



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

“Evaluación de la resistencia a la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* en dos especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum hirtum* y *Solanum* sp.”

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

Autora: Erika Carolina Reyna Sánchez
C.I: 0105776157
Correo: erikarsanchez80@gmail.com

Director: Ing. Patricio Salvador Castro Quezada. PhD.
C.I: 1103411151

CUENCA-ECUADOR

01-06-2021



RESUMEN

En Ecuador, el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) se ve limitado principalmente por *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum*. La interacción entre estos dos patógenos causa baja producción, y en algunos casos pérdida total del cultivo. Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar la resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* en dos especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum hirtum* y *Solanum* sp. El estudio constó de dos fases: la primera fase de la investigación se realizó bajo condiciones de invernadero y la segunda en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca. En la primera fase se inoculó plántulas de aproximadamente dos meses de edad de *Solanum hirtum*, *Solanum* sp. y *S. quitoense* (testigo sensible) con *M. incognita* y *F. oxysporum*. Para esto se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA) en arreglo factorial de 3x3 con cinco repeticiones. La segunda fase se realizó en laboratorio donde se analizó marcadores moleculares SSR y RGAs asociados a la resistencia, tanto para los parentales como para una población en segregación resultado del cruce entre *S. hirtum* y *S. quitoense*, para ello se consideró el polimorfismo presente en los productos de amplificación. Los resultados obtenidos indicaron que *S. hirtum* y *Solanum* sp. obtuvieron los mejores comportamientos en cuanto a las variables biomasa acumulada, altura, diámetro del tallo, grado decoloración y grado de severidad de la marchitez ya que presentaron diferencias significativas frente al testigo sensible *S. quitoense*. En cuanto al análisis molecular, se encontró polimorfismo en dos marcadores SSR y cuatro RGAs, los cuales amplificaron únicamente en *S. hirtum*, además presentaron polimorfismo en la población segregante de la cruce de *S. hirtum* x *S. quitoense*.

Palabras claves: Resistencia. *Fusarium oxysporum*. *Meloidogyne incognita*. Marchitez Vascular. Marcadores Moleculares. Microsatélites. Genes de Resistencia Análogos.



ABSTRACT

In Ecuador, cultivation of naranjilla crop (*Solanum quitoense* Lam.) is mainly limited by the nematode *Meloidogyne incognita* and the fungus *Fusarium oxysporum*. Interaction between these two pathogens causes low production and in some cases total loss of the crop. This research was carried out with the objective of evaluating the resistance to interaction between *M. incognita* and *F. oxysporum* in two species of the *Lasiocarpa* section: *Solanum hirtum* and *Solanum* sp. The study consisted of two phases: first, inoculation of *M. incognita* and *F. oxysporum* for three species on greenhouse; and, second, search for molecular markers associated with resistance. For the first phase, seedlings of approximately two months old of *S. hirtum*, *Solanum* sp. and *S. quitoense* (sensitive control) were inoculated with *M. incognita* and *F. oxysporum*. A randomized complete block design (DBCA) in a 3x3 factorial arrangement with five repetitions was used. For the second phase, molecular markers SSR and RGAs associated with resistance were analyzed in the Molecular Biology Laboratory of the University of Cuenca for parents and a segregating population of *S. hirtum* x *S. quitoense* cross. The results showed indicate that *S. hirtum* and *Solanum* sp. obtained the best performances in terms of the variables accumulated biomass, height, stem diameter, degree of discoloration and degree of severity of wilting, since they presented significant differences compared to the sensitive control *S. quitoense*. Two SSR markers and four RGAs markers based on resistance genes showed polymorphism. They amplified only in *S. hirtum*, and presented polymorphism in the segregating population of the *S. hirtum* x *S. quitoense* cross.

Keywords: Resistance. *Fusarium oxysporum*. *Meloidogyne incognita*. Vascular Wilt. Molecular Markers. Microsatellites. Analogous Resistance Genes.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE IMÁGENES	10
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	11
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1.1. Objetivo general	18
2.1.2. Objetivos específicos	18
3. HIPÓTESIS	18
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1. Generalidades de la Familia Solanaceae	19
4.2. Sección Lasiocarpa.....	19
4.3.1. Naranjilla en Ecuador	20
4.4. Especie <i>Solanum hirtum</i> Vahl	21
4.5. Especie <i>Solanum</i> sp.....	21
4.6. <i>Fusarium oxysporum</i>	22
4.7. <i>Meloidogyne incognita</i> (Nematodo del nudo de la raíz).....	22
4.8. Interacción entre <i>Meloidogyne incognita</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	22
4.9. Resistencia genética de las plantas	23
4.9.1. Mecanismo de resistencia: Respuestas de defensa de las plantas	24
4.10. Resistencia genética en la Naranjilla	25
4.11. Marcadores moleculares utilizados en el mejoramiento genético	25
4.11.1. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)	26



4.11.2.	Genes de Resistencia Análogos (RGAs)	27
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1.	Área de estudio	28
5.2.	Manejo del experimento	29
5.2.1.	Metodología para la determinación de la incidencia y severidad de <i>F. oxysporum</i> y el efecto de la interacción con <i>M. incognita</i> – Fase invernadero	29
5.2.1.1.	Obtención del material vegetal, composición del sustrato y esterilización ...	29
5.2.1.2.	Obtención del patógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	29
5.2.1.3.	Preparación de sustrato con clamidosporas	29
5.2.1.4.	Obtención del patógeno <i>Meloidogyne incognita</i>	30
5.2.1.5.	Inoculación de <i>M. incognita</i> y <i>F. oxysporum</i>	30
5.3.	Variables evaluadas para determinar la resistencia a la interacción entre <i>F. oxysporum</i> y <i>M. incognita</i>	31
5.4.	Diseño experimental.....	33
5.5.	Metodología para la identificación de marcadores moleculares Microsatélites (SSR) y Resistance Gene Analogs (RGAs) - Fase Laboratorio	34
5.5.1.1.	Obtención del material vegetal.	34
5.5.1.2.	Extracción de ADN	34
5.5.1.3.	Caracterización molecular.....	35
5.5.1.4.	Amplificación de ADN por medio de PCR	37
6.	RESULTADOS.....	38
6.1.	Análisis fenotípico de la resistencia a la interacción entre <i>F. oxysporum</i> y <i>M. incognita</i> . (Fase invernadero)	38
6.1.1.	Biomasa acumulada seca de la zona radicular	38
6.1.2.	Biomasa acumulada seca de la zona foliar	40
6.1.3.	Altura del tallo.....	41
6.1.5.	Incidencia de la marchitez vascular	43
6.1.6.	Grado de severidad de la marchitez	44



6.1.7.	Grado decoloración vascular	44
6.2.	Análisis de diversidad molecular para genotipos parentales <i>Solanum quitoense</i> , <i>Solanum hirtum</i> y <i>Solanum sp.</i>	46
6.2.1.	Amplificación por PCR de SSR.....	46
6.2.2.	Amplificación por PCR de RGAs	48
6.3.	Análisis de diversidad molecular para la población segregante proveniente de la cruza de <i>S. quitoense</i> x <i>S. hirtum</i>	50
7.	DISCUSIÓN	52
8.	CONCLUSIONES.....	57
9.	RECOMENDACIONES.....	58
10.	BIBLIOGRAFÍA	59
11.	ANEXOS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala para evaluar el nivel de severidad de la marchitez vascular causada por <i>F. oxysporum</i>	31
Tabla 2. Escala para evaluar el grado decoloración de la marchitez vascular causada por <i>F. oxysporum</i> al final del experimento	32
Tabla 3. Diseño experimental bloques completamente al azar en arreglo factorial 3x3 de los tratamientos realizados.....	33
Tabla 4. Descripción de los primers utilizados para amplificar genes de resistencia de las especies a evaluar	35
Tabla 5. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks y prueba de Levene	38
Tabla 6. Análisis de varianza para la variable biomasa acumulada de la zona radicular	39
Tabla 7. Análisis de varianza para la variable biomasa acumulada de la parte aérea.....	40
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable altura para especies y tipos de inoculación ...	41
Tabla 9. Análisis de varianza para la variable diámetro del tallo para especies y tipo de inoculación.....	42
Tabla 10. Clasificación para la variable grado de severidad de la marchitez	44
Tabla 11. Clasificación para la variable grado decoloración.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campus Yanuncay	28
Figura 2. Interacción entre especies y tipo de inoculación para la variable biomasa acumulada seca de la zona radicular	39
Figura 3. Representación gráfica de las medias de los tipos de inoculación para la variable biomasa acumulada seca de la zona foliar	40
Figura 4. Interacción entre especies y tipos de inoculación para la variable altura.....	41
Figura 5. Interacción entre especies y tipos de inoculación para la variable diámetro del tallo	42
Figura 6. Incidencia de la marchitez vascular de las especies por los tres tipos de inoculación.....	43
Figura 7. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer CA-MS23. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies <i>S. hirtum</i> , <i>Solanum</i> sp. <i>S. quitoense</i> , y el último (B) Blanco.	47
Figura 8. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer CA-MS23. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies <i>S. hirtum</i> , <i>Solanum</i> sp., <i>S. quitoense</i> , y el último (B) Blanco.....	47
Figura 9. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con la combinación H2017/H2026 En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies <i>S. hirtum</i> , <i>Solanum</i> sp., <i>S. quitoense</i> , y el último (B) Blanco.....	48
Figura 10. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con la combinación H2018/H2020. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles	



2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp. *S. quitoense*, y el último (B) Blanco..... 49

Figura 11. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con la combinación Ptokin1/XLRR Rev. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. quitoense*, *S. hirtum*, *Solanum* sp. y el último (B) Blanco..... 49

Figura 12. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer XLRR (F y R). En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp., *S. quitoense*, y el último (B) Blanco..... 50

Figura 13. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer (Ptokin1/XLRR Rev) para segregantes. 51

Figura 14. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer CA-MS23 para segregantes. 51

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Síntomas de la marchitez vascular: A: clorosis en las hojas, presentan una tonalidad que va del verde al amarillo. B: flacidez generalizada de toda la planta, las hojas se observan débiles y C: daños en el sistema vascular presente en el tallo.	43
Imagen 2. <i>S. quitoense</i> con grado decoloración vascular severa en raíz y tallo.....	45
Imagen 3. <i>Solanum</i> sp. con grado de decoloracion vascular intermedia en raíz y tallo.....	45
Imagen 4. <i>S. hirtum</i> con grado decoloración vascular leve de raíz y tallo	45
Imagen 5. Aislamiento del hongo <i>F. oxysporum</i> siembra directa en medio PDA.....	73
Imagen 6. Inoculación de <i>M. incognita</i> dos semanas antes de la inoculación de <i>F. oxysporum</i>	73
Imagen 7. Inoculación del sustrato con clamidosporas de <i>F. oxysporum</i>	73
Imagen 8. Crecimiento de las especies a lo largo del experimento.....	74



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones.

PTI: Inmunidad desencadenada por PAMPs.

ETI: Inmunidad activada por efectores. NB-LRR o NBS-LRR: Repetición de nucleótidos ricos en leucina

PCR: Reacción en la cadena de la polimerasa.

SSR: Secuencias simples repetidas.

RGAs: Genes de Resistencia Análogos

g: gramos

$\bar{X}$: Media

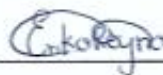
μ l: Microlitro

pb: Pares de bases

Cláusula de Propiedad Intelectual

Erika Carolina Reyna Sánchez, autora del trabajo de titulación "Evaluación de la resistencia a la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* en dos especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum hirtum* y *Solanum sp.*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 01 de junio de 2021



Erika Carolina Reyna Sánchez

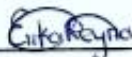
C.I: 0105776157

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Erika Carolina Reyna Sánchez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Evaluación de la resistencia a la Interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* en dos especies de la sección Lasiocarpa: *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, 01 de junio de 2021



Erika Carolina Reyna Sánchez

C.I: 0105776157



AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todos los docentes de la carrera por brindarme sus conocimientos y experiencias. En especial al Ing. Patricio Castro PhD. por su gran contribución, dedicación y tiempo brindado, agradezco su apoyo, confianza y capacidad para guiarme en la realización de esta investigación. Agradezco también a los Ing. Walter Larriva, Ing. Luis Minchala, Ing. Pablo Borja, Ing. Alfonso Palacios y Dr. Fernando Bermúdez por formar parte de este trabajo. A la institución por haber permitido formarme en sus aulas y ser una profesional llena de metas, sueños y estar incondicionalmente dispuesta para servir a la sociedad.

Erika Reyna S.



DEDICATORIA

A toda mi familia, especialmente a mi madre Teresa Sánchez, por brindarme todo su apoyo cuando más lo he necesitado, por sus consejos, valores, por ser fuente de inspiración y sobre todo por su amor y confianza.

A mis hermanos Ismael y Bryan por su apoyo incondicional y ser parte de mi vida.

Erika Reyna S.



1. INTRODUCCIÓN

La naranjilla es una solanácea de origen andino perteneciente a la sección Lasiocarpa. Es cultivada y consumida principalmente en Colombia, Ecuador y Perú. En los últimos diez años ha alcanzado una gran aceptación y demanda tanto a nivel nacional como internacional debido a su sabor agradable y aroma exquisito (Castro, Carrera, Herrera y Santana, 2018). En Ecuador ha llegado a constituirse en una primordial fuente de ingresos económicos en varios sectores, principalmente en la Amazonía Ecuatoriana, región que posee las condiciones adecuadas para el desarrollo de este frutal. Los cultivares que más se siembran y comercializan son: el híbrido Puyo (61%), híbrido Palora (38 %) y la variedad común (1 %) (Bermeo, 2015; Chong y Andrade, 2001).

En el 2015 la superficie cosechada del cultivo de naranjilla fue alrededor de 44 360 ton y un rendimiento de 13.52 ton.ha⁻¹ a nivel nacional. Este rendimiento fue considerado un porcentaje menor al generado en los años anteriores (Dávila, 2016). Estas pérdidas en rendimiento tanto para pequeños y medianos productores, se deben a la susceptibilidad del cultivo a varias plagas y enfermedades.

