

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

Evaluación de resistencia a la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* en una población segregante de la cruce entre *Solanum quitoense* y *Solanum lasiocarpum*

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniero
Agrónomo


Autores:

Oscar Andrés Ramírez Bermeo

Liz Lorena Campos Urgilez

Director:

Patricio Salvador Castro Quezada

ORCID:  0000-0002-2366-2256

Cuenca, Ecuador

2024-05-08

Resumen

El cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) representa uno de los rubros económicos más importantes para una gran parte de comunidades del Ecuador. Este cultivo se ve limitado principalmente por la afección de ciertos patógenos como los nematodos *Meloidogyne incognita* junto con el hongo *Fusarium oxysporum*, los cuales son causantes del deterioro en el desarrollo de las plantas ya establecidas en campo. Debido a esta razón, en el siguiente estudio se tiene como objetivo evaluar una población de segregantes de la cruce entre *S. quitoense* y la especie silvestre *S. lasiocarpum* reportada como resistente a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*, para determinar el nivel de daño y evaluar marcadores moleculares microsatélites y RGAs. Esta investigación se realizó en dos etapas: una etapa de invernadero en la que se evaluaron los segregantes infectados con patógenos a los 90 días en donde se analizaron los daños a nivel morfológico; y, una etapa en el laboratorio de Biotecnología de la facultad de Ciencias Agropecuarias, en la que se probaron diferentes combinaciones de primers asociados a la resistencia en otras solanáceas. Con respecto a la primera fase se realizó inoculaciones en 12 poblaciones (10 segregantes, *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*). Para lo cual se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial de 4x12, con cuatro 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 las 10 poblaciones segregantes resultado del cruce entre *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*. De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo observar que ciertos segregantes y el parental *S. lasiocarpum* obtuvieron los mejores resultados ya que presentaron diferencias significativas en comparación a *S. quitoense*, resultando este último susceptible en comparación a las demás poblaciones. En cuanto al análisis molecular, no se observó amplificaciones con los cebadores empleados para la PCR.

Palabras clave del autor: cultivo de naranjilla, agronomía, marchitez vascular, marcadores moleculares, microsatélites, genes de resistencia



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The cultivation of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) represents one of the most important economic activities for a large number of communities in Ecuador. This crop is limited mainly by the affection of certain pathogens such as the nematodes *Meloidogyne incognita* together with the fungus *Fusarium oxysporum*, which are responsible for the deterioration in the development of the plants already established in the field. For this reason, the following study aims to evaluate a population of segregants of the cross between *S. quitoense* and the wild species *S. lasiocarpum* reported as resistant to the interaction between *M. incognita* and *F. oxysporum*, to determine the level of damage and to evaluate microsatellite molecular markers and RGAs. This research was carried out in two stages: a greenhouse stage in which the segregants infected with pathogens were evaluated after 90 days, where damage was analyzed at the morphological level; and a stage in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, in which different combinations of primers associated with resistance in other solanaceae were tested. The first phase involved inoculations in 12 populations (10 segregants, *S. quitoense* and *S. lasiocarpum*). A completely randomized design (CRD) was used in a 4x12 factorial arrangement, with four replications. The second phase was carried out in the laboratory where SSR and RGA molecular markers associated with resistance were analyzed for both the parents and the 10 segregating populations resulting from the cross between *S. quitoense* and *S. lasiocarpum*. According to the results obtained, it was observed that certain segregants and the parental *S. lasiocarpum* obtained the best results, since they showed significant differences compared to *S. quitoense*, the latter being susceptible compared to the other populations. As for molecular analysis, no amplifications were observed with the primers used for PCR.

Author Keywords: orange blossom cultivation, agronomy, vascular wilt, molecular markers, microsatellites, resistance genes



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	11
1. Objetivos	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.	13
2. Hipótesis.....	14
3. Revisión bibliográfica.....	15
3.1 Generalidades sobre la familia Solanaceae.....	15
3.2 <i>Solanum quitoense</i> Lam.	15
3.3 <i>Solanum lasiocarpum</i>	16
3.4 <i>Meloidogyne incognita</i>	17
3.5 <i>Fusarium oxysporum</i>	17
3.6 Interacción entre <i>M. incognita</i> y <i>F. oxysporum</i>	18
3.7 Resistencia genética de las plantas.....	19
3.7.1. Mecanismo de resistencia: Respuestas de defensa de las plantas	19
3.8 Marcadores moleculares utilizados en el mejoramiento genético	20
3.8.1. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)	20
3.8.2. Genes de Resistencia Análogos (RGAs)	21
4. Materiales y métodos.....	22
4.1 Área de Estudio: Ubicación geográfica.	22
La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología e invernaderos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, ubicada en sector Yanuncay a una altura aproximada de 2567 m.s.n.m. con una temperatura ambiental entre 15-17 °C y una precipitación de 878 mm.....	
4.2 Materiales.....	23
Actividades y materiales	23
4.3 Métodos.....	23
4.3.1. Metodología para el objetivo específico 1	23
4.3.1.1. Obtención de las plántulas.....	23
4.3.1.3. Obtención del patógeno <i>M. incognita</i>	24
4.3.1.4. Inoculación de los fitoparásitos en las plántulas.	25

4.3.1.5. Variables a ser evaluadas para determinar resistencia a la interacción entre <i>F. oxysporum</i> y <i>M. incognita</i>	25
4.3.1.6. Diseño experimental.	27
4.3.1.7. Análisis estadísticos.....	29
4.3.2. Metodología para el objetivo específico 2 (Fase de laboratorio).	29
4.3.2.1. Material vegetal.	29
4.3.2.2. Extracción del ADN.	29
4.3.2.3. Cuantificación de ADN.....	29
4.3.2.4. Caracterización molecular.....	30
5. Resultados.	31
Nota: $p > 0.05$ indica normalidad y homogeneidad de varianzas.	32
5.1 Análisis fenotípico de la resistencia a la interacción entre <i>F. oxysporum</i> y <i>M. incognita</i> (Fase invernadero).....	32
5.1.1. Biomasa acumulada de la zona foliar.	32
5.1.2. Biomasa acumulada de la zona radicular.....	33
5.1.3. Grado de afección de las agallas.....	34
5.1.4. Longitud de la parte radicular	36
5.1.5. Altura del tallo	37
5.1.6. Diámetro del tallo.	38
5.1.7. Severidad de la marchitez.	39
5.1.8. Incidencia.	41
5.1.9. Grado decoloración vascular.....	41
5.2 Análisis de diversidad molecular para genotipos parentales <i>Solanum quitoense</i> , <i>Solanum lasiocarpum</i> y <i>Solanum sp.</i>	44
6. Discusión.....	45
7. Conclusiones	47
8. Recomendaciones	48
9. Referencias	49
10. Anexos.....	56

Índice de figuras

Figura 1: Ubicación del proyecto.	22
Figura 2. Peso seco foliar en gramos de las diferentes especies.	33
Figura 3. Peso seco radicular en gramos de las diferentes especies.	34
Figura 4. Nódulos en las raíces de naranjilla; A) Nódulos en <i>S. quitoense</i> , B) Nódulos en <i>s. lasiocarpum</i> , C) Nódulos en el segregante S5 que no presento infección.	35
Figura 5. Efecto de los tratamientos en el número de agallas.	36
Figura 6. Longitud de área radicular de las diferentes especies.	37
Figura 7. Altura en milímetros de las diferentes especies.	38
Figura 8. Diámetro en milímetros de las diferentes especies.	39
Figura 9. Efecto de los tratamientos en la severidad de la marchitez.	40
Figura 10. Severidad de la marchitez de las diferentes especies.	40
Figura 11. Niveles de incidencia de las diferentes especies.	41
Figura 12. <i>S. lasiocarpum</i> con grado de decoloración vascular intermedia en raíz y tallo... ..	42
Figura 13. <i>S. quitoense</i> con grado decoloración intermedio de raíz y tallo.	43
Figura 14. Niveles de incidencia de las diferentes especies.	44

Índice de tablas

Tabla 1. Materiales para utilizar por cada actividad	23
Tabla 2. Escala para evaluar la presencia de agallas en las plantas causada por <i>M. incognita</i>	25
Tabla 3. Escala para evaluar el nivel de severidad de la marchitez vascular causada por <i>F. oxysporum</i>	26
Tabla 4. Escala para evaluar el grado decoloración de la marchitez vascular causada por <i>F. oxysporum</i> al final del experimento	27
Tabla 5. Diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial 4x12 de los tratamientos realizados.	28
Tabla 6. Marcadores microsatélites y RGAs, que son basados en PCR.	30
Tabla 7. Valores de los supuestos de la estadística descriptiva.	32
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable peso seco foliar.	32
Tabla 9. Análisis de varianza para la variable peso seco radicular.	33
Tabla 10. Clasificación de las especies mediante el índice de severidad.	35
Tabla 11. Análisis de varianza para la variable longitud de área radicular.	36
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable altura.	37
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable diámetro.	38
Tabla 14. Efecto de los tratamientos en el grado de decoloración.	42

Agradecimientos

Agradecemos a nuestro director Ing. Patricio Castro Quezada PhD. Por su gran contribución, dedicación y todo el apoyo brindado para la realización de esta investigación. A la Universidad de Cuenca por habernos permitido formarnos en sus aulas, a los docentes y compañeros que participaron de alguna forma en el desarrollo de este estudio. De forma especial también a los Ing. Walter Larriva, Ing. Eduardo Chica e Ing. Mélida Rocano por formar parte de este trabajo.

Por ultimo y no menos importante un agradecimiento a nuestras familias y amigos por el apoyo al realizar esta investigación, por alentarnos a no rendirnos jamás a pesar de las malas circunstancias.

Liz Campos - Andrés Ramírez.

Dedicatoria

Dedico esta tesis de manera especial a mis padres; Blanca Bermeo y Rosendo Ramírez, quienes han sido mi modelo a seguir, gracias a su apoyo incondicional. A mis hermanos Diana, Patricia, Francisco, Johanna y María por apoyarme en cada paso. A mi pareja Pamela Cedeño quien sin su apoyo no hubiese podido lograr culminar esta etapa.

A la memoria de: Miguel Francisco Ramírez López quien gracias a sus consejos me enseñó a nunca rendirme. Y de Víctor Daniel Brito Guamán por ser mi amigo y compañero en nuestra etapa universitaria, aunque ya no estés, te llevo siempre en mi corazón.

Oscar Andrés Ramírez Bermeo.

El presente trabajo quiero dedicar principalmente a mi familia; mi esposo, padres, hermanos e hijos, con su ayuda y apoyo incondicional pude concluir esta etapa importante de mi vida.

Especialmente a mi hijo Thiago Fabricio Arbito Campos ya que él siempre fue mi impulso y motor para continuar el día a día, mi compañero de estudios y noches de desvelo.

Liz Lorena Campos Urgilez.

Abreviaturas y simbología

PCR: Reacción en la cadena de la polimerasa.

SSR: Secuencias simples repetidas.

RGAs: Genes de Resistencia Análogos

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.

Introducción

La naranjilla (*Solanum. quitoense* Lam) es una solanácea de origen andino, perteneciente a la sección Lasiocarpa, es un frutal originario de América del Sur, distribuida principalmente en Colombia, Ecuador y Perú (Gallo et al., 2021). Es una especie arbustiva, perenne, que produce frutas frescas para el consumo, o también sirve para la preparación de derivados tales como helados, mermeladas, conservas, etc. (Green et al., 2018). El fruto de la naranjilla tiene gran demanda en los mercados nacionales e internacionales y locales (Andrade et al., 2015). En Ecuador, la naranjilla es cultivada en su mayoría en la zona Oriental; siendo un cultivo muy representativo para los productores amazónicos, los cuales obtienen un rendimiento relativamente bajo (3.56 t/ha). El principal motivo de este bajo rendimiento es debido a problemas fitosanitarios (Castro & Herrera, 2019).

En Colombia, para el cultivo de *S. quitoense*, los principales problemas son *F. oxysporum* y *M. incognita*. Estos patógenos han producido problemas fitosanitarios graves, lo que ha obligado a muchos productores a abandonar el cultivo, presentando una gran pérdida en las plantaciones, o trasladar el cultivo a otras zonas, donde la adaptación no es la adecuada (Criollo & Muñoz, 2020).

Una de las principales plagas que causan daños en la naranjilla es el nematodo agallador de la raíz (*M. incognita*). Este puede ocasionar hasta el 100% de pérdidas del cultivo en las fases fenológicas más importantes de cosecha (Revelo, et al., 2010). El nematodo agallador encuentra hospedaje, alimentación y nutrición en la naranjilla en la parte radical de las plantas. Al establecerse en el cultivo las poblaciones del nematodo crecen rápidamente, lo que lleva a grandes daños en el crecimiento, reproducción y la calidad de los frutos en la cosecha (Bermeo, 2015). Este también produce síntomas como agallas en las raíces, afectando directamente a la absorción de nutrientes del suelo, causando efectos negativos en las partes aéreas de la planta (Salazar & Betancourth, 2017). El nematodo agallador dentro de la familia de las Solanáceas, genera pérdidas económicas hasta de un 47% (Curimilma, 2015). Para los productores de la zona la forma más accesible de controlar el ataque del

nematodo agallador, ha sido mediante el uso de químicos, afectando directamente al suelo, aire y agua (Duarte, 2015).

Para disminuir el impacto de las plagas se ha realizado un proceso de mejora genética, utilizando marcadores moleculares, en donde los híbridos obtenidos, tienen como resultado resistencia a diferentes plagas y enfermedades, pero la calidad de su fruto ha disminuido. En la constante búsqueda, se ha encontrado una variedad resistente a nematodos la cual es *S. lasiocarpum*, donde se inició la transferencia de genes, obteniendo nuevos híbridos, con resistencia a nematodos y buena calidad de fruto (Morales et al., 2008). Entre los marcadores moleculares utilizados en naranjilla tenemos a los microsatélites conocidos como SSRs ("Simple Sequence Repeats") (Weising et al. 1989) y Genes de Resistencia Análogos o (RGAs). Los RGAs se han convertido en marcadores eficientes de caracteres de resistencia controlados por genes cuantitativos (QTLs) (Peña & Páez, 2011). La ventaja 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 (Hurtado, 2004).

1. Objetivos

Objetivo General.

Evaluar una población de segregantes de la cruce entre *S. quitoense* y *S. lasiocarpum* para la resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*.

Objetivos Específicos.

- Determinar el nivel de daño de la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* en segregantes de la cruce *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*.
- Identificar marcadores moleculares RGA y microsatélites, posiblemente ligados a la resistencia en plántulas a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* de la población de segregantes.

2. Hipótesis

H0: Ningún segregante de la cruce entre *S. quitoense* L. y *S. lasiocarpum* presenta resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*.

H1: Al menos un segregante de la cruce entre *S. quitoense* L. y *S. Lasiocarpum* se presenta resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*.

3. Revisión bibliográfica

3.1 Generalidades sobre la familia Solanaceae.

La familia Solanaceae se encuentra ubicada en el orden Solanales. Esta familia posee aproximadamente 96 géneros y 2,300 especies (Cuevas et al., 2008) y está presente en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Se pueden encontrar en un rango altitudinal desde los 0 a 4200 m.s.n.m.; y, son especies por lo general arbustivas con distribución cosmopolita. En el Ecuador se ha podido registrar una gran cantidad de especies (se han registrado 362) de las cuales 67 de ellas son endémicas (Cárdenas, 2009).

3.2 *Solanum quitoense* Lam.

