> , <i>Solanum hirtum</i> y <i>Solanum</i> sp..... | 36 |
| 5.1.1. Incremento de la población de <i>M. incognita</i> .....                                                                        | 36 |
| 5.1.2. Variable diámetro de nódulos .....                                                                                             | 37 |
| 5.1.3. Incidencia e índice de nudosidad del nematodo <i>M. incognita</i> .....                                                        | 37 |
| 5.1.4. Severidad del nematodo <i>M. incognita</i> .....                                                                               | 38 |
| 5.1.5. Altura de planta.....                                                                                                          | 40 |
| 5.1.6. Diámetro del tallo .....                                                                                                       | 41 |
| 5.1.7. Biomasa acumulada .....                                                                                                        | 44 |
| 5.2. Análisis molecular para <i>Solanum quitoense</i> , <i>Solanum hirtum</i> y <i>Solanum</i> sp con marcadores RGAs y SSR .....     | 44 |
| 5.2.1. Polimorfismo molecular con el RGA CLRR (F-R) .....                                                                             | 45 |
| 5.2.2. Polimorfismo molecular con el microsatélite HpmsE 143 .....                                                                    | 45 |
| 5.2.3. Polimorfismo molecular en segregantes de la <i>S. hirtum</i> y <i>S. quitoense</i> .....                                       | 46 |
| 6. DISCUSIÓN.....                                                                                                                     | 48 |
| 7. CONCLUSIONES .....                                                                                                                 | 52 |
| 8. RECOMENDACIONES .....                                                                                                              | 53 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....                                                                                                      | 54 |
| ANEXOS.....                                                                                                                           | 60 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Materiales usados. ....                                                                                                    | 28 |
| Tabla 2: Escala para evaluar el índice de agallas en el estudio de resistencia a <i>M. incognita</i> . ....                         | 31 |
| Tabla 3: Escala de resistencia basada en el porcentaje de severidad. ....                                                           | 32 |
| Tabla 4: Nombre de marcadores SSR y RGAs evaluados. ....                                                                            | 35 |
| Tabla 5: Aumento de la población de <i>M. incognita</i> ....                                                                        | 36 |
| Tabla 6: Diámetro agalladuras ocasionadas por <i>M. incognita</i> ....                                                              | 37 |
| Tabla 7: Clasificación de los genotipos mediante el índice de nudosidad. ....                                                       | 38 |
| Tabla 8: Clasificación de las especies mediante el índice de severidad.....                                                         | 38 |
| Tabla 9: Medias de la altura del tallo registradas de las diferentes especies evaluadas en el transcurso de la investigación. ....  | 41 |
| Tabla 10: Medias del diámetro del tallo registradas de las diferentes especies evaluadas en el transcurso de la investigación. .... | 42 |
| Tabla 11: Biomasa acumulada de las tres especies. ....                                                                              | 44 |
| Tabla 12: Concentraciones de ADN del material vegetal evaluado.....                                                                 | 60 |



## ÍNDICE DE FOTOS

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Foto 1: Raíces de <i>S. hirtum</i> (A) testigo y (B) inoculada .....                                                                              | 39 |
| Foto 2: Raíces de <i>S. quitoense</i> (A) testigo y (B) inoculada.....                                                                            | 39 |
| Foto 3: Raíces de <i>Solanum</i> sp. (A) testigo y (B) inoculada. ....                                                                            | 39 |
| Foto 4: Plantas de <i>S. hirtum</i> a los 80 días. (A) Testigo y (B) inoculada .....                                                              | 43 |
| Foto 5: Plantas de <i>S. quitoense</i> a los 80 días- (A) Testigo y (B) inoculada .....                                                           | 43 |
| Foto 6: Plantas de <i>Solanum</i> sp. a los 80 días. (A) Testigo y (B) inoculada .....                                                            | 43 |
| Foto 7: Amplificación de bandas con el RGAs CLRR. Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio. ....                | 45 |
| Foto 8: Amplificación de bandas con el microsatélite HpmsE 143. Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio. ....  | 46 |
| Foto 9: Amplificación de bandas con el RGAs CLRR, Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio. ....                | 46 |
| Foto 10: Amplificación de bandas con el microsatélite HpmsE 143. Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio. .... | 47 |
| Foto 11: (A) Raíces De <i>S. quitoense</i> fuente de inóculo y (B) licuado de raíces para obtener el inóculo.....                                 | 63 |
| Foto 12: <i>Meloidogyne incognita</i> (A) huevo y (B) nematodo .....                                                                              | 63 |
| Foto 13: (A)Inoculación de <i>M. incognita</i> y (B) Evaluación de Marcadores moleculares. ....                                                   | 63 |
| Foto 14: Evolución de las especies durante los 80 días de evaluación. ....                                                                        | 64 |
| Foto 15: Medición del diámetro de nódulos.....                                                                                                    | 64 |



## ÍNDICE DE ANEXOS.

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1. Protocolo de extracción de nematodo método de Cobb (1918)..... | 60 |
| Anexo 2. Cuantificaciones de ADN.....                                   | 60 |
| Anexo 3. Mastermix y programas de amplificación de los SSR y RGAs.....  | 61 |
| Anexo 4. Protocolo de Fulton et. al 1995, para extracción de ADN.....   | 62 |
| Anexo 5. Fotografías .....                                              | 63 |



## ÍNDICE DE GRAFICOS.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1: Ciclo biológico de <i>M. incognita</i> . Fuente: Abad et al (2008) .....                                                                                                                                                                                                                | 24 |
| Gráfico 2: Escala de severidad de daño radical causado por <i>Meloidogyne</i> spp. De 0-10 %, inmune o resistente; 11-25 %, moderadamente resistente; 26-50 %, moderadamente susceptible; 51-75 %, susceptible; 76-100 %, altamente susceptible. Fuente: González & Betancourth-García (2017)..... | 32 |



## **ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA**

ONUAA: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura o FAO: Food and Agriculture Organization.

AGROCALIDAD: Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro.

PAP: Plaguicidas Altamente Peligrosos.

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones.

PTI: Inmunidad desencadena por PAMPs.

ETI: Inmunidad activada por efectores.

NB-LRR o NBS-LRR: Repetición de nucleótidos ricos en leucina.

SAM: Selección asistida por marcadores.

SAR: Sistema de resistencia adquirida.

SIR: Sistema de resistencia inducida.

PCR: Reacción en la cadena de la polimerasa.

SSR: Secuencias simples repetidas.

RGAs: Genes de Resistencia Análogos

## Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

---

Yo, Luis Daniel Pacheco Atariguana, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **Determinación de la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp.**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 06 de septiembre del 2019



Luis Daniel Pacheco Atariguana

C.I: 0105965982

### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Luis Daniel Pacheco Atariguana, autor del trabajo de titulación **Determinación de la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp."**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 06 de septiembre del 2019



Luis Daniel Pacheco Atariguana

C.I: 0105965982



## AGRADECIMIENTOS

Dejo constancia de agradecimiento a mi tutor el Ing. Patricio Castro P hD. por haber brindado su apoyo dedicación y dirección en la realización de esta tesis, más que todo por sus consejos y amistad; También, quiero agradecer a los Ing. Eduardo Chica, Ing. Walter Larriva, Ing. Luis Minchala e Ing. Lourdes Díaz por formar parte en el desarrollo de este trabajo y demás docentes que tuve la oportunidad de conocer en el transcurso de esta carrera, a E.R. por su apoyo moral incondicional, por último, a la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC).

Luis Pacheco A.



## DEDICATORIA

A mis padres Zoila y Alberto, y hermanos por estar siempre a mi lado apoyándome incondicionalmente a la realización de este gran sueño y a todas las personas que estuvieron junto a mí brindándome su apoyo para alcanzar la meta propuesta.

Luis Pacheco A.



## 1. INTRODUCCIÓN

La naranjilla tiene como centro de origen las estribaciones de la cordillera oriental de los Andes de Colombia, Perú y Ecuador. Esta fruta es utilizada sobre todo en la preparación de bebidas, helados mermelada, etc., y tiene cada vez una mayor demanda en los mercados internacionales. En el Ecuador se siembran las variedades híbrido Puyo (60%), híbrido Palora (35%) y la variedad común (5%). En el 2010 se tuvo una producción de 20 005 t, siendo la mayor zona de producción la provincia de Napo con 7 008 t con una superficie de 3 643 ha, el 79% de producción nacional está en la región Amazónica (Guayasamín, 2015).

Este cultivo es sensible a plagas y enfermedades que afectan drásticamente en su producción y que causan la reducción de la producción hasta en un 100%. Los principales patógenos que atacan a la naranjilla son: el nematodo agallador de la raíz (*Meloydogyne incognita*) y la pudrición radicular causada por fusarium (*Fusarium oxysporum f. sp. quitoense*) (Quitiaquez & Ximena, 2012; Revelo & Sandoval, 2003).

Los nematodos se encuentran entre los organismos altamente dañinos de la raíz que más pérdidas causan en los cultivos a nivel mundial, entre ellos las solanáceas como por ejemplo el tomate riñón, el pimiento, etc. Los productores de naranjilla dedicados a esta actividad utilizan productos tóxicos de gran residualidad, que con el tiempo causan problemas a la salud, tanto, de consumidores como de agricultores, además de contaminar el suelo, agua, y el medio ambiente; históricamente se han utilizado productos como: organofosforados (ETOPROP), carbamatos (FURADAN) y agroquímicos de alta residualidad (Bromuro de metilo), recomendados para el control de nematodos de los nódulos de las raíces. Según la agencia AGROCALIDAD y ONUAA el uso de estos PAP está prohibido o en vigilancia actualmente en numerosos países (Y. Arias et al., 2009; Bermeo Guamán, 2015; Lezaun, 2019; Navarrete, Ron, Viteri, & Viera, 2018; Quitiaquez & Ximena, 2012).



Una forma de mitigar el excesivo uso de plaguicidas, en especial los de acción nematicida, son sistemas de control de plagas y enfermedades que incluyen cada vez más el uso de estrategias integrales y prácticas de control cultural, biológico, mecánico, fitomejoramiento, etc. Se ha evidenciado que la lucha genética constituye uno de los ejes principales de estos nuevos enfoques, los cuales hoy en día constituyen una necesidad primordial tanto en el campo económico como ambiental y social, incrementando la productividad y al mismo tiempo reduciendo los riesgos para la salud humana y el ambiente (Montes Rojas, Muñoz, Terán G, Prado C, & Quiñónez, 2010; Navarrete, Ron, Viteri y Viera , 2018; Quitiaquez & Ximena, 2012).

La búsqueda de fuentes de resistencia a partir de especies silvestres (*S. hirtum*, *S. hyporhodium*, *S. vestissimun*, y *S. felinum*.) emparentadas al cultivo (*S. quitoense*), son la base fundamental para la introgresión de genes de resistencia, mediante los retrocruzamientos recurrentes obteniendo como resultado especies más vigorosa y de alta producción, reduciendo así el nivel de contaminación ambiental y por ende el uso de agroquímicos (González & Betancourth-García, 2017; Navarrete et al., 2018; Pineda & Gloria, 2004; Vásquez C. et al., 2011).

El mejoramiento genético en Ecuador para el desarrollo de nuevas variedades de naranjilla se sustenta en un esquema convencional. El INIAP a través del programa de mejora de Fruticultura ha generado y evaluado segregantes procedentes del cruce de *S. quitoense* con *S. hyporhodium* y *S. vestissimun* (Vásquez C. et al., 2011), en el cual la selección se fundamenta en el comportamiento agronómico. Sin embargo, conlleva mucho tiempo, Por esta razón es necesario buscar individuos afines con características de resistencia al nematodo e indagar técnicas moleculares que nos permitan acelerar un programa de fitomejoramiento en lo que respecta a la resistencia.



## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo general

Determinar la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum* sp.

### Objetivos específicos

- Determinar el nivel de daño en la raíz que produce *M. incognita* en especies *S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum* sp.
- Evaluar marcadores moleculares Microsatélites (SSR) y Genes de Resistencia Análogos, asociados a genes de resistencia en una población segregante de la cruce *S. quitoense*, x *S. hirtum*.

### HIPÓTESIS

- Ho: Ninguna de las especies evaluadas presentan resistencia al nematodo agallador *Meloidogyne incognita*.
- Ha: Al menos unas de las especies evaluadas presentan resistencia al nematodo agallador *Meloidogyne incognita*.