Una de las enfermedades más importantes es provocada por el hongo *Fusarium oxysporum*, la cual ha llegado a ocasionar hasta un 80% de pérdidas en el cultivo. El porcentaje de pérdidas aumenta cuando se presenta la interacción entre este hongo con el nematodo *Meloidogyne incognita*. Este sinergismo se caracteriza por producir una mayor agresividad y un incremento más rápido de la enfermedad, por lo que la permanencia de estos dos patógenos en el suelo ha conducido a la inhabilitación del uso del terreno para nuevas cosechas. Esto ha inducido a una fuerte migración por parte de los agricultores a zonas primarias y al uso excesivo de productos químicos (Kennete, Ramirez, Castro y Blanco, 2018; Palomares, 2009; Estupiñán y Ossa, 2007).



Para reducir el impacto del ataque de estos patógenos, se ha buscado varias opciones que se encuentren dentro de un enfoque moderno de defensa, reduciendo así el uso de productos químicos. Entre las principales alternativas de manejo integral se encuentran: los patrones resistentes y la resistencia genética (López y col., 2019).

La naranjilla presenta escasa variabilidad genética. Con el fin de obtener materiales con mejores características de productibilidad y resistencia a las principales plagas y enfermedades desde el 2005 el Programa Nacional de Fruticultura del INIAP ha generado una población segregante proveniente de cruzamientos interespecíficos entre *S. quitoense* con solanáceas silvestres. El mejoramiento genético en el cultivo de naranjilla se ha apoyado en la observación tanto morfológica como fisiológica. Hasta el momento estudios realizados han demostrado que miembros de la sección Lasiocarpa como *Solanum vestissimum* y *Solanum hirtum* presentan diversos grados de resistencia a *Meloidogyne incognita* y a *Fusarium oxysporum*. Por lo tanto, estos estudios permiten ser una base fundamental para introgresar genes de resistencia de estas especies en *S. quitoense* (Guayasamín, 2015; Revelo y Sandoval, 2003; Gallardo, 2004).

Sin embargo, no se ha determinado todavía los mecanismos genéticos involucrados en la resistencia, ni se han identificado los genes responsables. Tampoco se conoce la naturaleza de la resistencia si es monogénica o poligénica. Además no existe información disponible sobre marcadores moleculares ligados a la resistencia en este cultivo (Yáñez, 2017). Por lo que se considera oportuno que una de las mejores alternativas para el control de este sinergismo es el desarrollo de técnicas moleculares, las que podrían ser utilizadas para identificar resistencias a estos patógenos, con ellas se podrá generar información que dará lugar al planteamiento de diferentes programas de fitomejoramiento.

2. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo general

- Evaluar la resistencia a la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* en dos especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum hirtum* y *Solanum* sp.

2.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la incidencia y severidad de *Fusarium oxysporum* en plántulas de *S. hirtum* y *Solanum* sp.
- Determinar el efecto de la interacción entre *F. oxysporum* y *M. incognita* en plántulas de *S. hirtum* y *Solanum* sp.
- Identificar marcadores moleculares Microsatélites (SSR) y Genes de Resistencia Análogos (RGAs) asociados a genes de resistencia en los genotipos parentales y en una población segregante de la cruce *S. quitoense* x *S. hirtum*.

3. HIPÓTESIS

H₀: Ninguna de las especies evaluadas presenta resistencia a la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum*.

H_a: Al menos una de las especies evaluadas presenta resistencia a la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum*.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Generalidades de la Familia Solanaceae

La Familia *Solanaceae* es el tercer grupo más importante de plantas, económicamente el más valioso y variable en términos de vegetales cultivados. Está compuesta por hierbas, arbustos y árboles de distribución cosmopolita, con un centro de diversidad sudamericano, principalmente andino. En el Ecuador se han registrado 362 especies, de las cuales 67 son endémicas del país, 58 en la porción continental y nueve en Galápagos (Cárdenas, 2009; Knapp y col., 2018). Los genomas de las Solanáceas han sufrido relativamente pocas reestructuraciones y duplicaciones y por consiguiente conservan similar contenido y orden genético. Este aspecto hace de esta familia un modelo para explorar las bases de diversidad fenotípica, adaptación natural y agricultura ambiental en sus diferentes especies (Cárdenas, 2009).

4.2. Sección Lasiocarpa

La sección Lasiocarpa es un subgrupo del género *Solanum*, que incluye según diferentes investigadores entre 11 y 13 especies de arbustos o árboles pequeños. Algunas de las especies de la sección producen frutos comestibles y dos de ellas, *Solanum quitoense* y *Solanum* sp., son cultivos económicamente importantes en América Latina (Fory y col., 2011). Las demás especies de la sección Lasiocarpa son silvestres, pueden ser distinguidas de otros miembros espinosos de *Solanum* por una combinación de varios caracteres (Bermeo, 2015).

Varias especies de la sección Lasiocarpa han sido utilizadas con el fin de obtener variedades resistentes. En Ecuador y en varios países de la región andina se han identificado algunas especies silvestres, las cuales han sido muy valiosas para a través del mejoramiento genético, incrementar la variabilidad genética de la naranjilla y principalmente introducir la



resistencia genética a patrones resistentes en estas especies (Ochoa y col., 2016.; Revelo y col., 2010).

4.3. Especie *Solanum quitoense* Lam.

La naranjilla es una de las frutas andinas con mayor potencialidad debido a su exquisito sabor y aroma, pertenece a la familia *Solanaceae* y es una de las doce especies que constituyen la sección *Lasiocarpa*, es autógama y con muy poca variabilidad en sus características morfológicas (Bermeo, 2015).

Este frutal es originario de las estribaciones de los Andes de Ecuador, Colombia y Perú. Por lo tanto, este cultivo es adecuado en tierras altas comprendidas entre 1500 a 2800 m.s.n.m y a temperaturas entre 14 a 22 °C (INIAP, 2009; Varela, Velasquez, y Mejía, 2002).

Es una de las especies más susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, entre ellas las más limitantes para este cultivo se pueden mencionar el nematodo de la raíz (*Meloidogyne incognita*) y la fusariosis o marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*, siendo esta última un grave problema para los agricultores por los daños que provoca (Castro, Carrera, Herrera, y Santana, 2018).

4.3.1. Naranjilla en Ecuador

En el Ecuador la naranjilla se encuentra distribuida desde la frontera de Colombia hasta el Sur de la provincia de Loja. Se cultiva de manera comercial especialmente en la región Amazónica en las provincias de Napo, Morona Santiago, Pastaza, así como también en Tungurahua, Pichincha e Imbabura (Urbina, 2008).

Según los datos del MAGAP (2016), se tiene que en el 2015 la superficie cosechada del cultivo de naranjilla a nivel nacional alcanzó las 3 281 ha, con una producción total de 44 360 tm y un rendimiento de 13.52 ton.ha⁻¹ (Dávila, 2016). Del total de la superficie de

naranjilla sembrada en el país, las variedades que más se cultivan son el híbrido Puyo (61 %), híbrido INIAP Palora (38 %) y la variedad común (1 %)(Castro, 2018).

4.4. Especie *Solanum hirtum* Vahl.

Solanum hirtum es la especie más extendida y variable de la sección Lasiocarpa. Es una maleza nativa de América tropical, ampliamente distribuida desde México, al norte de Colombia hasta Venezuela. Se conoce como una especie no domesticada de porte arbustivo (NCBI, 2011; Paz, 2019) .

Bermeo (2015), menciona que las características genéticas hacen a *S. hirtum* una maleza exitosa, ya que pueden ser de valor para incorporarlas a *S. quitoense* y conseguir vigor y amplitud ecológica; es de particular importancia, la aparente presencia de resistencia a nematodos en algunas líneas de *S. hirtum*, esta especie se puede cruzar fácilmente con *S. quitoense* cuando se usa como el progenitor femenino.

4.5. Especie *Solanum* sp.

Solanum sp. pertenece a la sección Lasiocarpa de la familia de las solanáceas, lo que la relaciona filogenéticamente con la naranjilla o lulo (*Solanum quitoense*). Posee un crecimiento rápido, al principio es herbácea y luego semileñosa; y, puede alcanzar hasta 2 m de altura. Requiere de temperaturas medias entre 18 y 30°C, sin presencia de heladas y se beneficia de una sombra ligera durante sus primeros estados de desarrollo. La principal plaga que se presenta en este cultivo es el nematodo del género *Meloidogyne*. Estudios realizados en esta especie comprobaron la resistencia que presenta al ataque de *Fusarium* sp. (Endara, 2020; Cárdenas, 2009).



4.6. *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum es un hongo que habita en el suelo como saprofita facultativo y en condiciones de humedad y temperatura se comporta como patógeno parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas (Granada y col., 2001; Bermeo, 2015). Este patógeno al introducirse en las plantas, produce marchitez vascular, acompañada de amarillamiento, clorosis y flacidez de las hojas bajas y progresa hasta la marchitez de un lado de la planta y de un lado de la hoja. Esta enfermedad es considerada como una de las más difíciles de controlar, se encuentra distribuida en todo el país y se ha convertido en una de las principales limitantes del cultivo de naranjilla (Ochoa y col., 2001; Ochoa y col., 2010; Tipanluisa, 2011).

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

Meloidogyne incognita es un fitoparásito presente en todos los huertos frutales y se encuentra parasitando a todas las variedades comerciales de naranjilla. Una plantación atacada por este nematodo produce de 1 a 2 años, mientras que una plantación libre de esta plaga puede producir por tres o más años (Revelo y Muñoz, 2000; Zárate, 2008).

En la raíz, *M. incognita* infecta entre cinco y siete células del procambium para inducir en ellas hipertrofia y formar el sitio de alimentación. Los síntomas característicos de las plantas infectadas se inician con un retraso en el crecimiento, la marchitez y una clorosis en las hojas, acompañada de una necrosis de las mismas, provocada por una fuerte disminución de la eficiencia (Polanco, Gómez y Padilla, 2018; Salazar y Betancourth, 2017).

4.8. Interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum*

Los nematodos fitoparásitos pueden influir en la actuación de otros organismos fitopatógenos del suelo. En algunos casos, las interacciones entre nematodos fitoparásitos y hongos fitopatógenos pueden llegar a ocasionar la pérdida del cultivo, siendo por tanto



importante el conocimiento de los mecanismos implicados para desarrollar estrategias de control efectivas (Palomares, 2009).

Ochoa y col., (2001), mencionan que cuando existe una interacción entre *F. oxysporum* y el nematodo del nudo de la raíz *M. incognita*, se produce un incremento de la incidencia y severidad de la marchitez vascular, debido a que el nematodo altera la fisiología de la planta hasta tal punto que se tornan más susceptibles al ataque del hongo e incluso provoca una pérdida de resistencia a este patógeno, por ende esta sinergia entre ambos causa grandes pérdidas económicas a los agricultores. Palomares, (2009) indica que la fase más importante de esta interacción se produce tras la penetración de ambos patógenos en la planta huésped, además que en algunas interacciones entre nematodos y hongos se ha demostrado que el parasitismo por el nematodo reduce o bloquea la síntesis de compuestos defensivos de la planta frente a la infección por el hongo. Según Munguia y Matute, (1997) existen varios estudios que indican que la sensibilidad provocada por la interacción *Fusarium-Meloidogyne* se ve alterada por dos efectos separados ocasionados por el nematodo; el primero, un efecto localizado y confinado a la raíz donde las heridas causadas por el nematodo facilitan la penetración del hongo y el otro un efecto sistémico que inhibe los mecanismos de resistencia en el tallo por lo tanto no es necesario que ambos patógenos ataquen la misma parte de la planta para inducir un incremento de la susceptibilidad a la enfermedad.

4.9. Resistencia genética de las plantas

Las plantas están predispuestas continuamente al ataque de una amplia variedad de patógenos, pero también son resistentes a la vasta mayoría de ellos. Estas se defienden de los patógenos ejerciendo mecanismos físicos y químicos que han adquirido durante el proceso evolutivo y que reducen la posibilidad de infección o previenen el acceso de patógenos al hospedante (Estrada, 2006).



Entre las resistencias que se conocen son: la cualitativa, monogénica u oligogénica controlada en algunos casos por un gen o por pocos genes importantes o en algunos casos por muchos genes en un sistema poligénico. Por otro lado se encuentra la resistencia no específica, cuantitativa u horizontal, es comparativamente más difícil de manejar ya que en la misma participan un gran número de genes, su característica importante es la mayor estabilidad y durabilidad debido al efecto amortiguador del sistema poligénico (Bermeo, 2015).

4.9.1. Mecanismo de resistencia: Respuestas de defensa de las plantas

Las plantas poseen distintas estrategias de resistencia frente a los patógenos. La resistencia de no hospedante, es la primera barrera a la cual se enfrenta un patógeno y consiste principalmente en defensas físicas o químicas preformadas como paredes celulares gruesas, presentes en la superficie foliar y metabolitos secundarios. Cuando las defensas preformadas son superadas, ciertas moléculas patógenas conservadas denominadas PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) inducen un primer nivel de respuesta denominado inmunidad inducida por PAMP mediante receptores de reconocimiento de patrones de superficie celular (PRRs) que desencadenan la inmunidad activada por PAMPs (PTI) (Vivanco y Cosío, 2005; Ramos y Portal, 2010).

Los patógenos más especializados sobre un determinado hospedante vegetal, han desarrollado moléculas denominadas efectores, proteínas secretadas e introducidas en el hospedero capaces de suprimir la PTI. Sin embargo, las plantas han desarrollado un segundo nivel de resistencia donde receptores proteicos con dominios de unión a nucleótido (NBS) y dominios ricos en leucina (LRR), son capaces de reconocer de forma tanto directa o indirecta a los efectores y activar la denominada inmunidad inducida por efectores (ETI). ETI se realiza mediante los genes de resistencia y éstos reconocen a los efectores y los cambios del

metabolismo del hospedero inducidos por los efectores (causantes). ETI está frecuentemente mediado por una fuerte respuesta a una célula muerta localizada; respuesta hipersensitiva (HR) la cual indica los tejidos en los cuales el patógeno se intenta alimentar (Darino, 2015; Navarrete, 2017).

4.10. Resistencia genética en la Naranja

El mejoramiento genético de la naranja es un poco escaso, principalmente por su reducida variabilidad genética. La producción y uso de variedades o híbridos resistentes presentan ciertas desventajas como: la producción de semillas estériles y el uso de hormonas para incrementar el tamaño de su fruto, además de que no son totalmente resistentes a enfermedades especialmente a la marchitez causada por *F. oxysporum*, lo que demuestra que el mejoramiento convencional en la naranja no ha solucionado los problemas de su cultivo y producción (Mantilla, 2008; Soto, 2016).