S. quitoense Lam, es una especie arbustiva que se originó en América del Sur. Su fruta es la parte más importante, ya que con esta se realiza la preparación de jugos, bebidas, néctar, helados y concentrados de frutas (Gallo et al., 2021). *S. quitoense*, pertenece a la familia Solanaceae. Su morfología consiste en una raíz principal pivotante hasta de 50 cm, con varias raíces secundarias, un tallo erecto, con ramificaciones desde el suelo, robusto, cilíndrico, veloso y por lo general de color verde, sus hojas miden de 30 a 40 cm de largo, alternas, con una forma ovalada, presentan vellosidades, bordes ondulados. Sus flores son hermafroditas, los frutos son esféricos, de color amarillo o rojizo, son de aspecto liso y resistente, con pilosidad, la pulpa interna es verde, con un sabor agridulce (Revelo, et al., 2010). La naranjilla es un fruto climatérico, en la maduración de frutos, se dan cambios como el color, forma, textura, entre otros (Andrade et al., 2015).

Para el correcto desarrollo y formación de la fruta es importante las condiciones ambientales en la cual se encuentra (Ramirez et al., 2018). Se cultiva en las zonas subtropicales de Ecuador, donde existen precipitaciones altas, con una humedad relativa de 78 a 92%, deben de tener una buena exposición solar, no resisten lugares con alta frecuencia de vientos (Revelo, et al., 2010).

La naranjilla se reconoce como un frutal de gran aceptación en el mercado nacional e internacional. Este frutal se cultiva en la región Amazónica ocupando aproximadamente un

93.2% del área, presenta bajo rendimiento por los problemas fitosanitarios lo que representa 3.56 t/ha (Castro & Herrera, 2019). Esta especie en Ecuador se distribuye en las estribaciones externas de la cordillera y llanura amazónica: Baños, Baeza, valle del río Quijos, Reventador, Puyo, Archidona, Loreto, Lago Agrio, Sucúa, Zamora, Lita, Nanegalito, Los Bancos, Chiriboga, Pallatanga. En el Ecuador se encuentran las diferentes variedades tales como "Híbrido Puyo", "Baeza", "Bola", "Septentrional", entre otras (Andrade et al., 2015).

Esta especie es susceptible a diferentes insectos, enfermedades, nematodos, oomicetos (Gallo et al., 2021). Por lo tanto, es importante que se realicen procesos de hibridación, para que como resultado se puedan obtener plantas resistentes a los distintos problemas fitosanitarios que afectan a su desarrollo (Ramírez et al., 2018). Entre las afecciones fitosanitarias, que causan daño al cultivo de la naranjilla, los nematodos son considerados difíciles de identificar, por lo cual es muy común el uso de marcadores genéticos. El género *Meloidogyne* tiene la capacidad para producir diferentes cambios fisiológicos en el sistema radical de las plantas (Jaramillo et al., 2015).

La incidencia de estos nematodos en el cultivo de *S. quitoense*, es notable ya que ocasiona agallas en las raíces, de tal manera que disminuye la absorción de los nutrientes, produciendo falta de vigor, clorosis en hojas viejas y marchitez, afectando al 80% de la planta (Salazar & Betancourth, 2017). Al momento de la infestación de los nematodos en las plantas, estas no reaccionan a la fertilización que se aplica en el suelo (Montes et al., 2010).

3.3 *Solanum lasiocarpum*.

Las especies que pertenecen a la sección lasiocarpa, se encuentran ubicadas por lo general en el medio silvestre y contienen frutos comestibles (Vilas et al., 2013). Esta especie está presente en altitudes tanto bajas y medianas, de 0-1000 msnm, se encuentra en bosques, sitios perturbados y matorrales (Bohs, 2013). *S. lasiocarpum* es una especie perenne, erectas, liviana con una altura aproximada de 1 a 2 m, sus tallos son esencialmente sésiles. Las hojas son simples de forma ovadas, textura fina, pubescente, los pelos variables, margen dentado. Las inflorescencias son cortas, no ramificadas, articuladas en la base. Sus frutos son globosos, anaranjados cuando maduran, con pelos estrellados sésiles con puntos medios alargados 1.5 a 4 mm de largo, estos pelos están insertados en la base del tricoma, los mismos que persisten en la madurez (Bohs, 2013).

3.4 *Meloidogyne incognita*.

M. incognita, es un nematodo que ataca a todas las variedades de naranjilla existentes y cultivadas dentro del Ecuador, pudiendo causar hasta el 100% de pérdidas en el cultivo, una vez que llega a las raíces de la planta, el ataque afecta intensamente en el periodo de floración a comienzos de la fructificación. Esta especie de nematodo tiene un amplio rango de hospederos, por lo cual, si existe rotación de cultivo, puede establecerse en las malezas y aprovechar de los hospederos susceptibles (Revelo et al., 2010). La presencia de *M. incognita*, ocasiona pérdidas aproximadamente del 50%, en los cultivos de Solanáceas (Betancourt et al., 2012); en esta familia existen especies que son silvestres y son resistentes al ataque de *M. incognita*, mientras que *S. quitoense* y *S. betaceum* han demostrado ser susceptibles a su ataque (Navarrete et al, 2018).

M. incognita, es un género polífago de nematodos endoparásitos biotrofos que infectan a una variedad de especies vegetales superiores y tiene una distribución cosmopolita (Elling, 2013). Mientras que Rivera et al. (2020) ratifican que *M. incognita*, es endoparásita sedentaria y su ciclo biológico inicia con un huevo, continúa hasta que se desarrolla el primer estado juvenil (J1).

El estado infectivo es el estado juvenil (J2), en donde busca una zona apical no diferenciada, se mueve intracelularmente hasta encontrar un sitio de alimentación cerca del cilindro vascular. Al momento que se encuentra en la ubicación exacta de la raíz, este induce la formación de las células gigantes multinucleadas y altamente especializadas, en estos lugares donde el nematodo se estableció se produce hipertrofia e hiperplasia celular lo que origina la agalla o nódulo. Luego de algunas mudas la hembra globosa empieza a ovipositar cientos de huevos en una masa gelatinosa. Mientras que los machos abandonan la raíz (Rivera et al., 2020).

3.5 *Fusarium oxysporum*.

F. oxysporum es un patógeno que habita comúnmente en el suelo, el cual su manejo y control ha resultado difícil, en donde, una vez que se establece en el suelo, puede permanecer por largos periodos de tiempo (Vásquez & Castaño, 2017). Las condiciones adecuadas para que se desarrolle el hongo, se da con una temperatura que oscila entre 15 a 30 °C; en condiciones desfavorables como las temperaturas demasiado altas o bajas, sequía extrema o ausencia del hospedero, el patógeno forma esporas resistentes que pueden permanecer

inactivas durante mucho tiempo en el suelo, hasta cuando nuevamente se establece un cultivo susceptible en el predio, el cual puede activarse cuando encuentra las condiciones adecuadas y causar infección (Montes et al., 2010).

Las características morfológicas de *F. oxysporum* se presentan como, microconidios de forma globosa, oval y elíptica, usualmente no septados; en los macroconidios tienen una longitud corta a media, en forma de bote, ligeramente curvados a casi recto que se van estrechando gradualmente hacia ambos extremos. La célula apical de los macroconidios es en forma de gancho o ligeramente puntiaguda (Castro et al., 2018). Comprende una multitud de cepas que causan enfermedades de marchitez vascular en cultivos de importancia económica (Gordon, 2017).

Algunas de las especies silvestres de Solanáceas, pueden presentar resistencia y tolerancia hacia el ataque de la marchitez vascular (Morales et al., 2014). Una de las técnicas que se utiliza para el control de esta enfermedad, es el uso de variedades resistentes en las cuales se encuentran; *S. sessiliflorum*, *S. pseudolulo*, *S. candidum*, *S. hirtum*, *S. stramonifolium*, *S. pectinatum*, *S. hyporodum*, *S. vestissimum* y *S. felinum*, estas especies pertenecen a la sección Lasiocarpa del género *Solanum*. A partir de estas especies se han realizado cruces con naranjilla en donde se han obtenido híbridos resistentes como es el caso de INIAP - Palora, Puyo y Espinudo. Siendo estos híbridos resultantes del cruce entre *S. quitoense* y *S. sessiliflorum* (Castro & Herrera, 2019).

En los cultivos de *S. quitoense* en el Ecuador, la marchitez vascular es la enfermedad que con más severidad ataca a este cultivo causando el 80% de pérdidas (Castro, et al., 2018). *F. oxysporum* es reportado como el principal agente causante de la enfermedad de marchitez vascular o fusariosis, pero se desconoce si interactúa con otro patógeno para causar la enfermedad (Castro & Herrera, 2019).

3.6 Interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum*.

La interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* en *S. lycopersicum* aumenta la severidad de la infección, esto se debe al aumento de una mayor tasa de penetración de juveniles de *M. incognita*, dando como resultado una mayor acción del patógeno en cuanto al proceso infectivo, pudiendo observarse de manera significativa los cambios en los estados físicos de la planta como la reducción de la altura de la planta, longitud de raíz, peso de los brotes, ya que *M. incognita*, permite una penetración más eficiente por parte de *F. oxysporum* (Kassie et al., 2020).

En un estudio realizado por Meena, et al., (2015) nos indican que la interacción entre estos dos patógenos afecta de manera similar al género *Gerbera* y a las Solanáceas, indicando que en la intervención de los mismos afectan directamente al desarrollo de la planta de manera que al momento de establecerse *M. incognita* aumenta los daños por parte de *F. oxysporum*, como es el marchitamiento y crecimiento de las plantas, las mismas que afectan de forma inmediata a las raíces. Por su parte Palomares, (2009) menciona que el momento de mayor impacto en la planta huésped es cuando los patógenos penetran en la misma, además menciona que en algunas interacciones entre hongos y nematodos se ha demostrado que el parasitismo por el nematodo reduce o bloquea la síntesis de compuestos defensivos de la planta frente a infecciones fúngicas.

3.7 Resistencia genética de las plantas.

Las plantas están continuamente expuestas al ataque de una amplia variedad de microorganismos tales como virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos, pero, con el paso del tiempo las mismas han generado resistencia a una gran variedad de patógenos. Dicha resistencia no es más que la capacidad que la planta genera para evitar la proliferación de patógenos. Esta resistencia es heredada por los parentales que genéticamente han ido evolucionando hasta generar un mecanismo el cual es encargado de suprimir o retardar la invasión de un patógeno potencial. Los huéspedes se defienden de los patógenos a través de mecanismos físicos y químicos que han adquirido durante el proceso evolutivo (Robinson, 1969).

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

Las plantas han logrado adaptarse a las diferentes condiciones ambientales, tanto bióticas como abióticas, estas adaptaciones permitieron proliferarse de manera positiva (Gómez et al., 2011). Una de estas adaptaciones que las plantas han logrado está asociada a un tipo de respuesta que se clasifica en dos categorías; un primer sistema de defensa llamado constitutiva o preexistente y otro de respuesta de tipo inducible (Lu et al., 2018).

La defensa constitutiva o preexistente ya sean físicas o bioquímicas, es la resistencia que está asociada a condiciones preexistentes en la planta las cuales están siempre expresadas en un nivel basal. Este tipo de defensa presenta varias características preformadas como; paredes celulares, cutículas epidérmicas cerosas y la corteza. Estas características que tiene la planta son llamadas respuestas no activas, ya que estas están presentes estén o no ante ataque de un patógeno. Por otra parte, tenemos a las defensas constitutivas activas, las cuales están compuestas por ciertas sustancias que son resultantes

del metabolismo secundario de las plantas. Estos son sintetizados de forma constante por la planta y ofrecen defensa al ataque de patógenos (Lu et al., 2018).

Los mecanismos de defensa inducibles requieren sistemas de percepción de microorganismos invasores que permitan activar los genes implicados en la respuesta defensiva. Cuando las defensas preformadas son superadas, las plantas activan ciertas moléculas denominadas PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) e 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 & Cosio, 2005).

3.8 Marcadores moleculares utilizados en el mejoramiento genético

La información genética que posee cada individuo es determinada por su genotipo y se refiere a la totalidad de su información genética o parte de ella. Cada locus involucrado en la expresión del fenotipo representa el conjunto de genes presente en el locus tanto para regiones de ADN codificantes y no codificantes (Bergmann et al., 1989). Actualmente el uso de marcadores moleculares ha permitido la identificación de los agentes causales de plagas y enfermedades en el cultivo de naranjilla, siendo esta técnica efectiva, en ciertos casos presenta una ventaja debido a que la identificación morfológica es difícil de realizar (Castro et al., 2021).

3.8.1. Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR)

Los microsatélites, conocidos como SSRs ("Simple Sequence Repeats") o STRs ("Short Tandem Repeats"), son secuencias cortas de DNA constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. En genomas eucariontes son frecuentes estas secuencias cortas, arbitrariamente están mejor distribuidas, constituyen la clase más polimórfica de marcadores moleculares (Ferreira, et al., 1998).

Los marcadores microsatélites son regiones de secuencias cortas de ADN de dos a 10 pares de bases, distribuidas amplia y uniformemente por todo el genoma, especialmente en la mayoría de los eucariontes. La existencia de marcadores microsatélites en plantas había sido sugerida cuando se observó que oligonucleótidos compuestos por elementos repetidos de tipo TG y GATA/GACA, mostraban polimorfismo cuando se utilizaban como sonda RFLP (Weising et al., 1989).

Una búsqueda en bancos de datos de secuencia de ADN publicadas reveló que los sitios microsatélites están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil

pares de bases. Su frecuencia se constató en 34 especies vegetales, siendo el elemento repetido más común el dinucleótido AT (Morgante & Olivieri. 1993).

Los primers microsatélites son eficientes para obtener resultados en cuanto a la resistencia de la interacción entre *F. oxysporum* y *M. incognita*, ya que se puede observar polimorfismo en el parental *S. hirtum*, lo cual indica que de los ocho primers utilizados en dos de ellos se pudo obtener amplificación de los genotipos estudiados (Reyna, E. 2020).

3.8.2. 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 análisis de loci de caracteres cuantitativos QTLs (Peña & Páez, 2011). La base teórica para identificar RGAs, surge del conocimiento generado en los últimos años de la secuencia nucleotídica de varios genes R de resistencia a enfermedades. En estos genes R, se han encontrado homologías significativas en sus secuencias de ADN (motivos) y de aminoácidos. Las clases más abundantes de genes R codifican las proteínas que contienen en la parte central un sitio conformado con secuencias que unen nucleótidos (nucleotide binding site: NBS) y en el extremo carboxilo, un sitio de secuencias repetidas que codifican para varias leucinas (leucine rich repeats: LRR), formando un gen R del tipo NBS-LRR (Grant et al., 1995).

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 (Hurtado, 2004).

Los primers RGAs son más eficientes al momento de obtener resultados de polimorfismo ya que en las bandas evaluadas fueron más evidentes dicho polimorfismo que con los primeros microsatélites en *S. hirtum* (Reyna, 2020).

4. Materiales y métodos.

4.1 Área de Estudio: Ubicación geográfica.

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología e invernaderos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, ubicada en sector Yanuncay a una altura aproximada de 2567 m.s.n.m. con una temperatura ambiental entre 15-17 °C y una precipitación de 878 mm.