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Sección *Lasiocarpa* (*Solanum*, Clado: *Leptostemonum*)

Constituidas por más de 13 especies repartidas por el noroeste suramericano, pertenecientes a la familia Solanaceae de estas ocho se encuentran en Colombia, son muy pocas variabilidades morfológicas, fisiológicas y organolépticas. Estas especies producen frutos de las cuales *S. quitoense* y *S. sessiliflorum* (especies en proceso de domesticación) son producidas de manera comercial principalmente en los países de Colombia y Ecuador (Bedoya-Reina & Barrero, 2009; Bermeo Guamán, 2015; Bohs, 2004).

Se diferencian de otros miembros de solanáceas por sus características morfológicas: hojas grandes e irregulares revestidas de tricomas estrellados, inflorescencia no ramificada se prestan en los entre nudos, flores esteliiformes con anteras alargadas de dehiscencia poricida, frutos son bayas comestibles y presencia de espinas (Bedoya-Reina & Barrero, 2009; Bermeo Guamán, 2015; Orozco, Beltrán, Porras, & Nee, 2008).

En esta sección se encuentran las siguientes especies: *S. candidum* Lindl., *S. felinum* Whalen., *S. hirtum* Vahl., *S. hyporhodium* A. Br. Bouche., *S. Indicum*, *S. ferox*, *S. pectinatum* Dun., *S. pseudolulo* Heiser., *S. quitoense* Lam., *S. repandum*, *S. sessiliflorum* Dun., *S. stramonifolium* Jacq., *S. vestissimum* Dun. (Bermeo Guamán, 2015)

Muchos de estos miembros presentan resistencia a nematodos u otro patógeno, en los diversos estudios que se han realizado para resolver esta problemática ya sea para utilizarlas en campo directamente o como portainjertos (Crozzoli, Aguirre, & Angel, 2012; Quitiaquez & Ximena, 2012; Vásquez C. et al., 2011).



### 3.1.1. Especie *Solanum quitoense* Lam. (Naranjilla)

#### 3.1.1.1. Generalidades: Origen, ubicación e importancia del cultivo.

La naranjilla es un frutal andino de importancia desde hace más de 80 años llamado también fruto dorado de los Andes. Su centro de origen y diversidad genética se encuentra en Colombia, Perú y Ecuador (M. L. Arias, Cano, Paz, & Giraldo, 2007; Riascos, Santacruz, B, & C, 2012). En el Ecuador es de gran importancia económicas. Debido su alta demanda en los mercados nacionales y extranjeros, sus características organolépticas y su valor nutritivo, la hacen una fruta exótica de gran aceptación por parte de consumidores (Guayasamín, 2015; Santamaria, Mulrooney, & Kitto, 2004).

Las variedades producidas en Ecuador son: híbrido Puyo (60%) que tiene un problema de tamaño del fruto para esto los productores utilizan el herbicida hormonal 2,4 D que ayuda en el aumento de calibre del fruto; el híbrido Palora (35%), las variedades comunes: “Espinosa, Agria y Baeza Dulce” (5%), en las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago, y en la región andina de: Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo. En el III Censo Agropecuario del Ecuador del año 2000, la superficie cultivada de naranjilla fue de 7 983 ha cuya producción es de 14 894 Tm, sumando a estas 1 476 ha sembradas en asocio, en el 2010 se tuvo una producción de 20 005 t, siendo Napo la provincia de mayor producción con 7 008 t, seguido por Morona Santiago con 3 210 t. (Guayasamín, 2015; Quitiaquez & Ximena, 2012; Solagro, 2006; Vásquez C. et al., 2011; Zurita & Liliana, 2015)

La naranjilla es de gran demanda en los países de a Estados Unidos, Alemania y Colombia. Este último importa entre el 20% y 21.7% del total de su consumo de Ecuador con lo que se puede colegir que es una fruta con importancia económica (C, A, & B, 2009; Gómez-Merino, Trejo-Téllez, García-Albarado, & Cadeña-Íñiguez, 2014; Zurita & Liliana, 2015).



### 3.1.1.2. Plagas y Enfermedades.

Las plagas y enfermedades que afectan a este frutal son: la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), tizón tardío (*Phytophthora* sp), y marchitez bacterial (*Pseudomona solanacearum*). Las principales plagas son: nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne incognita*), gusano del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*) y el perforador del cuello (*Faustinus apicalis*). Todas las mencionadas ocasionan una pérdida de 405ha de cultivo, además causan incrementos en los costos de producción, disminución en el rendimiento y baja calidad del fruto. Subyacente a este factor se incrementa la siembra en áreas de ecosistemas no intervenidos donde se cree popularmente que está libre de estas plagas (Revelo & Sandoval, 2003; Santamaria et al., 2004; Zurita & Liliana, 2015).

### 3.1.2. Especie *Solanum hirtum* Vahl (Espinuda)

Genotipo silvestre que presenta una formación arbustiva de aproximadamente 2m de alto. Está considerada como maleza. Se encuentra dispersa desde México, Colombia hasta Venezuela. Presenta características genéticas de resistencia a nematodos, mismas que pueden ser incorporadas en procesos de fitomejoramiento para conseguir vigor y amplitud ecológica, debido a que se puede cruzar fácilmente con *S. quitoense* cuando se usa como el progenitor materno (Bermeo Guamán, 2015).

## 3.2. *Meloidogyne incognita* (Nematodo del nudo de la raíz)

### 3.2.1. Generalidades: distribución e importancia

*M. incognita* se encuentra en las regiones ecuatoriales de Costa, Sierra, y Oriente, desde el nivel del mar hasta los 2800 m s.n.m. Es una plaga muy importante que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas. (Bermeo Guamán, 2015; Guzmán-Piedrahita, Zastaño-Zapata, &



Villegas-Estrada, 2011; Navarrete et al., 2018; Solano-González, Esquivel-Hernández, Molina-Bravo, & Morera-Brenes, 2015).

### 3.2.2. Daños a nivel celular

Es un endoparásito sedentario su infección provoca pseudo-órganos llamados agallas. Cada J2 o juvenil infestivo es atraído a las zonas de elongación de la raíz donde penetra y migran hacia el meristemo apical, allí induce la desdiferenciación (hipertrofia e hiperplasia) de cinco a siete células, estas células infectadas del procambium son estimuladas a producir múltiples ciclos de mitosis sin citoquinesis, el resultado son células multinucleadas (gigantes), de aproximadamente 400 veces el tamaño normal de una célula vascular. Este sitio, formado por un crecimiento isotrópico, es el sitio de suministro de nutrientes al nematodo. Además, pueden dañar la resistencia genética a otros patógenos (Abad et al., 2008; Y. Arias et al., 2009; Chaves, Marcillo, González, & Garcia, 2011; Manzano, 2017; Navarrete et al., 2018). Poseen mecanismos para poner a trabajar a su beneficio el metabolismo de la planta hospedera, sumándole a esto mecanismos que secretan enzimas que degradan las paredes celulares (Y. Arias et al., 2009; Manzano, 2017).

### 3.2.3. Síntomas

A causa de las agallas producidas en las raíces, se produce una deficiencia nutricional e hídrica, en la parte aérea se produce amarillamiento, atrofia, marchitez, disminución del crecimiento, y dependiendo de la fase fenológica en la que se encuentre el cultivo, también afecta la reducción del calibre de los frutos. A medida que avanza el aumento de la población, la infestación se vuelve más crítica, el sistema radical se deteriora causando la muerte de la planta. Otro de los problemas es que las lesiones causadas en las raíces son vectores de entrada de patógenos como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*; enfermedad de significativa importancia en naranjilla (Mosquera-Espinosa, 2016; Perichi, Aguirre, & Vegas, 2019).

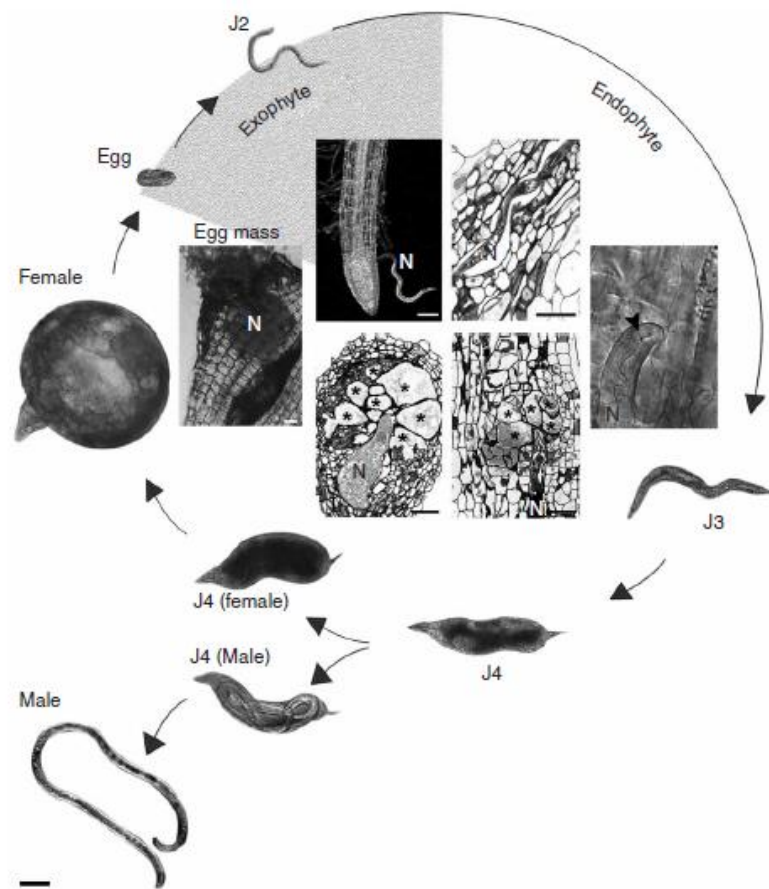


#### 3.2.4. Ciclo de vida de *M. incognita*.

Dependiendo de las condiciones ambientales, el ciclo de vida puede durar entre 30 y 50 días, pero el macho tiene una vida más corta. Comprende un estado de huevo, cuatro estados juveniles y un estado adulto, tras producirse cuatro mudas. En el estado adulto se produce un marcado dimorfismo sexual (Y. Arias et al., 2009; Armendáriz González, Quiña Cepeda, Ríos Salgado, & Landázuri Abarca, 2015; Lezaun, 2019).

Para la formación de una hembra, el juvenil J2 se alimenta y empieza a engordar rápidamente, dejando de nutrirse en los estados larvarios 3 y 4, desprendiéndose de las cutículas en la muda final. A la vez que se forman el útero y la vagina, produce huevos que se liberan en la superficie de la raíz. En todo su ciclo de vida puede producir hasta unos 2000 huevos (Abad et al., 2008; Armendáriz González et al., 2015; Lezaun, 2019).

En cambio, la formación de un macho, se da en el tercer y cuarto estado, El nematodo engorda, pero el estilete ya no es muy visible, se ha degenerado el bulbo medio y la gónada se ha alargado. Posteriormente, ocurre una metamorfosis donde el cuerpo se alarga dentro la una cutícula larval. Ocasionalmente, los machos se desarrollan y migran fuera de las raíces y dejan de alimentarse. Se cree que no juegan ningún papel en la reproducción (Abad et al., 2008; Armendáriz González et al., 2015; Lezaun, 2019).



**Gráfico 1:** Ciclo biológico de *M. incognita*. Fuente: Abad et al (2008)

### 3.3. Resistencia genética de las plantas a patógenos

Los microorganismos en general siempre están interactuando con las plantas, algunos de ellos actuando a favor de las mismas, mientras que otros lo hacen de manera patogénica. Este último tiene gran repercusión económica en la agricultura debido a que los cultivos son genéticamente uniformes y pueden ser atacados por un patógeno virulento. También el medio ambiente se ve afectado ya que los métodos de control son demasiado agresivos y tóxicos. Además, estudios demuestran que algunas especies de plantas pueden enfrentar a estos patógenos debido a que han desarrollado mecanismos de defensa genética activos o pasivos como respuesta a la interacción de un organismo altamente patógeno (Madriz Ordeñana, 2002; Ojito-Ramos & Portal, 2010; Pineda & Gloria, 2004).



### 3.3.1. Mecanismo de defensa y activación del sistema inmune de las plantas

Los mecanismos de defensa utilizados pueden ser: preexistentes, constitutivos o pasivos (fitoanticipinas) como presencia de tricomas, cera, exudados, etc., e inducibles o activos (fitoalexinas) las cuales se alertan luego de un intento de invasión. Para que esto suceda y se activen las defensas debe haber receptores apropiados en la membrana plasmática y señales sistémicas que inician en el lugar de infección patógeno (Madriz Ordeñana, 2002; Ojito-Ramos & Portal, 2010; Pineda & Gloria, 2004; Zárate Baca, 2008).

