


# UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
# FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
# ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

## TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* EN EL CULTIVO DE FRUTILLA *Fragaria ananassa* Duch. MEDIANTE INDICADORES MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN LAS PARROQUIAS DE CHECA, EL QUINCHE, PIFO, PUEMBO, Y YARUQUÍ, PROVINCIA DE PICHINCHA.**

Tesis Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Agrónomo, Otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Ingeniería Agronómica.

**AUTOR:**
**JAIRO LEONARDO GUEVARA ANDRADE**

**DIRECTORA:**
**ING. AGR. SONIA SALAZAR RAMOS**

**GUARANDA – ECUADOR**
**2015**

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** EN EL CULTIVO DE FRUTILLA ***Fragaria ananassa*** Duch. MEDIANTE INDICADORES MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN LAS PARROQUIAS DE CHECA, EL QUINCHE, PIFO, PUEMBO, Y YARUQUÍ, PROVINCIA DE PICHINCHA.

REVISADO POR:

……

ING. SONIA SALAZAR RAMOS

DIRECTORA DE TESIS

……

ING. DAVID SILVA GARCIA M.Sc.

BIOMETRISTA

APROBADA POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN DE TESIS.

……...

ING. JÓSE SÁNCHEZ MORALES Mg.

ÁREA TÉCNICA

……

ING SONIA FIERRO BORJA Mg.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

## DEDICATORIA

A FELIPE POR SU ALEGRÍA

A KEVIN POR SU FORTALEZA

A TANIA POR SU PACIENCIA

A JOHAN POR SU INTELIGENCIA

Y

A MATEO POR TODO

**“**Al rever mi pasado familiar, la historia cambia y tal vez yo con ella”.

## AGRADECIMIENTO

A mis Padres, Hermanas y Esposos, este presente simboliza mi gratitud por la invaluable ayuda, cariño, guía que siempre me han proporcionado.

A la Universidad Estatal de Bolívar, en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica y en ella a mí tribunal de Tesis, Ing. Sonia Salazar, Ing. David Silva M.Sc., Ing. Sonia Fierro Mg. y al Ing. José Sánchez Mg. por haberme brindado sus conocimientos en la revisión, preparación y desarrollo del trabajo de tesis.

A la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) especialmente a Patricia Garrido Haro M.Sc. (Directora de Diagnóstico Vegetal de Laboratorios) y a la Lcda. Sabrina Méndez Rivera **(**Responsable de Laboratorio Fitopatología) por la oportunidad de realizar mi tesis en el laboratorio, por su confianza, paciencia, disposición permanente y sobre todo su gran aporte en mi formación académica y personal.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Ing. Hernando Regalado, Ing. Alexander Toaza, Ing. Ana Garrido y al Ing. David Jarrín por su valiosa guía y asesoramiento y en especial por su amistad para que este trabajo de investigación haya culminado exitosamente.

Y un agradecimiento imperecedero a Andreas Bernreiter Ph. D., a Rosalía García Ph. D., y a Yeturo Sivaprasad Ph. D. por brindarme su valioso asesoramiento, su aporte intelectual y en especial por su amistad

## ÍNDICE DE CONTENIDOS


| CAP. | CONTENIDO | PAG. |
|---|---|---|
| **I.** | **INTRODUCCIÓN**…….... | 1 |
| **II.** | **MARCO TEÓRICO**…….... | 3 |
| **2.1.** | Origen……..... | 3 |
| **2.2.** | Producción de la frutilla…… | 3 |
| **2.3.** | Clasificación botánica……..... | 4 |
| **2.4.** | Características botánicas…… | 4 |
| **2.4.1.** | Sistema radicular……..... | 4 |
| **2.4.2.** | Tallo……. | 5 |
| **2.4.3.** | Estolones…… | 5 |
| **2.4.4.** | Hojas……... | 5 |
| **2.4.5.** | Inflorescencia……. | 6 |
| **2.4.6.** | Fruto…… | 6 |
| **2.5.** | Exigencias agroclimáticas del cultivo…… | 7 |
| **2.6.** | Tecnología del cultivo……..... | 7 |
| **2.7.** | Plagas y enfermedades……... | 8 |
| **2.8.** | Marchitez vascular producida por ***Fusarium oxysporum***…. | 8 |
| **2.8.1.** | Taxonomía de ***Fusarium oxysporum***…….. | 9 |
| **2.8.2.** | Formas especiales o variabilidad genética……... | 9 |
| **2.8.3.** | Ecología…….. | 10 |
| **2.8.4.** | Ciclo de la enfermedad…… | 10 |
| **A.** | Inoculación y penetración del patógeno al huésped……... | 10 |
| **B.** | Establecimiento de la infección y colonización del patógeno……. | 11 |
| **C.** | Crecimiento y reproducción del patógeno……..... | 12 |
| **D.** | Dispersión y supervivencia del patógeno……. | 13 |
| **2.8.5.** | Síntomas…… | 14 |
| **2.8.6.** | Reacciones de susceptibilidad y resistencia…… | 15 |
| **2.8.7.** | Métodos de control……... | 15 |
| **A.** | Método químico……..... | 15 |
| **B.** | Método cultural…….. | 16 |
| **C.** | Método genético…… | 16 |
| **2.9.** | Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)…….. | 16 |
| **2.10.** | Regiones de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosómico. …….. | 18 |
| **2.11.** | Región del gen factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1α)……. | 19 |