Con los avances en el área de la biotecnología vegetal, se abre la posibilidad de incorporar características deseables a la naranja, pudiendo conseguirse un mejoramiento dirigido y ajustado a satisfacer las necesidades específicas de los agricultores, así como las de los consumidores nacionales e internacionales. Ochoa y col., (2001) mencionan que la resistencia genética es la estrategia más eficiente para el control de enfermedades y el mejoramiento de la calidad de la fruta en suelos donde están presentes tanto *F. oxysporum* como *M. incognita*. Estudios de la resistencia genética en la sección Lasiocarpa del género *Solanum* del banco de germoplasma del INIAP, muestran que accesiones especialmente de *Solanum hirtum* presentan una resistencia parcial a estos patógenos.

4.11. Marcadores moleculares utilizados en el mejoramiento genético

Los marcadores moleculares son considerados fenotípicamente neutros, se presentan como puntos de referencia cromosómicos, que están localizados dentro del genoma de un

organismo. A través de técnicas moleculares permiten la determinación de la variabilidad genética de la especie eucarionte. Presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, éstos pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas y son aplicables a cualquier tipo de material vegetal; además, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres. En la actualidad existen diferentes tipos de marcadores que se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Azofeifa, 2006; Yáñez, 2017).

4.11.1. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)

Los marcadores microsatélites son regiones de secuencias cortas de ADN de dos a diez pares de bases, distribuidas amplia y uniformemente por todo el genoma, especialmente en la mayoría de los eucariontes. En plantas, por ejemplo, los sitios de microsatélites se encuentran ampliamente distribuidos con frecuencias de uno por cada 50 mil pares de bases. Han sido utilizados para la construcción de mapas genéticos e identificación y pureza varietal, estudios de diversidad, análisis de loci de caracteres cuantitativos (QTLs), entre otras aplicaciones. Los microsatélites son amplificados individualmente a través de la técnica del PCR, partiendo de un par de primers específicos y complementarios a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite (Torres, 2007). Se han identificado SSR asociados a la resistencia en diferentes cultivares de importancia a nivel mundial, entre ellos se encuentran: *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Oriza sativa*, *Zea mays* entre otras especies de interés agronomico, frente a patogenos como *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita* (Yáñez, 2017).



4.11.2. Genes de Resistencia Análogos (RGAs)

Son secuencias específicas de ADN genómico amplificadas por iniciadores degenerados. Los RGAs se han convertido en marcadores eficientes de caracteres de resistencia controlados por genes tanto cualitativos como QTLs, la función de los genes de resistencia análogos han contribuido a la identificación y clonación de genes R funcionales y además, se han convertido en marcadores eficientes para llevar a cabo la selección asistida por marcadores en programas de mejora (Peña y Páez, 2011).

La ventaja más significativa de los RGAs sobre los marcadores de ADN arbitrarios, es que representan genes potencialmente útiles, y sirven como genes candidatos para el reconocimiento celular y como marcadores informativos para inferir las relaciones genéticas entre los germoplasmas. Aunque no todos los productos amplificados son genes funcionales de resistencia a enfermedades, todos contienen secuencias conservadas de LRR (Repeticiones Ricas en Leucina), kinasa y/o NBS (Sitio de Unión de Nucleótidos) entre otros. Por lo tanto, hay una alta probabilidad de que los productos de la amplificación, estén relacionados con señales de reconocimiento de patógenos en plantas (Hurtado, 2004; Chen y col., 1998). Trabajos previos realizados han permitido identificar genes de resistencia a enfermedades específicas en cebada, trigo y arroz. Leister y col., (1996) obtuvieron productos de PCR en papa que eran homólogos a genes de resistencia y ligados al locus de resistencia a nematodos y al locus de resistencia al tizón tardío (Sánchez, 2007).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de estudio

El estudio fue ejecutado en el laboratorio de Biotecnología e invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, ubicada en el sector Yanuncay a una altura aproximada de 2567 m s. n. m. cuyas coordenadas UTM Este 719689 y Norte 9676987. El invernadero presentó una temperatura promedio de 18.6 °C y una humedad relativa de 71.5%.

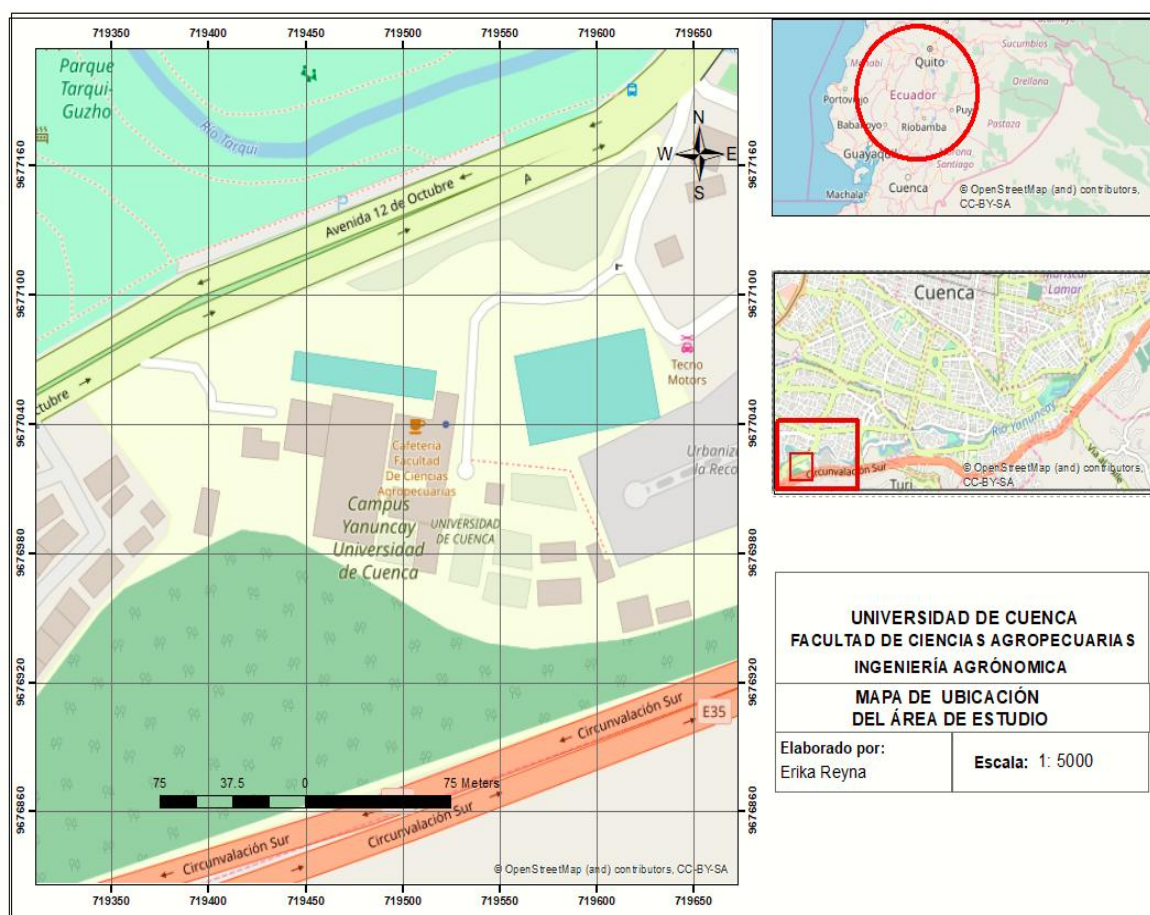


Figura 1. Mapa de Ubicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campus Yanuncay

Fuente: OpenStreetMap (OSM)

5.2. Manejo del experimento

5.2.1. Metodología para la determinación de la incidencia y severidad de *F. oxysporum* y el efecto de la interacción con *M. incognita* – Fase invernadero

5.2.1.1. Obtención del material vegetal, composición del sustrato y esterilización

El material vegetal utilizado se obtuvo previamente de las zonas frutícolas de naranjilla ubicadas en la provincia de Morona Santiago. El sustrato utilizado fue una mezcla de tierra negra, suelo franco y bocashi en proporción 40:40:20, el cual fue homogenizado y esterilizado usando la técnica de pasteurización con vapor de agua a 100°C durante 120 minutos.

5.2.1.2. Obtención del patógeno *Fusarium oxysporum*

La cepa de *F. oxysporum* fue proporcionada por Marco Méndez, egresado de la Carrera de Ing. Agronómica, la cual obtuvo de trabajos previos realizados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

5.2.1.3. Preparación de sustrato con clamidosporas

Una vez obtenida la cepa de *F. oxysporum*, se utilizó el protocolo desarrollado por Larkin, (1993) adaptado por Gallardo, (2004), el cual consistió en sembrar un pedazo de micelio del cultivo monospórico en medio líquido papa-dextrosa (PD), el cultivo permaneció en agitación constante por 15 días para luego ser homogenizado en una licuadora durante 10 seg. Luego con una jeringuilla se inoculó 50 ml de este medio en fundas previamente llenadas con 1 kg de suelo estéril de textura arenosa, para promover la formación de clamidosporas en el suelo seco. Para determinar la concentración del hongo en el suelo se realizó una disolución peso/volumen 1:1000 y se procedió a sembrar en medio PDA, al tercer día se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (ufc).

5.2.1.4. Obtención del patógeno *Meloidogyne incognita*

Las cepas de *M. incognita* se obtuvieron partir de trabajos realizados previamente en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Pacheco, 2019).

5.2.1.5. Inoculación de *M. incognita* y *F. oxysporum*

Bajo condiciones de invernadero, se realizó la evaluación de *F. oxysporum*, *F.oxysporum* + corte y la interacción *F.oxysporum* + *M. incognita*. Las especies fueron propagadas por semilla, posterior a eso las plántulas de aproximadamente dos meses de edad fueron trasplantadas a bolsas de polietileno negro de 1kg de capacidad.

La inoculación de *M. incognita* se realizó calibrando la población inicial (P_i) del nematodo a 1000 huevos + J2/planta (Pacheco, 2019). Con la ayuda de una pipeta el inoculo se ubicó directamente cerca del sistema radicular de las plántulas realizando cuatro hoyos siguiendo el sistema cardinal a 2cm de profundidad y a 2 cm de distancia del tallo.

La fuente de inoculo de *F. oxysporum* obtenido se mezcló con el sustrato previamente esterilizado, ajustando la concentración de la dosis a 5000 ufc/g de suelo; el mismo que permaneció húmedo dos semanas hasta el momento del trasplante del material vegetal.

Para evaluar la presencia del hongo en *F. oxysporum*+ corte, se realizó cortes de 1 cm en el ápice de las raíces de las 3 especies vegetales. Para evaluar la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* lo primero que se realizó fue la inoculación del nematodo dos semanas antes de la inoculación del hongo.

5.3. Variables evaluadas para determinar la resistencia a la interacción entre *F. oxysporum* y *M. incognita*

Incidencia (%): Se empleó la fórmula propuesta por Gómez y col., (2011).

$$IE (\%) = \frac{No. plantas enfermas - plantas sanas}{No. total plantas} \times 100$$

Dónde: IE= Incidencia

Grado de severidad de la marchitez: Los datos se tomaron de acuerdo a la escala del CIAT, (1987) adaptada por Estupíñan y Ossa, (2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala para evaluar el nivel de severidad de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum*.

Severidad	Porcentaje (%)	Características
1	0	No manifestación de síntomas.
3	10	Muy pocas hojas marchitas, no más del 10% del follaje total esta marchito y/o clorótico.
5	25	Aproximadamente 25% de hojas exhiben marchitez y, clorosis
7	50	Aproximadamente 50% de hojas y ramas exhiben marchitez, clorosis y necrosis limitada, las plantas son achaparras.
9	100	Plantas muertas o severamente infectadas que muestran prácticamente todo su follaje marchito, clorosis, necrosis y/o defoliación prematura.

Fuente: Estupíñan y Ossa, (2007).

Grado decoloración vascular: Al final del experimento cada planta fue retirada de la bolsa de polietileno, y los haces vasculares fueron seccionados transversalmente para evaluar la decoloración o necrosis vascular, los datos se tomaron de acuerdo a la escala propuesta por Corrales y CIAT, 1987 adaptada por Estupíñan y Ossa, (2007) (Tabla 2).

Tabla 2. *Escala para evaluar el grado decoloración de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* al final del experimento*

Grado decoloración vascular	Descripción vascular	Características
0	Ausencia de decoloración vascular	
1	Ligera (Decoloración leve del sistema vascular 25% de la planta)	
2	Intermedia (Decoloración moderada del sistema vascular 50% de la planta)	
3	Severa (Decoloración severa del sistema vascular 75% de toda la planta)	

Fuente: Estupiñán y Ossa, (2007)

Altura (cm) y diámetro del tallo (mm): Con la ayuda de una regla milimetrada, se tomó la altura medida desde el nivel del sustrato hasta donde culmina la yema apical. Con un calibrador se tomó el diámetro a la altura del cuello de la planta, la toma de datos se realizó cada 15 días a partir de la primera inoculación, hasta los 90 días.

Biomasa acumulada radicular y aérea: Al final del experimento se obtuvo la biomasa seca expresada en gramos de todo el sistema radicular y del área foliar. Para ello se realizó un lavado de los residuos presentes en las plantas, se cortó las mismas a nivel de la base del tallo para separar la parte aérea (tallos y hojas) y la parte de la raíz. A continuación, las muestras fueron colocadas en una funda de papel, y se llevaron al horno de secado a 65 °C por 72 horas.

5.4. Diseño experimental

Para el experimento se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA), con arreglo factorial de 3x3 y cinco repeticiones.

- El factor A, correspondió a tres especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. más la especie *S. quitoense* que se usó como testigo sensible.
- El factor B, correspondió a tres tipos de inoculación: *F. oxysporum*, *F. oxysporum* + corte y *F. oxysporum*+ *M. incognita*.

Se obtuvieron un total de 9 tratamientos. La unidad experimental estuvo conformada por una planta contenida en una funda con sustrato 1 kg, obteniendo así 45 unidades experimentales. Cada unidad experimental presentó dos submuestras, teniendo un total de 90 plantas (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño experimental bloques completamente al azar en arreglo factorial 3x3 de los tratamientos realizados.