La resistencia inducida se da por una serie de eventos que involucra la activación de genes de defensa, pueden ser de dos clases: la inmunidad adaptativa o SAR (Sistema de resistencia adquirida) cuando interviene un mecanismo antiviral, y la inmunidad innata o SIR (Sistema de resistencia inducida) consistiendo en la activación de señales que provocan los patógenos mediante las cuales las plantas detectan la presencia de un individuo malicioso, y es llamado patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) situados en la superficie de las células, dando como resultados la activación de la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI), y la segunda es la inmunidad activada por efectores (ETI), existen patógenos que logran inhibir o suprimir las defensas primarias (PTI), no obstante, en el transcurso del tiempo las plantas han evolucionado mecanismos especializados controlados por los genes de resistencia, los cuales dan un reconocimiento genético del patógeno (modelo gen por gen) y son detectados por las proteínas NBS-LRR y desencadena respuestas de hipersensibilidad (HR) o la muerte localizada patógeno (Madriz Ordeñana, 2002; Ojito-Ramos & Portal, 2010; Pineda & Gloria, 2004; Riveros Angarita, 2001).



### 3.4. Marcadores moleculares en resistencia

Los marcadores moleculares pueden ser definidos como cualquier expresión fenotípica (cuantificable u observable) controlada por un gen de fácil detección. Puede considerarse un marcador; cualquier tipo de molécula ya sea de origen orgánico u inorgánico característico de un organismo (Azofeifa-Delgado, 2006). La SAM permite evaluar individuos desde sus primeros estadios de desarrollo, utilizando todo el individuo o solo una parte de él. Es una estrategia valiosa que permite acortar los programas de fitomejoramiento. Para cumplir tal objetivo se pueden utilizar una gran diversidad de marcadores basado o no en PCR (Contreras, 2009).

#### 3.4.1. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR) en la resistencia.

Los microsatélites (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats), secuencias pequeñas de dos a 10 pares de bases, distribuidas aleatoriamente por todo el genoma y de gran variabilidad, se encuentra en ADN de eucariotas y algunas procariotas las cuales pueden o no estar ligadas a genes, pero muy útiles para identificar o medir el polimorfismo que puede existir entre especies o variedades relacionadas. A su vez, permite estudiar el ligamiento genético (Azofeifa-Delgado, 2006). Los microsatélites pueden servir para detectar alelos de interés ya sea de características cualitativas o cuantitativas, asociadas a mejoramientos agronómicos, como resistencia a plagas o enfermedades (Amayo & Orlando, 2002).

Se ha podido asociar SSR con resistencia en los siguientes casos: con una secuencia de tetra nucleótido a un gen de la nitrato reductasa (NR), que confiere resistencia al tizón bacteriano común (CBB) incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) en frejol (Yu, Park, Zhang, Haffner, & Poysa, 2004) y los microsatélites CIR 316-201, BNL3545-118 y BNL3661-185 en la resistencia al nematodo *M. incognita* en algodón (Gutiérrez et al., 2010).



### 3.4.2. Genes de Resistencia Análogos (RGAs)

Los RGAs son marcadores moleculares que se definen sobre dominios conservados y motivos que desempeñan papeles específicos en la resistencia de los patógenos como LRR (Repeticiones Ricas en Leucina), NBS (Sitio de Unión a Nucleótidos), Receptores de quinasas o Dominios cinasa serina/treonina. Los RGAs se pueden localizar utilizando herramientas bioinformáticas fundamentándose en sus características estructurales conservadas, ofreciendo oportunidades de aislar secuencias homologas en otras especies de vegetales (Deng et al., 2000; Sekhwal et al., 2015). Con el uso de este tipo de marcadores se ha podido aislar muchos genes de resistencia partiendo de secuencias homólogas, como la resistencia al nematodo (Gro1) y al tizón tardío (R7). Varios RGAs en resistencia en soya, genes de resistencia a potivirus (Rsva y Rpv), pudrición de la raíz (Rps1, Rps2, Rps3) ocasionada por *Phytophthora*, mildiu polvoriento (rmd) en soya, resistencia a la roya en trigo (Lrk10). Además se han utilizado RGAs en estudios de co-segregación de locis de resistencia (Sánchez-Pérez, 2007).



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

**Tabla 1:** Materiales usados.

| <b>Biológico</b>                                                                                                                                                        |  | <b>Físicos</b>                                                                                                                                                                         |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Cepa de <i>M. incognita</i>                                                                                                                                             |  | Cajas Petri, vasos de precipitación, cámara de Neubauer, Erlenmeyer, tubos de ensayo, puntas para micro pipeta, pissetas, tamices, bisturí, mechero de Bunsen, pinzas, gradillas, etc. |                  |
| Plántulas <i>S. quitoense</i> , <i>S. hirtum</i> y <i>Solanum</i> sp.                                                                                                   |  |                                                                                                                                                                                        |                  |
| ADN de segregantes de la cruce <i>S. quitoense</i> x <i>S. hirtum</i>                                                                                                   |  | Sustrato estéril, vaso plásticos de 16 oz, libreta de campo, rótulos de identificación.                                                                                                |                  |
| <b>Equipos</b>                                                                                                                                                          |  | <b>Reactivos</b>                                                                                                                                                                       | <b>Programas</b> |
| Cámara de flujo, vórtex, balanza, estufa, incubadora, refrigeradora, centrifugadora, termociclador, cámara de electroforesis, transiluminador, autoclave, micropipetas. |  | Alcohol, agua destilada, Isopropanol, agarosa, Marcador molecular SSR y RGAs (primers) Tampón de extracción Tampón de lisis de núcleos, etc.                                           | Infostat         |

Fuente: Autor, 2019

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. El área de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de cultivo in vitro e invernaderos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Cuenca, campus Yanuncay. Se encuentra una altura aproximada de 2567 m s.n.m., en las coordenadas UTM - 2°55'12.564", -79°1'30.6122". Las condiciones ambientales del invernadero temperatura promedio 18.6°C y humedad relativas del 71.5%.



## **4.2.2. Manejo del experimento.**

### **4.2.2.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1 (Invernadero).**

#### **4.2.2.1.1. Obtención de material vegetal.**

El material vegetal para la evaluación de la resistencia se colectó en las zonas frutícolas de naranjilla en la provincia de Morona Santiago.

#### **4.2.2.1.2. Composición del sustrato y esterilización.**

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de un suelo franco, tierra negra de cerro y bocashi, en las siguientes proporciones: 40:40:20. Fue completamente homogenizado y libre de grumos, facilitando así la esterilización. El sustrato fue esterilizado por el método de pasteurización con vapor caliente de agua a 100°C durante 120 minutos con el que se elimina la mayoría de microorganismos exceptuando alguna bacterias esporígenas (Aguilera, 2016).

#### **4.2.2.1.3. Obtención del patógeno.**

La obtención de *M. incognita* se realizó de raíces infectadas, estas fueron colectadas en zonas frutícolas de naranjilla en la provincia de Morona Santiago.

Para la obtención del inóculo se extrajo material de las raíces que presentaron síntomas de agalladura en plantas infectadas mediante la técnica del hipoclorito de sodio, donde las raíces infectadas se cortaron en trozos no mayores de 0.3 cm, luego se colocó en un vaso de licuadora (10gr de raíces aprox.) y se procedió a licuar con una solución de NaClO al 0.5% en un tiempo de 1 minuto. Esta suspensión se pasó a través de diversos tamices hasta el de 10 micras. Se lavó hasta eliminar el NaClO sobre los tamices, el material retenido en el último tamiz (10 micras) se colocó en un recipiente de 2000 ml, este proceso se repitió con todas las raíces infectadas.



Posteriormente se contó y calibró la solución (Bermeo Guamán, 2015; Crozzoli et al., 2012; Perichi et al., 2019).

#### **4.2.2.1.4. Propagación de la especie e inoculación de *M. incognita***

Para los ensayos de campo se utilizaron plantas propagadas por semillas obtenidas con anterioridad en bandejas de germinación. Este proceso se llevó a partir de turba estéril donde se depositó una semilla por alveolo. Las plántulas de dos meses de edad fueron sembradas en vasos de plástico de 1 kg de capacidad, con sustrato previamente esterilizado.

La inoculación se realizó directamente en las raíces de las plántulas a través de cuatro hoyos en las posiciones de los puntos cardinales, a 2 cm de profundidad (Perichi et al., 2019) y a 2 cm de distancia del tallo con la ayuda de una pipeta, el inóculo se calibró en una población de ( $P_i$  = población inicial )  $2000h+ J2$ /planta seccionada en dos, cada una fue  $1000 h+ J2$ /planta, realizadas con una diferencia de 15 días garantizando la infección.

#### **4.2.2.1.5. Variables a ser evaluadas para determinar la resistencia a *M. incognita*.**

Para comparar las variables se evaluaron plantas de las tres especies sin inoculación.

**Altura y diámetro del tallo:** Con la ayuda de una regla milimetrada, se tomó la altura medida desde el nivel del sustrato hasta donde culmina la yema apical; la medición del diámetro fue medido a la altura del cuello de la planta, con un calibrador, cada 15 días a partir de la primera inoculación, hasta los 80 días post-inoculación.

**Biomasa acumulada:** Para determinar la biomasa acumulada se tomó 5 plantas por especie, se separaron parte aérea y radical, se colocó las partes de plantas en una funda de papel, y en un horno de secado donde se las deshidrato a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se pesó el tejido de cada parte en una balanza analítica.



Para comparar las siguientes variables a *S. quitoense* se lo consideró como testigo susceptible.

**Aumento de la población de nematodos:** se calculó mediante la relación propuesta por Seinhorst (1970) (Bermeo Guamán, 2015).

$$I = \frac{P_f - P_i}{P_i}$$

Dónde:

I = Número de veces en que se incrementara la población

P<sub>f</sub> = Población final (raíces + suelo)

P<sub>i</sub> = Población inicial

Para el conteo de la población final de nematodos en las raíces se utilizó el mismo método propuesto para obtención del inoculo. En cuanto al conteo de nemátodos del suelo fue mediante el método de Cobb (1918) (Anexo1).

**Incidencia:** Se extrajo las raíces de todas las especies tratando de no ocasionar daño al sistema radical; evaluando el número de plantas afectadas por el nematodo a los 80 días después de la inoculación, con la siguiente fórmula (González & Betancourth-García 2017).

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Nº de plantas afectadas} * 100}{\text{total de plantas}}$$

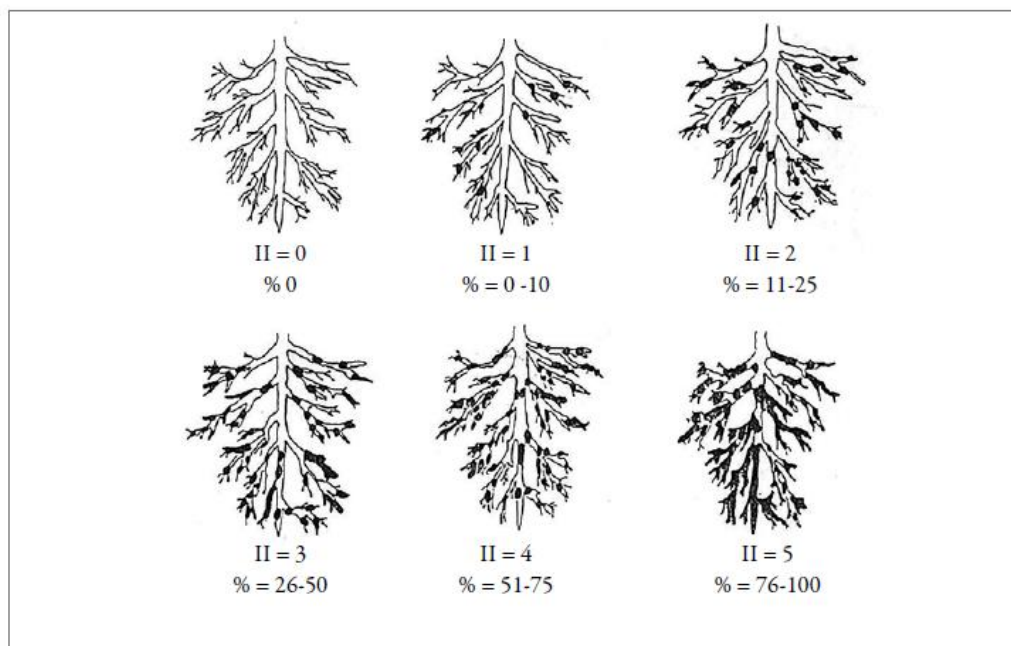
**Índice de nudosidad:** Se utilizó la escala de evaluación propuesta por Taylor y Sasser (1983) (Tabla 2), tomando en cuenta el número de agallas por raíz (Montes Rojas et al., 2010).