| | | |
|---|---|---|
| **III.** | **MATERIALES Y MÉTODOS**……..... | 21 |
| **3.1.** | **MATERIALES**…….. | 21 |
| **3.1.1.** | Ubicación del ensayo……..... | 21 |
| **3.1.2.** | Situación climática…… | 21 |
| **3.1.3.** | Zona de vida……..... | 21 |
| **3.1.4.** | Material experimental…….. | 22 |
| **3.1.5.** | Equipos y materiales de laboratorio……..... | 22 |
| **3.1.6.** | Materiales de oficina……. | 23 |
| **3.1.7.** | Materiales de campo…… | 23 |
| **3.2.** | **MÉTODOS**……..... | 24 |
| **3.2.1.** | Factor de estudio……..... | 24 |
| **3.2.2.** | Tratamientos…….. | 24 |
| **3.2.3.** | Procedimiento…….. | 25 |
| **3.2.4.** | Tipo de análisis……. | 25 |
| **3.2.5.** | Métodos de evaluación y datos tomados……. | 25 |
| **3.2.6.** | Manejo del ensayo…… | 27 |
| **A.** | Proceso de colecta de muestras……..... | 27 |
| **B.** | Siembra del material vegetal y sustrato…..... | 29 |
| **C.** | Purificación y obtención de cultivos monospóricos……. | 30 |
| **D.** | Almacenaje de las muestras de campo…… | 31 |
| **E.** | Conservación del patógeno (cepario)…… | 31 |
| **F.** | Masificación del micelio en medio líquido……. | 32 |
| **G.** | Identificación morfológica y morfométrica del fitopatógeno……..... | 33 |
| **H.** | Evaluación bioquímica por el sistema de identificación BIOLOG…….…… | 33 |
| **I.** | Evaluación a nivel molecular (Análisis filogenético)……..... | 34 |
| **J.** | Evaluación de primers específicos……..……. | 37 |
| **K.** | Evaluación de la patogénesis aplicando los Postulados de Koch……..... | 38 |
| **IV.** | **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**…….. | 40 |
| **4.1.** | Identificación del aspecto colonial y morfometría…… | 41 |
| **4.2.** | Evaluación bioquímica mediante el sistema de identificación BIOLOG…….. | 43 |
| **4.3.** | Evaluación a nivel molecular (Análisis filogenético)…… | 45 |
| **4.4.** | Evaluación de la forma especial ***Fusarium oxysporum*** con primers específicos…….. | 53 |
| **4.5.** | Evaluación de la patogénesis aplicando los Postulados de Koch……..... | 54 |

**V.** **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**..... 56
**5.1.** CONCLUSIONES..... 56
**5.2.** RECOMENDACIONES..... 58
**VI.** **RESUMEN Y SUMMARY**..... 59
**6.1.** RESUMEN..... 59
**6.2.** SUMMARY..... 60
**VII.** **BIBLIOGRAFÍA**..... 61
**APÉNDICES**

| N° | ÍNDICE DE CUADROS | PAG. |
|---|---|---|
| **1** | Información de las muestras procesadas durante el proceso de tesis en el laboratorio de Fitopatología. AGROCALIDAD 2015 | 27 |
| **2** | Características de la morfología colonial de los 13 aislados sembrados en PDA | 40 |
| **3** | Medidas de las macroconidias de los 13 aislados fueron sembrados en medio de cultivo CLA | 41 |
| **4** | Lecturas de las microplacas correspondientes a los 13 aislados de ***Fusarium sp***. | 43 |
| **5** | Concentración del ADN de los patógenos aislados de plantas de frutilla ***Fragaria ananassa*** Duch. | 44 |
| **6** | Análisis de varianza para los 13 tratamientos | 53 |
| **7** | Datos de sintomatología obtenidos de las plantas inoculadas con los aislados de los 13 tratamientos. | 59 |

| N° | ÍNDICE DE FIGURAS | PAG. |
|---|---|---|
| **1** | Diagrama de ubicación de las regiones ITS en la cadena de ADN ribosómico | 19 |
| **2** | Mapa de región del gen TEF-1α de *Fusarium* usada para identificación de especies. | 19 |
| **3** | Análisis electroforético del producto PCR de regiones ITS amplificado de 13 tratamientos (T1-T13), más un marcador de peso molecular de 100 pb y los posibles hongos ***Pestalotia sp***. (P) y ***Rhizoctonia sp.*** (R), más un control negativo | 46 |
| **4** | Alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE en base a codones de las secuencias en estudio. | 47 |
| **5** | Árbol consenso construido con el método de máxima verosimilitud, basado en las distancias de las secuencias de las regiones del espaciador transcribible interno (ITS) en el ADN ribosómico: f. sp. | 48 |
| **6** | Visualización del producto PCR de la región EF-1α amplificado de 13 muestras de ADN (T1-T13), un marcador de peso molecular de 100pb y un control negativo | 49 |
| **7** | Visualización del producto PCR de la región EF - 1 α amplificado de 13 aislados de ADN (T1 - T13), un marcador de peso molecular de 100pb y un control negativo. Previa aplicación de la técnica Band-stab PCR | 50 |
| **8** | Alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE en base a codones de las secuencias en estudio. | 51 |
| **9** | Árbol consenso construido con el método de máxima verosimilitud, basado en las distancias de las secuencias de la regio EF 1 α del ADN. | 52 |
| **10** | Visualización del producto PCR de ***Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*** amplificado con primers específicos Fofra-F y Fofra-R, de 13 aislados de ADN (No. 1-13), marcador de peso molecular de 100pb y un control negativo. | 53 |

| N° | ÍNDICE DE TABLAS | PAG. |
|---|---|---|
| **1** | Zonas productoras de frutilla en el país. | 3 |
| **2** | Requerimientos agroecológicos del cultivo de frutilla. | 7 |
| **3** | Requerimientos edáficos del cultivo de frutilla. | 7 |
| **4** | Registro insectos-plaga, nematodos y hongos fitopatógenos de la frutilla. | 8 |
| **5** | Intervalos de lecturas realizadas en el sistema de identificación BIOLOG. | 34 |
| **6** | Secuencias nucleotídicas utilizadas para la amplificación de regiones ITS(s) y TEF-1α | 35 |
| **7** | Secuencias nucleotídicas sintetizadas utilizadas para la amplificación de la ***Fusarium oxysporum*** f. sp**. *fragariae*** | 37 |

**N°** **ÍNDICE DE ANEXOS**

**1** Ubicación de zonas de muestreo

**2** Cronograma de actividades

**3** Presupuesto de tesis

**4** Composición de los medios de cultivo

**5** Características morfológicas de *Fusarium*

**6** Fotografías del manejo y evaluación de la investigación

**7** Glosario de términos

# I. INTRODUCCIÓN

Las formas silvestres de frutilla están adaptadas a diversos climas en casi todo el mundo excepto en África, Asia y Nueva Zelanda. La frutilla de fruto grande se generó a partir de 1800, constituyendo el punto de partida de las variedades modernas que dominan la producción mundial (Ramallo, J. et al., 1994).