Tratamiento	Factor A Especies	Factor B Tipo de inoculación
T1	<i>Solanum hirtum</i>	<i>F. oxysporum</i>
T2	<i>Solanum hirtum</i>	<i>F. oxysporum</i> + corte
T3	<i>Solanum hirtum</i>	<i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>
T4	<i>Solanum</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>
T5	<i>Solanum</i> sp.	<i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>
T6	<i>Solanum</i> sp.	<i>F. oxysporum</i> + corte
T7	<i>Solanum quitoense</i>	<i>F. oxysporum</i> + corte
T8	<i>Solanum quitoense</i>	<i>F. oxysporum</i>
T9	<i>Solanum quitoense</i>	<i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>

TRATAMIENTOS									
BLOQUE I	T3	T1	T9	T7	T4	T2	T8	T6	T5
BLOQUE II	T2	T9	T8	T4	T1	T5	T7	T3	T6
BLOQUE III	T7	T4	T6	T9	T1	T2	T3	T5	T8
BLOQUE VI	T8	T6	T2	T1	T5	T7	T9	T4	T3
BLOQUE V	T1	T3	T5	T8	T7	T9	T2	T1	T4

Los datos obtenidos de la investigación fueron analizados para verificar los supuestos de normalidad (test de Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianza (test de Levene). A las variables biomasa seca de la zona radicular y zona foliar, altura y diámetro de tallo que cumplieron con los supuestos, se realizó un análisis de varianza (ADEVA) y prueba de comparación de Tukey al 5 %. A la variable incidencia registrada en porcentaje se aplicó la transformación hiperbólica inversa de X, apropiada cuando los datos son porcentajes ($p = \arcsin \sqrt{\%}$) (Sokal y Rohlf, 1986) y se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al no presentarse normalidad y homogeneidad. Para las variables: grado de severidad de la marchitez y grado decoloración vascular, se procedió a realizar estadística descriptiva. El análisis estadístico se lo realizó con el software Infostat versión 2020e.

5.5. Metodología para la identificación de marcadores moleculares

Microsatélites (SSR) y Genes de Resistencia Análogos (RGAs) - Fase Laboratorio

5.5.1.1. Obtención del material vegetal.

Para este objetivo se analizaron los parentales *S. hirtum*, *Solanum* sp. y el testigo sensible *S. quitoense* más el material genético de una población segregante proveniente de la cruce de *S. quitoense* x *S. hirtum*. La población segregante fue proporcionada por el Dr. Rafael Morales de trabajos previos realizados en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

5.5.1.2. Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo previamente a partir de hojas apicales de los individuos a estudiar. De cada uno de ellos se tomó 100 mg de tejido vegetal. Para ello se utilizó el protocolo de Fulton y col., (1995) (Anexo 1).

5.5.1.3. Caracterización molecular

Una vez obtenido el ADN de los parentales y de los segregantes se utilizó marcadores SSR y RGAs para determinar la presencia de marcadores moleculares posiblemente asociados a la resistencia entre los genotipos evaluados mediante PCR. Esta técnica se realizó con primers específicos para los marcadores moleculares (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción de los primers utilizados para amplificar genes de resistencia de las especies a evaluar

Iniciadores SSR	Dominio (gene)	Secuencias (5'→3') *	planta	Referencia
MtB331 F MtB331 R	-	GGCTTCCTGATGCTGG TAG ACAAGCAGGTTGGACACACA	-	(Mun y col., 2006; (Yang et al., 2007)
CA-MS12 F CA-MS12 R	-	TCAAGAACTTGTATTTCTTCCC CTTACCTTGGTACCCCCACC	-	(Voorrips et al., 2004)
CA-MS22 F CA-MS22 R	-	GATCACACCATCTCTACTAACAG TT TGCATTGCATATGCATCTTTC	-	(Voorrips y col., 2004)
CA-MS23 F CA-MS23 R	-	CACAAGTGTTGTTTCACCTCTTT TC GACTCACATAGCCCGAAGAAA AT	-	(Voorrips y col., 2004)
CA-MS25 F CA-MS25 R	-	TTTCCTTCATATCAAGCCATACA A TTTTTGGTGATGAATTCTTTT	-	
Sat 235 F Sat 235 R	-	TCGTTCTGTCATTAAATCGTCAA GCAAATCATGAAAATAGTTGGT G	-	(Gichuru, 2008)
Hi07h02 F Hi07h02 R	-	CAAATTGGCAACTGGGTCTG GTTTAGGTGGAGGTGAAGGGAT G	-	(Patochi, 2008)
MtB99 F MtB99 R	-	CTTGGCAAAATGTCAACTCT GGAAAGGGGTTAGGTGAGTA	-	(Mun y col., 2006; Yang y col., 2007)

Tabla 4 (Continuación).

h2_119h6a F	-	CGCACGAGTTGGATATGATG	-	
h2_119h6a R13		CGTCGCACGAGTTTACTGAT		
H2-13M22a F	-	TCAAACCTCAAGCCACCACAA	-	
H2-13M22a R		GCTCGAGTCATGGAGGGTAA		
Iniciadores RGAs				
XLRR F	LRR	CCGTTGGACAGGAAGGAG	Arroz	(Chen y col., 1998)
XLRR R		CCCATAGACCGGACTGTT		
S2	NBS	CAICAIAAIGGITGIGGIGG	<i>A. thaliana</i>	(Zhang y col., 2002)
AS3	NBS	IAGIGCAGIGGIAGICC	<i>A. thaliana</i>	
PtoFen-S	Pto	ATGGGAAGCAAGTATTCAAGGC	Tomate	(Leister, 1996)
PtoFen-ASR F	Pto	TTGGCACAAATTCTCATCAAGC		
H1145 F	-	GGIGGIRTIGGIAAIACIAC	-	
H2022 R	Universal	CAGNGCNAGNGGNAGNCC	-	
H2026 R	TIR	RAARCAIGCDATRTGIARRAA	-	
H2016b F	Kinasa-1a	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG	-	
H2017 F	Kinasa-1a	GGIGGIWSIGGIAARACIAC	-	
H2018 F	Kinasa-1a	GGIGGIYTIGGIAARACIAC	-	(Cho, 2005)
H2019 F	Kinasa-1a	GGIGGIATIGGIAAAACIAC	-	
H1146 R	Universal	IARIGYIARIGGIARICC	-	
H2021b R	Universal	CAACGCTAGTGGCAATCC	-	
H2020 R	Universal	CAANGCCAANGGCAANCC	-	
H2023 R	TIR	RAARCAIGCSATRTCIARRAA	-	



5.5.1.4. Amplificación de ADN por medio de PCR

Los masters mix de las reacciones se llevaron a cabo con agua ultra estéril, buffer de la enzima, juego de dNTPs, MgCl₂, cebadores F y R, Taq polimerasa (INVITROGEN ®) y ADN de los genotipos a evaluar (las concentraciones para cada reactivo se especifican en el Anexo 2). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Termociclador Eppendorf Mastercycler.

Los productos de la PCR se realizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5% utilizando el buffer TAE 1X. En las muestras se utilizó un marcador molecular de 100 pb de peso (INVITROGEN ®) como estándar molecular. Se aplicó corrida electroforética a 100 V durante 40 minutos. Finalmente, los geles se colocaron en bromuro de etidio y el resultado se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad.

El análisis de diversidad molecular fue estimado a partir del polimorfismo molecular estudiado a partir de marcadores RGAs y SSR entre todos los genotipos. Se visualizó la presencia o ausencia de los productos de amplificación para todas las muestras analizadas. La presencia se interpretó como regiones del genoma asociadas a la resistencia y la ausencia a falta de regiones asociadas a la resistencia.

6. RESULTADOS

Al verificar la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos de cada una de las variables mediante la prueba de Shapiro Wilks y prueba de Levene, se observó que existe una distribución normal en biomasa seca, altura y diámetro de tallo (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba de normalidad Shapiro-Wilks y prueba de Levene

Variables	Shapiro-Wilks (Normalidad) p(Unilateral D)	Levene (Homogeneidad de varianza)
Biomasa seca de la zona radicular	0,4152	0,1312
Biomasa seca del área foliar	0,9922	0,2338
Altura	0,2983	0,1731
Diámetro	0,2890	0,6373

El (p-valor) > 0,05 indica normalidad en los residuos y homogeneidad de varianzas.

6.1. Análisis fenotípico de la resistencia a la interacción entre *F. oxysporum* y *M. incognita*. (Fase invernadero)

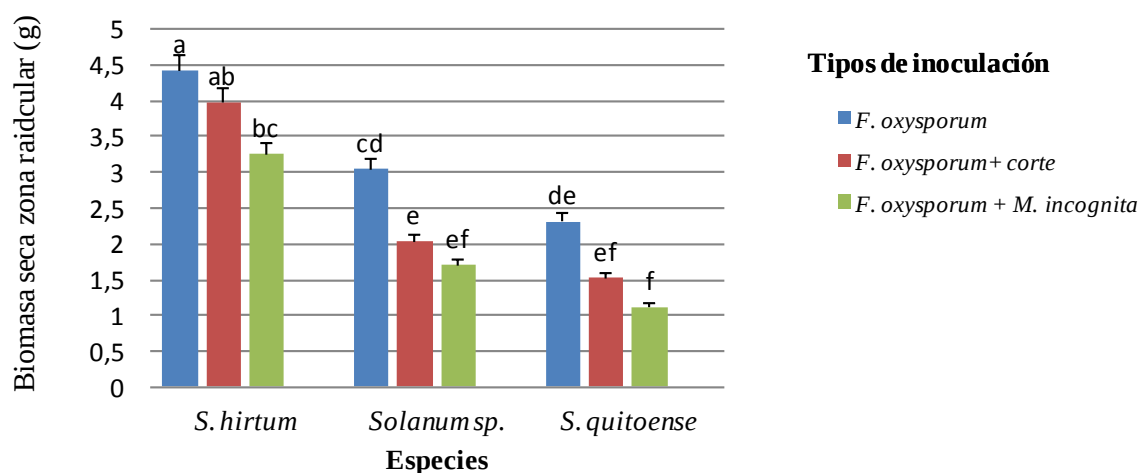
6.1.1. Biomasa acumulada seca de la zona radicular

El análisis de varianza obtenido a partir de los datos para la variable biomasa acumulada seca radicular muestra que existen diferencias significativas para la interacción entre especies y tipo de inoculación ($p=0,0001$) (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de varianza para la variable biomasa acumulada de la zona radicular

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Modelo	109,84	17	6,46	17,57	<0,0001
Bloque	5,81	9	0,65	1,75	0,0923
Tipo de inoculacion	19,73	2	9,87	26,83	<0,0001
Especie	74,6	2	37,3	101,41	<0,0001
Tipo de inoculacion*especies	9,7	4	2,42	6,59	0,0001
Error	26,48	72	0,37		
Total	136,32	89			

Al realizar las comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0,05$) se pudo observar que las tres especies presentaron mayor biomasa seca radicular al ser inoculadas solo con *F. oxysporum*, entre ellas *S. hirtum* fue la que obtuvo el valor más alto con una media de 4,42 g. Por otro lado, aquellas plantas inoculadas con la mezcla *F. oxysporum* + *M. incognita* presentaron los valores más bajos, siendo el testigo *S. quitoense* la especie que presentó la media más baja 1.12 g. (Figura 2).

**Figura 2.** Interacción entre especies y tipo de inoculación para la variable biomasa acumulada seca de la zona radicular

6.1.2. Biomasa acumulada seca de la zona foliar

El análisis de varianza obtenido a partir de los datos para la variable biomasa acumulada del área foliar, muestra que existen diferencias significativas para especies ($p < 0,0001$) y tipos de inoculación ($p = 0,0478$), pero no hubo interacción (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza para la variable biomasa acumulada de la parte aérea

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Modelo	129,95	17	7,64	13,1	<0,0001
Bloque	4,41	9	0,49	0,84	0,5822
Tipo de inoculacion	3,7	2	1,85	3,17	0,0478
Especie	119,19	2	59,6	102,09	<0,0001
Tipo de inoculacion*especie	2,64	4	0,66	1,13	0,3482
Error	42,03	72	0,58		

Los resultados obtenidos muestran que *S. hirtum* fue la especie que mayor biomasa seca foliar presentó obteniendo una media de 3,89 g. En cuanto al tipo de inoculación se pudo observar que las especies que obtuvieron mayor biomasa en el follaje fueron las inoculadas con *F. oxysporum* ($\bar{X}=2,96$), en comparación con las medias de *F. oxysporum* + corte ($\bar{X}=2,6$ g) y *F. oxysporum* + *M. incognita* ($\bar{X}=2,49$ g) (Figura 3).

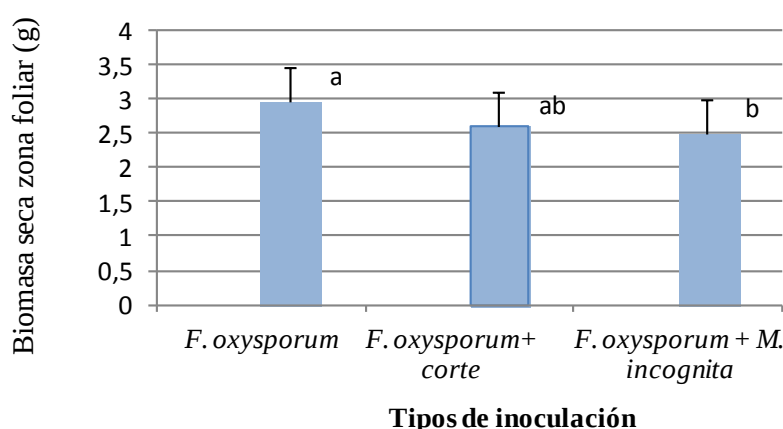


Figura 3. Representación gráfica de las medias de los tipos de inoculación para la variable biomasa acumulada seca de la zona foliar

6.1.3. Altura del tallo

En la tabla 8 se observa que la variable altura presenta diferencias significativas para especies y tipos de inoculación. Además, existe interacción significativa entre especies y tipos de inoculación ($p=0,0018$).

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable altura para especies y tipos de inoculación

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Modelo	790,7	17	46,51	37,79	<0,0001
Bloque	5,71	9	0,63	0,52	0,8589
Tipo de inoculación	60,7	2	30,35	24,66	<0,0001
Especie	700,81	2	350,4	284,7	<0,0001
Tipo de inoculación*especie	23,48	4	5,87	4,77	0,0018
Error	88,62	72	1,23		
Total	879,32	89			

Al realizar la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) se observó que las plantas de *S. hirtum* al ser inoculadas con *F. oxysporum* fueron las que presentaron mayor altura con una media de 16,2 cm. Por el contrario, las plantas de esta misma especie inoculadas con *F. oxysporum* + corte y *F. oxysporum* + *M. incognita* presentaron un comportamiento similar al encontrarse en el mismo rango. De igual manera sucedió con las plantas de *Solanum* sp. Las plantas del testigo *S. quitoense* presentaron menor altura al ser inoculadas con *F. oxysporum* + *M. incognita* que al ser inoculadas solo con *F. oxysporum* (Figura 4).