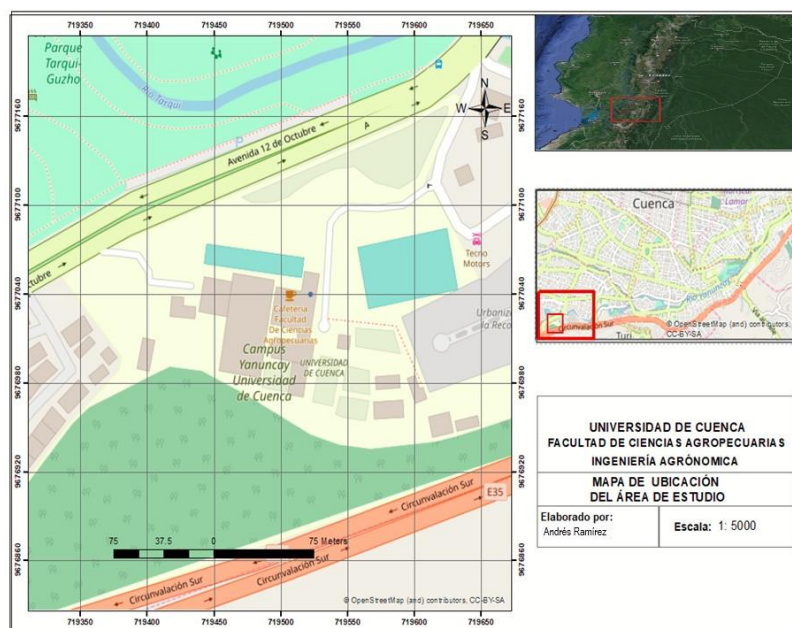


Figura 1: Ubicación del proyecto.

4.2 Materiales

Actividades y materiales

Tabla 1. Materiales para utilizar por cada actividad

Biológicos	Físicos	De laboratorio
<ul style="list-style-type: none"> - Plántulas de <i>S. quitoense</i>, <i>S. lasiocarpum</i> y <i>Solanum</i> sp. - ADN de los segregantes de la crucea <i>S. quitoense</i> x <i>S. lasiocarpum</i> y Parentales - Cepa de hongo <i>F. oxysporum</i> - Cepa de nematodo <i>M. incognita</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Sustrato estéril - Fundas plásticas - Libreta de campo - Rótulos de identificación - Calibrador 	<ul style="list-style-type: none"> - Cajas Petri. - Cámara de Neubauer - Tubos de ensayo - Mechero de alcohol - Microscopio óptico. - Pipeta graduada. - Tamices de 100, 200 y 500 - Puntas para micropipeta - Erlenmeyer - Bisturí - Estufa. - Licuadora. - Estereoscopio.
Equipos	Reactivos	Programas
<ul style="list-style-type: none"> - Cámara de flujo - Vórtex - Balanza analítica - Incubadora - Refrigeradora - Centrifugadora - Termociclador - Cámara de electroforesis - Autoclave & Agitador 	<ul style="list-style-type: none"> - Agar Papa y Dextrosa (PDA) - Cloro - Gel de agarosa - Agua destilada - Marcadores moleculares - Microsatélites y RGAs (primers) - Tampón de extracción, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> - Infostat - Software estadístico R - Software Excel - Google earth

4.3 Métodos

4.3.1. Metodología para el objetivo específico 1

4.3.1.1. Obtención de las plántulas

Las plántulas se obtuvieron de semillas de una población segregante entre *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*. Para la siembra el sustrato a utilizar fue una mezcla de tierra negra, suelo franco y bocashi en proporción 40:40:20, el cual previamente fue homogenizado y esterilizado usando la técnica de pasteurización con vapor de agua a 100°C durante 120 minutos tiempo estimado para la eliminación de patógenos. En los semilleros se realizó de dos a tres riegos mínimos por semana y fertilización cada 15 días. Al momento que dichas plantas alcanzaron unos 5 a 8 cm de alto, se procedió al trasplante en bolsas de 1 kg, con el mismo sustrato usado para la germinación.

4.3.1.2. Obtención del patógeno *F. oxysporum* y preparación de sustrato con clamidosporas

La cepa de *F. oxysporum* fue proporcionada por el Ing. Patricio Castro y la Ing. Adriana Tenesaca, docentes de la Carrera de Ing. Agronómica, el mismo que se obtuvo de trabajos previos realizados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

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 (PDA), el cultivo permaneció en agitación constante por 15 días para luego ser homogenizado en una licuadora durante 10 seg con la finalidad de obtener clamidosporas. Seguido de esto con una jeringuilla se inoculó 50 ml de este medio con inóculo en fundas 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).

4.3.1.3. Obtención del patógeno *M. incognita*.

Las cepas de *M. incognita* se obtuvieron mediante la recolección en campo de plantas infectadas. Para la obtención del inóculo, se extrajo el material vegetativo de las raíces las que previamente fueron evaluadas y presentaron síntomas de agalladuras, se utilizó la técnica del hipoclorito de sodio; las raíces infectadas se cortaron en trozos con un espesor no mayor a 3 mm. Posterior a ser cortados los trozos se colocaron aproximadamente 10 gramos de material vegetal en un vaso de licuadora, lo que se licuo con una solución de NaClO al 0.5% por aproximadamente 1 minuto. La suspensión resultante fue filtrada a través de diversos tamices concluyendo con el tamiz de 10 micras. Finalmente se debe lavar, todo esto para eliminar el NaClO, el material retenido en el último tamiz se debe colocar en un recipiente de vidrio de 2000 ml. Este proceso fue replicado con todas las plantas obtenidas en campo. Posteriormente se realizó el conteo de la población de nematodos (Crozzoli et al., 2012).

4.3.1.4. Inoculación de los fitoparásitos en las plántulas.

La inoculación de patógenos se realizó después de 20 días del trasplante en las bolsas, todo esto bajo condiciones controladas (invernadero). Los tratamientos a los que se realizará la inoculación fueron: 1) *F. oxysporum*; 2) *M. incognita*; 3) *F. oxysporum* + *M. incognita*; 4) Testigo.

La inoculación de *M. incognita* se realizó calibrando la población inicial (P_i) del nematodo a 1000 huevos + J2/planta (Pacheco, 2019). Con una pipeta se inocularán directamente cerca del sistema radicular de las plántulas realizando cuatro hoyos siguiendo el sistema cardinal a 2 cm de profundidad y a 2 cm de distancia del tallo. Luego de ello, a los 90 días que finalizó la investigación se procedió a determinar la severidad e incidencia del patógeno (Crozzoli, et al., 2012).

La fuente de inóculo de *F. oxysporum* obtenida 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 de *F. oxysporum* se realizó cortes de 1 cm en el ápice de las raíces de las 12 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.

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

Para comparar las variables se evaluaron los parentales, plantas en segregación de la cruce entre *S. quitoense* y *S. lasiocarpum* y las plantas testigo. Las variables evaluadas fueron:

Presencia de agallas: En el laboratorio, se cuantificó el número de agallas y con el resultado de la misma se determinó el índice de agallas mediante la escala propuesta por Ramos et al., (1998). para *M. incognita* (Tabla 2).

Tabla 2. Escala para evaluar la presencia de agallas en las plantas causada por *M. incognita*.

Grado de afección.	No. de Agallas.	Calificación
0	0	Libre

1	1 a 10	Baja
2	11 a 30	Moderada
3	31 a 75	Alta
4	> 75	Muy alta.

Fuente: Ramos et al., (1998).

Altura y diámetro del tallo: Con la ayuda de una regla milimetrada, se tomó la altura medida desde el nivel del sustrato hasta donde culmina la yema apical; con la ayuda de un calibrador se tomó el diámetro a 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: Para determinar la biomasa acumulada se tomó 5 plantas por especie, se separó la parte aérea y radical, se colocó las partes de plantas en una funda de papel, y en un horno se las deshidrataron a 65°C durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se pesó el tejido de cada parte en una balanza analítica.

Incidencia: Para determinar el porcentaje de incidencia en las plantas se empleó la fórmula propuesta por Gómez. et al., (2011).

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

Dónde: IE= Incidencia de los patógenos.

Grado de severidad de la marchitez: para determinar el grado de severidad de la marchitez en las plántulas se utilizó una escala propuesta por Estupiñán & Ossa, (2007), la cual trata de evaluar cuantitativamente el nivel de marchitez vascular de las plantas (Tabla 3).

Tabla 3. 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: Estupiñan y Ossa, (2007).

Grado de decoloración vascular: Esta variable fue evaluada al final del experimento, ya que las plántulas fueron retiradas de las fundas, y los haces vasculares seccionados transversamente para evaluar la decoloración y necrosis del tallo de las plantas; para determinar el porcentaje de decoloración en el tallo se tomó como referencia la escala propuesta por Estupiñan & Ossa, (2007). (Tabla 4).

Tabla 4. Escala para evaluar el grado decoloración de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* al final del experimento

Grado	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: Estupiñan y Ossa, (2007).

4.3.1.6. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial de 4x12, con cuatro repeticiones, en donde los tratamientos fueron las combinaciones de 4 tratamientos de inoculación (solo inoculación con *F. oxysporum*, sólo inoculación con nematodos, ambos patógenos y un testigo) y 12 poblaciones (10 segregantes, *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*). La especie *S. lasiocarpum* se utilizó como testigo resistente y la especie *S. quitoense* se empleó como testigo sensible. La unidad experimental estuvo conformada por una planta contenida en una funda con sustrato de 1 kg, obteniendo así 192 unidades experimentales (Tabla 5).

Tratamientos: 4x12 (48)

Repeticiones: 4

Factor 1 (tratamiento de inoculación): Factor 1: *F. oxysporum* + *M. incognita*, Factor 2: *M. incognita*, Factor 3: *F. oxysporum*. Factor 4: Testigo.

Factor 2 (población): 10 poblaciones segregantes, *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*.

Tabla 5. Diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial 4x12 de los tratamientos realizados.

S3T2	S4T3	SQT3	S8T4	S4T4	S3T2	S5T4	S3T3	S10T2	S7T2	S10T2	S6T3
S8T2	S5T2	SLT1	SQT2	SQT1	SLT1	S7T2	S2T4	S9T3	SQT4	S1T1	S3T2
S1T1	S2T4	S9T2	SLT4	S7T3	S3T4	S10T4	S7T2	S8T3	S2T1	S7T2	S3T4
S5T3	S4T2	S2T4	S8T3	S10T3	S4T3	S2T3	S8T1	S8T4	S3T3	S10T1	S3T1
SLT4	SQT1	SQT3	S5T3	S6T2	SQT1	S9T1	S10T4	S10T1	S6T2	S4T2	S10T3
S5T1	S6T4	S3T1	S9T1	SLT1	S6T3	S1T1	S5T2	S1T2	S2T3	S6T1	S9T4
SLT2	SQT3	S7T4	S1T4	S7T1	S5T4	S1T2	S9T3	S9T1	S10T4	S2T4	S9T2
S5T1	S8T4	S4T1	S4T1	S10T2	SQT4	SLT3	S4T4	SLT3	SQT1	S5T1	S5T2
S3T3	S1T4	S2T3	S10T3	S4T2	S1T3	S1T2	S7T1	SLT4	S5T4	S4T3	S4T1
S8T3	S3T4	S8T2	S2T3	S1T3	S10T1	S9T4	S10T2	S4T2	SQT2	S8T1	S3T3
S1T3	S2T2	SLT2	S8T2	S7T3	S3T1	S10T1	S6T3	S5T3	S1T2	S7T4	S2T2
S2T2	S5T2	S7T4	S1T3	SLT4	SLT3	S9T3	S9T4	S7T3	SLT3	SLT2	S8T2
SLT1	S3T1	S2T1	S8T4	S9T1	S2T1	S6T4	S6T1	S1T4	S9T3	SQT4	S7T1
S5T4	S6T1	S4T3	S5T3	S9T2	S4T4	S3T2	S9T2	S6T2	S7T1	S1T1	S8T1
S10T4	SLT2	SQT4	S6T2	S2T2	S7T3	S4T1	S10T3	S6T4	S6T4	S6T3	S7T4
S5T1	S6T1	S8T1	SQT2	SQT3	SQT2	S3T4	S2T1	S1T4	S4T4	S9T4	S8T3

Clave: SL: *S. lasiocarpum*, SQ: *S. quitoense*, S1- S10: Segregantes de la cruce entre *S. quitoense* + *S. lasiocarpum*. Tratamientos: T1: *F. oxysporum* + *M. incognita*, T2: *M. incognita*, T3: *F. oxysporum*, T4: Testigo.

4.3.1.7. Análisis estadísticos.

Obtenidos los datos correspondientes a las variables crecimiento y diámetro del tallo, biomasa acumulada, grado de infección de nematodos, incidencia de *F. oxysporum*, grado de severidad de la marchitez, grado decoloración vascular, se realizó un test de Shapiro-wilks modificado para determinar si hubo normalidad en la distribución de datos y un test de Levene para evaluar homocedasticidad. En el caso de las variables que cumplieron con los supuestos, se realizó un ANOVA y una prueba de significancia múltiple de Tukey; sin embargo, esto no sucedió para los datos de las variables número de agallas y severidad de la marchitez donde se utilizó una prueba no paramétrica como la de Kruskal Wallis para obtener diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico InfoStat.

4.3.2. Metodología para el objetivo específico 2 (Fase de laboratorio).

4.3.2.1. Material vegetal.

Para este objetivo se evaluaron las especies *S. quitoense*, *S. lasiocarpum*., más el material genético de 10 poblaciones segregantes de *S. quitoense* x *S. lasiocarpum*. La población segregante se realizó la cruce entre las dos especies para su posterior evaluación.

4.3.2.2. Extracción del ADN.

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

4.3.2.3. Cuantificación de ADN.

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

4.3.2.4. 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.

Se utilizó marcadores microsatélites y RGAs, que son basados en PCR, por medio de primers, estos marcadores fueron utilizados en *S. hirtum* que se evaluaron en la resistencia de los patógenos.

Tabla 6. Marcadores microsatélites y RGAs, que son basados en PCR.

RGAs		Secuencias (5'→3')	Bases de diseño/gen	Referencia
RLRR	F	CGCAACCACTAGAGTAAC	LRR / <i>RPS2</i>	(Zhang, Khan, Niño-Liu, & Foolad, 2002)
	R	ACACTGGTCCATGAGGTT		
CLRR	F	TTTTCGTGTTCAACGACG	LLR / <i>Cf-9</i>	
	R	TAACGTCTATCGACTTCT		
ANo.2	F	TATAGCGGCCGCIARIGGIARNCC		
ANo.3	R	ATATGCGGCCGCGGIGGIGTIGGIAARACNAC		
NBS	F	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	NBS / <i>Ny</i> <i>RPS2</i>	
	R	YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC		
S1	F	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG		
AS1	R	CAACGCTAGTGGCAATCC		
Ptokin1	F	GCATTGGAACAAGGTGAA	Kinasa / <i>Pto</i>	
Ptokin2	R	AGGGGGACCACCACGTAG		
Ptokin3	F	TAGTTCGGACGTTTACAT	Kinasa / <i>Pto</i>	
Ptokin4	R	AGTGTCTTGTAGGGTATC		

SSR	Secuencias (5'→3')		Referencia
HpmsE032	F	ATGCGCAAAGGGAGAAAATTCA	(Suwor, Thummabenjapone, Sanitchon, Kumar, & Techawongstien, 2015)
	R	CGAACTAACCGTTCATGGTGGA	
HpmsE143	F	CCATTTCAGCTAGGGTTCAGTCCA	
	R	CGACCAAATCGAATCTTCGTGA	
CA-MS6	F	CAGAGCACTTGACATGCCTT	(Voorrips, Finkers, Sanjaya, & Groenwold, 2004)
	R	GATCTTTATAGTAGCTCATCAATA	
Sat 207	F	GAAGCCGTTTCAAGCC	(Combes et al., 2000)
	R	CAATCTC TTTCCGATGCTCT	

Fuente: Autores, 2023.