El consumo de frutilla (***Fragaria ananassa*** Duch.) tiene gran aceptación mundial, por lo que su cultivo se ha extendido a U.S.A., Canadá, México, Colombia, Chile, Argentina, Guatemala, Costa Rica, Ecuador y a casi toda Europa, generándose una creciente expansión de consumidores, favorecido por el trasporte aéreo (Fernández, J. 2005).

En Ecuador el cultivo intensivo de frutilla se inició aproximadamente en 1983, principalmente en la Provincia de Pichincha, en las Parroquias de Puembo, Pifo, Yaruquí, Checa y El Quinche (Bejarano, W. 1993). Este cultivo constituye una importante alternativa socioeconómica para estas Provincias (http://www.revistaelagro.com).

El incremento del área cultivada y el proceso de importación del material vegetativo con fines de propagación, han provocado que formas patogénicas existentes y nuevas sean diseminadas por prácticas culturales inapropiadas, lo cual excede con frecuencia el control fitosanitario del cultivo de frutilla (Dávalos, P. et al., 2011).

La patogenicidad especifica de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** causante de la pudrición vascular (http://nt.ars-grin.gov), fue reportado por primera vez en Australia en 1965 (http://link.springer.com) y actualmente en Japón (http://www.actahort.org), Corea (http://ocean.kisti.re.kr), Chile (http://micologia.uv.cl), España (http://apsjournals.apsnet.org), U.S.A. (http://apsjournals.apsnet.org), China (http://link.springer.com), México (Dávalos, P. et al. 2011), y en Irak (http://www.jebas.org) atribuyendo que su diseminación a nivel mundial se debe a su difícil diagnóstico

(http://micologia.uv.cl). Por lo que es necesario que la capacidad científica, tecnológica y de infraestructura de las instituciones responsables del cuidado del estatus fitosanitario de los productos agropecuarios, genere y difunda información con respecto al cultivo.

Actualmente el desarrollo y uso de nuevas tecnologías de biología molecular basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se pueden utilizar para la aplicación de marcadores moleculares. El Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPDs), Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) entre otras, son empleadas en el análisis del polimorfismo genético del ADN, que con el desarrollo de software bioinformáticas diseñados para el análisis de secuencias, nos permite obtener información eficiente y oportuna aplicable a un gran número de muestras, siendo técnicas más específicas, objetivas, sensibles y rápidas que los métodos tradicionales.

Esta investigación propone, identificar y evaluar, al hongo ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae***, para poder establecer o descartar su presencia en Ecuador, planteándose los siguientes objetivos:

- Identificar la morfología y morfometría del fitopatógeno.
- Evaluar la bioquímica del fitopatógeno mediante el uso del sistema de identificación BIOLOG.
- Secuenciar la región de los espacios intergénicos del ADN ribosómico (ITS) y del Factor de Elongación 1 alfa (EF-1$\alpha$), para realizar la identificación a nivel molecular.
- Evaluar primers específicos para la identificación taxonómica de la forma especial del fitopatógeno.
- Evaluar la patogénesis del presunto agente causal en plantas sanas de frutilla aplicando los postulados de Koch.

# II. MARCO TEÓRICO

## 2.1. Origen

La frutilla comercial ***Fragaria ananassa*** Duch., deriva de la hibridación entre las especies ***Fragaria chiloensis*** (pistilada) de Chile y ***Fragaria virginiana*** (estaminada) del este de U.S.A.; este híbrido presenta flores hermafroditas autocompatibles y descendencia indefinidamente fértil, justificando su determinación como nueva especie híbrida, que posee hojas grandes de color verde claro o verde obscuro con pecíolo largo y fruto de gran tamaño con forma y color variable (http://inta.gob.ar).

## 2.2. Producción de la frutilla

Internacionalmente la producción de frutilla ha crecido 13% en los últimos cinco años. Este crecimiento se debe al desarrollo tecnológico, aumento del área de cultivo bajo invernadero, por su sabor y por los beneficios que aporta a la salud (http://www.odepa.cl). A nivel mundial países como China, U.S.A., México. Turquía, España y Egipto son los principales productores (http://faostat3.fao.org).

**Tabla 1.** Zonas productoras de frutilla en el país.

| PROVINCIA | CANTONES |
|---|---|
| Carchi | Mira, Montúfar, Bolívar |
| Imbabura | Ibarra, Atuntaqui, Cotacachi, Pimampiro, Urcuquí |
| Pichincha | Quito, Rumiñahui |
| Cotopaxi | Salcedo, Pujilí |
| Tungurahua | Ambato, Pelileo, Patate |
| Bolívar | Guaranda, Chillanes, S. Miguel, Chimbo |
| Chimborazo | Riobamba, Alausí, Pallatanga |
| Cañar | Azogues, Biblián |
| Azuay | Cuenca, Gualaceo |
| Loja | Loja, Cariamanga |

Fuente: Bejarano, W. 1993

En Ecuador las áreas de mayor producción están en la Provincia de Pichincha con 400 ha de cultivo, Tungurahua con 240 ha y las Provincias

de Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura y Azuay con más de 40 ha de producción (Tabla 1). Las variedades como Diamante, Oso Grande, Monterrey y Albión, se cultivan entre los 1300 y 3600 msnm con temperaturas promedio de 15°C, estas variedades tienen textura y peso similar diferenciándose por su tamaño (http://www.revistaelagro.com).

## 2.3. Clasificación botánica

La clasificación taxonómica de la frutilla es:

| | |
|---|---|
| Súper reino | : Eucariota |
| Reino | : Vegetal |
| División | : Antofita |
| Clase | : Dicotiledónea |
| Subclase | : Rosidae |
| Orden | : Rosales |
| Familia | : Rosaceae |
| Subfamilia | : Rosoidea |
| Tribu | : Potentilla |
| Género | : *Fragaria* |
| Especie | : ***Fragaria ananassa*** Duch. |
| Nombre común | : Frutilla, Fresa o Fresón |

Fuente: http://www.tdx.cat

## 2.4. Características botánicas

La frutilla es perenne, herbácea, rastrera y estolonífera, no supera los 30 cm de altura (Dávalos, P. et al., 2011).