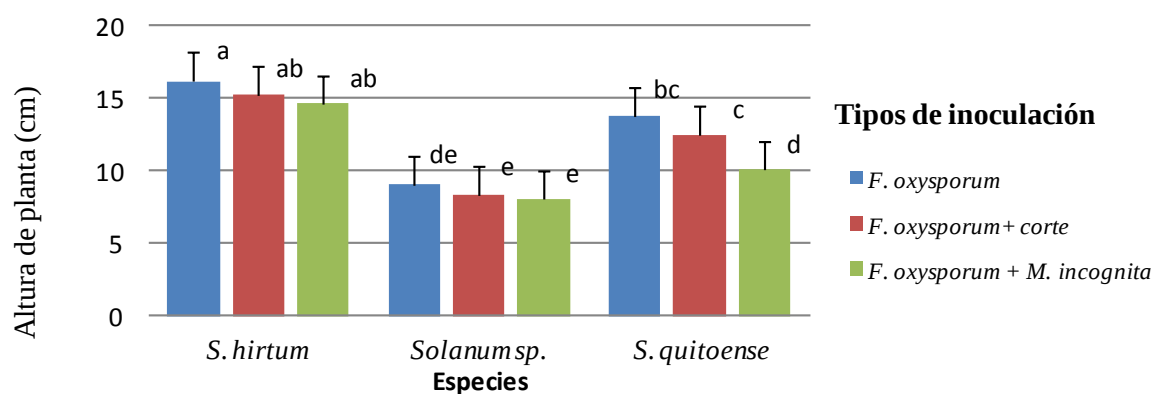


Figura 4. Interacción entre especies y tipos de inoculación para la variable altura

6.1.4. Diámetro del tallo

En el análisis de varianza obtenido (Tabla 9), se observa que existen diferencias significativas para especies y tipos de inoculación, y de igual manera se muestra diferencias altamente significativas a la interacción entre especie y tipo de inoculación ($p=0,001$).

Tabla 9. Análisis de varianza para la variable diámetro del tallo para especies y tipo de inoculación

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Modelo	57,05	17	3,36	11,15	<0,0001
Bloque	5,66	9	0,63	2,09	0,0416
Tipo de inoculacion	44,57	2	22,28	74,05	<0,0001
Especie	0,58	2	0,29	0,97	0,3844
Tipo de inoculacion*especie	6,24	4	1,56	5,18	0,001
Error	21,67	72	0,3		
Total	78,72	89			

S. hirtum y *Solanum* sp. incluyendo el testigo presentaron los resultados más altos al ser inoculadas con *F. oxysporum* mostrando medias de 8,36 mm, 7,64 mm y 7,43 mm respectivamente. Por otro lado, las plantas inoculadas con *F. oxysporum* + *M. incognita* presentaron los valores más bajos, teniendo así al testigo *S. quitoense* con la media más baja de 5,86 mm (Figura 5).

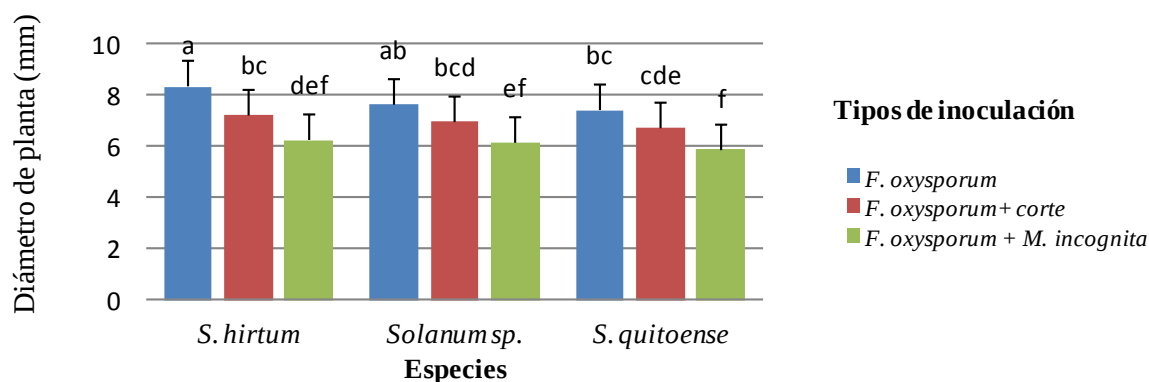


Figura 5. Interacción entre especies y tipos de inoculación para la variable diámetro del tallo

6.1.5. Incidencia de la marchitez vascular

A lo largo del experimento se pudo observar que los síntomas de marchitez vascular se manifestaron en hojas, tallos y raíces, algunas lesiones se encuentran en la **Imagen 1**. De acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Kruskal Wallis los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p=0,4335$). Las especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. presentaron una incidencia del 70,7% en plantas inoculadas solo con *F. oxysporum*, aquellas inoculadas con mezcla de *F. oxysporum* + corte y *F. oxysporum* + *M. incognita* obtuvieron valores de incidencia de 80,9% a 100%, y el testigo *S. quitoense* presentó en todos los tipos de inoculación una incidencia del 100% (Figura 6).

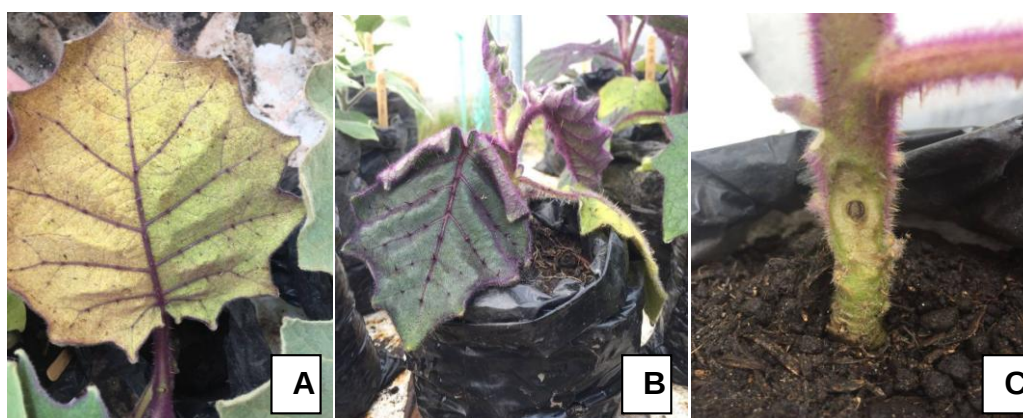


Imagen 1. Sintomas de la marchitez vascular: **A:** clorosis en las hojas, presentan una tonalidad que va del verde al amarillo. **B:** flacidez generalizada de toda la planta, las hojas se observan débiles y **C:** daños en el sistema vascular presente en el tallo.

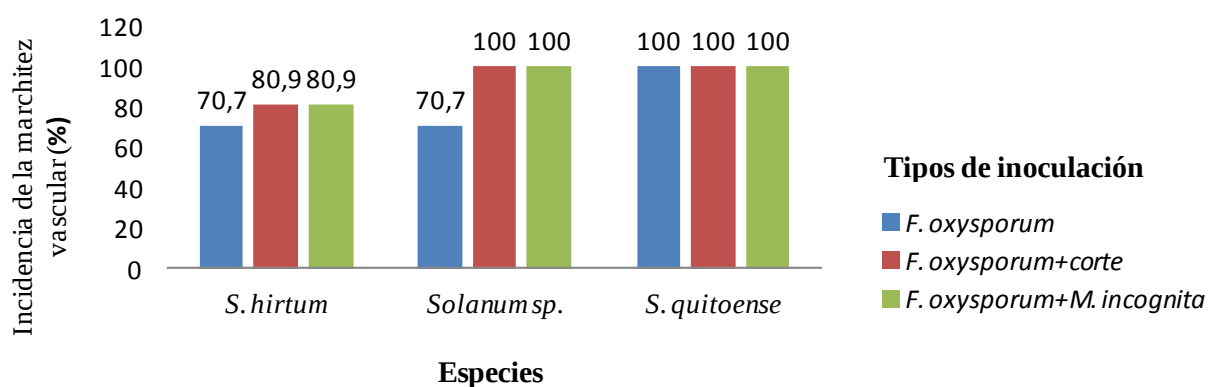


Figura 6. Incidencia de la marchitez vascular de las especies por los tres tipos de inoculación

6.1.6. Grado de severidad de la marchitez

Los datos registrados sobre la variable severidad indicaron que la especie *S. hirtum* inoculada tanto con *F. oxysporum* y *F. oxysporum* + corte y la especie *Solanum* sp. inoculada con *F. oxysporum* presentaron un grado de severidad de 3 mostrando pocas hojas marchitas y cloróticas. En la escala 5 se encontró a *S. hirtum*+ *F. oxysporum* + *M. incognita*, *Solanum* sp.+ *F. oxysporum* + corte y a *Solanum* sp.+ *F. oxysporum* + *M. incognita* lo que significa que tuvieron aproximadamente el 25% de hojas marchitas y cloróticas, *S. quitoense* al ser inoculada con los tres tipos de inoculación presentó los grados de severidad más altos (7) con aproximadamente el 50% de hojas y ramas marchitas, clorosis y necrosis limitada (Tabla 10).

Tabla 10. Clasificación para la variable grado de severidad de la marchitez

Tratamientos	Grado de severidad	% de severidad
<i>S. hirtum</i> + <i>F. oxysporum</i>	3	10
<i>S. hirtum</i> + <i>F. oxysporum</i> + corte	3	10
<i>S. hirtum</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>	5	25
<i>Solanum</i> sp.+ <i>F. oxysporum</i>	3	10
<i>Solanum</i> sp.+ <i>F. oxysporum</i> + corte	5	25
<i>Solanum</i> sp.+ <i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>	5	25
<i>S. quitoense</i> + <i>F. oxysporum</i>	7	50
<i>S. quitoense</i> + <i>F. oxysporum</i> + corte	7	50
<i>S. quitoense</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>	7	50

6.1.7. Grado de coloración vascular

A los 90 días después de la inoculación la mayoría de plantas presentaron síntomas característicos en diferentes grados ocasionados por la infección, presentando lesiones necróticas en los haces vasculares (**Imagen 2, 3, 4**).



Imagen 2. *S. quitoense* con grado decoloración vascular severa en raíz y tallo

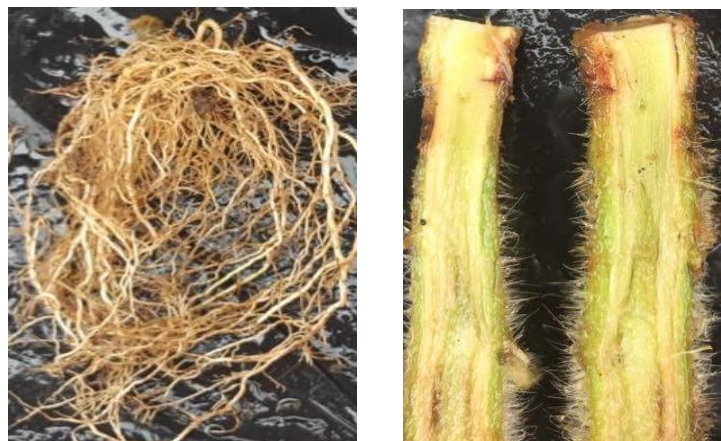


Imagen 3. *Solanum* sp. con grado de decoloracion vascular intermedia en raíz y tallo



Imagen 4 *S. hirtum* con grado decoloración vascular leve de raíz y tallo

Se identificó que las plantas de *S. hirtum* inoculadas con *F. oxysporum*, *F. oxysporum* + corte y *F. oxysporum*+ *M incognita* presentaron un grado de decoloración leve del sistema vascular. La especie *Solanum* sp. de igual manera presentó decoloración leve y solo las

plantas inoculadas con *F. oxysporum*+ *M. incognita* presentaron una decoloración intermedia (grado 2). En cuanto a las plantas del testigo *S. quitoense* se pudo evidenciar que fueron las más afectadas ya que presentaron una decoloración intermedia y severa especialmente aquellas inoculadas con *F. oxysporum* + *M. incognita* (grado 3) Tabla 11.

Tabla 11. Clasificación para la variable grado decoloración

Tratamientos	Grado decoloración	Descripción vascular
<i>S. hirtum</i> + <i>F. oxysporum</i>	1	Ligera
<i>S. hirtum</i> + <i>F. oxysporum</i> + corte	1	Ligera
<i>S. hirtum</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>	1	Ligera
<i>Solanum</i> sp.+ <i>F. oxysporum</i>	1	Ligera
<i>Solanum</i> sp.+ <i>F. oxysporum</i> + corte	1	Ligera
<i>Solanum</i> sp.+ <i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>	2	Intermedia
<i>S. quitoense</i> + <i>F. oxysporum</i>	2	Intermedia
<i>S. quitoense</i> + <i>F. oxysporum</i> + corte	2	Intermedia
<i>S. quitoense</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>M. incognita</i>	3	Severa

6.2. Análisis de diversidad molecular para genotipos parentales *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp.

En total se utilizaron ocho pares de primers SSR y un conjunto de 32 combinaciones de primers RGAs correspondientes a dominios conservados en genes de resistencia a enfermedades en plantas (Anexo 2). El criterio de selección fue la presencia o ausencia de bandas en visualización en gel de agarosa.

6.2.1. Amplificación por PCR de SSR

De los ocho pares de primers microsatélites utilizados, se pudo obtener polimorfismo en dos de ellos: CA-MS12 y CA-MS23 los cuales mostraron buena amplificación.

Con el primer **CA-MS12** se obtuvo 5 fragmentos amplificados de 600pb, 500pb, 400pb, 150pb y 50pb aproximadamente únicamente en el genotipo *Solanum hirtum* (Figura 7). No se obtuvo amplificación en los demás parentales: *S. quitoense* y *Solanum* sp.