4.3.2.5. 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 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 foto documentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad.

El análisis de diversidad molecular fue estimado a partir del polimorfismo molecular estudiado los 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.

5. Resultados.

Los datos obtenidos de la investigación fueron analizados para verificar los supuestos de normalidad (test de Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (test de Levene), las cuales

mostraron que existe normalidad y homogeneidad en el caso de las variables peso seco foliar, peso seco radicular, longitud de la parte radicular, diámetro y altura; sin embargo, esto no sucedió para los datos de las variables número de agallas y severidad de la marchitez (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de los supuestos de la estadística descriptiva.

Variables	Shapiro Wilks		Levene
	W*	p	P
Peso foliar seco	0.98	0.2174	0.1279
Peso seco radicular	0.98	0.1709	0.4705
Numero de agallas	0.84	<0.001	<0.001
Severidad de la marchitez	0.90	<0.001	<0.001
Longitud de área Radicular	0.99	0.422	0.1251
Altura	0.98	0.179	0.4705
Diámetro	0.99	0.940	0.9169

Nota: $p > 0.05$ indica normalidad y homogeneidad de varianzas.

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

5.1.1. Biomasa acumulada de la zona foliar.

Realizado el ANOVA se obtuvo que en la variable biomasa acumulada de la zona foliar indica que existen diferencias estadísticamente significativas para el caso de genotipos ($R^2=0.28$, $CV=4.91$); sin embargo, esto no ocurrió para los tratamientos en donde existe diferencias entre medias que no son significativas (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable peso seco foliar.

F.V.	SC	GI	CM	F	P
Genotipo	7.24	11	0.66	4.88	<0.01
Tratamiento	0.16	3	0.05	6.07	0.68
Error	19.17	177	0.11	0.5	
Total	26.57	191			

Al realizar las comparaciones con la prueba de Tukey se pudo obtener que existen tres rangos, siendo que el genotipo S10 tuvo el mejor rendimiento con un valor de 1.4 g en el caso del testigo y una media general de: $MED=1.2$, $DE=0.35$. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre *S. lasiocarpum* y *S. quitoense*, ya que obtuvieron una media general de 0.71 y 0.54 respectivamente. Por otra parte, la menor cantidad de biomasa foliar acumulada

se dio en el caso del tratamiento *F. oxysporum* + *M. incognita*, para los genotipos S6 y S1 con un valor de 0.28 y 0.30 respectivamente. (Figura 2).

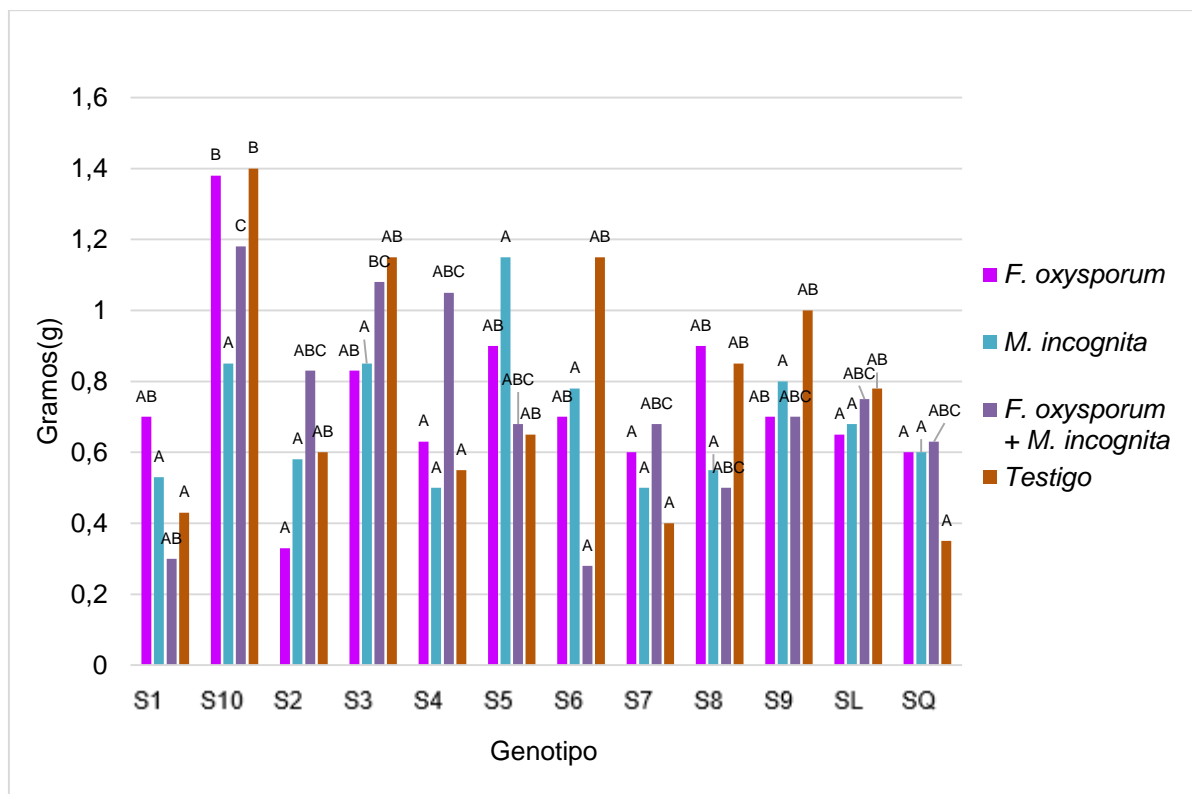


Figura 2. Peso seco foliar en gramos de las diferentes especies.

5.1.2. Biomasa acumulada de la zona radicular

Realizado el análisis de la varianza se obtuvo que en la variable biomasa acumulada de la zona radicular existen diferencias estadísticamente significativas para el caso de especies ($R^2 = 0,24$, $CV = 49.27$); sin embargo, esto no se repitió para los tratamientos en donde existe diferencias entre medias que no son estadísticamente significativas (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza para la variable peso seco radicular.

F.V.	SC	GI	CM	F	P
Genotipo	3.87	11	0.35	4.84	<0.01
Tratamiento	0.18	3	0.06	0.81	0.49
Error	12.87	177	0.07		
Total	16.92	191			

Los resultados de la comparación de medias por el método Tukey mostraron dos rangos para el peso seco radicular, siendo el genotipo S10 el que tuvo el valor más alto en todos los

tratamientos (MED=0.89, DE= 0.36), dejando ver que el tratamiento *F. oxysporum* el que presento mayor biomasa (MED= 1,38), repitiendo resultado con la variable “Biomasa acumulada de la zona foliar”; sin embargo, el genotipo S6 y S8 obtuvieron los valores más bajos en el tratamiento 3, repitiendo el resultado el genotipo S6 con la variable anterior. El genotipo S7 fue la que obtuvo el resultado promedio más bajo con un valor de (MED=0.38, DE= 0.23); por otro lado, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre *S. lasiocarpum* y *S. quitoense* con un valor de 0.52 y 0.51 respectivamente (Figura 3).

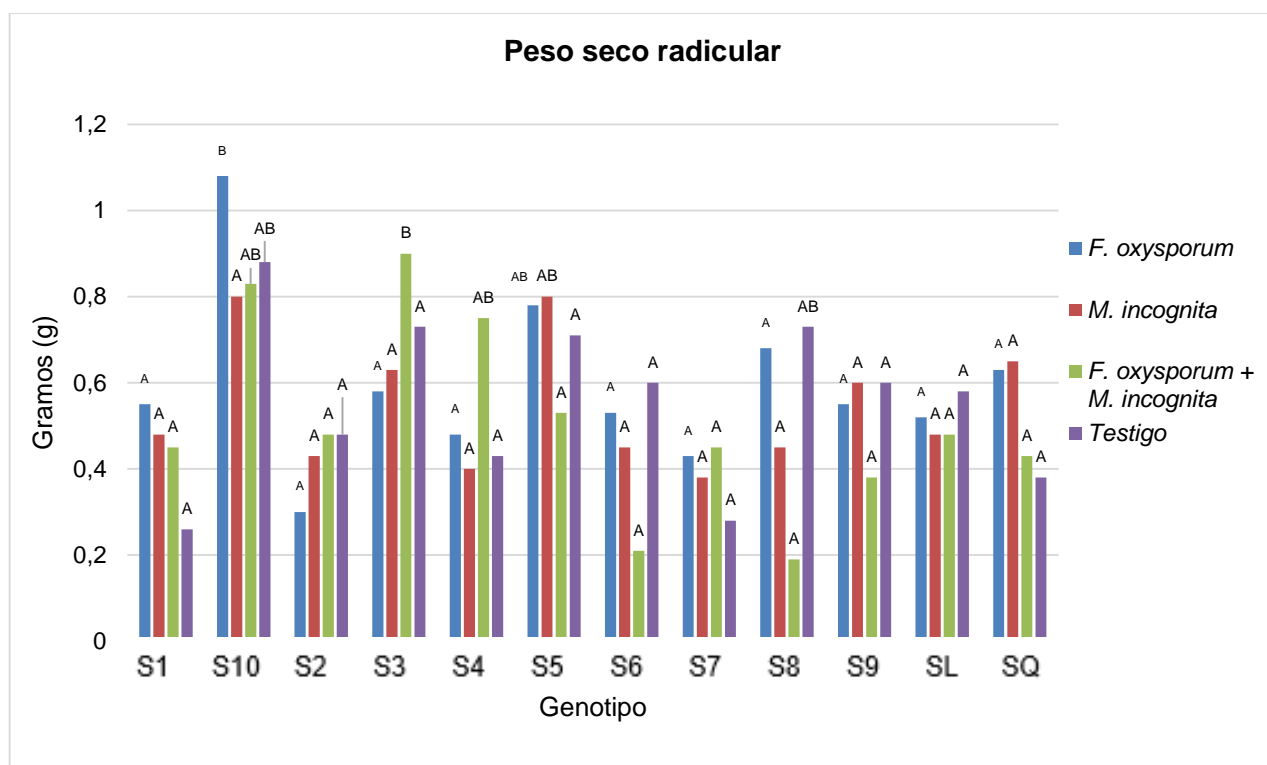


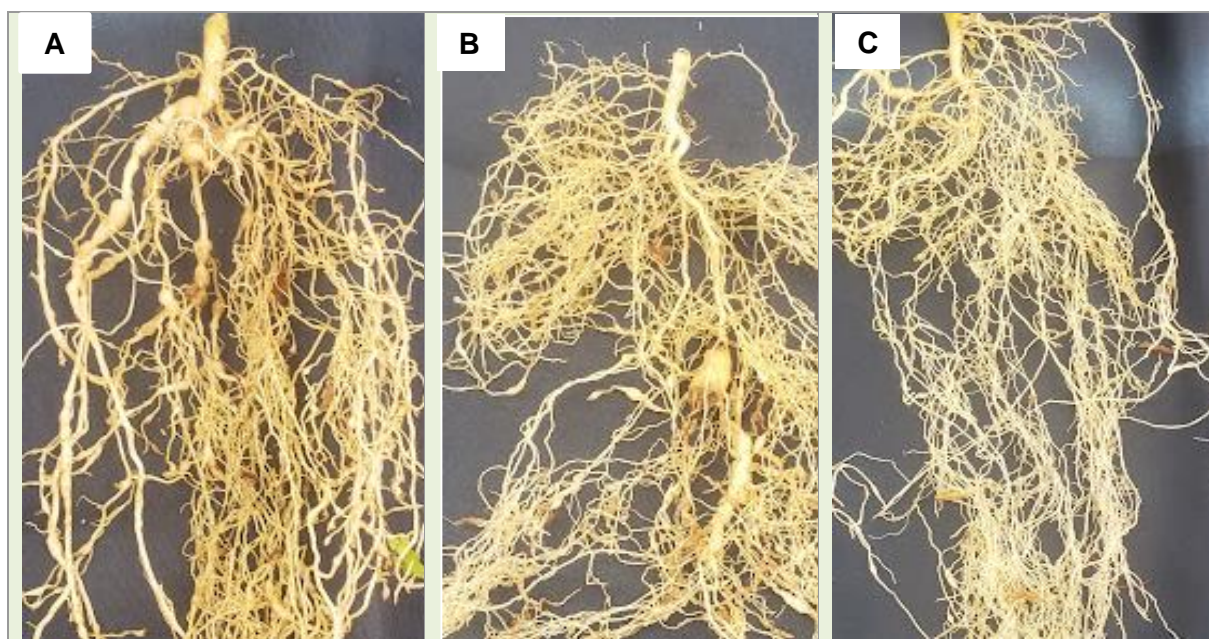
Figura 3. Peso seco radicular en gramos de las diferentes especies.

5.1.3. Grado de afección de las agallas

Los resultados de severidad a los 90 días después de la inoculación indicaron una variación en los grados de afección de los genotipos, mostrando a las especies susceptible (*S. quitoense*) con el grado de agallas más alto con un valor de 3, lo que equivale a una incidencia de 31 a 75 nódulos por planta presentando una reacción de susceptibilidad. *S. lasiocarpum* y el genotipo S5 mostraron los grados de afección más bajos con 1 y 0 respectivamente, lo que se cataloga como resistente por la cantidad de nódulos contabilizados en los genotipos (Tabla 10).

Tabla 10. Clasificación de las especies mediante el índice de severidad.

Genotipo	Grado de afección	No. de agallas	Calificación
<i>S. quitoense</i>	3	31 a 75	Alta
<i>S. lasiocarpum</i>	1	1 a 10	Baja
S1.	1	1 a 10	Baja
S2.	1	1 a 10	Baja
S3.	1	1 a 10	Baja
S4.	1	1 a 10	Baja
S5.	0	0	Libre
S6.	1	1 a 10	Baja
S7.	1	1 a 10	Baja
S8.	1	1 a 10	Baja
S9.	1	1 a 10	Baja
S10.	1	1 a 10	Baja

**Figura 4.** Nódulos en las raíces de naranjilla; A) Nódulos en *S. quitoense*, B) Nódulos en *S. lasiocarpum*, C) Nódulos en el genotipo S5 que no presenta infección.

Por otra parte, al realizar la prueba de Kruskal Wallis se pudo obtener 3 rangos ($H=76.21$, $p < 0.01$), siendo el testigo el que obtuvo un valor de 0 y 0.08 para la inoculación solo con *Fusarium oxysporum* los cuales podemos decir que presentaron un grado de

resistencia alto. Por otro lado, el tratamiento con inoculación solo con *Meloidogyne incognita* fue el que mostró mayor susceptibilidad con una media de 1.98 (la mediana en este caso fue 2) grado de número de agallas, el tratamiento 3 obtuvo un valor de medio de 1.13 y una mediana de 1 existiendo una interacción entre *F. oxysporum* y *M. incognita* (Figura 5).