**Tabla 2:** Escala para evaluar el índice de agallas en el estudio de resistencia a *M. incognita*.

| Índice de nudosidad | Nº de nódulos/planta | Calificación                        |
|---------------------|----------------------|-------------------------------------|
| 0                   | 0                    | Plantas se clasifican como inmunes. |
| 1                   | 1-2                  | Planta se considera resistente.     |
| 2                   | 3-10                 | Planta medianamente resistente      |
| 3                   | 11- 30               | Planta moderadamente susceptible.   |
| 4                   | 31-100               | Planta susceptible                  |
| 5                   | >100                 | Planta altamente susceptible.       |

Fuente: Montes Rojas et al., 2010

**Severidad:** Los porcentajes de infección se utilizó la escala propuesta por Taylor y Sasser (1983) obtenido de González & Betancourth-García (2017). (Gráfico 2). Articulada a una escala (Tabla 3) (Chaves et al., 2011).



**Gráfico 2:** Escala de severidad de daño radical causado por *Meloidogyne* spp. De 0-10 %, inmune o resistente; 11-25 %, moderadamente resistente; 26-50 %, moderadamente susceptible; 51-75 %, susceptible; 76-100 %, altamente susceptible. Fuente: González & Betancourth-García (2017)

**Tabla 3:** Escala de resistencia basada en el porcentaje de severidad.

| Gradaos de afección | % de afección | Reacción del genotipo          |
|---------------------|---------------|--------------------------------|
| 0                   | 0             | Inmune (I)                     |
| 1                   | 1 – 10        | Resistente (R)                 |
| 2                   | 11 – 25       | Moderadamente resistente (MR)  |
| 3                   | 26 – 50       | Moderadamente susceptible (MS) |
| 4                   | 51 – 75       | Susceptible (S)                |
| 5                   | 76 – 100      | Altamente susceptible (AS)     |

Fuente: (Chaves et al., 2011)

#### 4.2.2.1.6. Diseño experimental y análisis estadísticos

Se utilizó un diseño al azar (DCA) con tres especies (*S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum* sp.) y cinco repeticiones, todas infectadas con *M. incognita*, más unidad testigo por cada especie. La unidad experimental fue conformada por tres plantas de cada especie contenidas en



un vaso plástico, la cantidad de sustrato colocado fue 1kg, dando como resultado 18 unidades experimentales, siendo por lo tanto un total de 54 plantas, las que conformaron el experimento.

Los datos correspondientes a las variables crecimiento y engrose del tallo, índice de nodulación, número de nematodos, biomasa acumulada e índice Rf, presentaron normalidad (test de Shapiro-wilks modificado) y homocedasticidad (test de Levene). Se sometieron a un ANOVA y una prueba de comparación rango de múltiple de Tukey 5%. La variable número de nematodos fue sometida a una transformación logarítmica ( $y = \log_{10}(x + 1)$ ), donde, X = valor de la variable. Es común utilizar este tipo de transformaciones cuando se trabaja con nematodos debido a la variación entre genotipos sensibles y resistentes (Caromel et al., 2005). Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico Infostat.

#### **4.2.2.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2 (Laboratorio).**

##### **4.2.2.2.1. Material vegetal.**

Para este objetivo se evaluó las especies *S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum* sp., más el material genético de una población segregante de *S. quitoense* x *S. hirtum*. La población segregante fue proporcionado por el Dr. Rafael Morales, de trabajos previos realizados en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

##### **4.2.2.2.2. Extracción del ADN.**

Para los análisis moleculares se procedió a la extracción de ADN a partir de hojas frescas de las plantas de las especies evaluadas (fase invernadero) y de las líneas en segregación proporcionadas provenientes de la cruce *S. quitoense* x *S. hirtum*. Las extracciones de ADN se realizaron de aproximadamente 100 mg de las hojas apicales de todas las especies, de acuerdo a la metodología de Fulton et al (1995). El ADN extraído se guardó -20°C.



#### **4.2.2.2.3. Cuantificación de ADN.**

Las concentraciones de ADN se cuantificaron en un espectrofotómetro (EPOCH) y se diluyeron a una concentración final de 50 ng/μl para la amplificación por PCR y se utilizó 1 a 2 μl de este ADN stock.

#### **4.2.2.2.4. Caracterización molecular.**

A partir del ADN genómico extraídos de hojas de las especies y segregantes de la crusa *S. quitoense* x *S. hirtum* se utilizó marcadores moleculares basados en PCR de tipo SSR y RGAs (Tabla 4) para determinar la presencia de marcadores moleculares asociados a la resistencia.

#### **4.2.2.2.5. Amplificación por PCR.**

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler NexusGSX1, en un volumen final de 25 μl de solución final que contenía ADN genómico, dNTPs, cebadores F y R, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa (Invitrogen) y agua ultra estéril (las concentraciones para los primers utilizados se especifican en el anexo 1. Los productos de la amplificación se separaron en geles de agarosa al 1% a 100 V durante 45 minutos. Un marcador molecular de 1kp de peso (Invitrogen) se utilizó como estándar molecular.

**Tabla 4:** Nombre de marcadores SSR y RGAs evaluados.

| RGAs     |   |                                  | Bases de<br>diseño/gen       | Referencia                                                                     |
|----------|---|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|          |   | Secuencias (5'→3') *             |                              |                                                                                |
| RLRR     | F | CGCAACCACTAGAGTAAC               | LRR / <i>RPS2</i>            | (Zhang, Khan,<br>Niño-Liu, &<br>Foolad, 2002)                                  |
|          | R | ACACTGGTCCATGAGGTT               |                              |                                                                                |
| CLRR     | F | TTTTTCGTGTTCAACGACG              | LLR / <i>Cf-9</i>            |                                                                                |
|          | R | TAACGTCTATCGACTTCT               |                              |                                                                                |
| ANo. 2   | F | TATAGCGGCCGCIARIGGIARNCC         |                              |                                                                                |
| ANo. 3   | R | ATATGCGGCCGCGGIGGIGTIGGIAARACNAC |                              |                                                                                |
| NBS      | F | GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC          | NBS / <i>N</i> y <i>RPS2</i> |                                                                                |
|          | R | YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC          |                              |                                                                                |
| S1       | F | GGTGGGGTTGGGAAGACAACG            |                              |                                                                                |
| AS1      | R | CAACGCTAGTGGCAATCC               |                              |                                                                                |
| Ptokin1  | F | GCATTGGAACAAGGTGAA               | Kinasa / <i>Pto</i>          |                                                                                |
| Ptokin2  | F | AGGGGGACCACCACGTAG               |                              |                                                                                |
| Ptokin3  | F | TAGTTCGGACGTTTACAT               | Kinasa / <i>Pto</i>          |                                                                                |
| Ptokin4  | R | AGTGTCTTGTAGGGTATC               |                              |                                                                                |
| SSR      |   |                                  | Secuencias (5'→3') *         | Referencia                                                                     |
| HpmsE032 | F | ATGCGCAAAGGGAGAAAATTCA           |                              | (Suwor,<br>Thummabenjapone,<br>Sanitchon, Kumar,<br>& Techawongstien,<br>2015) |
|          | R | CGAACTAACCGTTCATGGTGGA           |                              |                                                                                |
| HpmsE143 | F | CCATTCAGCTAGGGTTCAGTCCA          |                              | (Voorrips, Finkers,<br>Sanjaya, &<br>Groenwold, 2004)                          |
|          | R | CGACCAAATCGAATCTTCGTGA           |                              |                                                                                |
| CA-MS6   | F | CAGAGCACTTGACATGCCTT             |                              | (Combes et al.,<br>2000)                                                       |
|          | R | GATCTTTATAGTAGCTCATCAATA         |                              |                                                                                |
| Sat 207  | F | GAAGCCGTTTCAAGCC                 |                              |                                                                                |
|          | R | CAATCTC TTTCCGATGCTCT            |                              |                                                                                |

Fuente: Autor, 2019



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis fenotípico de resistencia en invernadero para *Solanum quitoense*,

#### *Solanum hirtum* y *Solanum* sp.

#### 5.1.1. Incremento de la población de *M. incognita*

El incremento de la población se calculó con datos provenientes de 10 plantas por cada especie *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp., a los 80 días de la siembra. La prueba de Shapiro-Wilk para las variables población final del suelo (Pf suelo), población final de la raíz (Pf raíz), población final (Pf total) y Rf (incremento o índice de reproducción), demostró que las tres especies presentaron una distribución normal ( $p > 0.05$ ). La prueba de Levene, mostró que hay homogeneidad de varianzas ( $F_{(2,27)} = 0.36$ ,  $p > 0.05$ ), y un coeficiente de variación de 10.99%.

Los resultados del análisis ANOVA de las variables Pf suelo, Pf raíz, Pf total y Rf se muestran en la Tabla 5. Se puede evidenciar que existe diferencias significativas entre especies ( $F_{(2,27)} = 98.82$ ,  $p < 0.0001$ ). La prueba de Tukey da como resultado dos rangos: **a** para *S. hirtum* y sp. y **b** para *S. quitoense*. La población final de nemátodos (suelo y raíz) en *S. quitoense* fue de 3125.9 nematodos promedio, siendo el incremento 1.56 veces lo que equivale a un 56% mayor en relación con la población inicial. En *S. hirtum* y *Solanum* sp. la población decreció un 15% y 6% respecto a la población inicial inoculada.

**Tabla 5:** Aumento de la población de *M. incognita*

| Especie             | Pf suelo<br>(media $\pm$ DE) | Pf raíz<br>(media $\pm$ DE) | Pf total<br>(media $\pm$ DE) | Rf     |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------|
| <i>S. quitoense</i> | 1250.36 $\pm$ 90.05 a        | 1875.54 $\pm$ 135.08 a      | 3125.9 $\pm$ 225.13 b        | 1.56 b |
| <i>S. hirtum</i>    | 680.92 $\pm$ 101.15 b        | 1021.38 $\pm$ 151.72 b      | 1702.3 $\pm$ 252.87 a        | 0.85 a |
| <i>Solanum</i> sp.  | 755.4 $\pm$ 103.64 b         | 1133.1 $\pm$ 155.46 b       | 1888.5 $\pm$ 259.09 a        | 0.94 a |

Pf = población final, Rf= Tasa o índice de reproducción ( $Rf = Pf/Pi$ ), medias con la misma letra no difieren según el contraste de medias Tukey 5%.



### 5.1.2. Variable diámetro de nódulos

La variable diámetro de nódulos presentó una distribución normal ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas, ( $F_{(2,42)} = (3.03)$ ,  $p > 0.05$ ). La prueba de ANOVA indica que existe diferencias significativas entre especies ( $F_{(2,42)} = 48.32$ ,  $p < 0.0001$ ). La prueba de Tukey dio tres rangos (a, b y c), siendo *S. hirtum* la especie con menor diámetro de agallas, seguido por *Solanum sp.* y *S. quitoense* quien presento el mayor diámetro de nódulos.

**Tabla 6:** Diámetro agalladuras ocasionadas por *M. incognita*

| Especie             | D. nód<br>(media $\pm$ DE) |
|---------------------|----------------------------|
| <i>S. quitoense</i> | 3.01 $\pm$ 0.24 c          |
| <i>S. hirtum</i>    | 1.83 $\pm$ 0.42 a          |
| <i>Solanum sp.</i>  | 2.24 $\pm$ 0.32 b          |

D. nód= diámetro de nódulos, medias con la misma letra no presentan diferencia estadística significativas  $P \leq 0.05$

### 5.1.3. Incidencia e índice de nudosidad del nematodo *M. incognita*

La incidencia fue determinada por la presencia de infección de *M. incognita* en el sistema radical, todas las plántulas presentaron agalladuras lo que representa el 100% de incidencia.

La variable índice de nudosidad se calculó en base al número de nódulos de la raíz a los 80 días. Los datos fueron transformados a logaritmo de base 10 ( $y = \log_{10}(x + 1)$ ) para obtener normalidad ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas,  $F_{(2,42)} = 0.36$ ,  $p > 0.05$ .