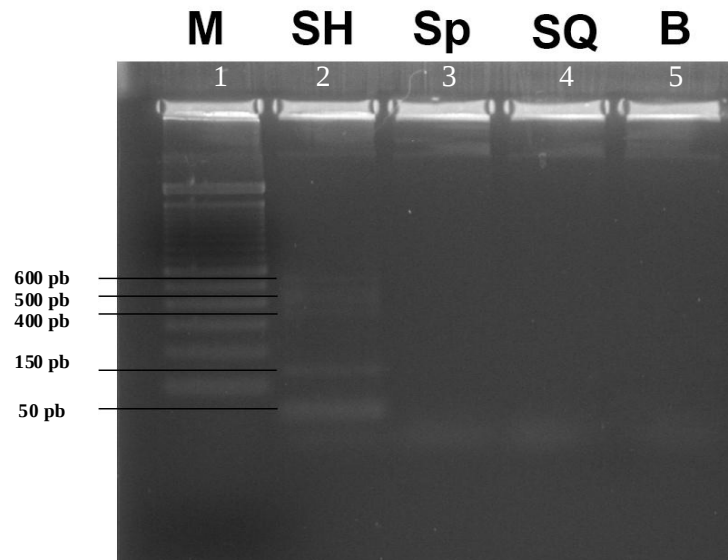


Figura 7. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer CA-MS23. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp. *S. quitoense*, y el último (B) Blanco.

Con el primer **CA-MS23** se pudo observar 2 fragmentos de amplificación en el genotipo *Solanum hirtum* con un peso molecular 700pb y 300 pb aproximadamente. Igual que en el primer anterior no se obtuvo amplificación en los demás parentales: *S. quitoense* y *Solanum* sp. (Figura 8).

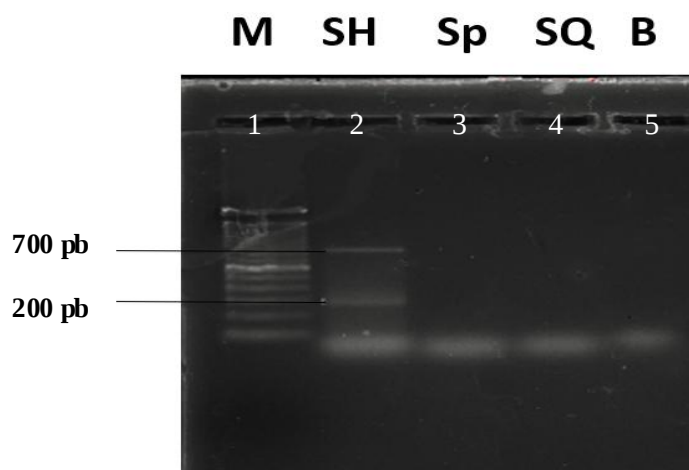


Figura 8. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer CA-MS23. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp., *S. quitoense*, y el último (B) Blanco.

6.2.2. Amplificación por PCR de RGAs

Del conjunto de 32 pares de primers RGAs evaluados los que dieron polimorfismo fueron las combinaciones H2017/H2026, H2018/H2020, Ptokin1/XLRR (R) y la pareja XLRR (F y R) todos ellos presentaron amplificación únicamente en el parental *Solanum hirtum*, en los demás parentales no se pudo observar ninguna banda amplificada.

La combinación de primers **H2017/H2026** muestra 2 bandas de amplificación en el genotipo *Solanum hirtum* con un peso molecular 300pb y 200pb (Figura 9).

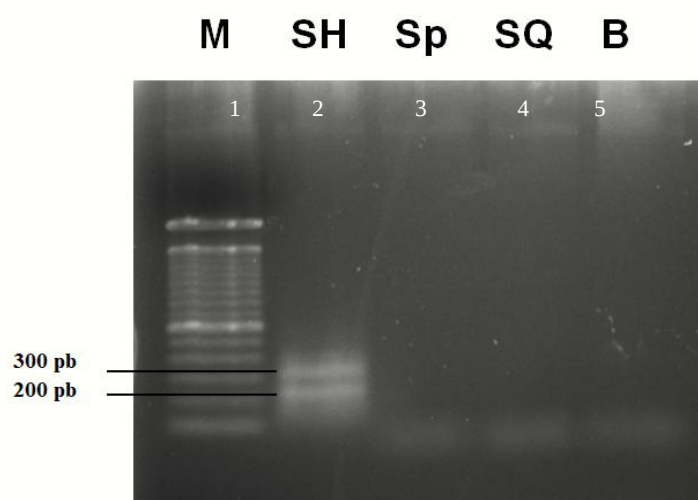


Figura 9. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con la combinación H2017/H2026 En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp., *S. quitoense*, y el último (B) Blanco.

En la figura 10 se puede observar 3 bandas de amplificación con un peso molecular de 300pb, 200pb y 100pb aproximadamente presentes solo en el genotipo *S. hirtum*. Estas bandas fueron producto de la combinación de los primers RGAs **H2018/H2020**.

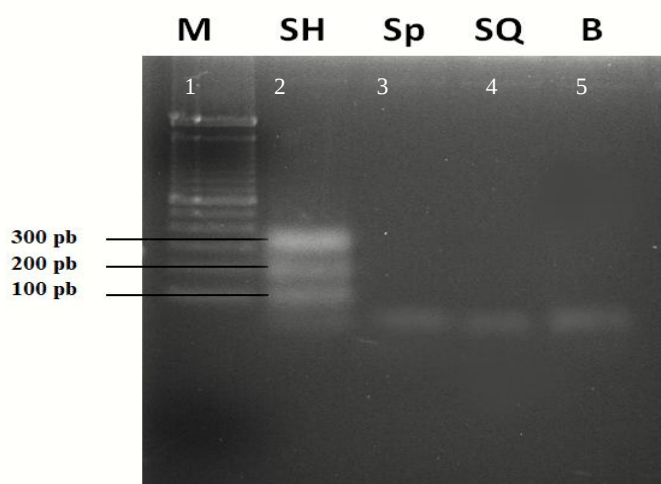


Figura 10. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con la combinación H2018/H2020. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp. *S. quitoense*, y el último (B) Blanco.

La amplificación con los primers **Ptokin1/XLRR Rev** generó 3 bandas presentes en el patrón *S. hirtum* con un peso molecular 350pb, 200pb y 50pb aproximadamente. No se obtuvo amplificación en los demás patrones: *S. quitoense* y *Solanum* sp. (Figura 11).

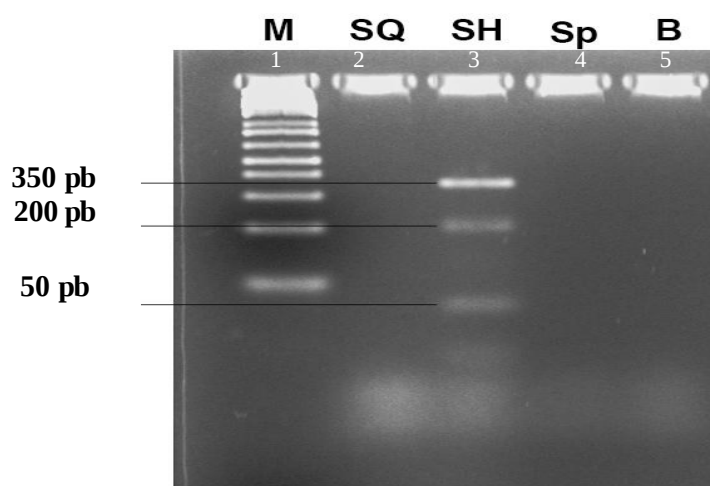


Figura 11. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con la combinación Ptokin1/XLRR Rev. En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. quitoense*, *S. hirtum*, *Solanum* sp. y el último (B) Blanco.

La pareja de primers **XLRR (F y R)** generó como producto de amplificación 4 bandas con peso molecular de 600 pb, 300pb, 250pb y 150pb únicamente en el parental *S. hirtum* (Figura 12).

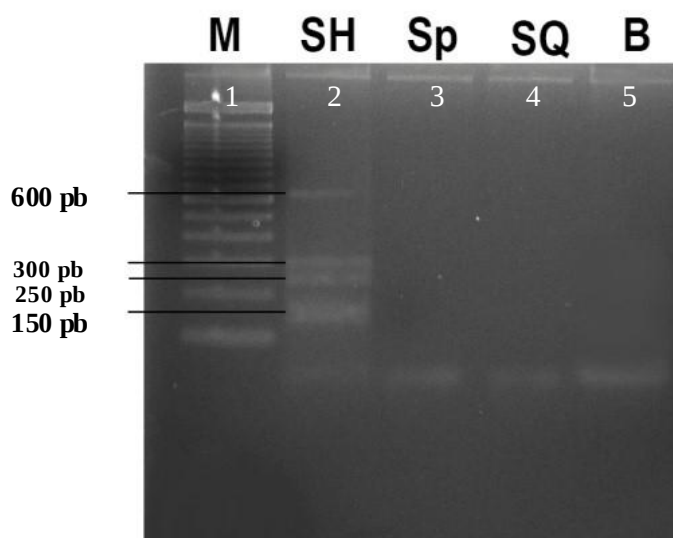


Figura 12. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer XLRR (F y R). En el carril 1 (M) marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Los carriles 2-4 muestras de ADN de las especies *S. hirtum*, *Solanum* sp., *S. quitoense*, y el último (B) Blanco.

6.3. Análisis de diversidad molecular para la población segregante proveniente de la cruce de *S. quitoense* x *S. hirtum*.

Los 6 marcadores tanto SSR y RGAs que mostraron polimorfismo en los parentales se emplearon para visualizar polimorfismo en la población segregante proveniente de la cruce de *Solanum hirtum* x *Solanum quitoense*. Los fragmentos de amplificación se clasificaron de igual manera como presencia /ausencia. Se pudo observar que solo el primer SSR (CA-MS23) y la combinación de RGAs (Ptokin1/XLRR Rev) mostraron polimorfismo en los segregantes 21.3, 42.4, 42.13, 43.5 con fragmentos amplificados de 200 a 300 pb.

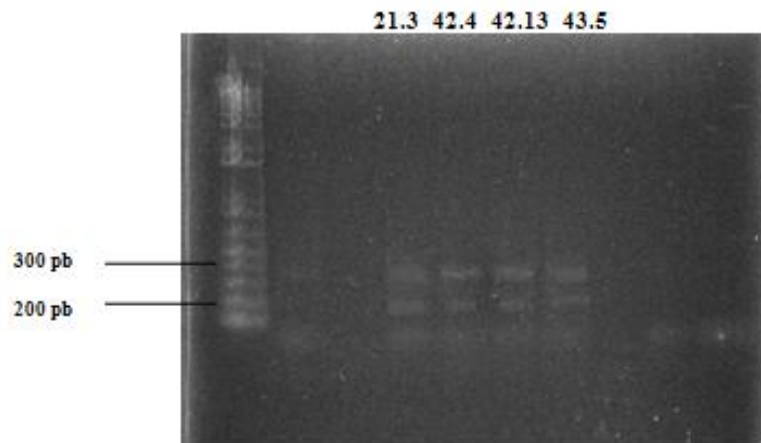


Figura 13. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer (Ptokin1/XLRR Rev) para segregantes.

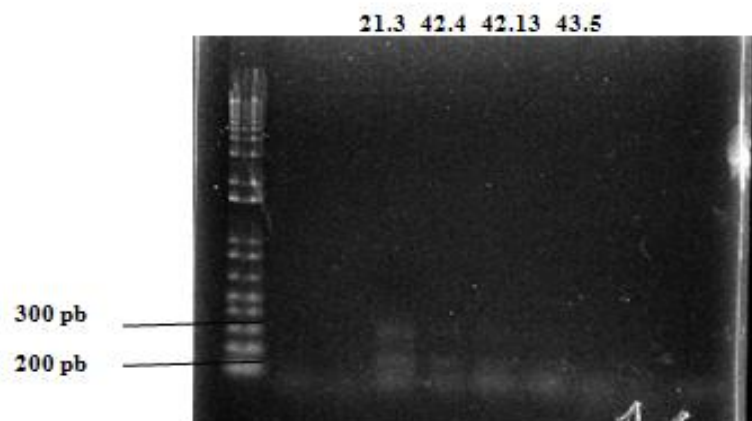


Figura 14. Visualización de los fragmentos de PCR amplificados con el primer CA-MS23 para segregantes.

7. DISCUSIÓN

Esta investigación fue llevada a cabo para evaluar la resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* en dos especies de solanáceas *S. hirtum* y *Solanum* sp. frente al testigo sensible *S. quitoense* a nivel de invernadero y laboratorio. Con el análisis fenotípico se pudo observar que casi todas las plantas tratadas independientemente del tipo de inoculación, presentaron síntomas característicos de la marchitez vascular (clorosis, marchitamiento, necrosamiento de haces vasculares) pero en diferentes grados y severidad como lo describen algunos autores (Estupiñán y Ossa, 2007; Arizala y col., 2011; Vásquez y Castaño., 2017).

Con respecto a la biomasa seca acumulada tanto de la zona radicular como foliar, se encontraron diferencias estadísticas entre las especies y tipos de inoculación. Aquellas inoculadas solo con *F. oxysporum* presentaron los valores más altos de biomasa, siendo *S. hirtum* la especie con la media más alta. Lo contrario ocurrió con plantas inoculadas con *F. oxysporum* + *M. incognita* ya que presentan valores bajos de biomasa. Guzmán, Zamorano, y López (2020), en su revisión exponen que las raíces infectadas por *M. incognita* provocan cambios morfológicos produciendo una reducción significativa de las mismas, de igual forma ocurre con el área foliar. La presencia de estos patógenos reduce la tasa fotosintética y por lo tanto su biomasa foliar también lo hace. Los datos del estudio muestran que la especie *S. quitoense* fue la más afectada. Según Endara (2020) este efecto depende de la reacción del material vegetal al ataque de estos patógenos y se expresa de manera diferente dependiendo de la interacción de los patógenos y la planta hospedera en base a las cualidades de cada material.

Para las variables altura y diámetro del tallo, *S. hirtum* fue la especie que presentó valores superiores frente a *Solanum* sp. y al testigo *S. quitoense* independientemente del tipo de inoculación. Se puede mencionar que las plantas de *Solanum* sp. no alcanzaron un buen



desarrollo debido a que las condiciones ambientales no fueron las favorables. Según Santacruz (2004), esta especie se encuentra cultivada en zonas con altitudes desde 0 hasta los 1500 m.s.n.m. lo cual difiere de esta investigación debido a que ésta se llevó a cabo en una altitud de 2567 msnm, a pesar de eso esta especie no se vio muy afectada por los patógenos. Respecto al tipo de inoculación las especies presentaron menor altura y diámetro al ser inoculadas con la mezcla *F. oxysporum* + *M. incognita*, especialmente el testigo *S. quitoense* resultados similares obtuvieron Padilla, Róger, y Vargas (1980) al observar que plantas de arveja tuvieron una altura y diámetro significativamente menor al ser inoculadas con la combinación de ambos patógenos debido a que cuando penetran las raíces las plantas interfieren con los procesos fisiológicos, relacionados con la absorción de agua y nutrientes, de este modo crean efectos sobre la síntesis de clorofila y fotosíntesis, provocando disminución en el crecimiento y productividad de las plantas.