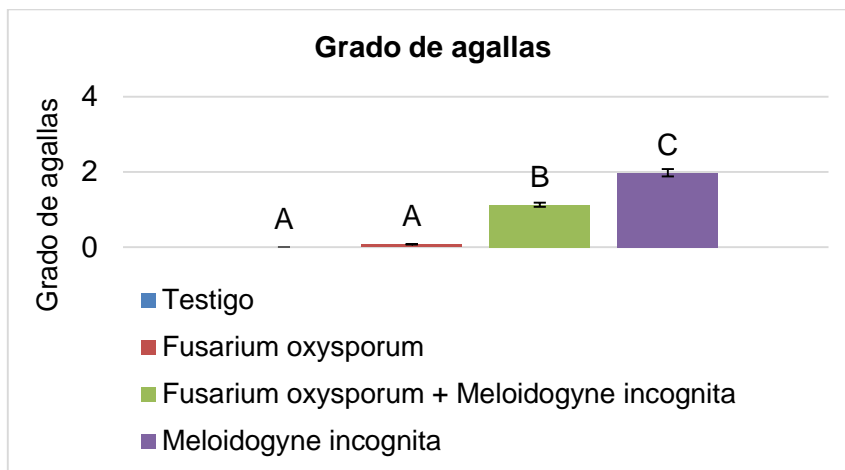


Figura 5. Efecto de los tratamientos en el número de agallas.

5.1.4. Longitud de la parte radicular

Los resultados del ANOVA mostraron que en la variable longitud de la parte radicular existen diferencias estadísticamente significativas para el caso de genotipos ($R^2 = 0,24$, $CV = 11.87$); sin embargo, esto no se repitió para los tratamientos en donde existe diferencias entre medias que no son estadísticamente significativas (**Tabla 11**).

Tabla 11. Análisis de varianza para la variable longitud de la parte radicular.

F.V.	SC	GI	CM	F	P
Genotipos	0.36	11	0.03	4.40	<0.01
Tratamiento	0.05	3	0.02	2.17	0.09
Error	1.33	177	0.01		
Total	1.74	191			

Nota: $p < 0.05$ indica diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de la comparación de medias por el método Tukey, se pudo obtener 2 rangos en la variable longitud de la parte radicular, siendo que los genotipos S4 y S10 tuvieron el valor más alto en comparación con el testigo sin inoculación, con una media de 34.1 y 31.03 cm. respectivamente; sin embargo, el genotipo S1 fue el que obtuvo el resultado más bajo con un valor de promedio de 21.66; por otro lado no existieron diferencias estadísticamente

significativas entre *S. lasiocarpum* y *S. quitoense* con un valor de 26.53 y 23.85 respectivamente (**Figura 6**).

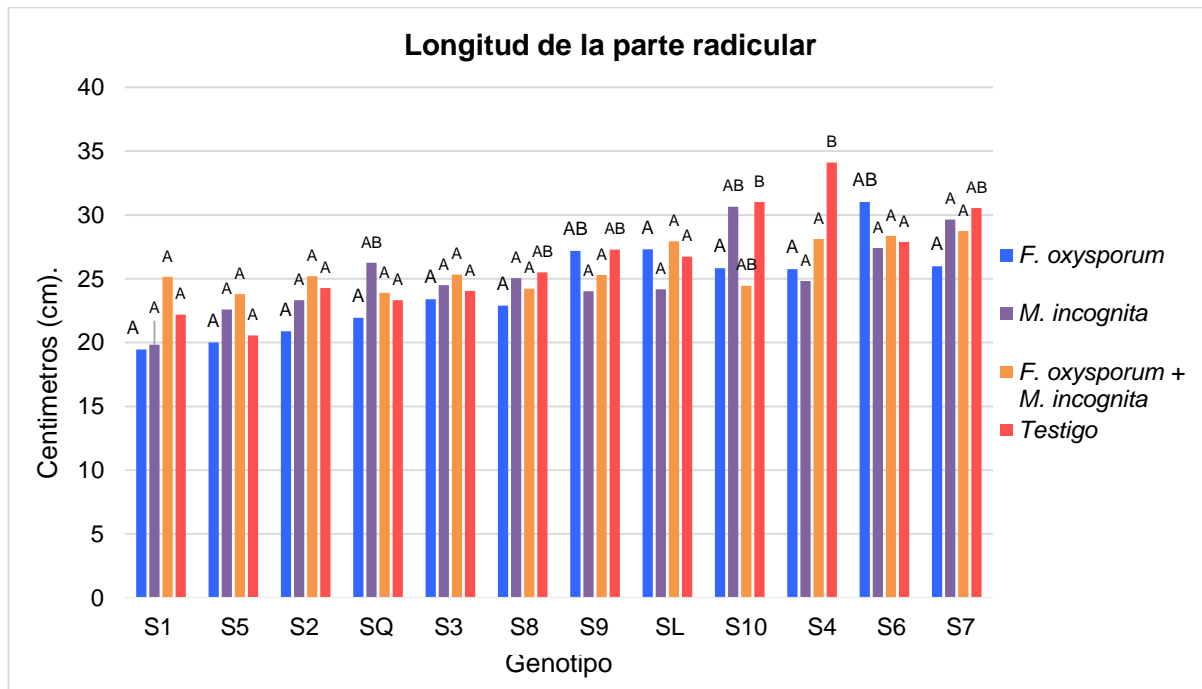


Figura 6. Longitud de área radicular de las diferentes especies.

5.1.5. Altura del tallo

Los resultados del análisis de la varianza mostraron que en la variable altura existen diferencias estadísticamente significativas para el caso de genotipos ($R^2= 0.55$, $CV=19.99$); sin embargo, esto no se sucedió para los tratamientos en donde existe diferencias entre medias que no son estadísticamente significativas (**Tabla 12**).

Tabla 12. Análisis de varianza para la variable altura.

F.V.	SC	GI	CM	F	P
Genotipos	383.61	11	34.87	18.65	<0.01
Tratamiento	13.93	3	4.64	2.48	0.06
Error	205.30	177	1.16		
Total	350.92	191			

Realizado la prueba de medias por el método Tukey, se pudieron obtener 4 rangos en la variable, el S10 tuvo el rendimiento más alto en todos los tratamientos ($MED=10.58$,

DE=1.71); a su vez el genotipo S1 para el tratamiento de *M. incognita* se vio más afectado puesto que presento el valor más bajo con un valor de 4.88; por otro lado, existieron diferencias entre *S. lasiocarpum* y *S. quitoense* en todos los casos (**Figura 7**).

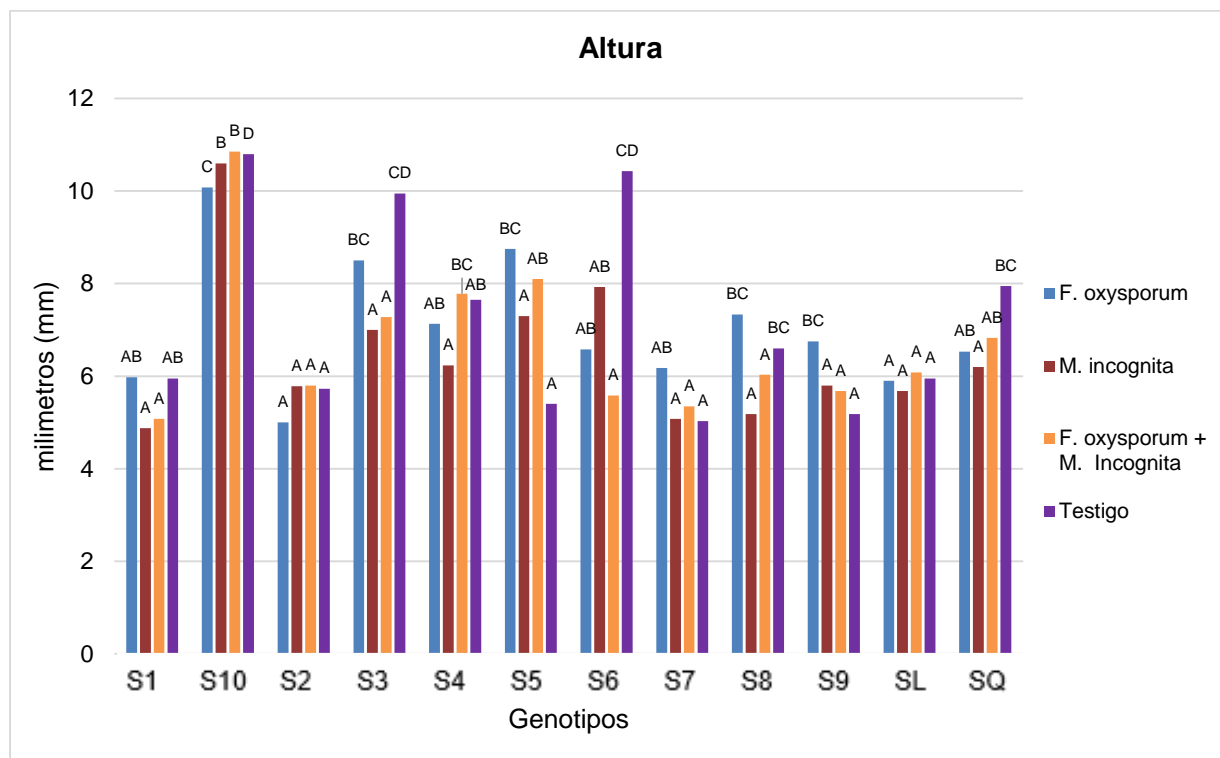


Figura 7. Altura en milímetros de las diferentes especies.

5.1.6. Diámetro del tallo.

Realizado el ANOVA se obtuvo que en la variable diámetro existen diferencias estadísticamente significativas entre especies ($R^2= 0.41$, $CV=19.11$); sin embargo, esto no se sucedió para los tratamientos en donde existe diferencias entre medias que no son estadísticamente significativas (**Tabla 13**).

Tabla 13. Análisis de varianza para la variable diámetro.

F.V.	SC	GI	CM	F	P
Especie	144.15	11	13.10	11.30	<0.01
Tratamiento	1.06	3	0.35	0.31	0.82
Error	205.30	177	1.16		
Total	350.92	191			

Al realizar la comparación de medias con la prueba de Tukey, se pudieron obtener 3 rangos en la variable Diámetro, el genotipo S10 tuvo el rendimiento promedio más alto (MED=7.13, DE=1.08); así mismo el genotipo S6 inoculado con *M. incognita* obtuvo el valor más alto (MED=7.68), por otro lado, existieron diferencias estadísticamente significativas entre *S. lasiocarpum* y *S. quitoense* con un valor medio de 5.75 y 3.44 respectivamente, siendo SL mejor en todos los tratamientos (**Figura 8**).

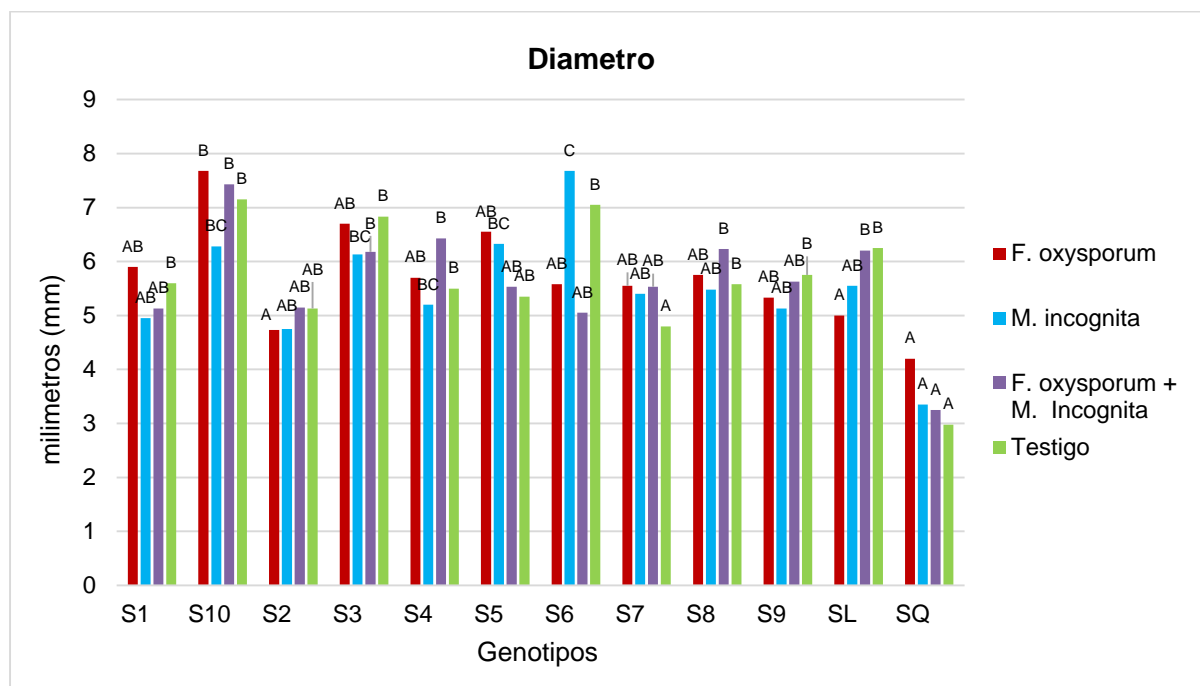


Figura 8. Diámetro en milímetros de las diferentes especies.

5.1.7. Severidad de la marchitez.

El porcentaje de amarillamiento producido por la marchitez vascular mostró que las especies evaluadas con los tres tipos de inoculación presentaran diferencias significativas ($p < 0.01$).

Realizada la prueba de Kruskal Wallis se pudo obtener 3 rangos ($H=68.21$, $p < 0.01$), siendo que el tratamiento testigo obtuvo un valor de 0, seguido por 11.23 para *M. incognita*, por otro lado, *F. oxysporum* y *M. incognita* + *F. oxysporum* fueron los más afectados con una media de 20.17 y 25.46 respectivamente (**Figura 9**).

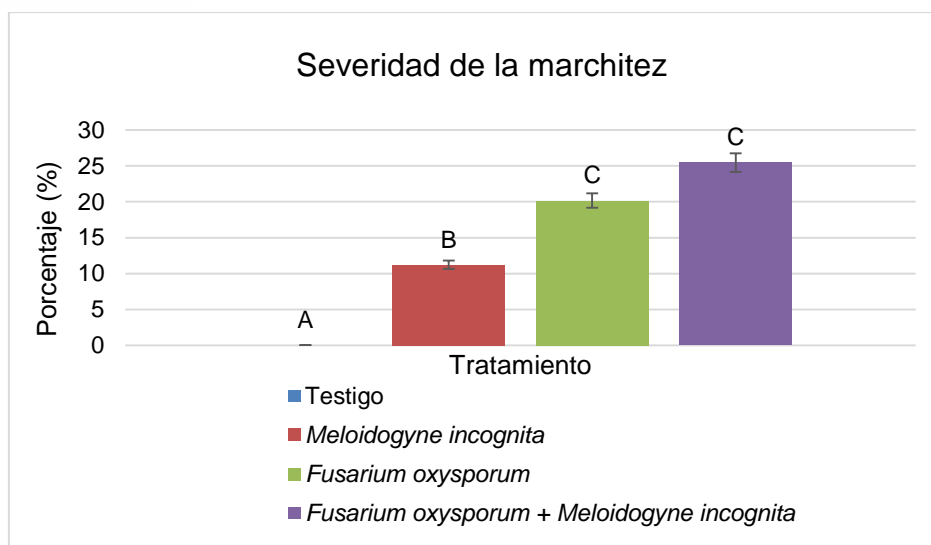


Figura 9. Efecto de los tratamientos en la severidad de la marchitez.