Mediante el análisis ANOVA se determinó diferencias significativas entre especies ( $F_{(2,42)} = 135.08$ ,  $p < 0.0001$ ), y la prueba de Tukey dio dos rangos a y b (Tabla 7). *S. quitoense* presentó el mayor índice de nudosidad.

**Tabla 7:** Clasificación de los genotipos mediante el índice de nudosidad.

| <b>Especie</b>      | <b>Nº nód<br/>(media ± DE)</b> | <b>Índice de<br/>nudosidad</b> | <b>Reacción</b>       |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| <i>S. quitoense</i> | 167.87 ± 34.68 b               | 5                              | Altamente susceptible |
| <i>S. hirtum</i>    | 34.73 ± 18.09 a                | 4                              | susceptible           |
| <i>Solanum sp.</i>  | 33.73 ± 13.89 a                | 4                              | susceptible           |

Nº nód= número de nódulos, los valores de número de nódulos fueron sometidos a una transformación mediante la fórmula  $y = \log_{10}(x + 1)$ , medias con la misma letra no presentan diferencia estadística significativas  $P \leq 0.05$

#### 5.1.4. Severidad del nematodo *M. incognita*

Los resultados de severidad a los 80 días después de la inoculación indicaron una variación en los grados de afección de los genotipos mostrando a las especies susceptible (*S. quitoense*) con el grado de afección más alto de 4 lo que equivale a un porcentaje de severidad del 51 al 75 % presentando una reacción de susceptibilidad. *S. hirtum* y *Solanum sp.* mostraron un grado de afección de 2 lo que equivale al entre el 11 al 25% de severidad, que se cataloga como moderadamente resistente.

**Tabla 8:** Clasificación de las especies mediante el índice de severidad.

| <b>Especie</b>      | <b>Grados de<br/>afección</b> | <b>% de severidad</b> | <b>Reacción</b> |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------|
| <i>S. quitoense</i> | 4                             | 51 - 75%              | S               |
| <i>S. hirtum</i>    | 2                             | 11 - 25%              | MR              |
| <i>Solanum sp.</i>  | 2                             | 11 - 25%              | MR              |

S= susceptible, MR = moderadamente resistente.



**Foto 1:** Raíces de *S. hirtum* (A) testigo y (B) inoculada



**Foto 2:** Raíces de *S. quitoense* (A) testigo y (B) inoculada



**Foto 3:** Raíces de *Solanum* sp. (A) testigo y (B) inoculada.



### 5.1.5. Altura de planta

A pesar de que todas las plantas tuvieron la misma edad al momento del trasplante e inoculación, estas presentaron variación de alturas iniciales, esto debido a que diferían en los tiempos de germinación.

*S. quitoense* presentó una variación de crecimiento desde los 3 cm en el día de inoculación de los nematodos, hasta 19 cm tomada luego de 80 días después de la inoculación. Hasta los 45 días las plantas testigo e infectadas no presentaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) en el crecimiento que fue muy homogéneo.

A partir de los 60 días de inoculación el crecimiento mostró diferencias estadísticas significativas entre el testigo con el infestado por *M. incognita*, por lo tanto, se puede inferir que mientras se incrementa la población de nematodos, este influye en el crecimiento de *S. quitoense*.

Al analizar los datos para la especie *S. hirtum* se puede evidenciar que esta no presentó diferencia en el crecimiento, tanto la infectada como el testigo fueron iguales mostrando una tendencia de crecimiento similar, las pruebas de Tukey al 5% para *Solanum* sp. determinaron que existe diferencia estadística, no obstante, matemáticamente las alturas del testigo con las infectadas eran diferentes, de un cm promedio desde el día de la inoculación rango que se mantuvo hasta los 80 días.



**Tabla 9:** Medias de la altura del tallo registradas de las diferentes especies evaluadas en el transcurso de la investigación.

| Especie             | días | Infestado<br>(media $\pm$ DE) | Testigo<br>(media $\pm$ DE) | P- valor  | F     |
|---------------------|------|-------------------------------|-----------------------------|-----------|-------|
| <i>S. quitoense</i> | 0    | 3.08 $\pm$ 0.39               | 3.3 $\pm$ 0.2               | 0.35 NS   | 1.42  |
|                     | 15   | 3.71 $\pm$ 0.45               | 4.13 $\pm$ 0.15             | 0.1311 NS | 1.26  |
|                     | 30   | 5.5 $\pm$ 0.35                | 5.8 $\pm$ 0.2               | 0.1765 NS | 1.05  |
|                     | 45   | 8.35 $\pm$ 0.43               | 8.8 $\pm$ 0.3               | 0.1069 NS | 1.24  |
|                     | 60   | 14.02 $\pm$ 0.7               | 15.93 $\pm$ 0.15            | 0.0003 ** | 2.48  |
|                     | 80   | 16.33 $\pm$ 0.94              | 18.2 $\pm$ 0.56             | 0.0047 ** | 0.79  |
| <i>S. hirtum</i>    | 0    | 2.33 $\pm$ 0.57               | 2.77 $\pm$ 0.15             | 0.21 NS   | 1.71  |
|                     | 15   | 3.18 $\pm$ 0.93               | 3.26 $\pm$ 0.16             | 0.8877 NS | 0.02  |
|                     | 30   | 4.34 $\pm$ 0.96               | 4.4 $\pm$ 0.26              | 0.9173 NS | 0.01  |
|                     | 45   | 6.21 $\pm$ 0.92               | 7 $\pm$ 1                   | 0.1973 NS | 1.81  |
|                     | 60   | 12.05 $\pm$ 1.41              | 12.83 $\pm$ 0.76            | 0.3745 NS | 0.83  |
|                     | 80   | 15.92 $\pm$ 1.13              | 15.33 $\pm$ 1.04            | 0.4188 NS | 0.69  |
| <i>Solanum sp.</i>  | 0    | 2.93 $\pm$ 0.77               | 3.87 $\pm$ 0.55             | 0.0625 NS | 4.01  |
|                     | 15   | 3.31 $\pm$ 0.74               | 4.3 $\pm$ 0.5               | 0.0434 *  | 4.81  |
|                     | 30   | 3.94 $\pm$ 0.53               | 4.93 $\pm$ 0.6              | 0.0192 *  | 8.49  |
|                     | 45   | 5.58 $\pm$ 0.48               | 6.33 $\pm$ 0.29             | 0.0192*   | 6.77  |
|                     | 60   | 7.27 $\pm$ 0.43               | 8.23 $\pm$ 0.25             | 0.0019 ** | 13.84 |
|                     | 80   | 8.15 $\pm$ 0.74               | 9.33 $\pm$ 0.58             | 0.019*    | 6.72  |

Todos los datos presentaron normalidad ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianza ( $p > 0.05$ ), NS= no significativo, \* significativo, \*\* altamente significativo en la prueba de Tukey a nivel  $P \leq 0.05$

#### 5.1.6. Diámetro del tallo

Al comparar la variable diámetro del tallo de las plantas infectadas con nematodos y las testigos de las tres especies, se distinguió una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) a partir de los 60 días de inoculación en la especie *S. quitoense*. Las otras dos especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. presentaron un engrasamiento homogéneo con su testigo sin inocular a pesar que al final de presentaron agalladuras en su sistema radicular, lo que no afectó ni en el desarrollo del tallo, ni en el engrasamiento del mismo.



**Tabla 10:** Medias del diámetro del tallo registradas de las diferentes especies evaluadas en el transcurso de la investigación.

| Especie             | Días | Infestado<br>(media $\pm$ DE) | Testigo<br>(media $\pm$ DE) | P- valor  | F     |
|---------------------|------|-------------------------------|-----------------------------|-----------|-------|
| <i>S. quitoense</i> | 0    | 3.05 $\pm$ 0.18               | 3.02 $\pm$ 0.16             | 0.8096 NS | 0.06  |
|                     | 15   | 3.74 $\pm$ 0.29               | 3.92 $\pm$ 0.06             | 0.3241 NS | 1.04  |
|                     | 30   | 4.37 $\pm$ 0.25               | 4.66 $\pm$ 0.18             | 0.0806 NS | 3.48  |
|                     | 45   | 6.54 $\pm$ 0.4                | 6.75 $\pm$ 0.28             | 0.4056 NS | 0.73  |
|                     | 60   | 8.30 $\pm$ 0.65               | 9.56 $\pm$ 0.40             | 0.0054 ** | 10.36 |
|                     | 80   | 9.07 $\pm$ 0.51               | 10.80 $\pm$ 0.45            | 0.0001**  | 29.36 |
| <i>S. hirtum</i>    | 0    | 0.84 $\pm$ 0.32               | 1.09 $\pm$ 0.18             | 0.2018 NS | 1.77  |
|                     | 15   | 1.9 $\pm$ 0.38                | 2.1 $\pm$ 0.25              | 0.3899 NS | 0.78  |
|                     | 30   | 2.31 $\pm$ 0.37               | 2.48 $\pm$ 0.47             | 0.508 NS  | 0.46  |
|                     | 45   | 4.13 $\pm$ 0.37               | 4.11 $\pm$ 0.09             | 0.9328 NS | 0.01  |
|                     | 60   | 7.29 $\pm$ 0.35               | 7.27 $\pm$ 0.26             | 0.9326 NS | 0.01  |
|                     | 80   | 8.74 $\pm$ 0.52               | 8.06 $\pm$ 0.51             | 0.0533 NS | 4.35  |
| <i>Solanum sp.</i>  | 0    | 2.32 $\pm$ 0.47               | 2.7 $\pm$ 0.17              | 0.1927 NS | 1.85  |
|                     | 15   | 3.22 $\pm$ 0.47               | 3.37 $\pm$ 0.19             | 0.5871 NS | 0.31  |
|                     | 30   | 3.81 $\pm$ 0.47               | 4.19 $\pm$ 0.27             | 0.197 NS  | 1.81  |
|                     | 45   | 6.57 $\pm$ 0.49               | 6.6 $\pm$ 0.14              | 0.6702 NS | 0.19  |
|                     | 60   | 8.16 $\pm$ 0.2                | 7.99 $\pm$ 0.26             | 0.2207 NS | 1.62  |
|                     | 80   | 8.93 $\pm$ 0.35               | 9.06 $\pm$ 0.3              | 0.5665 NS | 0.34  |

Todos los datos presentaron normalidad ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianza ( $p > 0.05$ ), NS= no significativo, \* significativo, \*\* altamente significativo en la prueba de Tukey a nivel  $P \leq 0.05$



**Foto 4:** Plantas de *S. hirtum* a los 80 días. (A) Testigo y (B) inoculada



**Foto 5:** Plantas de *S. quitoense* a los 80 días- (A) Testigo y (B) inoculada



**Foto 6:** Plantas de *Solanum* sp. a los 80 días. (A) Testigo y (B) inoculada



### 5.1.7. Biomasa acumulada

Para la variable biomasa acumulada (Total, raíz y follaje) se obtuvo una distribución normal ( $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas. La biomasa seca acumulada en las especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. fueron iguales al compararse con su testigo no inoculado. Así, estas no presentaron una disminución de biomasa acumulada seca a pesar de presentar infección por *M. incognita*. Por el contrario *S. quitoense* presentó una reducción de materia seca tanto en follaje como raíz al compararse con su testigo sin inoculación.