Las especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. presentaron porcentajes de incidencia bajos en plantas inoculadas solo con *F. oxysporum*, pero se observó que las plantas inoculadas con la mezcla de *F. oxysporum* + corte y *F. oxysporum* + *M. incognita* los valores de incidencia aumentaron de 80 a 100%, al igual que el testigo *S. quitoense* que presentó en todos los tipos de inoculación un 100% de incidencia. Resultados similares obtuvieron Betancourth y col. (2005) quienes hallaron que las especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. inoculadas solo con *F. oxysporum* presentaron síntomas como clorosis, secamiento y caída de algunas hojas por lo que la reacción al patógeno se considera favorable y se pueden considerar como moderadamente resistentes, aunque se observó diferencias en la intensidad de la colonización vascular al ser inoculadas con la mezcla de ambos patógenos. De igual manera Gallardo (2004) en su estudio menciona que todas las accesiones de naranjilla (*Solanum quitoense*) en este caso nuestro testigo sensible, fueron susceptibles a *F. oxysporum* y a la inoculación



conjunta *F. oxysporum* + *M. incognita* aunque se observaron porcentajes severos en esta especie.

Para la variable severidad de la marchitez, Ochoa (2010); y, Munguia y Matute (1997) en sus estudios mencionan que la inoculación conjunta entre *F. oxysporum* y *M. incognita* produce mayores daños a las plantas. En este caso las especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. presentaron daños leves e intermedios de marchitez. Sin embargo, el testigo *S. quitoense* mostró daños relativamente mayores al ser inoculadas con *F. oxysporum* + *M. incognita*. Estos resultados sugieren que los nematodos rompieron la resistencia, alterando la fisiología de la planta hasta tal punto que estas se vuelvan más susceptibles al ataque del hongo, o incluso hacen que pierdan la resistencia al mismo, permitiendo así el desarrollo más rápido del hongo que produce la marchitez vascular. Por otro lado, González y col. (2017) mencionan que la infección por nematodos formadores de agallas provoca cambios fisiológicos en la raíz. Esto trae como consecuencia que variedades de solanáceas resistentes a *Fusarium* se vuelvan susceptibles al hongo.

Para la evaluación de los marcadores moleculares SSR y RGAs, se usaron primers basados en dominios conservados de genes R considerados como marcadores candidatos para el reconocimiento de genes de resistencia a enfermedades en varios cultivos. Se ha visto que genes R de diferentes especies de plantas con especificidad para una amplia variedad de patógenos, codifican proteínas estructuralmente similares, esto sugiere un alto grado de conservación entre las vías que usan las plantas para activar respuestas de defensa. Aunque los primeros genes R se aislaron desde *Arabidopsis*, tomate, tabaco y arroz, el surgimiento de la nueva metodología permitió la extensión a otras especies de plantas cultivables como por ejemplo trigo, cebada, avena, soja, garbanzo, maíz y girasol (El Mujtar, 2009; Hurtado, 2011).



De acuerdo a los de análisis de PCR realizados con los primers SSR y RGAS (tabla 5), seis de ellos lograron amplificar y mostrar polimorfismo en la especie resistente *S. hirtum* y en algunos segregantes de la cruce de *S. hirtum* x *S. quitoense*. Esto posiblemente se deba a que la naranjilla al ser autógama y poseer un nicho ecológico exclusivo y aislado ha sufrido de deriva génica, la disminución de la riqueza alélica afecta principalmente a aquellos alelos que son menos frecuentes dentro de la población (Yáñez, 2017). Por otro lado Fory y col. (2011) en su trabajo observaron mayor polimorfismo en especies silvestres de la sección *Lasiocarpa* como *S. hirtum* en comparación con los taxones cultivados de *S. quitoense* y *Solanum* sp.

Algunos estudios han hecho uso de los marcadores SSR CA-MS12 Y CA-MS23 para identificar genes de resistencia en varios cultivos. Los resultados que se obtuvieron en cuanto a estos primers guardan relación con el trabajo realizado por Voorrips y col. (2004);y, Ridzuan y col. (2018) sobre antracnosis en una población de pimiento (*Capsicum annuum*). Ellos obtuvieron un buen nivel de polimorfismo al evaluar rasgos relacionados con la resistencia, por lo que pudieron identificar varios QTLs a esta enfermedad. Hurtado (2004) y Enríquez (2011) indican que se ha observado que los sitios SSR están bien conservados entre especies relacionadas, lo que permite en algunos casos, la transferencia de marcadores entre especies incluso entre géneros usando cebadores heterólogos.

Por otra parte Pan y col. (1999) así como Cho (2005) señalan que en los cultivos de tomate, trigo, café y sorgo, se puede obtener un alto nivel de polimorfismo al usar el conjunto de primers RGAs H2017/H2026 y H2018/H2020. Estudios similares se obtuvieron al evaluar el cultivo de remolacha (*Beta vulgaris*) y melón (*Cucumis melo*); además se consiguió identificar genes análogos de resistencia al nematodo Hs1pro-1 y el gen Fom-1, que controla la resistencia a las razas 0 y 2 de *F. oxysporum* fs. *melonis* (Hunger y col., 2003; Brotman y col., 2002).



En cuanto a los primers XLLR (F y R) y Ptokin1/XLRR (R) la información es más abundante y permite una mejor comparación con los resultados obtenidos en este trabajo. La gran mayoría de los datos disponibles para ambas combinaciones corresponde a cultivos como arroz, trigo o cebada, sin embargo se han aislado RGAs de otros cultivos como yuca y aguacate, obteniendo altos niveles de polimorfismo, lo que ha permitido identificar varios loci que confieren resistencia a patógenos como *Puccinia graminis*, *Phytophthora cinnamomi* Rands y a tizón de la cabeza de Fusarium (Hurtado, 2004; Sánchez, 2007; Mazaheri y col., 2008).

Collins y col. (1998), mencionan que la mayoría de genes de resistencia a enfermedades en las plantas que se han clonado contienen un dominio NBS y un dominio LRR y los dos están relacionados con resistencia gen por gen a varias enfermedades causadas por hongos, virus, bacterias o nematodos. Estos amplifican una misma región genómica en dos clones diferentes por lo que se indica que, aunque se tenga dos especies vegetales diferentes encuentran total similitud y en un 99% de homología. Leister y col. (1996) concuerdan que la región amplificada por los primers RGAs es conservada no solo entre variedades de la misma especie, sino que también entre especies diferentes.

Por lo que se plantea la posibilidad de introgresar genes de resistencia contra patógenos de la especie parcialmente resistente *S. hirtum* a la variedad susceptible *S. quitoense*. Teniendo en cuenta además que es la especie que posee mayor compatibilidad sexual con *S. quitoense*. Otro hecho importante de *S. hirtum*, como fuente de germoplasma, es el hecho de que esta especie es el taxón más extendido y variable de la sección Lasiocarpa (Whalen y Heiser, 1981).

8. CONCLUSIONES

- Al concluir con la fase de invernadero se obtuvo que las especies *S. hirtum* y *Solanum* sp. presentaron un porcentaje de incidencia bajo y un grado de severidad leve al ser inoculadas solo con *F. oxysporum* por lo que son resistentes a este patógeno.
- Al evaluar la interacción entre *F. oxysporum* y *M. incognita* se obtuvo que las dos especies fueron parcialmente resistentes ya que presentaron grados de severidad intermedio.
- *S. quitoense* nuestro testigo sensible, fue susceptible a *F. oxysporum* y a la inoculación conjunta *F. oxysporum* + *M. incognita* presentando grados de severidad severos y una incidencia total.
- En cuanto a la fase de laboratorio se encontró polimorfismo en dos marcadores SSR: CA-MS12 y CA-MS23 y cuatro RGAs: H2017/H2026, H2018/H2020, Ptokin1/XLRR (R) y la pareja XLRR (F y R) que amplificaron únicamente en la especie *S. hirtum*, de estos marcadores únicamente el SSR (CA-MS23) y la combinación de RGAs (Ptokin1/XLRR Rev) presentaron polimorfismo en la población segregante de la cruce de *S. hirtum* x *S. quitoense*.



9. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*, bajo condiciones de campo a fin de verificar la resistencia de *S. hirtum* y *Solanum* sp.
- Continuar evaluando diferentes especies de la sección Lasiocarpa para determinar su resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*.
- Realizar análisis en campo de la población segregante proveniente de la cruce de *S. hirtum* y *S. quitoense* para identificar la resistencia a patógenos encontrada en los marcadores moleculares.



10. BIBLIOGRAFÍA

- Arizala, M., Monsalvo, Á., Betancourth, C., Salazar, C., y Lagos, T. (2011). Evaluación de solanáceas silvestres como patrones de lulo (*Solanum quitoense* Lam) y su reacción a *Fusarium* sp. Revista de Ciencias Agrícolas, 147-160.
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2), 221-242.
- Betancourth, C., Zambrano, M., y Narváez, C. (2005). Reacción de diferentes genotipos de lulo (*Solanum quitoense*) al ataque de *Fusarium oxysporum*. Revista de Ciencias Agrícolas, XXII (I - II).
- Bermeo, N. (2015). Evaluación de la resistencia a *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita* en segregantes de cruzamientos entre miembros de la sección Lasiocarpa. Recuperado el 22 de Febrero de 2019. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/933/1/96284.pdf>
- Brotman, Y., Silberstein, L., Kovalski, I., Perin, C., Dogimont, C., Pitrat, M., Klingler, J., Thompson, G., y Perl-Treves, R. (2002). Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. Theoretical and Applied Genetics, 104(6), 1055-1063. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0808-x>
- Cárdenas, Z. (2009). Identificación de híbridos en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante el uso de marcadores COSII [Pontificia Universidad Javeriana]. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/652/cien12.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castro, W. (2018). Identificación y caracterización de hongos asociados a la marchitez vascular en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en Pastaza, Ecuador Recuperado el



- 12 de Abril de 2019. Obtenido de
<http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/10791/William%20Octavio%20Castro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castro, W., Carrera, K., Herrera, F., y Santana, R. (2018). Identificación de aislados de *Fusarium spp.* asociados a *Solanum quitoense* Lam. en Pastaza, Ecuador. Centro Agrícola, 5-11.
- Chen, M., Line, R. F., y Leung, H. (1998). Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis: Theoretical and Applied Genetics, 97(3), 345-355. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s001220050905>
- Cho, J. M. (2005). Isolation and characterization of resistance gene analogs (rgas) in sorghum. Obtenido de <https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/237>
- Chong, L., y Andrade, F. (2001). Exportacion de naranjilla en conserva hacia los Estados Unidos y sus efectos en la economía ecuatoriana . Recuperado el 25 de Febrero de 2019. Obtenido de
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3519/1/6046.pdf>
- Collins, N., Webb, C., Seah, S., Ellis, J., Hulbert, S., y Pryor, A. (1998). The Isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. Obtenido de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI.1998.11.10.968>
- Dávila, M. (2016). Diversidad de hongos asociados a lesiones foliares en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en varias localidades de la Amazonía Ecuatoriana. Recuperado el 24 de Abril de 2019, Obtenido de
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12524/FERNADA%20D%C3%81VILA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>



- Darino, A. (2015). Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a roya de la hoja del trigo. Universidad de Buenos Aires. Obtenido de https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5666_Darino.pdf
- El Mujtar, V. (2009). Análisis integrado de factores genéticos, bióticos y abióticos para la formulación de una nueva hipótesis sobre la etiología del “mal del ciprés” Universidad de la Plata. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2620/Documento_completo_en_baja_resoluci3B3n.pdf?sequence=3
- Endara, D. (2020). *Evaluación de la resistencia/tolerancia a Meloidogyne sp. de 10 líneas promisorias de Naranjilla*. Recuperado el 21 de Enero de 2021, de Repositorio Espe: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/22046/T-IASAI-005580.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Enríquez, M. (2011). Generación de Marcadores Moleculares en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sin Cyphomandra betacea Sendt.*) para estudios de diversidad genética de germoplasma ecuatoriano Escuela Superior Politécnica del Litoral. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17205/1/D-90876.pdf>
- Estrada, G. (2006). Mecanismo de resistencia de las plantas 1 (1). Recuperado el 15 de Marzo de 2019. Obtenido de https://www.academia.edu/36359554/._Mecanismo_de_resistencia_de_las_plantas_1_1_
- Estupiñán, H., y Ossa, J. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis Peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales por el microorganismo.. Recuperado el 15 de Marzo de 2019. Obtenido de



<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8319/tesis293.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Fory, P., Sánchez, I., Bohórquez, A., Ramírez, H., Medina, C., y Lobo, M. (2011). Genetic Variability of the Colombian Collection of Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) and Related Species of Section Lasiocarpa. 5465-5476. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a01v63n01.pdf>
- Fulton , T., Julapark ,C., y Tanksley, D. (1995). Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. Plant Molecular Biology Reporter, 207-209.
- Gallardo, C. (2004). Control químico y estudio de la diseminación de *Fusarium oxysporum* en huertos comerciales de babaco (*Carica heilbornii* nothovar pentagona) en los valles de Tumbaco y los Chillos. Recuperado 19 de junio de 2019. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=boQzAQAAMAAJ&dq=La+inoculaci%C3%B3n+se+realiz%C3%B3+con+el+sustrato+conteniendo+clamid%C3%B3sporas+de+fusarium&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Granada, D., Amezquita, D., Mendoza, G., y Zapata, H. (2001). *Fusarium Oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7-25. Recuperado el 12 de Junio de 2019. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462>
- Gómez, P., Sánchez, A., Calleros, G., Carvajal, R., y Padrón, E. (2011). Incidencia y Severidad de la Marchitez del Agave (*Tequilana Weber* Var. Azul.) en la zona sur del Estado de Nayarit, México. *Nueva Época*, 8(2), 5.
- González, I., Arias, Y., y Peteira, B. (2017). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*- tomate. *Revista Protección Vegetal* , 1-7.