### 2.4.1. Sistema radicular

La corona es la zona donde se origina el sistema radicular de aspecto fibroso y fasciculado (adventicio) de unos 30 a 50 cm de profundidad y 30 cm en sentido lateral (Ramallo, J. et al*.,* 1994), el 80 - 90% de las raíces se concentran en los primeros 30 cm (http://www2.inia.cl), conteniendo entre 25 y 100 raíces primarias con miles de pequeñas raíces laterales que carecen de cámbium y tienen un período de vida corto (Bejarano, W. 1993).

### 2.4.2. Tallo

El tallo (corona) es semisubterráneo y reducido, de 2 - 3 cm de longitud, el cual se alarga lentamente formando nudos y entrenudos muy cortos. Insertadas de forma helicoidal se encuentran dos tipos de yemas axilares; las yemas florales que originan las inflorescencias y las yemas vegetativas que dan origen a las hojas y estolones. A medida que envejece tiene la capacidad de dividirse y originar hasta 8 - 10 nuevas coronas (http://www.tdx.cat).

### 2.4.3. Estolones

Los estolones son tallos rastreros, desarrollados en días largos a temperaturas de 22 a 24°C (http://www2.inia.cl), una planta vigorosa puede producir 10 - 15 estolones, el primer nudo es latente pero a veces da origen a otro estolón más pequeño. En el extremo del estolón se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo emite raíces, originando una nueva planta (Bejarano, W. 1993).

### 2.4.4. Hojas

La germinación de la semilla es epigea presentando dos cotiledones redondeados, posteriormente aparecen dos hojas simples, bi, tri o penta lobuladas. El follaje normal presenta tres folíolos terminales levemente pedunculados de bordes dentados, con un par de estípulas triangulares y adnadas a su base que protegen a las yemas y corona de heladas o del efecto de suelos muy fríos; muchas veces las hojas presentan en el pecíolo un par de pequeños folíolos (http://www.tdx.cat).

Las hojas presentan en el haz un color verde oscuro y gris velloso por el envés, poseen muchos estomas (300 - 400 estomas por $mm^2$), comparado con otras plantas (manzano posee 246 estomas por $mm^2$).

Esta característica sumada a la posesión de un sistema radical superficial, hace que la planta sea sensible al suministro de agua, humedad ambiental, temperatura, intensidad y duración de luz (http://www.tdx.cat).

### 2.4.5. Inflorescencia

La inflorescencia parte de las axilas de las hojas sobre el pedúnculo y se agrupa en racimos, cimas bíparas o unifloras. Estas pueden tener un raquis con ramificación alta o ramificación basal, siendo de simetría actinomorfa (radial), pedunculada con un grueso receptáculo que se hipertrofia después de la fecundación para convertirse en la parte carnosa y comestible de la planta (Bejarano, W. 1993).

Cada flor hermafrodita contiene un receptáculo compuesto por miles de ovarios que están rodeados por un anillo de estambres de longitud variable, contiene un cáliz con cinco sépalos persistentes y una corola con cinco pétalos ovales (Bejarano, W. 1993).

Una flor inicial puede tener 500 pistilos y una final sólo 50, cuando el grano de polen germina sobre cada estigma su núcleo cae al estilo y fertiliza ciertas células en el óvulo dentro de cada ovario para formar el embrión; esta fertilización inicia el crecimiento del embrión dentro de una semilla dura (aquenio) (http://www2.inia.cl).

### 2.4.6. Fruto

Es un fruto múltiple (poliaquenio) considerado no climatérico. Los aquenios son frutos secos indehiscentes, uniseminados monospermas, que se insertan en la superficie del hipanto; un fruto mediano contiene de 150 a 200 aquenios, pudiendo llegar hasta 400 en los frutos de gran tamaño (http://www.tdx.cat). El hipanto maduro tiene hasta 5 cm de diámetro presenta formas diversas como achatada, globosa, globosa – cónica, cónica alargada, cónica alargada con cuello, en cuña alargada y en cuña corta (http://www.tdx.cat).

## 2.5. Requerimientos agroclimáticos de la frutilla

**Tabla 2.** Requerimientos agroecológicos del cultivo de frutilla.

| REQUERIMIENTOS | RANGO ÓPTIMO |
|---|---|
| Clima | Subártico y subtropical |
| Temperatura | 15 a 20°C en el día y 15 a 16°C en la noche |
| Humedad relativa | 60 -75% |
| Pluviosidad | 400 - 600 mm |
| Altitud | 1200 hasta 2500 msnm |
| Formación ecológica | Bosque seco Montano bajo (bs-MB) |

Fuente: PROEXANT. 1993

**Tabla 3.** Requerimientos edáficos del cultivo de frutilla.

| REQUERIMIENTO | RANGO ÓPTIMO |
|---|---|
| Textura | Franco - arenosa; areno - arcillosa o en suelos arenosos con disponibilidad de la humedad suficiente |
| pH | 5.5 a 6.5 |
| Materia orgánica | 2 y 3 % |
| Conductividad eléctrica | Menor a 1 dS/m |

Fuente: PROEXANT. 1993

## 2.6. Tecnología del cultivo

El sistema de riego por goteo es recomendable en plantaciones comerciales, se debe usar agua libre de sales de sodio, cloro y boro. Aguas que contengan entre 400 a 6000 ppm de sales totales no deben ser utilizadas. La cantidad de riego recomendado semanalmente es de 2.5 l/$m^2$ con (http://www.ipni.net).

Dependiendo del análisis de suelos, variedad y época de plantación, se recomienda que la proporción de N: P: K requerido es 1: 0.8: 1,8. En general la dosis de fertilizante sugeridas para distintas situaciones es 150 - 250 Kg N/ha, 90 - 180 Kg $P_2O_5$/ha y 270 - 400 Kg $K_2O$/ha (http://www.revistaelagro.com).