Realizada la prueba de Kruskal Wallis se pudo obtener 3 rangos ($H=31.85$, $p < 0.01$), de los cuales *S. lasiocarpum* obtuvo el mejor resultado ($MED=1.06$), en la misma línea los genotipos S6, S4, S7 también estuvieron en este rango evidenciando menos severidad; no obstante, *S. quitoense* fue la más afectada por el tratamiento *F. oxysporum* + *M. incognita* con una severidad del 70% (**Figura 10**).

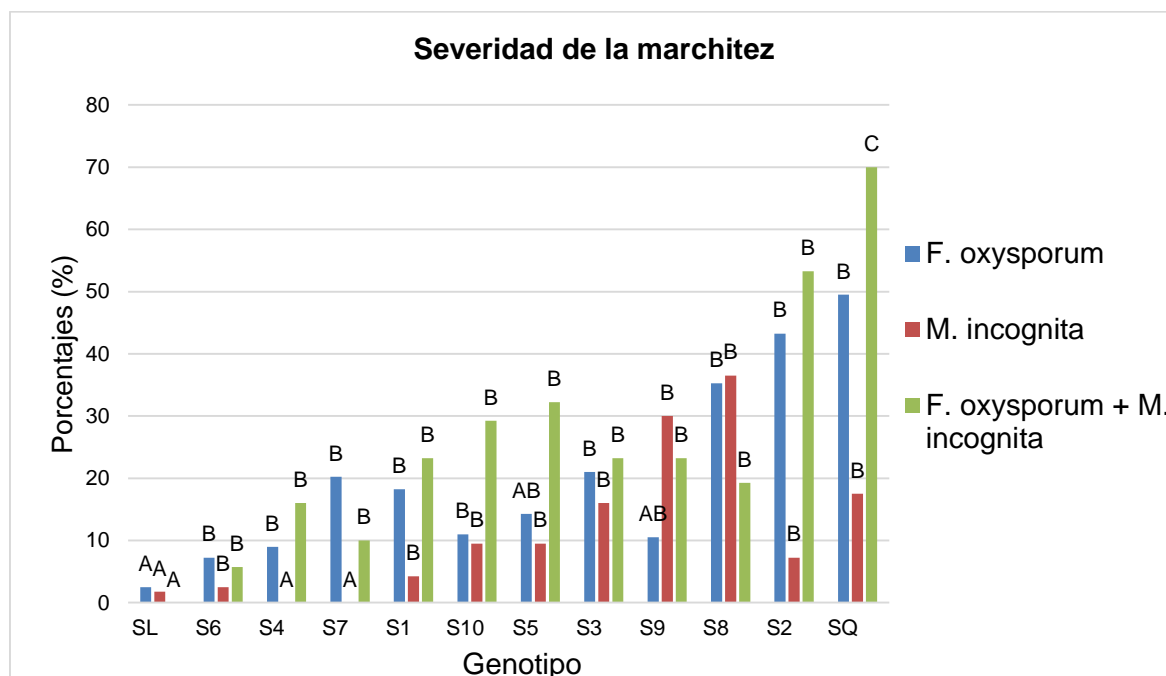


Figura 10. Severidad de la marchitez de las diferentes especies.

5.1.8. Incidencia.

Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis, mostraron que para el caso de tratamientos solo el testigo se diferenció del resto ($H=70.76$, $p < 0.01$) puesto que el mismo conto con incidencia 0, por su parte el resto de tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre si perteneciendo todos ellos al mismo rango. Para el caso de las especies también existieron diferencias significativas ($H=25.46$, $p < 0.01$) ya que nuevamente *S. lasiocarpum* obtuvo el mejor resultado junto con S7, por otro lado, *S. quitoense*, S1, S10, S8 y S4, pertenecieron al rango más bajo (**Figura 11**).

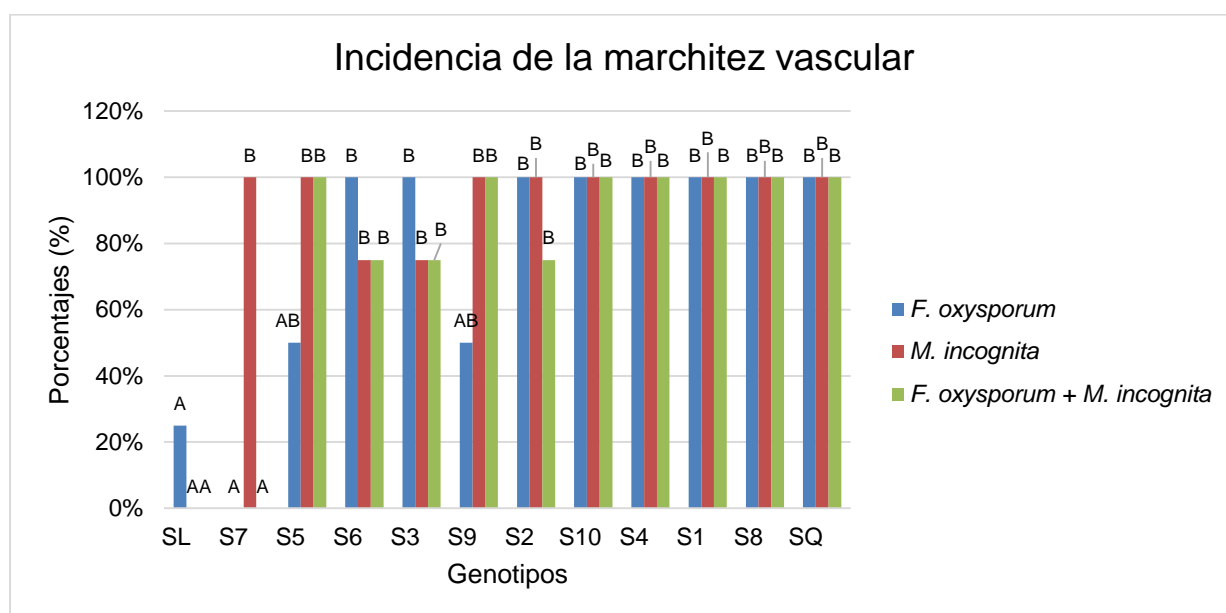


Figura 11. Niveles de incidencia de las diferentes especies.

5.1.9. Grado decoloración vascular.

Transcurridos los 90 días después de la inoculación se pudo evidenciar que una gran cantidad de plantas presentaron síntomas característicos en diferentes grados ocasionados por la infección, presentando lesiones necróticas en los haces vasculares (**Figura 12, 13**). De acuerdo al análisis no paramétrico de Kruskal Wallis obtenido para esta variable, se observó que existe diferencias significativas ($p = < 0.01$).

Realizada la prueba antes mencionada se pudo evidenciar que existen tres rangos en la variable grado de decoloración vascular ($H=49.44$, $p < 0.01$); se pudo ratificar que el tratamiento testigo no obtuvo ningún valor, repitiendo el caso con la incidencia, con respecto a los tratamientos donde *F. oxysporum* estuvo involucrado estos valores de decoloración fueron más altos; a su vez el tratamiento de *M. incognita* obtuvo un valor intermedio entre los otros rangos ya mencionados (**Tabla 15**).

Tabla 14. Efecto de los tratamientos en el grado de decoloración.

Tratamiento	Decoloración	Rango
Testigo	0	A
<i>Meloidogyne incognita</i>	0.46	B
<i>Fusarium oxysporum</i> + <i>Meloidogyne incognita</i>	1.04	C
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.04	C

Nota. Las letras marcan los diferentes rangos.



Figura 12. *S. lasiocarpum* con grado de decoloración vascular intermedia en raíz y tallo



Figura 13. *S. quitoense* con grado decoloración intermedio de raíz y tallo.

Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis, indican que existen diferencias entre genotipos para el caso del grado de descolonización vascular ($H=25.89$, $p < 0.01$), *S. lasiocarpum* presentaron un grado de decoloración ausente ya que obtuvo un valor de 0, en este mismo rango los genotipos S7, S6, y S4; con respecto a la especie *S. quitoense* se puede notar que tuvo un efecto negativo en todos los tratamientos con excepción en el testigo, obteniendo un grado de decoloración intermedia, puesto que obtuvo un valor de 1.44 siendo este el más alto, el resto de especies se mantuvieron en un rango medio entre 0.69 del genotipo S9 y 0.94 del genotipo S8, todas ellas en el mismo rango (**Figura 14**).

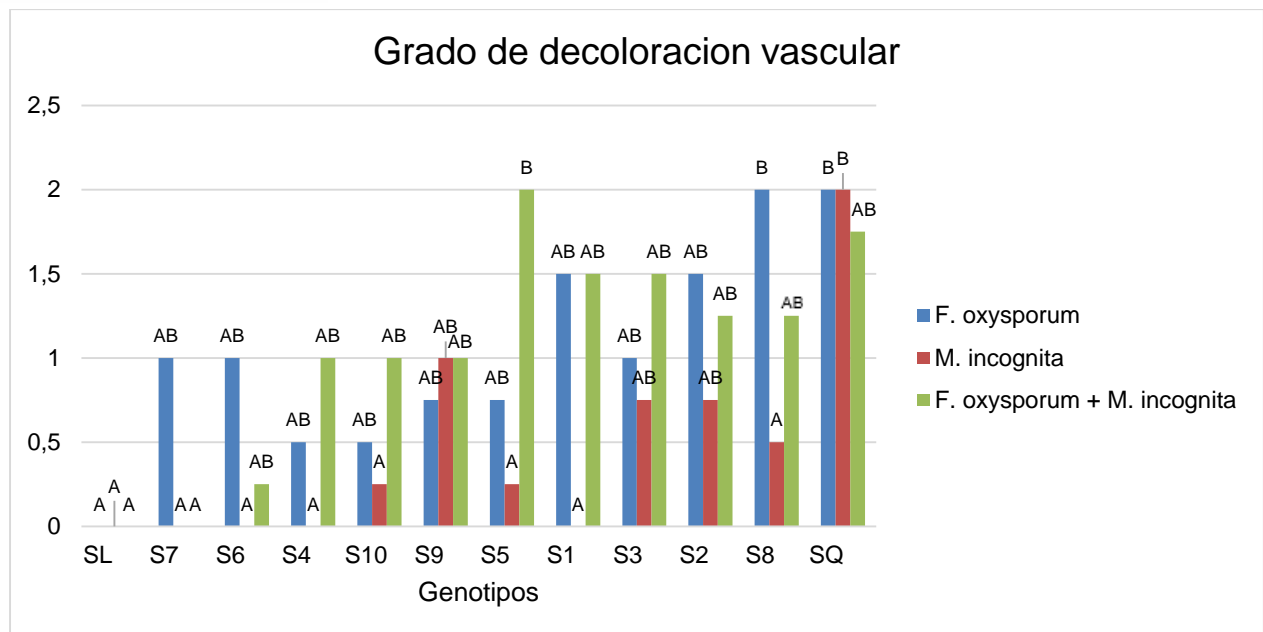


Figura 14. Niveles de incidencia de los diferentes genotipos.

5.2 Análisis de diversidad molecular para genotipos parentales *Solanum quitoense*, *Solanum lasiocarpum* y *Solanum sp.*

No se obtuvo amplificaciones con los cebadores empleados para las pruebas de PCR.

6. Discusión

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la resistencia a la interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* en diez segregantes de la cruce entre *S. quitoense* x *S. lasiocarpum* a nivel de invernadero. Con el análisis fenotípico se pudo observar que en gran parte de las plantas tratadas independientemente del tipo de inoculación presentaron síntomas característicos asociados a la marchitez vascular (clorosis, marchitamiento y necrosamiento de los haces vasculares, cabe recalcar que los síntomas se presentaron en diferentes grados y severidad. Esto concuerda con la investigación realizada por Estupiñán & Ossa, (2007), donde los resultados obtenidos fueron similares a la de esta investigación.

Se evidencia una tendencia constante en el crecimiento de las plantas, que se ve directamente afectado debido a la presencia de agentes patógenos. De acuerdo con Jacquet et al. (2005), la presencia de *M. incognita* y *F. oxysporum* en las raíces de la naranjilla interrumpe el flujo de agua y nutrientes, lo que resulta en un efecto directo sobre el desarrollo de la planta. Ambos estudios sostienen que las raíces afectadas por estos patógenos no son funcionales, lo cual conlleva a una disminución en la tasa metabólica del hospedero. Este impacto negativo en el flujo de recursos esenciales contribuye a la merma en el crecimiento de las plantas, siendo un fenómeno observado de manera consistente.

Con respecto a la marchitez, pesos secos foliar y en incidencia se puede decir que estas manifestaciones son consistentes con la descripción de Retana et al. (2018), quienes señalan que el crecimiento de hifas del patógeno a lo largo de la xilema facilita la colonización y obstrucción de los conductos, dando lugar a una necrosis observable en secciones longitudinales del tallo en *S. quitoense*. De acuerdo con Gonzales (2012), *F. oxysporum* produce fitotoxinas que inducen una reacción inhibitoria del crecimiento debido a desequilibrios hormonales, ya que estas sustancias tienen la fuerza necesaria para superar la acción estimulante del crecimiento de las giberelinas. Además, las plantas afectadas por este patógeno tienden a mostrar un tipo de enanismo en comparación con las plantas sanas.

La incidencia de *M. incognita* en las especies de la familia Solanaceae, según Navarrete et al. (2018), puede alcanzar un nivel de incidencia del 100% a los 60 días en *Solanum hirtum*; sin embargo, en los casos de los genotipos los niveles de incidencia fueron diferentes entre sí, pero siempre en niveles más bajos al primer caso mencionado, esto como lo manifiesta el mismo autor que puede existir indicios de inmunidad entre genotipos. Adicionalmente, se destaca que los nematodos del género *Meloidogyne* muestran una alta especificidad,

parasitando un elevado número de especies de plantas sensibles, según lo informado por Karssen & Moens (2006).

Los genotipos obtuvieron resultados distintos en todas las variables; estos resultados coinciden con los informes de Betancourth et al. (2005) acerca de *S. hirtum* y *S. sessiliflorum* con sus genotipos mostrando cierto nivel de resistencia a *F. oxysporum*; además, se sugiere la existencia de una forma especial del hongo identificada como *F. oxysporum* f. sp. quitoense, como previamente señalaron Ochoa et al. (2001) y Ávila et al. (2019) en Ecuador.

Con respecto a la severidad Chávez et al. (2011), menciona que tanto los genotipos de *Solanum quitoense* como los genotipos silvestres (*S. mammosum*, *S. hirtum*, *S. marginatum* y *S. umbellatum*) exhibieron diversos grados de respuesta a *Meloidogyne* siendo que 21 genotipos mostraron moderada susceptibilidad (26-50% de severidad), indicando una marcada sensibilidad de las especies evaluadas al nematodo, por lo cual sugiere que los mecanismos de respuesta de las especies a *Meloidogyne*, ya sean constitutivos o inductivos, se expresan de manera diferencial dependiendo de la interacción específica entre el nematodo y el hospedante, lo que a su vez influye en la activación o ausencia de la expresión de estos mecanismos de resistencia (Camacho, 1991).

Comparando los resultados con los hallazgos de Duarte et al. (2020), quienes reportaron períodos de incubación de siete días en plantas de *S. quitoense* inoculadas con nueve aislados de *Fusarium oxysporum* obtenidos en Nariño, y los resultados encontrados por Ochoa et al. (2001), que registraron períodos de incubación de 39 a 48 días, se destaca la discrepancia en los tiempos de incubación de la enfermedad entre los autores.