- Guayasamín, M. (2015). Evaluación ex ante del impacto socio-económico del manejo convencional y mejorado del cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense*) en el Ecuador. Recuperado el 5 de Marzo de 2019. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4551/1/T-UCE-0004-17.pdf>
- Guzmán, O., Zamorano, C., y López, H. (2020). Interacciones fisiológicas de las plantas con nematodos fitoparásitos: una revisión. Boletín Científico Centro de Museos , págs. 190-205.
- Hunger, S., Gaspero, G., Mohring, S., Bellin, D., Schafer, R., Borchardt, D., Durel, C., Werber, M., Weisshaar, B., Salamini, F., y Schneider, K. (2003). Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Obtenido de <https://sci-hub.si/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669798>
- Hurtado, P. (2004). Detección de marcadores microsatélites y búsqueda de genes análogos de resistencia asociados con la resistencia al añublo bacterial de la yuca. Universidad de los Andes. Recuperado el 29 de Agosto de 2020. Obtenido de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/10127/u245459.pdf?sequence=1>
- INIAP. (2009). Naranjilla de jugo (*Solanum quitoense* Latt.) injerta en patrones de solanáceas silvestres resistentes a *Fusarium oxysporum* y a *Meloidogyne incógnita*. Boletín Divulgativo No. 354.
- Knapp, S., Ulloa, C., y Montúfar, R. (2018). Libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador. Recuperado el 20 de agosto de 2020. Obtenido de <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500428>
- Kennete, R., Ramirez, J., Castro, O., y Blanco, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Scielo, 115-126.



- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., y Gebhardt, C. (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants.
- López, W. C., Sánchez, K. C., y Isla, L. H. (2019). Incidencia de la marchitez vascular de *Solanum quitoense* en la región amazónica de Pastaza, Ecuador. 5.
- Mantilla, M. (2008). Semantic Scholar. Recuperado el 08 de Junio de 2019. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/afb0/856bc46cd99f4dee88b8a699ae2f9a3fafec>.
- Mazaheri, M., Reza, M., Mostafa, S., Ghareyazie, B., Abdemishani, S., y Mardi, M. (2008). Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with the major QTL of *fusarium head blight (FHB)* resistance, Qfhs.ndsu-3BS in wheat. 6(2), 119-123. Obtenido de <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=127783>
- Mun, J., Kim, D., Choi, H., Gish, J., Debelle, F., y Mudge, J. (2006). Distribution of Microsatellites in the genome of *Medicago truncatula* a resource of genetic marker that integrate genetic and physical map. *Genetics Society of America* , 2541-2555.
- Munguia, M., y Matute, L. (1997). Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* fs.y su interaccion con *Meloidogyne* sp. en el complejo de la marchitez lenta del café Recuperado el 21 de Junio de 2019, de <http://repositorio.una.edu.ni/1682/1/tnh20m966.pdf>
- Navarrete, X. (2017). Evaluación de la infestación de cinco especies de solanáceas al parasitismo del nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne incognita* y el contenido de alcaloides en frutos de tomate de árbol y naranjilla injertados en estas especies. Universidad de las Fuerzas Armadas. Recuperado el 29 de agosto de 2020. Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13142/1/T-ESPE-053868.pdf>
- NCBI. (2011). Solanaceae un recurso taxonómico global para la familia de las solanáceas. Obtenido de <http://solanaceaesource.org/taxonomy/term/107345/descriptions>



- Ochoa, J. B., Yangari, B., Galarza, V., y Fiallos, J. (2001). Vascular Wilt of Common Naranjilla (*Solanum quitoense*) caused by *Fusarium oxysporum* in Ecuador. *Online. Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2001-0918-01-HN.
- Ochoa, J., Ellis, M., y Alwang, J. (2010). El manejo de la "Fusariosis" como base para un cultivo ecológico de la naranjilla en el Ecuador. Boletín.No 138, INIAP.
- Ochoa, M., Balaguera, E., Ardila, G., Pinzón, H., y Álvarez, G. (2016). Crecimiento y desarrollo del fruto de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en el municipio de San Antonio del Tequendama (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 347. Obtenido de https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:512
- Padilla, C., López, R., y Vargas, E. (1980). Interacción entre *Meloidogyne spp.* y *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi en arveja. *Agronomía Costarricense* , 55-60.
- Pacheco, L. (2019) Determinación de la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp. Repositorio Digital Universidad de Cuenca.
- Palomares, J. (2009). Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo. Recuperado el 14 de Junio de 2019. Obtenido de <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/2252/9788478019601.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pan, Q., Wendel, J., y Fluhr, R. (1999). Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10754062/>
- Patocchi, A., y Broggini, G. (2005). Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene Vm. *ResearchGate* , 630-636.



- Paz, L. (2019). *Steemit*. Recuperado el 16 de Junio de 2019, Obtenido de <https://steemit.com/steemstem/@lupafilotaxia/biotipo-y-adaptabili-1560542453>
- Peña , R., y Páez , J. (2011). Nematodos Fitopatogenos . *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia* .
- Polanco, F., Gómez, S., y Padilla, C. (2018). Evaluación de la resistencia de un híbrido F1 de *Solanum quitoense* Lam. a *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) y *Meloidogyne incognita*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, Obtenido de https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num2_art:520
- Ramos, K., y Portal, O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. 10(1), 17.
- Revelo, J., y Muñoz, L. (2000). Repositorio Digital INIAP: Inducción de resistencia al nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne incognita*) en naranjilla mediante radiaciones Gamma. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3598>
- Revelo , J., y Sandoval , P. (2003). Factores que afectan la produccion y productividad de la Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en a region Amazonica del Ecuador. Recuperado el 12 de Junio de 2019. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2434>
- Revelo, J., Viteri, P., Gallegos, P., Vásquez, W., Valverde, F., y León, J. (2010). Manual del Cultivo Ecológico de la Naranjilla. INIAP Archivo Histórico.
- Ridzuan, R., Rafii, M., Izera, S., Mohammad, M., Miah, G., y Usman, M. (2018). Breeding for Anthracnose Disease Resistance in Chili: Progress and Prospects. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/b5e8/4b8a4fb7925ac092a0f8d765f2627b53e188.pdf>
- Salazar, C., y Betancourth, C. (2017). Reaction of genotypes of lulo (*Solanum quitoense* Lam.) to *Meloidogyne* spp. under field conditions. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 295-306. Recuperado el 12 de Junio de 2019. Obtenido de https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:629



- Sánchez, L. (2007). Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill. Var. *Drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Recuperado el 12 de septiembre de 2020. Obtenido de http://www.avocadosource.com/papers/Mexico_Papers/SanchezPerezJose2007.pdf
- Santacruz, M. (2004). Biblioteca digital Zamorano. Recuperado el 16 de Mayo de 2020, de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2029/1/CPA-2004-T050.pdf>
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1986). Introducción a la bioestadística. Reverte. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=t0PXnIO147cC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Soto, L. (2016). Despliegue diferencial de genes candidatos que se activan durante el cultivo in vitro de hipocotilo de naranjilla *Solanum quitoense* Lam var. Quitoense. Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10095/1/T-UCE-0004-85.pdf>
- Tipanluisa, S. (2011). *Repositorio Digital Universidad Tecnica de Cotopaxi*. Recuperado el 15 de Abril de 2019. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/960/1/T-UTC-1256.pdf>
- Torres , A. (2007). Caracterización genética de la Naranjilla (*Solanum quitoense*) y sus parientes interespecíficos de la sección Lasiocarpa mediante análisis de secuencias simples repetidas. Recuperado el 15 de Mayo de 2019. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3484>
- Urbina, G. (2008). Centro de Documentacion Universidad Estatal de Bolivar. Guaranda.



- Varela, C., Velasquez, C., y Mejía, M. (2002). Respuesta fisiológica del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a diferentes concentraciones de N, P, Ca y Mg en la solución nutritiva. *Acta Agronómica*, 53-59.
- Vásquez, L., y Cataño, J., (2017). *Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate* *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder y H.N. Hansen: una revisión. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v20n2/v20n2a14.pdf>
- Vivanco, M., y Cosío, E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 8.
- Viteri, P., Vásquez, W., León, J., Viera, W., Pozo, M., Hijanosa, M., y Ochoa, J. (2009). Naranjilla de jugo (*Solanum quitoense* Latti.) injerta en patrones de solanáceas silvestres resistentes a *Fusarium oxysporum* y a *Meloidogyne incógnita*. Recuperado el 30 de Junio de 2019. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/bitstream/41000/305/1/iniapscbd354n.pdf>
- Voorrips, E., Finkers, R., Sanjaya, L., y Groenwold, R. (2004). QTL mapping of anthracnose (*Colletotrichum* spp.) resistance in a cross between *Capsicum annuum* and *C. chinense*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1275-1282. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1738-1>
- Whalen, M., y Heiser, D. (1981). Taxonomy of *Solanum* section *Lasiocarpa*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302634013>
- Yang, S., Gao, M., Deshpande, S., Lin, S., Roe, B., y Zhu, H. (2007). Genetic and physical localization of an anthracnose resistance gene in *Medicago truncatula*. *Springer*, 45-52.
- Yáñez, D. (2017). Validación y caracterización de marcadores moleculares microsatélites para genotipaje de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) Universidad de las Américas.



Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8206/1/UDLA-%20EC-TIB-2017-40.pdf>

Zhang, P., Khan, A., Niño-Liu, D., y Foolad, 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.

Zárate, 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 *Solanaceae* del Ecuador. Recuperado el 27 de Marzo de 2019. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1042/1/T-ESPE-026698.pdf>



11. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Fulton y col., 1995, para extracción de ADN

1. Cada muestra se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se le adiciono 200 μ L de tampón de micropreparación se adiciono tres esferas pequeñas metálicas y con ayuda de TissueLyser se trituro por cinco minutos, se adiciono 200 μ 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 agitó 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 μ 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 μ 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 μ L de TE (Fulton y col., 1995).

Anexo 2. Mezcla y programas de amplificación (PCR) de los SSR y RGAs para las muestras del material vegetal.

Primers	Reactivo	Cantidad (μl)	Pasos	Ciclos	T °C	Tiempo (min)
SSR						
CA-MS12 CA-MS23	Agua	10.2	Desnaturalización inicial	35	94	3
	Buffer 1X	2				
	MgCl2	1.6	Desnaturalización		94	0.5
	DNTPs	0.8 (3.2)	Alineamiento		50	0.5
	Primer F	1	Extensión		72	1
	Primer R	1	Extensión final		72	10
	Taq Polimerasa	0.5				
	ADN	0.5				

Referencia (Voorrips, Finkers, Sanjaya y Groenwold, 2004)

RGAs						
XLRR	Agua	2	Desnaturalización inicial	36	95	4
	Buffer 1X	2.5				
	MgCl2	5	Desnaturalización		94	1
	DNTPs	3 (12)	Alineamiento		52	1
	Primer F	1	Extensión		72	1.5
	Primer R	1	Extensión final		72	7
	Taq Polimerasa	0.5				
	ADN	1				

Referencia (Chen, Line y Leung, 1998)

H2017/H2026 H2018/H2020	Agua	1.5	Desnaturalización inicial	35	94	4
	Buffer 1X	2.5				
	MgCl ₂	5	Desnaturalización		94	0.75
	DNTPs	3 (12)	Alineamiento		45	0.5
	Primer F	0.5	Extensión		72	1



Primer R	0.5	Extensión final	72	10
Taq Polimerasa	0.5			
ADN	2.5			

Referencia Adaptado de (Cho, 2005)

Ptokin1/XLRR rev	Agua	6.9	Desnaturalización	94	5
	Buffer 1X	2.5	inicial		
	MgCl ₂	2.5	Desnaturalización	94	1
	DNTPs	2 (8)	Alineamiento	45	1
	Primer F	2	Extensión	72	2
	Primer R	2			
	Taq Polimerasa	0.5	Extensión final	72	7
	ADN	0.6			

Referencia

Fuente: autor, 2020

Anexo 3. Combinaciones de los primers RGAs

Primers				
F/R	F /R	F/R	F/ R	F/R
H1145/H1146	H2016/H1146	H2017/H1146	H2018/H1146	H2019/H1146
H1145/H2020	H2016/H2020	H2017/H2020	H2018/H2020	H2019/H2020
H1145/H2021b	H2016/H2021b	H2017/H2021b	H2018/H2021b	H2019/H2021b
H1145/H2022	H2016/H2022	H2017/H2022	H2018/H2022	H2019/H2022
H1145/H2023	H2016/H2023	H2017/H2023	H2018/H2023	H2019/H2023
H1145/H2026	H2016/H2026	H2017/H2026	H2018/H2026	H2019/H2026

Fuente: Autor, 2020

Anexo 4. Fotografías

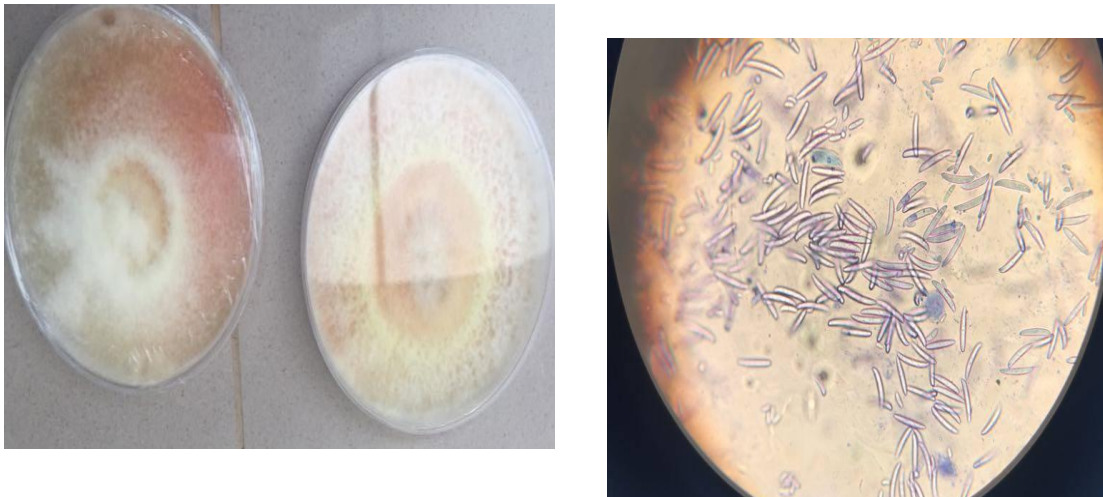


Imagen 5. Aislamiento del hongo *F. oxysporum* siembra directa en medio PDA.



Imagen 6. Inoculación de *M. incognita* dos semanas antes de la inoculación de *F. oxysporum*



Imagen 7 Inoculación del sustrato con clamidosporas de *F. oxysporum*



Imagen 8. Crecimiento de las especies a lo largo del experimento