## 2.7. Plagas y enfermedades

**Tabla 4.** Registro insectos-plaga, nematodos y hongos fitopatógenos de la frutilla.

| NOMBRE COMÚN | NOMBRE CIENTÍFICO |
|---|---|
| **PLAGAS** | |
| Acaro de las manchas | ***Tetranychus urticae*** Koch. |
| **ENFERMEDADES** | |
| Pudrición gris del fruto | ***Botrytis cinérea*** Pers. |
| Pudrición de raíces | ***Cylindrocarpon sp.*** |
| Pudrición de raíces | ***Fusarium sp.*** |
| Mancha de la hoja | ***Mycosphaerella fragariae*** (Tul.) Lind. |
| Muerte de plántulas | ***Pythium sp.*** |
| Pudrición de raíces | ***Rhizoctonia solani*** Kuehn. |
| Marchitamiento | ***Verticilium albo-atrum*** Reinke & Berth. |
| Pudrición radicular y momificación del fruto | ***Phytopthora sp.*** |
| **NEMATODOS** | |
| Nematodos de las yemas y hojas | ***Aphelenchoides sp.*** |
| Nematodo de las agallas | ***Meloidogyne sp.*** |
| Nematodo lesionador | ***Pratylenchus sp.*** |
| Nematodo del raquitismo | ***Tylenchorhynchus sp.*** |
| Nematodo del suelo (larvas) | ***Tylenchus sp.*** |

Fuente: MAG. 1986

## 2.8. Marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum*

***Fusarium oxysporum*** es un hongo cosmopolita, presente en el suelo como saprófito o como patógeno especializado, parasitando a más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas (http://www.virtual.unal.edu.co).

Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento alcanzando 4.5 (-6.5) cm de diámetro en cuatro días a 25°C. Estas colonias se pueden presentar micelial o pionnotal: las primeras contienen micelio aéreo con aspecto algodonoso de coloración variable, (de blanco a rosado durazno un tanto amarillento pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar) y con pocas microconidias, la pionnotal presenta poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias (Domsch, K. et al., 2007).

### 2.8.1. Taxonomía de ***Fusarium oxysporum***

Dominio : Eucariota
Reino : Fungi
División : Ascomycota
Subdivisión : Pezizomycotina
Clase : Sordariomycetes
Subclase : Hypocreomycetidae
Orden : Hypocreales
Familia : Nectriaceae
Género : *Fusarium*
Especie : ***Fusarium oxysporum***
Fuente: http://www.mycobank.org

### 2.8.2. Formas especiales o variabilidad genética

La forma especial (f. sp.) corresponde a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades morfológicas en su habilidad para parasitar una especie, género o familia específica, por lo cual, aislamientos con el mismo rango de hospedantes, se asignan a una forma especial (Domsch, K. et al*.,* 2007). Además se subdivide en razas fisiológicas, variabilidad relacionada con las condiciones ambientales, ecológicas, geográficas y la presencia de un hospedante u hospedantes. Razón por la cual las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislados del hongo son el principal criterio para diferenciar las formas especiales y sus razas fisiológicas (http://micologia.uv.cl).

***Fusarium oxysporum*** produce marchitez vascular en diversos cultivos económicamente importantes, en diferentes países y regiones; por ejemplo en cultivos como el tomate (f. sp. ***lycopercisi***), cebolla (f. sp. ***cepae***), repollo (f. sp. ***conglutinas***), remolacha (f. sp***. betae***), banano (f. sp. ***cubense***), cítricos (f. sp. ***citri***), melón (f. sp. ***melonis***), vid (f. sp. ***herbemontis***), frejol (f. sp. ***phaseoli***), soya (f. sp. ***glycines***), palma africana (f. sp. ***elaedis***), clavel (f. sp. ***dianthi***), crisantemo (f. sp. ***chrysanthemi***), trébol (f. sp***. trifolii***), alfalfa (f. sp. ***medicaginis***), eucalipto (f. sp***. eucalipti***) entre otros (http://www.revistas.unal.edu.co).

### 2.8.3. Ecología

El género *Fusarium* usa como nichos, el suelo (hasta 100 cm de profundidad), partes aéreas de las plantas y sustratos orgánicos. Factores como clima, vegetación, tipo de suelo, humedad del suelo y fertilidad inciden directamente en la distribución y abundancia de este hongo. Encontrándose en forma abundante en suelos fértiles pero no es común encontrarlos en suelos forestales (Leslie y Summerell. 2006).

***Fusarium oxysporum*** está comúnmente presente de forma muy destructiva en las regiones templadas más cálidas y en los trópicos y subtrópicos, llegando a ser menos dañinos o raros en climas más fríos, excepto cuando el cultivo se realiza en invernadero (Agrios, G. 1995). Algunas especies se han encontrado en el desierto y en zonas árticas; donde las condiciones ambientales prevalentes son severas (Leslie y Summerell. 2006).

### 2.8.4. Ciclo de la enfermedad

#### A. Inoculación y penetración del patógeno al huésped

Las macroconidias formadas en el tejido del hospedero pueden ser lavadas y caer al suelo, donde algunas se convierten en clamidósporas (inóculo inicial). La germinación de conidias o clamidósporas primaria o secundaria es el primer paso en el ciclo de vida de ***Fusarium oxysporum***, pero es dependiente del número de propágulos en la zona de penetración, de la disponibilidad de carbono y nitrógeno (nutrientes de la rizósfera) y de la supresividad de la microflora (Domsch, K. et al., 2007).

La penetración comienza con la adhesión del patógeno a la superficie externa de los órganos de la planta; el propágulo contiene en su superficie un mucilago que es la mezcla de polisacáridos, glicoproteínas, polímeros de hexosaminas y materiales fibrilares, que al humedecerse se torna

pegajosa y ayuda al patógeno a adherirse a la planta. Los tubos germinativos producen también sustancias mucilaginosas ya sea en toda su longitud o sólo en la punta del tubo germinativo, que le permite adherirse a la estructura cuticular del hospedante que se altera quizá como resultado de las enzimas digestivas contenidas en la cubierta mucilaginosa del tubo germinativo (Agrios, G. 1995).

Comúnmente el patógeno penetra por los pelos absorbentes o células de la epidermis junto a la cofia de la raíz, o dentro de la zona de elongación. Moviéndose intercelularmente e intracelularmente a través del tejido parenquimatoso, penetra al meristemo primario e invade los vasos traqueales diferenciados de la zona de la protostela, luego coloniza las células endodérmicas y el periciclo dentro de la zona de diferenciación (http://books.google.com.ec). También puede ingresar a través de heridas, el hipocótilo o los cotiledones (Agrios, G. 1995).