En cuanto a la selección de genotipos con diferentes grados de reacción, Hussey y Janssen (2004), sugieren que la evaluación preliminar del índice de nudosidad para el caso de *Meloidogyne* puede resultar invaluable para continuar con selecciones en evaluaciones posteriores que permitan determinar el factor de reproducción siendo el nematodo la limitante de los materiales seleccionados. Este enfoque integral, que abarca tanto la resistencia genética de ciertos genotipos combinada a otras condiciones óptimas contribuiría a desarrollar estrategias más efectivas para gestionar un cultivo con fines comerciales.

7. Conclusiones

- Al finalizar las etapas de estudio bajo invernadero se revelaron las diferencias a nivel de genotipo y especies entre *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*, en el cual el segregante S10 mostró tener las mejores características fenotípicas en cuanto a crecimiento.
- El segregante S7 mostró mayor resistencia al ataque de los patógenos tanto como en la incidencia, grado de decoloración vascular, severidad de marchitez, soportando de esta manera la interacción entre los dos patógenos.
- En cuanto al grado de afectación de agallas causado por *M. incognita*, el segregante S5 presentó mayor resistencia al no tener presencia de agallas en sus raíces.
- En cuanto a la fase de laboratorio, se puede indicar que no se encontró polimorfismo en los genotipos de las especies con los marcadores moleculares utilizados.

8. Recomendaciones

- Al iniciar con un futuro proyecto es necesario considerar la viabilidad de semillas que se vayan a evaluar, ya que de esta forma se pueda evidenciar el estado inicial para continuar con su germinación.
- Seguir evaluando el resto de los segregantes de la cruce entre *S. lasiocarpum* y *S. quitoense*, para identificar cuál de ellos presentan mayor resistencia para los patógenos evaluados, y entre ellos hacer una comparación para obtener al más resistente.
- Realizar análisis en campo de las poblaciones segregante provenientes de la cruce de *S. lasiocarpum* y *S. quitoense* para identificar la resistencia a patógenos.
- Evaluar el rendimiento de cultivo de los respectivos segregantes en investigaciones posteriores.

9. Referencias

- Andrade, C., Moreno, M. J., Guijarro, C., Fuentes, M., & Concellon, A. (2015). Caracterización de la naranjilla (*Solanum quitoense*) común en tres estados de madurez. *Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 215-221.
- Avila, A.; Ochoa, J.; Proaño, K.; Martínez, M. (2019). Jasmonic acid and nitric oxide protects naranjilla (*Solanum quitoense*) against infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* by eliciting plant defense responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 106: 129-136.
- Betancourth, C.; Zambrano, M.; Narváez, C. (2005). Reacción de diferentes genotipos de lulo (*Solanum quitoense*) al ataque de *Fusarium oxysporum*. *Revista de Ciencias Agrícolas*. 22(1-2).
- Bergmann, F., Gregorius, H. R., & Scholz, F. (1989). Isoenzymes, indicators of environmental impacts on plants or environmentally stable gene markers. In *Genetic effects of air pollutants in forest tree populations* (pp. 17-25). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bermeo, N (2015). "Evaluación de la resistencia a *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita* en segregantes de cruzamientos entre miembros de la sección lasiocarpa". (Tesis pregrado, Universidad Central del Ecuador). Repositorio Nacional de la Universidad Central del Ecuador.
- Betancourt, C., Salazar, C., & Castillo, A. (2012). Efecto de controladores biológicos sobre el nematodo *Meloidogyne* spp en lulo (*Solanum quitoense* Lam). *Revista de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño*, 83-94.
- Bohs, L. (20 de noviembre de 2013). Fuente de solanáceas. Obtenido de Fuente de Solanaceas: <http://solanaceaesource.org/>
- 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>.

- Camacho, RV 1991. Reacción de tres selecciones de batata a diferentes niveles poblacionales del nemátodo *Meloidogyne incognita*. Tesis de grado. Maracay, Ecuador, Universidad Central de Ecuador. 46p
- Castro López, W., Carrera Sanchez, K., & Herrera Isla, L. (2019). Incidencia de la marchitez vascular de *Solanum quitoense* en la región amazónica de Pastaza, Ecuador. *Centro Agrícola*, 46(1), 13-17.
- Castro, P., Díaz, L., & Belesaca, I. (2021). Estado actual del uso de marcadores moleculares en el diagnóstico y control genético de enfermedades de naranjilla *Solanum quitoense*. *Bosques Latitud Cero*, 11(2): 98-107. <https://doi.org/10.54753/blc.v11i2.1063>
- Castro, W., Carrera, K., Herrera, F., & Cupull, R. (2018). Identificación de aislados de *Fusarium spp.* asociados a *Solanum quitoense* Lam en Pastaza, Ecuador. *Centro Agrícola*. P. 5-11.
- Castro, W., & Herrera, L. (2019). *La naranjilla (Solanum quitoense Lam.) en Ecuador*. Santa Clara: Feijó.
- Cuevas, C. T., Vargas, O., & Rodríguez, A. (2008). Solanaceae diversity in the state of Jalisco, Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 79(1), 67-79.
- Criollo, H., & Muñoz, J. (2020). Irradiación con rayos gamma (Co 60) de lulo con y sin espinas callos y plántulas (*Solanum quitoense* Lam) Producidas in vitro. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 80-89.
- Crozzoli, R., Aguirre, Y., & Angel, L. (2012). Patogenicidad del nematodo agallador, *Meloidogyne enterolobii*, en lulo (*Solanum quitoense* Lam) en macetas. *Nematologia Mediterranea*, 40(2).
- Curimilma, S. (2015). "Control del nematodo agallador de las raíces del tomate *Meloidogyne incognita* (kofit and white, 1919) con extractos estandarizados de tres plantas nativas con propiedades nematocidas". (Tesis pregrado, Universidad Nacional de Loja). Repositorio Nacional de la Universidad Nacional de Loja.

- Duarte, M (2015). "Control biológico del nematodo agallador de las raíces de la naranjilla *Meloidogyne spp* mediante aislamientos nativos de hongos nematófagos". ((Tesis pregrado, Universidad Nacional de Loja). Repositorio Nacional de la Universidad Nacional de Loja.
- Eckart, E. (2008). Solanaceae and convolvulaceae: secondary metabolites. *Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)* Springer-Verlag, Berlin.
- Elling, A. (2013). Major Emerging Problems with Minor Meloidogyne Species. *Revista de Fitopatología*, 1092-1102.
- Ferreira, M. E., Fernández, J. N., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético.
- Gallo, Y., Marin, M., & Gutierrez, P. (2021). Detección de virus de ARN en *Solanum quitoense* mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS) utilizando entradas de ARN total y bicatenario. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Gelpud Chaves, C., Mora Marcillo, E., & Salazar Gonzalez, C. (2011). Susceptibility of genotypes of *Solanum spp.* to the nematode causative of the root knot *Meloidogyne spp.*(chitwood). *Acta Agronómica*, 60(1), 50-67.
- Gonzales, I.; Arias, Y.; Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* - Tomate. *Rev. Protección Veg.* 27(1): 1-7
- Gordon, T. (2017). *Fusarium oxysporum* y el síndrome de marchitez por Fusarium. *Revisión anual de fitopatología*. P. 23-39.
- Grant, M. R.; Godiard, L.; Straube, E.; Ashfield, T.; Lewald, J.; Sattler, A.; Innes, R.W. and Dangl, J. L. (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269:843-846.

- Green, K., Mollov, D., Tran, L., Alvarez, R., Ochoa, J., Quito, D., & Karasev, A. (2018). Caracterización de un nuevo tymovirus causante de retraso del crecimiento y mosaico clorótico en naranjilla (*Solanum quitoense*). *Plant Disease*, 911-918.
- Hurtado, P. (2004). Detección de marcadores microsatélites y búsquedas de genes análogos de resistencia asociados con la resistencia al añublo bacterial de la yuca (Master 's thesis, Uniandes).
- Hussey, RS; y Janssen, GJW 2004. Nematodo agallador: especie *Meloidogyne*. En: Starr, JL; Cocinero, R.; y Bridge, J. (Eds.). Resistencia de las plantas a nematodos parásitos. CABI Publishing, Nueva York. Páginas. 43-70.
- Jacquet, M., Bongiovanni, M., Martinez, M., Verschave, P., Wajnberg, E., & Castagnone-Sereno, P. (2005). Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the Mi gene. *Plant pathology*, 54(2), 93-99.
- Jaramillo, J., Guerrero, M., Fuentes, A., Viader, J. M., Meza, J., & Hortencia, L. (2015). Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 1-11.
- Karssen, G.; y Moens, M. 2006. Nematodos agalladores. En: Perry, enfermera registrada; y Moens, M. (Eds.). *Nematología vegetal*. Publicación CABI, Wallingford, Reino Unido págs. 59-90.
- Kassie, Y., Ebrahim, A., & Mohamed, Y. (2020). Efecto de interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* en genotipos seleccionados de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). *Revista Africana de Investigación Agrícola*, 330-342.
- Lu, X., Zhang, J., Brown, B., Li, R., Rodríguez, J., Berasategui, A., Liu, B., Xu, M., Luo, D., Pan, Z., Baerson, SR., Gershenzon, J., Li, Z., Sesma, A., Yang, B., & Peters, RJ (2018). Inferir funciones en la defensa de la asignación metabólica de los diterpenoides del arroz. *La Célula Vegetal*, 30 (5), 1119-1131.

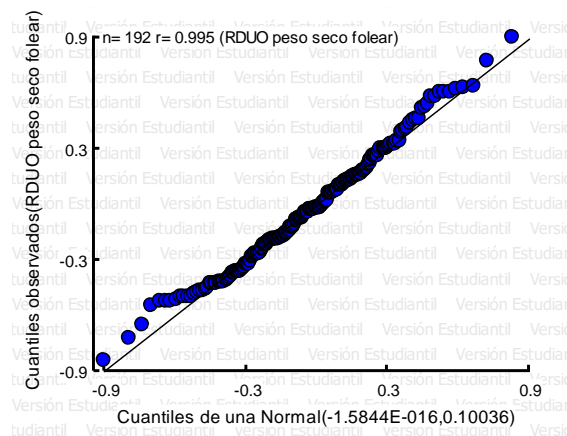
- Meena, S., Ramyabharathi, S., & Raguchander. (2015). *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* interaction in Gerbera. *African Journal of Microbiology Research*, 1282- 1285.
- Morgante, M., & Olivieri, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal*, 3(1), 175-182.
- Montes, C., Muñoz, L., Teran, F., Prado, F., & Quiñonez, M. (2010). Evaluación de patógenos en clones de lulo (*Solanum quitoense* Lam). *Redalyc*, 144-154.
- Morales, R., Espinosa, G., Morales, N., Troya, H., & Lopez, P. (2008). Búsqueda de marcadores moleculares en Naranjilla (*Solanum quitoense* Mill) para la resistencia al Nematodo (*Meloidogyne incognita*) y *Fusarium oxysporum*. *Estudios Universitarios*, 179-195.
- Morales, M., Espinosa, G., Morales, A., Sanchez, B., Jimenez, A., & Milian, Y. (2014). Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género Solanum sección Lycopersicon. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 62-73.
- Navarrete, X., Ron, L., Viteri, P., & Viera, W. (2018). Parasitismo del nematodo agallador de la raíz (*Meloidogyne incognita*) en cinco especies de solanáceas silvestres. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*.
- Ochoa, J.; Yangari, B.; Galarza, V.; Fiallos, J. (2001). Vascular wilt of common Naranjilla (*Solanum quitoense*) caused by *Fusarium oxysporum* in Ecuador. *Plant Health Progress*.
- Pacheco, L. D. (2019). Determinación de la resistencia a *Meloidogyne incognita*, en tres especies de la sección Lasiocarpa: *Solanum quitoense*, *Solanum hirtum* y *Solanum* sp. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Peña, R., & Páez, J. (2011). Nematodos Fitopatógenos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Ramirez, F., Kallarackal, J., & Davenport, T. (2018). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) Fisiología reproductiva: una revisión. *Scientia horticulturae*, 163-176.

- Rentería, M.; Guerra, M.; Ochoa, A.; Moreno, S.; Varela, A.; Gutiérrez, I.; Meza, A. (2018). Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México. *Revista mexicana de fitopatología*. 36(2): 233-255
- Revelo, J., Vasquez, W., Valverde, F., León, J. & Gallego, P. (2010). Manual del Cultivo Ecológico de la Naranja. Quito: INIAP.
- Reyna, E. (2020). "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.*". P. 1-73.
- Rivera, N., Domingo, J., & Arreaga, J. (2020). Manejo de nematodos con enmiendas orgánicas. San Marcos.
- Robinson, R. A. 1969. 'Disease resistance terminology'. Review of applied Mycology 48: 593-606.
- Salazar, C., & Betancourth, C. (2017). Reacción de genotipos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a *Meloidogyne spp.* en condiciones de campo. *Corpoica*.
- Torres, A., Vargas, J. C., García, Y., Arteaga, Y., & Navarrete, H. (2017). *Solanum quitoense* Lam, un rubro económico de alto valor en la Amazonía Ecuatoriana. *Gente, Bosque y Biodiversidad*, 137.
- Vásquez, L. & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) WC SNYDER & HN HANSEN]: UNA REVISIÓN. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.
- Vilas, V., Dhanpal, N., & Vasantrao, P. (2013). Medicinal Plants from Solanaceae Family. *J. Pharam. and Tech*, 143-151.
- Vivanco, J. M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V. M., & Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 341(2), 68-75.

Weising, K; Weigand, F; Driesel, J; Kahl, G; Zischler, H; Epplen, T. (1989).
Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genome. Nucl. Acid Res.
17:120-128.

10. Anexos

Anexo A. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable “Peso seco foliar”.



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO peso seco foliar	192	0.00	0.32	0.98	0.2174

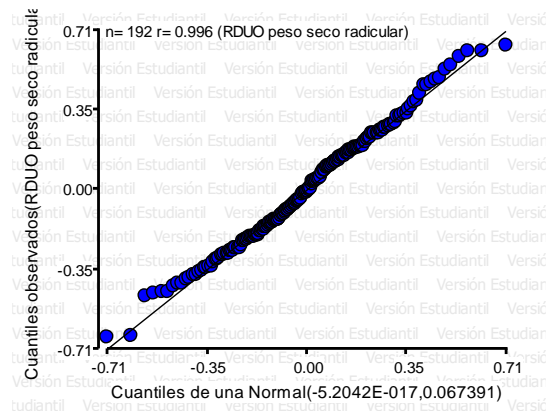
RABS peso seco foliar

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS peso seco foliar	192	0.10	0.03	72.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.70	14	0.05	1.47	0.1279
Especie	0.49	11	0.04	1.31	0.2198
Tratamiento	0.21	3	0.07	2.03	0.1121
Error	6.05	177	0.03		
Total	6.76	191			

Anexo B. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable “Peso seco radicular”.



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO peso seco radicular	192	0.00	0.26	0.98	0.1709

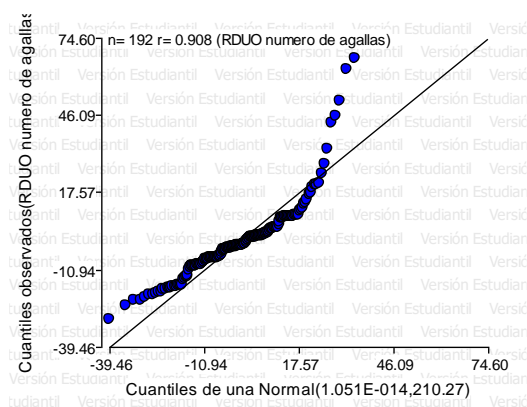
RABS peso seco radicular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS peso seco radicular	192	0.07	0.00	67.67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.29	14	0.02	0.98	0.4705
Especie	0.26	11	0.02	1.14	0.3319
Tratamiento	0.03	3	0.01	0.41	0.7449
Error	3.73	177	0.02		
Total	4.03	191			

Anexo C. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable “Numero de agallas”.