**Tabla 11:** Biomasa acumulada de las tres especies.

| Especie               |         | Plantas<br>inoculadas<br>(media $\pm$ DE) | Testigo<br>no inoculado<br>(media $\pm$ DE) | P- valor  | Reacción     | F      |
|-----------------------|---------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------|--------------|--------|
| <i>S. quitoense</i>   | Raíz    | 2.66 $\pm$ 0.24 b                         | 3.30 $\pm$ 0.20 a                           | 0.0085 ** | No tolerante | 14.77  |
|                       | Follaje | 8.44 $\pm$ 0.46 b                         | 10.53 $\pm$ 0.25 a                          | 0.0004 ** |              | 51.42  |
|                       | Total   | 11.28 $\pm$ 0.59 b                        | 13.83 $\pm$ 0.21 a                          | 0.0004 ** |              | 49.74  |
| <i>S. hirtum</i>      | raíz    | 3.10 $\pm$ 0.52 a                         | 3.0 $\pm$ 0.10 a                            | 0.762 NS  | Tolerante    | 0.10   |
|                       | Follaje | 8.18 $\pm$ 0.52 a                         | 8.30 $\pm$ 0.56 a                           | 0.7672 NS |              | 0.10   |
|                       | Total   | 11.28 $\pm$ 0.85 a                        | 11.30 $\pm$ 0.50 a                          | 0.9722 NS |              | 0.0013 |
| <i>Solanum</i><br>sp. | Raíz    | 2.98 $\pm$ 0.18 a                         | 3.30 $\pm$ 0.36 a                           | 0.1356 NS | Tolerante    | 2.97   |
|                       | Follaje | 6.12 $\pm$ 0.58 a                         | 5.73 $\pm$ 0.12 a                           | 0.3078 NS |              | 1.24   |
|                       | Total   | 9.1 $\pm$ 0.73 a                          | 9.03 $\pm$ 0.40 a                           | 0.8914 NS |              | 0.02   |

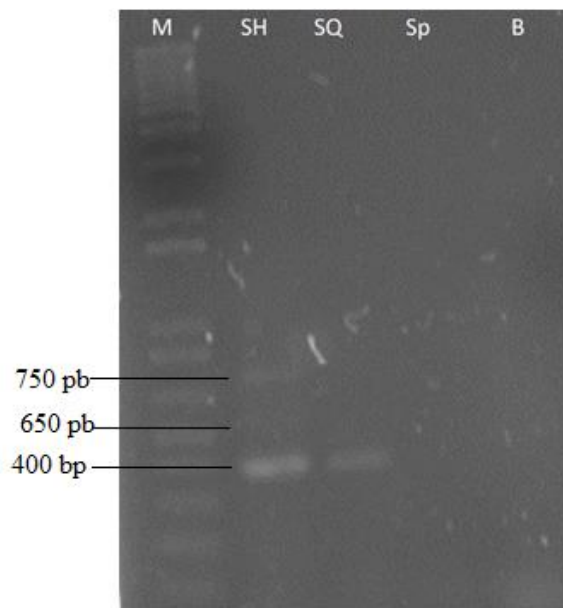
NS= no significativo, \*\* altamente significativo, medias con la misma letra indican diferencias significativas a nivel  $P \leq 0.05$  en la prueba de Tukey entre inoculadas y testigo. Todos los datos presentaron normalidad y homogeneidad de varianza ( $p > 0.05$ ).

### 5.2. Análisis molecular para *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp con marcadores RGAs y SSR

Se probaron 11 pares iniciadores, siete RGAs y cuatro SSR, la lista de secuencias de iniciadores utilizados se muestra en la tabla 4. De los primers utilizados, dos amplificaron y mostraron polimorfismo para *S. hirtum* con respecto al sensible *S. quitoense*. El microsatélite HpmsE 143 y el RGA (CLRR), amplificando bandas muy visibles en la especie *S. hirtum*. No obstante, ningún primer amplificó bandas visibles en *Solanum* sp.

### 5.2.1. Polimorfismo molecular con el RGA CLRR (F-R)

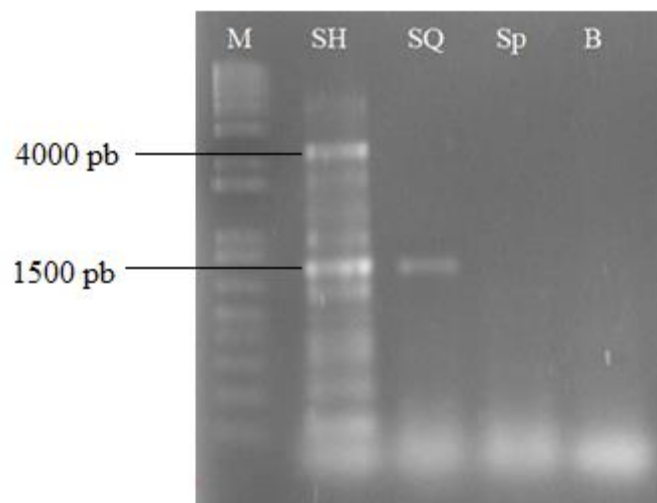
Para la pareja de primers (F: 5'TTTTCGTGTTCAACGACG3'; R: 5'TAACGTCTATCGACTTCT3') se obtuvo dos bandas que amplificaron únicamente en *S. hirtum* de un peso molecular de 750 y 650pb. También se obtuvo una banda monomórfica que amplificó tanto para la especie *S. hirtum* como para *S. quitoense* de 400pb.



**Foto 7:** Amplificación de bandas con el RGAs CLRR. Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio.

### 5.2.2. Polimorfismo molecular con el microsatélite HpmsE 143

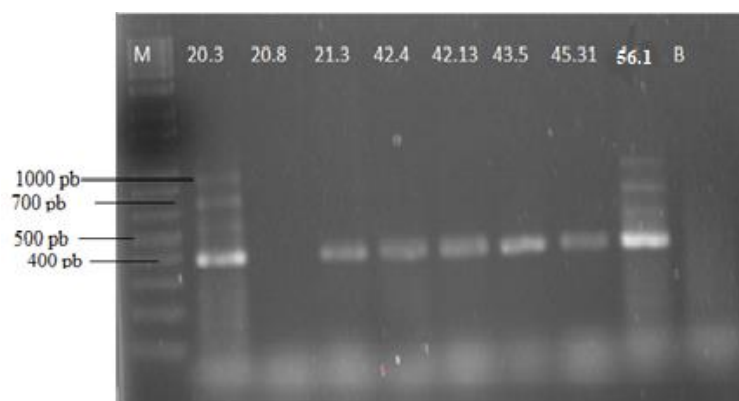
Para la pareja de primers HpmsE143 (F: 5'CCATTCAGCTAGGGTTCAGTCCA3'; R: 5'CGACCAAATCGAATCTTCGTGA3') se obtuvo múltiples bandas polimórficas para *S. hirtum* (aproximadamente 12), de las cuales las más representativas son de 4000 y 1500pb y una banda en *S. quitoense* de 1500pb. Para *Solanum* sp. no hubo amplificación.



**Foto 8:** Amplificación de bandas con el microsatélite HpmsE 143. Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio.

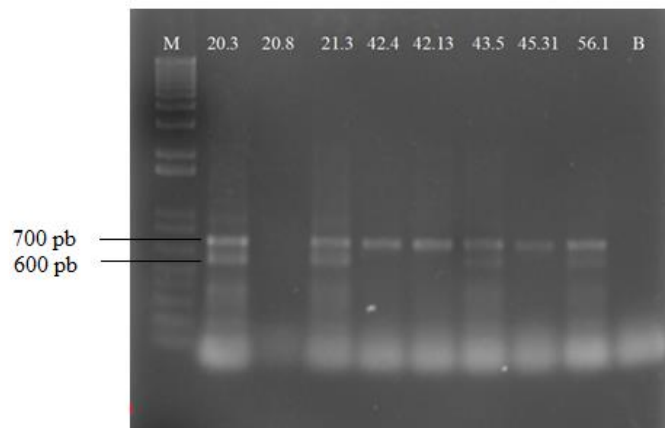
### 5.2.3. Polimorfismo molecular en segregantes de la *S. hirtum* y *S. quitoense*

Al analizar en los segregantes con los primers RGAs (CLRR F-R) y los microsatélites HpmsE 143 (F-R) se obtuvo polimorfismo molecular a nivel de segregantes. Para el primer CLRR (F-R) se produjo un patrón polimórfico en las segregantes 20.3 y 56, a la altura de 1000, 700, y 500pb. También se produjo una banda monomorfica de 400pb en todos los segregantes.



**Foto 9:** Amplificación de bandas con el RGAs CLRR, Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio.

Para el microsatélite HpmsE 143 se produjo un patrón polimórfico en los segregantes 20.3, 21.3, 43.5y 56, a la altura de 600pb y en todos los segregantes se produjo una banda monomórfica de 700pb.



**Foto 10:** Amplificación de bandas con el microsatélite HpmsE 143. Gel de agarosa 0.5%, marcador molecular 1kb, tinción con bromuro de etidio.



## 6. DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluaron y analizaron tres especies de solanáceas (*S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum* sp.) con el objetivo de buscar fuentes de resistencia al nematodo del nudo de la raíz *M. incognita*, mediante análisis fenotípico y molecular. Para el análisis fenotípico se analizaron las siguientes variables: Incremento de la población, diámetro de las agallas (nódulos), incidencia, índice de nudosidad, severidad, desarrollo de la planta (alturas y grosor del tallo) y biomasa acumulada; mientras que para el análisis molecular la amplificación a partir de primers RGAs y SSR.

Con respecto al análisis fenotípico se observaron diferencias significativas de *S. hirtum* y *Solanum* sp, con relación al cultivo susceptible *S. quitoense*. Cook y Starr (2006) definen como cultivo resistente aquel que permite muy poca o nula reproducción del nematodo y susceptible aquel cultivo que permite la libre reproducción del nematodo en su tejido. En este estudio, mientras que el nematodo *M. incognita* alcanzó una población elevada en *S. quitoense* y presentó un índice de reproducción de 1.56, que indica susceptibilidad, para las otras dos especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. la población final decreció. De entre las dos, *S. hirtum* presentó el Rf más bajo con un valor de 0.85. Resultados similares fueron reportados por Navarrete et al., (2018) quienes obtuvieron en *S. hirtum* un Rf de 0.75. Además, en este estudio se indica que un índice de reproducción de nematodos menor a 1 corresponde a plantas resistentes.

Otro indicador de resistencia, se establece a través del número de nódulos causados por *M. incognita*. En *S. hirtum* y *Solanum* sp. disminuyó significativamente con respecto a la comparación con *S. quitoense*, la cual presento un mayor número de nódulos en su sistema radical. Se ha indicado que una baja formación de nudos radiculares depende tanto de la especie de *Meloydogyne* sp. y del grado de susceptibilidad del hospedero (Oka Y, Karssen G y Mor M., 2003). Bastidas & Elianet (2017) sostienen que un mayor índice de agallamiento produce un



incremento de la población final, datos que concuerdan con la investigación, en vista que el testigo susceptible *S. quitoense* presentó mayor nodulación y a su vez una población final superior a *S. hirtum* y *Solanum* sp. No obstante, Navarro-Barthelemy, Gómez, Enrique, González, & Rodríguez, (2009) indican que el índice de agallas no debe usarse como única forma de determinar la resistencia. Así, en el caso del nematodo de agallas, de acuerdo a Starr y Mercer (2009) la población final de nematodos no es proporcional al número de nódulos ya que se puede presentar un alto número de nódulos y una baja población de nematodos o al revés. Esto podría explicar los resultados obtenidos con *S. hirtum* con respecto a *Solanum* sp., con un Rf de 0.85, pero mayor nodulación.

De acuerdo al grado de severidad *S. quitoense* presenta una condición de susceptibilidad. Por el contrario *S. hirtum* y *Solanum* sp. son catalogadas como moderadamente resistentes. Resultados similares fueron reportados por Chaves et al., (2011) quienes evaluaron varias especies de Solanáceas silvestres incluyendo una variedad susceptible *S. quitoense*.

Para las variables altura y diámetro del tallo se puede evidenciar una diferencia en el desarrollo a partir de los 60 días en *S. quitoense* al compararse con su testigo sin inoculación. Tanto el diámetro (Tabla 6) y la población final (Tabla 5) permite confirmar que el nematodo fue capaz de infectar y multiplicarse en *S. quitoense*; no obstante, en *S. hirtum* y *Solanum* sp. los diámetros y poblaciones fueron bajos. Gómez et al., (2012) sugieren que con el transcurso del tiempo y el incremento de la población empiezan a mostrarse características de pobre desarrollo. Además un marcado enanismo y la acumulación de biomasa es deficiente (Corrales, Agudelo, & Marin, 1999). Niño, Arbeláez, & Navarro, (2008) reportaron diferencia en el crecimiento de *Physalis peruviana* L. a los 15 y 30 días después de la inoculación con una población de 100 larvas J2/100cm<sup>3</sup> de suelo, además también reportan que una población baja de nematodos 50 larvas J2/100cm<sup>3</sup> no causó mucha pérdida de desarrollo de las plantas.