### B. Establecimiento de la infección y colonización del patógeno

El establecimiento inicial del patógeno en los elementos del xilema y su distribución sistémica se debe a la capacidad de producir enzimas que degradan las paredes celulares de la planta. Enzimas como la Metilesterasa Pectina (PME) son característica de ***Fusarium oxysporum*** (Leslie y Summerell. 2006), esta enzima conjuntamente con la poligalacturonasa y la pectintranseliminasa degrada la pectina; mientras que las enzimas celulasa y hemicelulasa degradan la celulosa (https://books.google.com.ec).

Además produce toxinas como el Lycomarasin y ácido fusárico que son capaces de producir varias alteraciones en las plantas como por ejemplo incremento de la respiración, alteración del metabolismo del fenol, activación de la polifenoloxidasa, incremento de la actividad de los reguladores de crecimiento, disminución de la tasa fotosintética, enanismo, pérdida de agua a través de la transpiración, entre otras (Agrios, G. 1995).

La colonización se desarrolla después de que germinan las esporas, en el estado inicial de la infección, el hongo produce hifas que son confinadas en los vasos del protoxilema y metaxilema, después invade lateralmente vaso a vaso los elementos primarios y secundarios del xilema a través de las paredes del protoxilema. A continuación se da un explosivo estado de invasión hacia tallos y peciolos distribuyéndose sistemáticamente en los vasos largos reticulados a través de los plasmodesmos; el movimiento inicial a través del xilema de raíces jóvenes puede ser muy lento, mientras que en raíces maduras es muy veloz (Leslie y Summerell. 2006).

La distribución ascendente está dada principalmente por la producción de microconidias, que son arrastradas por la savia. Las microconidias luego germinan, desarrollan hifas que penetran los poros de las barreras y esporulan bajo la obstrucción. Estas microconidias secundarias son llevadas hacia arriba y germinan en la siguiente barrera que encuentren y así en un proceso repetitivo (https://books.google.com.ec).

### C. Crecimiento y reproducción del patógeno

El hongo crece en los elementos del xilema beneficiándose de las sustancias celulósicas o pectináceas expuestas en las paredes de los vasos y de carbohidratos, aminoácidos y minerales muy diluidas contenidas en los fluidos vasculares (https://books.google.com.ec). Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Domsch, K. et al., 2007) por lo que su reproducción se realiza mediante la formación de tres tipos de esporas asexuales:

- Microconidias.- Esporas de multiplicación y diseminación en la planta, generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las dimensiones de las microconidias es de 5 - 12 µm de largo por 2.3 - 3.5 µm de ancho (Domsch, K. et al., 2007).

- Macroconidias.- Esporas de multiplicación y diseminación de la planta, por lo general están ubicadas en los esporodoquios, tienen paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Las dimensiones de las macroconidias oscila entre (20-) 27 – 46 (-60) µm de largo por 3.0 - 4.5 (-5.0) µm de ancho (Domsch, K. et al*.,* 2007).

- Clamidósporas.- Esporas de resistencia a condiciones adversas, formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, tienen paredes gruesas y redondas constituidas por 1 o 2 células, formadas terminalmente o intercaladas en el micelio más viejo (Agrios, G. 1998) y sostenidas en falsas cabezas de pequeñas monofiálides, poseen un tamaño de 5 a 15 µm de diámetro (Domsch, K. et al., 2007).

### D. Dispersión y supervivencia del patógeno

En la planta el micelio se proyecta del sistema vascular hacia las células que están muriendo o muertas por la escasez de agua y de esta manera se expande por todos los tejidos de la planta donde esporula abundantemente. Las microconidias se producen abundantemente en el interior de los vasos xilemáticos con mayor frecuencia en todas las condiciones y las macroconidias son las esporas típicas que aparecen sobre la superficie de plantas (http://www.virtual.unal.edu.co).

En tanto la planta infectada continúe viviendo, el hongo se limita a tejidos vasculares y sus células vecinas en forma de micelio o conidios. Se propaga a través de los vasos xilémicos hasta colonizar toda la planta, cuando la enfermedad ha ocasionado la muerte de la planta infectada el hongo esporula sobre su superficie (Agrios, G. 1995).

En ausencia de sustrato adecuado el patógeno inverna como clamidósporas colonizando como parásito o saprófito residuos de plantas.

La supervivencia depende de clamidóspora las cuales germinan teniendo una vida corta pero de suficiente duración para permitir la formación de clamidósporas de remplazo, este proceso de “reciclaje” es muy importante para la longevidad de muchas especies de *Fusarium* en el suelo (Agrios, G. 1998). Las esporas son diseminadas hacia nuevas plantas por el viento, agua, en tubérculos, semillas de algunas plantas o esquejes de plantas infectadas (Agrios, G. 1995).

### 2.8.5. Síntomas

Las enzimas del hongo provocan oxidación de geles y gomas, producidos y acumulados en las células atacadas (tílides), con frecuencia las células parenquimatosas en torno de los vasos xilémicos son estimulados por las secreciones del patógeno para que se dividan excesivamente y esto sumado a las paredes adelgazadas y débiles dan como resultado la disminución del diámetro o el colapso total de los vasos, provocando obstrucción e impidiendo el paso de agua y savia. La separación de la estela del tejido cortical y la muerte de la planta está asociada con la extensa colonización del cámbium – floema. La colonización del cámbium ocurre cuando se encuentra una severa expresión de los sistemas externos de marchitez (Agrios, G. 1995).

El desarrollo de la marchitez es una respuesta al número y distribución de los vasos taponados que impide que el agua se distribuya lateralmente a los vasos adyacentes. Este estrés hídrico severo se evidencia especialmente en los pecíolos donde la resistencia del xilema es mucho menor que en el resto de la planta (Harris y Ferris. 1991).

En los retoños tiernos y jóvenes infectados la clorosis puede o no presentarse, si se presentasen, en la corona se observan zonas decoloradas café rojizas, llegando al extremo de destruir los tejidos que se encuentran por debajo de la corona (Agrios, G. 1995).