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO numero de agallas	192	0.00	14.50	0.84	<0.0001

RABS numero de agallas

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS numero de agallas	192	0.35	0.30	99.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

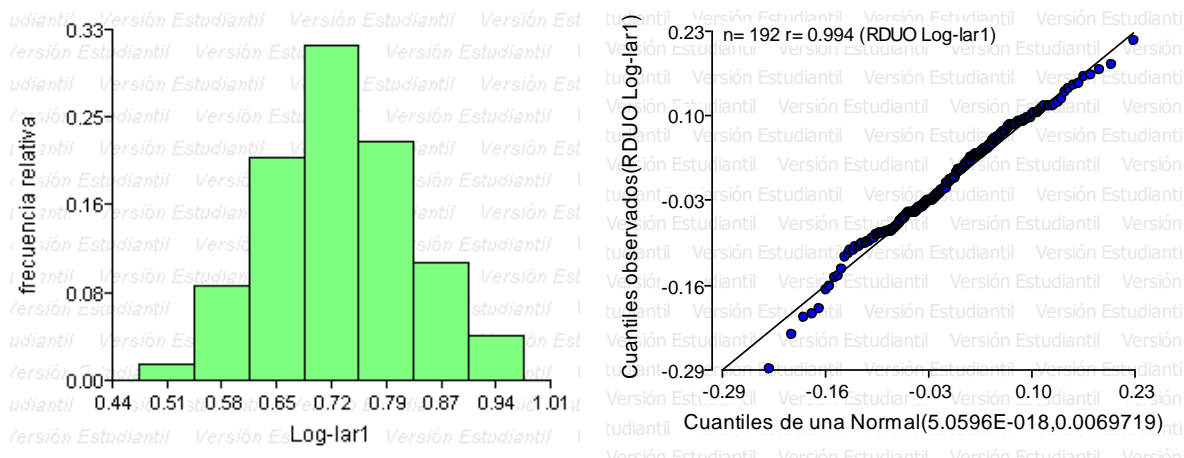
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8261.36	14	590.10	6.86	<0.0001
Especie	3793.30	11	344.85	4.01	<0.0001
Tratamiento	4468.06	3	1489.35	17.32	<0.0001
Error	15215.96	177	85.97		
Total	23477.32	191			

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RABS Raiz #ag	192	1.11	1.04	0.81	<0.0001
RDUO Log #ag	192	0.00	0.34	0.97	0.0072
RDUO numero de agallas	192	0.00	14.50	0.84	<0.0001

Nota: La variable no cumplió con el parámetro de la normalidad pese a la transformación de datos (Raíz y Logaritmo)

Anexo D. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable “Longitud del área radicular”.



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Log-lar1	192	0.00	0.08	0.99	0.4220

RABS longitud del area radicular

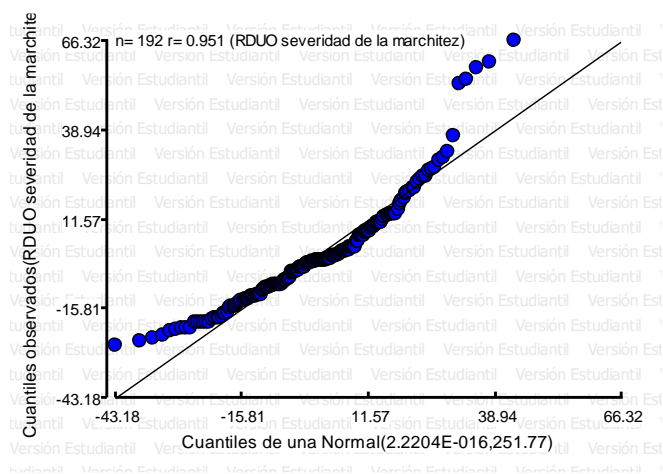
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS longitud del area rad..	192	0.10	0.03	76.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	187.16	14	13.37	1.47	0.1251
Especie	174.79	11	15.89	1.75	0.0658
Tratamiento	12.37	3	4.12	0.45	0.7146
Error	1606.06	177	9.07		
Total	1793.22	191			

Nota: La variable cumplió con el parámetro de la normalidad después de la transformación de datos (Logaritmo).

Anexo E. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable “Severidad de la marchitez”.



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO severidad de la march..	192	0.00	15.87	0.90	<0.0001

Análisis de la varianza

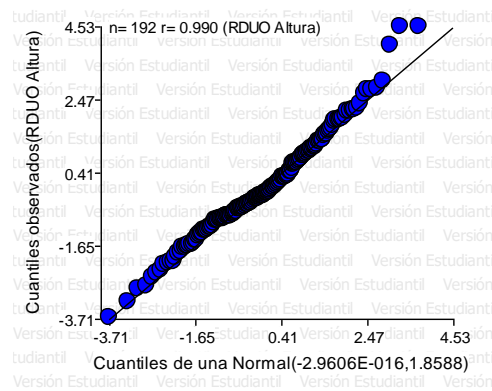
Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS severidad de la march..	192	0.31	0.26	84.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7348.53	14	524.89	5.71	<0.0001
Especie	4573.05	11	415.73	4.52	<0.0001
Tratamiento	2775.47	3	925.16	10.06	<0.0001
Error	16275.44	177	91.95		
Total	23623.97	191			

Nota: La variable no cumplió con los parámetros de la normalidad y homogeneidad.

Anexo F. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable "Altura".



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO altura	192	0.00	1.32	0.98	0.1080
RDUO diametro	192	0.00	1.04	0.99	0.4419

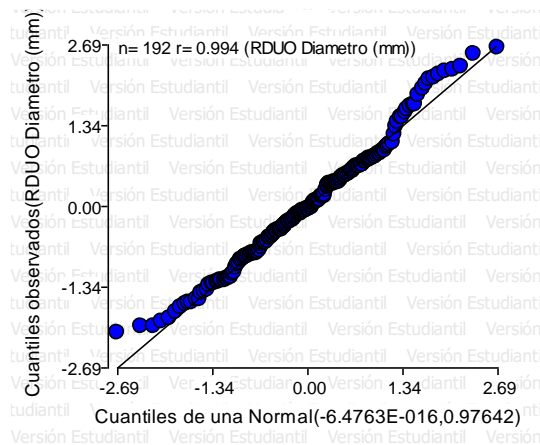
RABS altura

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS altura	192	0.01	0.00	79.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.19	3	0.40	0.60	0.6184
Tratamiento	1.19	3	0.40	0.60	0.6184
Error	125.14	188	0.67		
Total	126.33	191			

Anexo G. Resultados de las pruebas de Shapiro Wills y Levene para la variable "Diametro".



Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p{Unilateral D}
RDUO altura	192	0.00	1.32	0.98	0.1080
RDUO diametro	192	0.00	1.04	0.99	0.4419

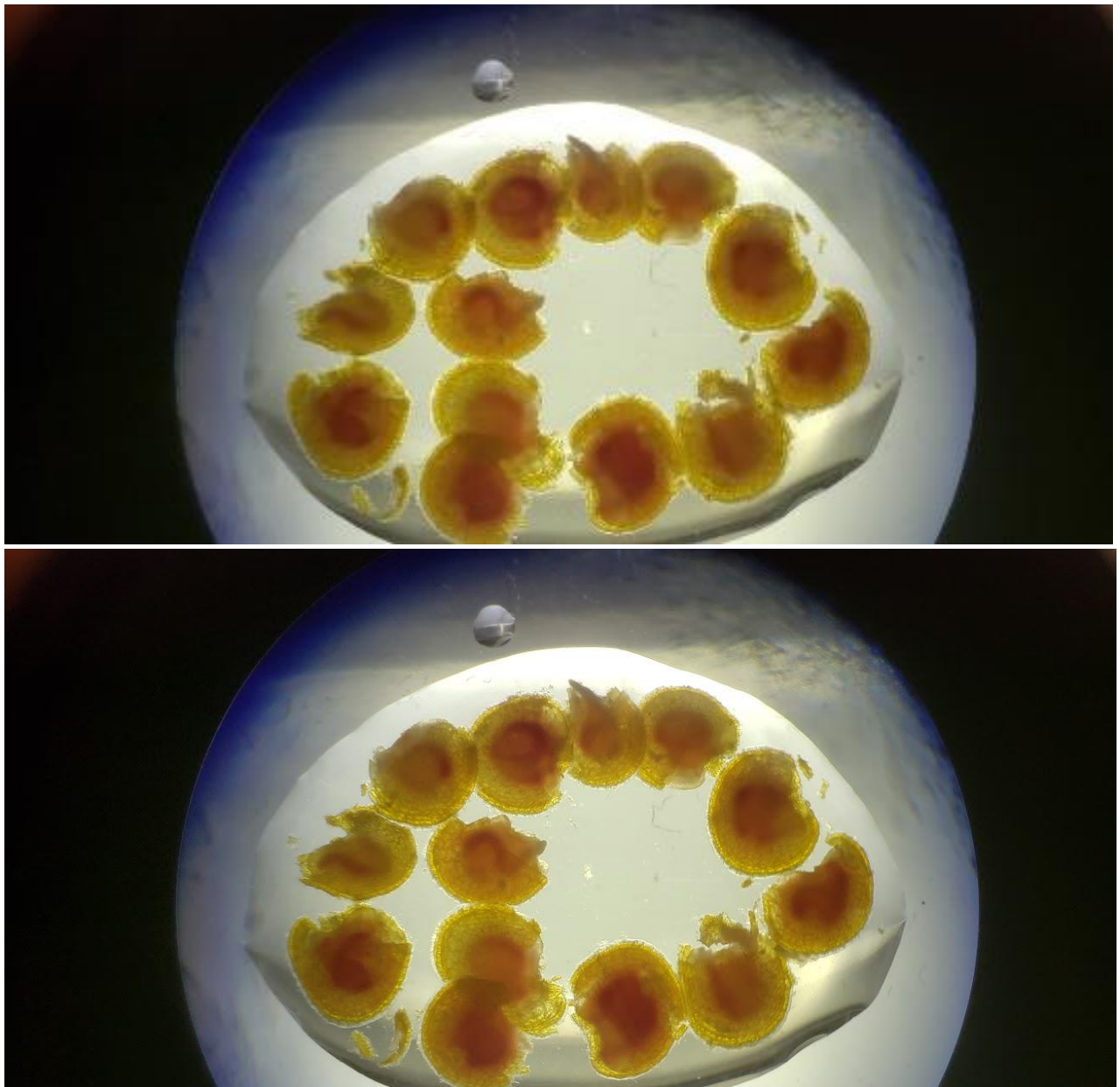
RABS diametro

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS diametro	192	2.7E-03	0.00	81.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.22	3	0.07	0.17	0.9169
Tratamiento	0.22	3	0.07	0.17	0.9169
Error	81.20	188	0.43		
Total	81.42	191			

Anexo H. Viabilidad de las semillas con la técnica de tinción con tetrazolio.



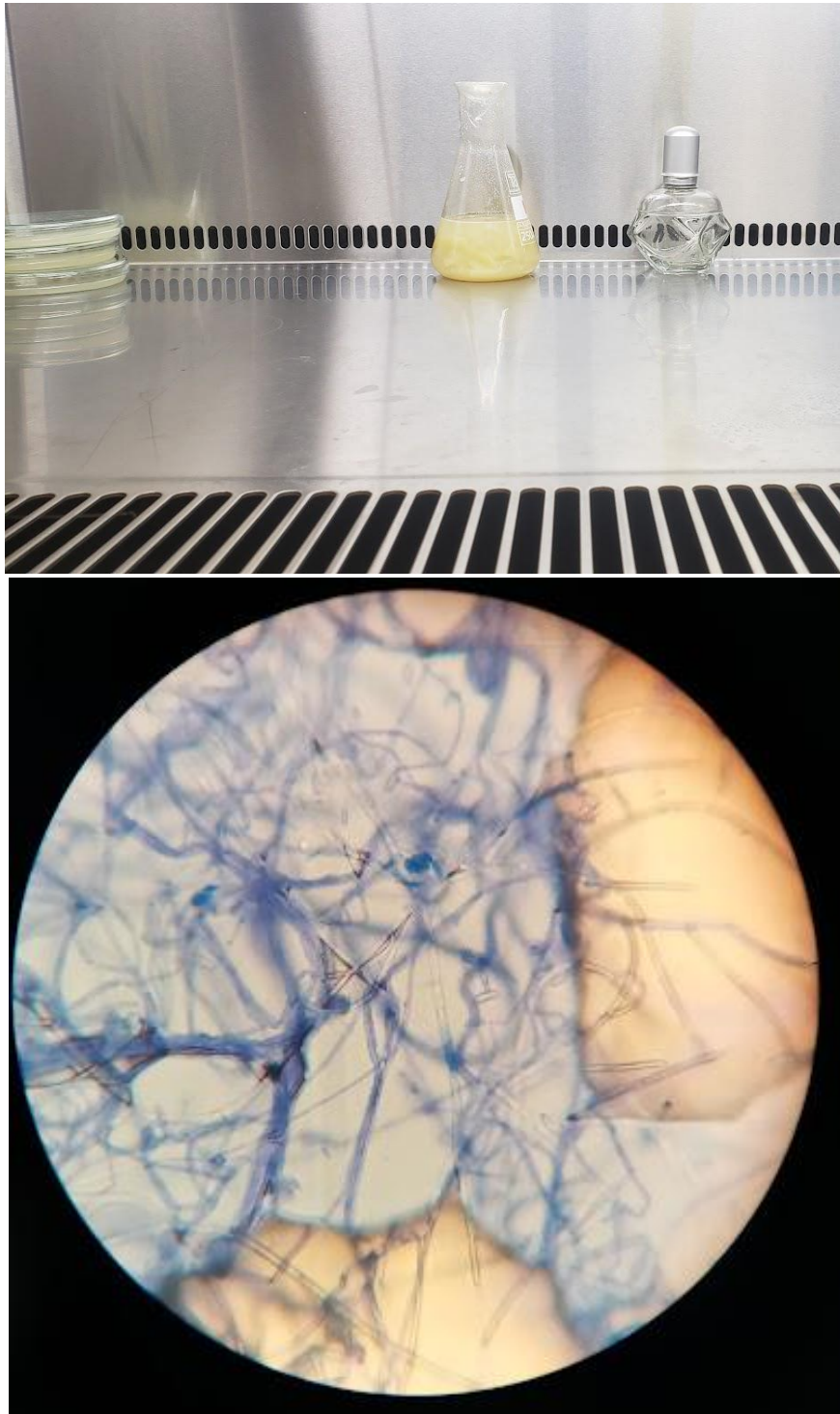
Anexo I. Siembra de las semillas de las diferentes poblaciones



Anexo J. Instalación de las unidades experimentales.



Anexo K. Aislamiento del hongo *F. oxysporum* siembra directa en medio PDA.



Anexo L. Obtención del nematodo *M. incognita* en laboratorio.



Anexo M. Crecimiento de las especies a lo largo del experimento.