Para el índice de nudosidad Padilla, López y Vargas (1980), argumentan que a mayor índice de nudosidad el peso seco se incrementa en arveja bajo el ataque de *Meloidogyne* spp. Resultados contradictorios se obtuvieron en *S. quitoense* quien obtuvo mayor agallamiento, pero menor biomasa acumulada con respecto a su testigo sin inoculación. Estos datos que coinciden con los obtenidos por Duque Aristizábal & Guzmán Piedrahíta, (2013) en *Psidium guajava*, quienes obtuvieron mayor peso seco en las plantas no inoculadas con el nematodo *M. incognita*. Además Sharma, Haseeb, & Abuzar, (2006) indican que la disminución de la biomasa acumulada en *Pisum sativum* tanto de la zona radical como parte aérea, se debe al incremento de la infestación y acción del nematodo en la zona radical.

Para la evaluación de marcadores moleculares RGAs y SSR, se usaron primers definidos sobre motivos conservados de genes de resistencia clonados y validados con anterioridad en diferentes cultivos. Las actuales técnicas de secuenciación masiva permiten conocer las secuencias de plantas modelos (ej. *Arabidopsis thaliana*) o cultivos de importancia económica (Ej. maíz o tomate). Múltiples estudios se han realizado aprovechando zonas de homología de genes de resistencia para definir primers que podrían utilizarse para rastrear genes de resistencia en otros cultivos (Lefebvre & Chèvre, 1995). Esto a partir de dominios conservados en genes R (Torres Pacheco et al., 2007). Esta información proporcionada por marcadores moleculares polimórficos son la base del proceso mejoramiento genético.

Al analizar los marcadores moleculares nombrados en la Tabla 4, se encontró polimorfismo molecular para la especie susceptible *S. quitoense* y la especie resistente *S. hirtum*. Dos pares de primers permitieron detectar polimorfismo: el RGAs CLRR (F-R) y el SRR HpmsE 143 (F-R).

RGAs definidos sobre diferentes dominios se han utilizado para aislar numerosos genes de resistencia (Sekhwal et al., 2015). El marcador molecular CLRR, fue diseñado para



amplificar el gen *Cf-9*, el cual codifica una proteína repetitiva rica en leucina (LRR) fuera del citoplasma, dando resistencia al hongo *Cladosporium fulvum* (Hammond-Kosack, Tang, Harrison, & Jones, 1998). En esta investigación los primers definidos sobre el dominio LRR mostraron un polimorfismo de amplificación de bandas.

Se ha utilizado marcadores SSR para identificar genes de resistencia en diferentes cultivos por ejemplo en yuca se asoció SSR en la identificación de algunas regiones cromosómicas que confieren la resistencia al ácaro *Mononychellus tanajoa* (Macea Choperena, Ospina, Fregene, Montoya-Lerma, & Bellotti, 2012). En nuestro estudio el microsatélite HmpsE 143 produjo una amplia gama de polimorfismo en *S. hirtum* y una banda monomórfica en *S. quitoense*. Este SSR fue asociado al gen PBC81, el cual confiere resistencia de amplio espectro similar para muchas especies de antracnosis en *Capsicum* sp (Kim, Yoon, & Lee, 2017; Suwor et al., 2015). Ambos marcadores mostraron ser polimórficos en la población segregante de la cruce entre *S. quitoense* y *S. hirtum*, por lo tanto, podría ser potencialmente utilizados para rastrear la resistencia al nematodo de agallas en el cultivo de naranjilla.



## 7. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado se puede concluir lo siguiente:

- De acuerdo a las variables analizadas incremento de la población y biomasa acumulada *S. hirtum* y *Solanum* sp. presentaron resistencia en comparación con el testigo susceptible *S. quitoense*.
- La variable índice de nudosidad no es un buen indicador de la resistencia en la interacción entre las especies objeto de nuestro estudio y el nematodo *M. incógnita*. Para esta variable las tres especies fueron susceptibles.
- Se definió dos marcadores moleculares polimórficos para *S. hirtum*: el RGAs CLRR (F-R) y el SRR HpmsE 143 (F-R), que produjeron bandas para uno de los parentales resistentes. No hubo amplificación para *S. quitoense* y *Solanum* sp.
- Ambos marcadores mostraron polimorfismo en la población segregante de *S. quitoense* y *S. hirtum*.



## 8. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se plantea las siguientes recomendaciones:

- En vista que en condiciones de campo no es posible separar la interacción *Meloydogyne incognita* x *Fusarium oxysporum* se recomienda realizar pruebas fenotípicas de patogenicidad que incluyan esta interacción, y determinar cómo reaccionan *S. hirtum* y *Solanum* sp. en presencia del hongo.
- Realizar pruebas citológicas sobre las reacciones de resistencia a nivel de la raíz contra el nematodo *M. incognita*, con el fin de determinar si las reacciones de defensa de la planta en *S. hirtum* y *Solanum* sp incluyen reacciones de hipersensibilidad al nematodo. Esta evaluación podría darnos pistas sobre los mecanismos de resistencia (¿resistencias cualitativas o cuantitativas?).
- Realizar los análisis fenotípicos sobre la población de segregantes de *S. hirtum* y *S. quitoense* para establecer una relación clara con los marcadores moleculares encontrados, y verificar si estos pueden utilizarse en un programa de fitomejoramiento.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.-M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Deleury, E., ... Wincker, P. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8), 909-915. <https://doi.org/10.1038/nbt.1482>
- Aguilera, N. C. (2016). *Análisis de sistemas de convección en el tratamiento térmico de suelos o sustratos agrícolas para su desinfección en continuo* (Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universitat Politècnica de València). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=115619>
- Amayo, Y., & Orlando, V. (2002). Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote. ( *Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/805>
- Arias, M. L., Cano, C. I. M., Paz, O. A. D., & Giraldo, A. B. (2007). Variabilidad morfológica de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y especies relacionadas de la sección lasiocarpa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 60(2), 3939-3964.
- Arias, Y., González, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suárez, Z., & Peteira, B. (2009). Aspectos generales de la interacción tomate (*Solanum lycopersicon* L.) \_ *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 1-13.
- Armendáriz González, I., Quiña Cepeda, D. M., Ríos Salgado, M. E., & Landázuri Abarca, P. (2015). *Nematodos fitopatógenos*. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/10174>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Bastidas, N., & Elianet, X. (2017). Evaluación de la infestación de cinco especies de solanáceas al parasitismo del nemátodo del nudo de la raíz *Meloidogyne incognita* y el contenido de alcaloides en frutos de tomate de árbol y naranjilla injertados en estas especies. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/13142>
- Bedoya-Reina, O. C., & Barrero, L. S. (2009). Filogenia de lulo, tomate de árbol y sus parientes silvestres. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 180-190. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol10\\_num2\\_art:140](https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num2_art:140)
- Bermeo Guamán. (2015). Evaluación de la resistencia a *Fusarium Oxysporum* y *Meloidogyne Incognita* en segregantes de cruzamientos entre miembros de la sección lasiocarpa. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5916>
- Bohs, L. (2004, marzo). A Chloroplast DNA Phylogeny of *Solanum* Section Lasioscarpa [Text]. <https://doi.org/info:doi/10.1600/036364404772974310>
- C, C. I. M., A, M. L., & B, E. M. (2009). Revisión del estado del conocimiento sobre la función productiva del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 167-179. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol10\\_num2\\_art:139](https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num2_art:139)



- Caromel, B., Mugniéry, D., Kerlan, M.-C., Andrzejewski, S., Palloix, A., Ellissèche, D., ... Lefebvre, V. (2005). Resistance quantitative trait loci originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(11), 1186-1194. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1186>
- Chaves, C. G., Marcillo, E. M., González, C. S., & Garcia, C. B. (2011). Susceptibilidad de genotipos de *Solanum* spp. al nematodo causante del nudo radical *Meloidogyne* spp. (chitwood). *Acta Agronómica*, 60(1), 50-67.
- Cobb, N. A. 1918. Estimating the nematode population of soil. United States. Department of Agriculture of United State (USDA)
- Combes, M. C., Andrzejewski, S., Anthony, F., Bertrand, B., Rovelli, P., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2000). Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, 9(8), 1178-1180.
- Contreras, C. (2009). Identificación de híbridos en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante el uso de marcadores COSII. Recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/652>
- Cook R, Starr JL. (2006) Resistant Cultivars. In: Perry RN, Moens M (editors). *Plant Nematology*. CABI. UK.; pp 370-391
- Corrales, S. P., Agudelo, F. V. de, & Marin, N. B. (1999). Reconocimiento de nematodos y efecto de *Meloidogyne* spp. En el cultivo de lulo *Solanum quitoense* lam. *Acta Agronómica*, 49(3 y 4), 43-47.
- Crozzoli, R., Aguirre, Y., & Angel, L. (2012). Patogenicidad del nematodo agallador, *Meloidogyne enterolobii*, en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en macetas. *Nematologia Mediterranea*, 40(2). Recuperado de <http://journals.fcla.edu/nemamedia/article/view/87097>
- Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Chen, C., Yu, C., Weber, C. A., ... Gmitter Jr., F. G. (2000). Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5), 814-822. <https://doi.org/10.1007/s001220051548>
- Duque Aristizábal, A., & Guzmán Piedrahíta, Ó. A. (2013). Behavior of guava materials (*Psidium guajava* linneo) on the root knot nematode [*Meloidogyne incognita* (kofoid & white) chitwood and *Meloidogyne javanica* (treub) chitwood] parasitism. *Luna Azul*, (37), 130-154.
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., & Tanksley, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13(3), 207-209. <https://doi.org/10.1007/BF02670897>
- Gómez, L., Enrique, R., Hernández-Ochandía, D., Miranda, I., González, E., Peteira, B., & Rodríguez, M. G. (2012). Susceptibilidad de genotipos de *Solanum lycopersicum* L. frente a *Meloidogyne incognita* Kofoid y White (Chitwood). *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 111-116.



- Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., García-Albarado, J. C., & Cadeña-Íñiguez, J. (2014). Lulo (*Solanum quitoense* [Lamarck.]) como cultivo novedoso en el paisaje agroecosistémico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (9), 1741-1753.
- González, C. S., & Betancourth-García, C. (2017). Reacción de genotipos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a *Meloidogyne* spp. en condiciones de campo. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 295-306. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num2\\_art:629](https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:629)
- Guayasamín, G. (2015). *Evaluación ex ante del impacto socio-económico del manejo convencional y mejorado del cultivo de naranjilla (Solanum quitoense) en el Ecuador*. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4551>
- Gutiérrez, O. A., Jenkins, J. N., McCarty, J. C., Wubben, M. J., Hayes, R. W., & Callahan, F. E. (2010). SSR markers closely associated with genes for resistance to root-knot nematode on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(7), 1323-1337. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1391-9>
- Guzmán-Piedrahita, Ó., Zastaño-Zapata, J., & Villegas-Estrada, B. (2011). Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica - PDF. Recuperado 16 de marzo de 2019, de docplayer.es website: <https://docplayer.es/23420998-Principales-nematodos-fitoparasitos-y-sintomas-ocasionados-en-cultivos-de-importancia-economica.html>
- Hammond-Kosack, null, Tang, null, Harrison, null, & Jones, null. (1998). The tomato Cf-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product avr 9. *The Plant Cell*, 10(8), 1251-1266. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.8.1251>
- Kim, H., Yoon, J. B., & Lee, J. (2017). Development of Fluidigm SNP Type Genotyping Assays for Marker-assisted Breeding of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.). Recuperado 30 de junio de 2019, de /paper/Development-of-Fluidigm-SNP-Type-Genotyping-Assays-Kim-Yoon/07246be533492fef8d752017dab78b4b9ffad5a0
- Lefebvre, V., & Chèvre, A. (1995). Tools for marking plant disease and pest resistance genes: A review. *Agronomie*, 15(1), 3-19.
- Lezaun, J. (2019). Nematodos Fitoparásitos. Recuperado 20 de marzo de 2019, de CropLife Latin America website: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/nematodos-fitoparasitos>
- Macea Choperena, E. D. P., Ospina, C., Fregene, M., Montoya-Lerma, J., & Bellotti, A. C. (2012). Identificación de microsatélites en yuca asociados con la resistencia al ácaro *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 38(1), 70-75.
- Madriz Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Recuperado de <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr:80/handle/11554/6562>
- Manzano, F. E. D. (2017). Análisis funcional de genes cruciales para el desarrollo de sitios de alimentación inducidos por nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.) en arabidopsis. Functional analysis of genes crucial for the development of feeding sites induced by root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in arabidopsis