### 2.8.6. Reacción de susceptibilidad y resistencia

La producción de compuestos fenólicos, taninos y enzimas (glucanasas y quitinasas) por parte de plantas resistentes, causan degradación de los compuestos de la pared celular del patógeno (Agrios, G. 1995). La resistencia de algunas plantas a sus respectivas formas especiales puede estar relacionado con la oclusión vascular por geles, tílides, gomas o colapsos vasculares (Leslie y Summerell. 2006).

En la reacción de resistencia se observa, que la primera hoja sobre el sitio de inoculación presenta clorosis y abscisión al poco tiempo de la inoculación, pero los síntomas no progresan al pasar el tiempo y las plantas presentan una aparente mejoría. Además la decoloración vascular se restringe, en la mayoría de los casos a 1 – 2 cm desde el lugar de inoculación (Harris y Ferris. 1991).

La resistencia hacia el hongo puede ser alcanzada por mecanismos que operan durante el estado prevascular, vascular o ambos durante la patogénesis. La formación de una papila, el engrosamiento celular de paredes y la rápida diferenciación de la endodermis, son algunos de los mecanismos más importantes en la limitación de la invasión (Domsch, K. et al*.,* 2007).

### 2.8.7. Métodos de control

#### A. Método químico

Los fungicidas sistémicos que contienen Thiabendazol o sus derivados y que incluyen al compuesto Benomyl han sido un método efectivo en el control de la marchitez vascular (Agrios, G. 1995). El control mediante el uso de Bromuro de Metilo (98%), Cloropicrina, Basamid y Borlex es efectivo pero tienen la desventaja de necesitar equipo especial, su costo es elevado y algunos productos se encuentran prohibidos en diferentes países (http://www.redalyc.org).

El control con, Terraclor 75% (P.C.N.B.) Captan, Tiabendazol, Carbendazin o Metiltiofanato, Carboxim+Thiram, Tricoderm SO, Maestro, etc. aplicados al cuello de la planta pueden ayudar con el control de la enfermedad (Morales y Álvarez. 2007).

**B. Método cultural**

Entre los métodos culturales tenemos: la solarización, el barbecho profundo, rotación de cultivo, dejar el suelo sin cultivar, evitar el exceso de humedad, o la inundación de los terrenos de cultivo han sido útiles para disminuir las poblaciones del patógeno en el suelo pero no lo elimina totalmente. La biofumigación por medio de estiércol de cabra, oveja y vaca podría ser útil porque al incorporar materia orgánica al suelo aumenta la microflora y se produce mayor competencia entre los habitantes del suelo (http://www.redalyc.org).

**C. Método genético**

El método efectivo para controlar el marchitamiento por *Fusarium* ha sido el uso de variedades resistentes, Debido a la inmovilidad relativa de los patógenos y por lo tanto al desarrollo y distribución de cualquier nueva raza patogénica, las variedades se mantienen resistentes durante largos periodos de tiempo (Agrios, G. 1998).

## 2.9. Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En los últimos veinte años el desarrollo de técnicas moleculares permiten conocer la información genética de los organismos, evidenciando las variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo (Picca, A. et al., 2004). Mediante la aplicación de estas técnicas se ha podido diseñar y describir iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del DNAr mitocondrial y nucleico de hongos (White, T. et al., 1990), regiones como los del espaciador interno transcrito (ITS) del ARN ribosomal, regiones de espaciadores intergénicos (IGS) del ARN ribosomal, gen de la β-tubulina,

gen de la calmodulina, gen de la subunidad menor del ARN ribosomal mitocondrial (mtSSU) y el gen del factor de elongación de la transcripción TEF-1α (https://books.google.com.ec).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, es una técnica *in vitro* desarrollada por Kary Mullis en 1985, utilizada para amplificar enzimáticamente un gran número de copias de un fragmento de ADN cuya secuencia se conoce (http://www.ecotips.com.mx).

La PCR se lleva a cabo en tres pasos (Delidow, B. et al*.,* 1993):

1) Desnaturalización del ADN en dos cadenas simples por fusión a temperatura elevada (90 - 95°C).

2) Anillamiento de dos oligonucleótidos (iniciadores) en las cadenas originales para la síntesis de una nueva cadena disminuyendo la temperatura a 40 - 60°C, estos iniciadores contienen entre 10 y 30 bases de ADN.

3) Extensión de la nueva cadena a partir de los iniciadores, añadiéndose nucleótidos libres en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) con una temperatura elevada a 70 - 75°C en la cual se incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, utilizando ADN polimerasa como catalizador cuya temperatura óptima oscila alrededor de los 72ºC e iones $Mg^{2+}$ como cofactor.

Los iniciadores son secuencias relativamente cortas diferentes entre sí y complementarias al ADN diana que debe amplificar. Las fases de desnaturalización, anillamiento y extensión constituyen un ciclo, un protocolo de amplificación por lo general tiene de 30 – 50 ciclos; cuando un ciclo térmico se completa, el producto es un segmento de ADN bicatenario que sirven como ADN blanco, y en unos pocos ciclos más, el producto predominante será el fragmento de ADN que corresponde a la distancia entre los iniciadores. Así la repetición de ciclos origina un número exponencial de secuencias amplificadas (Torres y Baca. 1995).

## 2.10. Regiones de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosómico

Las regiones ITS son secuencias de ADN altamente específicas, que se encuentran entre los genes que codifican para RNA ribosomal. Estas regiones son utilizadas en el estudio de poblaciones puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener una buena información filogenética y taxonómica de los individuos (Liu, Z. et al., 1992).

Los genes ribosomales y los espacios entre ellos proveen sitios diana atractivos para la detección molecular y estudios filogenéticos porque en ellos ocurre un alto número de copias, poseen secuencias conservadas como también variables que pueden ser amplificados y secuenciados con iniciadores universales basados en sus secuencias conservadas. Los genes 5.8S, 18S y 28S para el ARN ribosomal nuclear en hongos son organizados normalmente en tándem con repeticiones idénticas de 60-200 copias por genoma haploide (Henson y French.1993).