- (<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>, Universidad de Castilla-La Mancha). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=150013>
- Montes Rojas, C., Muñoz, L. A., Terán G, V. F., Prado C, F. A., & Quiñónez, M. A. (2010). Evaluación de patógenos en clones de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Acta Agronómica*, 59(2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=169916224003>
- Mosquera-Espinosa, A. T. (2016). Plant parasitic nematodes associated with *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn., *Solanum quitoense* Lam. and *Daucus carota* L. in Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(1), 87-97. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.45180>
- Navarrete, X., Ron, L., Viteri, P., & Viera, W. (2018). Parasitism of the root knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) chitwood in five wild Solanaceae species. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 71(1), 8367-8373.
- Navarro-Barthelemy, L., Gómez, L., Enrique, R., González, F. M., & Rodríguez, M. G. (2009). Comportamiento de genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Frente a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) CHITWOOD<sup>1</sup>. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 54-56.
- Niño, N. E., Arbeláez, G., & Navarro, R. (2008). Efecto de diferentes densidades poblacionales de *Meloidogyne* hapla sobre uchuva (*Physalis peruviana* L.) en invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 58-67.
- Ojito-Ramos, K., & Portal, O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología Vegetal*, 10(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/266>
- Oka, Yuji & Karssen, Gerrit & Mor, Mishael. (2003). Identification, host range and infection process of *Meloidogyne marylandi* from turf grass in Israel. *Nematology* 5 (2003) 5. 5. 10.1163/156854103322746904.
- Orozco, C. I., Beltrán, G. D., Porras, N., & Nee, M. (2008). Listado de especies espinosas de *Solanum* L. (*Leptostemonum*, Solanaceae). *Biota Colombiana*, 9(2), 239-249.
- Padilla, C.; López, R. y Vargas, E. (1980). Interacción entre *Meloidogyne* spp. y *Fusarium oxysporium* f.sp. pisi en arvejas. *Agron. Costarr.*, 4(1), 55-60
- Perichi, G., Aguirre, Y., & Vegas, A. (2019). *Plantas de pimentón cv. Río tocuyo*. 7.
- Pineda, E. G., & Gloria, E. L. (2004). Genes de Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 414-422.
- Quitiaquez, M., & Ximena, S. (2012). Evaluación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de plagas en naranjilla (*Solanum quitoense* lam. var. iniap quitoense) en río negro, provincia de tungurahua. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/2215>
- Revelo, J., & Sandoval, P. (2003). Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la Región Amazónica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2434>
- Riascos, M., Santacruz, A., B, T. L., & C, O. C. (2012). Caracterización morfológica de 39 genotipos de la colección de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) de la Universidad de Nariño. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 29(1), 57-69.



- Riveros Angarita, A. S. (2001). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Recuperado de <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr:80/handle/11554/6592>
- Sánchez-Pérez, J. de la L. (2007). Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. 147.
- Santamaria, L., Mulrooney, R. P., & Kitto, S. L. (2004). Screening for root-knot nematode response in somaclonal variants of *solanum quitoense* lam. *Nematropica*, 34(1), 73-82.
- Sekhwil, M. K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S., & You, F. M. (2015). Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19248-19290. <https://doi.org/10.3390/ijms160819248>
- Sharma, A., Haseeb, A., & Abuzar, S. (2006). Screening of field pea (*Pisum sativum*) selections for their reactions to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 7(3), 209-214. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0209>
- Solagro. (2006). Naranjilla - *Solanum quitoense*. Recuperado 18 de marzo de 2019, de <http://www.solagro.com.ec/web/cultdet.php?vcultivo=Naranjilla>
- Solano-González, S., Esquivel-Hernández, A., Molina-Bravo, R., & Morera-Brenes, B. (2015). Identificación de especies de *Meloidogyne* asociadas a plantas ornamentales de altura en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2), 247. <https://doi.org/10.15517/am.v26i2.19280>
- Starr JL y Mercer CF. 2009. Desarrollo de variedades resistentes. pp. 326-337. En Perry RN, Moens M y Starr JL (eds). *Nematodos de nudo de raíz*. Editorial CABI, Wallingford. 488 p.
- Suwor, P., Thummabenjapone, P., Sanitchon, J., Kumar, S., & Techawongstien, S. (2015). *Phenotypic and genotypic responses of chili (Capsicum annuum L.) progressive lines with different resistant genes against anthracnose pathogen (Colletotrichum spp.)*. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0723-7>
- Torres Pacheco, I., González Chavira, M. M., Villaseñor Mir, H. E., Huerta Espino, J., Villordo Pineda, E., Espitia Rangel, E., ... Guevara Olvera, L. (2007). Marcadores genéticos de resistencia a roya de tallo (*Puccinia graminis* Persoon f. sp. *avenae*) en avena (*Avena sativa* L.). *Agricultura técnica en México*, 33(3), 221-230.
- Vásquez C., W., Viteri D., P., Martínez, A., Villares, M., Ayala, G., & Jácome, R. (2011). *Naranjilla (Solanum quitoense Lam.): Tecnologías para mejorar la productividad y la calidad de la fruta*. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2771>
- Voorrips, R. E., Finkers, R., Sanjaya, L., & Groenwold, R. (2004). QTL mapping of anthracnose ( *Colletotrichum* spp.) resistance in a cross between *Capsicum annuum* and *C. chinense*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 109(6), 1275-1282. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1738-1>
- Yu, K., Park, S. J., Zhang, B., Haffner, M., & Poysa, V. (2004). An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. *Euphytica*, 138(1), 89-95. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000047077.75285.60>



- Zárate Baca, S. (2008). *Búsqueda de los genes de resistencia Mi-1 Y Mi-3 al nemátodo formador de nudo MELOIDOGYNE SPP. en varias especies silvestres de la familia SOLANCEAE del Ecuador*. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/1042>
- Zhang, L. P., Khan, A., Niño-Liu, D., & Foolad, M. R. (2002). A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* cross. *Genome*, 45(1), 133-146.
- Zurita, Q., & Liliana, K. (2015). *Viabilidad de la exportación de naranjilla deshidratada al mercado estadounidense*. Recuperado de <http://repositorio.ulvr.edu.ec/handle/44000/597>



## ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de extracción de nematodo método de Cobb (1918)

1. Colocar 100 gr de suelo en un recipiente con agua aprox. 2 litros, remover hasta separar los nemátodos de las partículas de suelo, dejar reposar la suspensión por 30 seg para que las partículas más grandes se sedimenten.
2. Pasar la suspensión por una serie de tamices hasta el N° 500 en otro recipiente. es conveniente agitar suavemente dentro del agua los restos que quedaron en el tamiz.
3. Colocar el material retenido en el tamiz N° 500 un vaso de precipitación colocar agua hasta un volumen conocido.
4. Tomar una alícuota de 1ml de suspensión y colocar en una caja petri para su respectivo conteo.

### Anexo 2. Cuantificaciones de ADN

**Tabla 12:** Concentraciones de ADN del material vegetal evaluado.

| Especies     | Concentración<br>ng/ $\mu$ L |
|--------------|------------------------------|
| S. quitoense | 1416.7                       |
| S. hirtum    | 1107.7                       |
| Solanum sp.  | 444.6                        |
| Segregantes  |                              |
| 20.3         | 530.1                        |
| 20.8         | 756.1                        |
| 21.3         | 2440.6                       |
| 42.4         | 372.3                        |
| 42.13        | 510.8                        |
| 43.5         | 1206.5                       |
| 45.31        | 1130.1                       |
| 56.1         | 564                          |

Fuente: Autor, 2019



### Anexo 3. Mastermix y programas de amplificación de los SSR y RGAs

| Primers                                | Reactivo          | Cantidad<br>µl | Paso                      | Ciclos | Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>(min) |
|----------------------------------------|-------------------|----------------|---------------------------|--------|---------------------|-----------------|
| <b>CLRR</b>                            | Agua              | 2.7            | Desnaturalización Inicial | 1      | 95                  | 4               |
|                                        | Buffer 1X         | 2.5            | Desnaturalización         |        | 94                  | 1               |
|                                        | MgCl <sub>2</sub> | 5              | Alineamiento              | 36     | 50                  | 1               |
|                                        | dNTPs             | 3(12)          | Extensión                 |        | 72                  | 1.5             |
|                                        | Primer F          | 0.5            | Extensión Final           | 1      | 72                  | 7               |
|                                        | Primer R          | 0.5            |                           |        |                     |                 |
|                                        | Taq Polimerasa    | 1              |                           |        |                     |                 |
|                                        | ADN               | 0.8            |                           |        |                     |                 |
| <b>HpmsE143 R</b><br><b>HpmsE143 F</b> | Agua              | 1.5            | Desnaturalización Inicial | 1      | 94                  | 3               |
|                                        | Buffer 1X         | 2.5            | Desnaturalización         |        | 94                  | 0.5             |
|                                        | MgCl <sub>2</sub> | 2.5            | Alineamiento              | 36     | 50                  | 0.5             |
|                                        | dNTPs             | 3(12)          | Extensión                 |        | 72                  | 2               |
|                                        | Primer F          | 2.5            | Extensión Final           | 1      | 72                  | 10              |
|                                        | Primer R          | 2.5            |                           |        |                     |                 |
|                                        | Taq Polimerasa    | 1              |                           |        |                     |                 |
|                                        | ADN               | 0.5            |                           |        |                     |                 |

Fuente: Autor, 2019



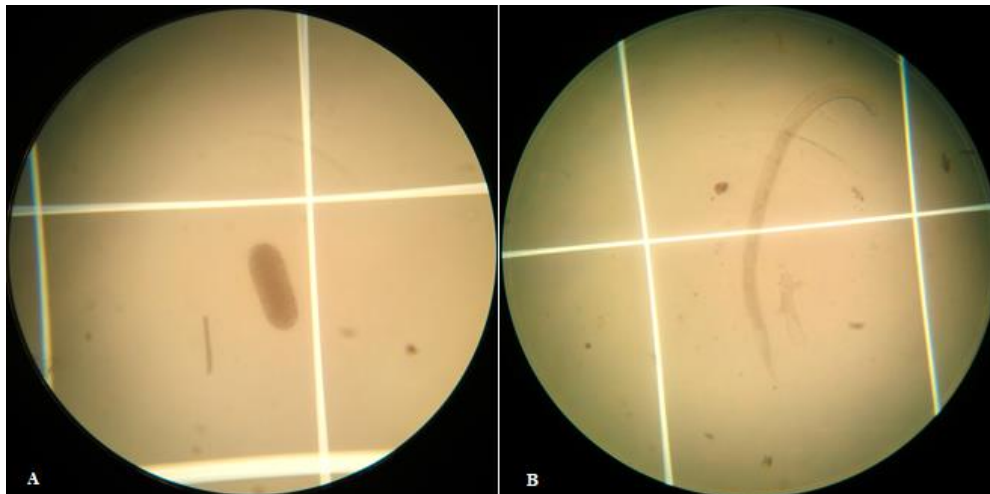
#### **Anexo 4. Protocolo de Fulton et. al 1995, para extracción de ADN**

1. Cada muestra se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se le adiciono 200  $\mu$ L de tampón de micropreparación se adiciono tres esferas pequeñas metálicas y con ayuda de Tissuelyser se trituro por cinco minutos, se adiciono 200  $\mu$ L de tampón de micropreparación para volver a pasar por el Tissuelyser por dos minutos, se agito ligeramente al vórtex e inmediatamente se incubo por 120 minutos a 65°C (Fulton, Chunwongse, & Tanksley, 1995).
2. A continuación, la muestra se trató con una mezcla Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) se agito 50 veces aproximadamente y se centrifugo por cinco minutos a 10000 revoluciones por minuto (rpm) y se recuperó la fase superior (más clara) que contiene el ADN en un nuevo tubo (Fulton et al., 1995).
3. Seguido se mezcló con etanol al 95% adicionando 800  $\mu$ L de este y se volvió a poner a la centrifuga por cinco minutos a 10000 rpm, transcurrido este proceso se desechó el etanol y se adiciono 400  $\mu$ L de etanol al 70% (en este estado se puede conservar el ADN a -20 °C por tiempo indefinido), se dejó que el etanol de volatilice y se adiciono 50  $\mu$ L de TE (Fulton et al., 1995).

## Anexo 5. Fotografías



**Foto 11:** (A) Raíces De *S. quitoense* fuente de inóculo y (B) licuado de raíces para obtener el inóculo.



**Foto 12:** *Meloidogyne incognita* (A) huevo y (B) nematodo



**Foto 13:** (A) Inoculación de *M. incognita* y (B) Evaluación de Marcadores moleculares.



**Foto 14:** Evolución de las especies durante los 80 días de evaluación.



**Foto 15:** Medición del diámetro de nódulos.