A pesar de la conservación de los genes del RNA de los hongos, existe la variación suficiente en las secuencias para permitir su uso como sitios diana para la amplificación diferencial. Considerablemente, la variación de secuencia más grande es encontrada en los espacios internos transcritos (ITS), regiones entre los genes RNAr dentro de una unidad repetitiva de RNAr. Entonces, algún organismo o incluso cepas diferentes asiladas de un mismo organismo que tengan repeticiones del DNAr, pueden ser detectados específicamente por la selección de iniciadores basados en los espaciadores de las regiones variables (Henson y French. 1993).

Como se indica en la Figura 1, las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes 18S, 5.8S, y 28S y los dos espaciadores internos ITS1 e ITS2. También encontramos asociados a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS-1 y ETS-2). Todas estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles

taxonómicos. La secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y el ITS1 e ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas (White, T. et al., 1990).

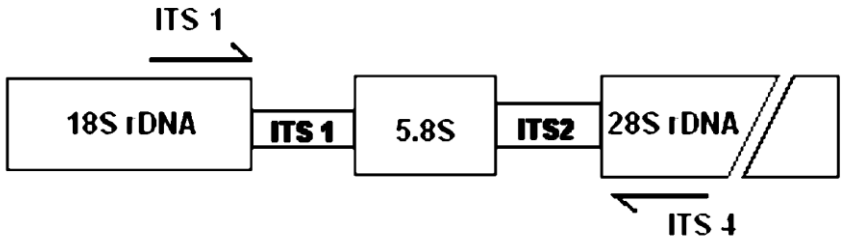



**Figura 1.** Diagrama de ubicación de las regiones ITS en la cadena de ADN ribosómico

Fuente: http://www.ica.gov.co

## 2.11. Región del gen factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1α)

El gen del factor de elongación de la transcripción (TEF-1α), el cual codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción proteica, es el más utilizado para la determinación de especies dentro del género *Fusarium* (Figura 2) (http://www.researchgate.net).

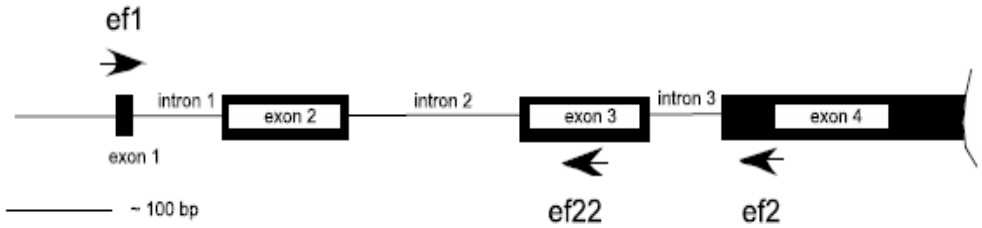



**Figura 2.** Mapa de región del gen TEF-1α de *Fusarium* usada para identificación de especies.

Fuente: http://www.researchgate.net

Dicho gen tiene gran utilidad filogenética dado que (http://www.researchgate.net):

- Proporciona información a nivel de especies del género, dado su elevado grado de polimorfismo,
- No se han detectado copias no-ortólogas del gen dentro del género,
- Se han diseñado primers universales que funcionan para toda la amplitud filogenética del género.

Se han diseñado varios primers específicos para amplificar regiones de dicho gen. Los primers específicos EF1 y EF2 amplifican una región del gen TEF-1α, que incluye tres intrones correspondientes a más de la mitad de la longitud del amplicón. Estos primers pueden ser aplicados a una amplia variedad de hongos ascomicetes filamentosos (http://www.researchgate.net).

En particular dicha región es amplificable en todas las especies de *Fusarium* conocidas, obteniéndose un amplicón de aproximadamente 700 bp. Este gen parece ser de copia única en el género *Fusarium* y muestra un elevado grado de polimorfismo de secuencia para especies muy relacionadas, incluso mayor porción en intrones de genes que los que codifican proteínas como la calmodulina, β-tubulina e histona H3. Sin embargo no presenta variaciones intraespecíficas (Kristensen, R. *et al.,* 2005).

Por esta razón el gen TEF-1α se ha convertido en un marcador de elección como herramienta “single-locus” de identificación de *Fusarium*. En general, no existen valores establecidos de similitud de secuencias para decidir que un aislamiento de un hongo filamentoso pertenece o no a una especie. Es por ello que, en algunos casos, para asegurar la identificación se analiza más de un gen y se espera que los resultados sean concordantes (http://www.researchgate.net).

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1. MATERIALES

### 3.1.1. Ubicación del ensayo

Provincia : Pichincha
Cantón : Quito
Parroquias : Checa, El Quinche, Pifo, Puembo y Yaruquí

- La fase de laboratorio se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro (AGROCALIDAD)

Laboratorios AGROCALIDAD
Dirección : Av. Interoceánica Km. 14½
Parroquia : La Granja MAGAP
Cantón : Tumbaco
Provincia : Pichincha

### 3.1.2. Situación geográfica

La zona de muestreo se encuentra entre los 2340 y 2770 msnm, con una media anual de 800 mm de precipitación, un promedio del 84% de humedad relativa y con temperaturas; máxima promedio de 31°C y mínima promedio de 7°C. Presentando mínimas variaciones entre las localidades muestreadas debido a su cercanía con relación a su posición geográfica (http://www.serviciometeorologico.gob.ec).

### 3.1.3. Zona de vida

La clasificación de la zona de vida de las Parroquias: Pifo, Yaruquí, Checa, Puembo, El Quinche, corresponde a un Bosque seco-Montano Bajo (bs-MB) (Holdridge, L. 1967).

### 3.1.4. Material experimental

- Plantas de frutilla (***Fragaria ananassa***).

### 3.1.5. Equipos y materiales de laboratorio

**A. Equipos**

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Balanza de precisión
- Estufa
- Incubadora
- Refrigeradoras
- Microscopios
- Sorbona
- Baño María
- Destilador de agua
- Esterilizador de asas
- Microondas
- Sistema de identificación BIOLOG
- Termociclador
- Turbidímetro
- Centrifuga
- Vortex
- Cámara de electroforesis
- Micro pipetas
- Cuantificador Nanodrop
- Bomba de vacío
- Fotodocumentador
- Cabina de bioseguridad Tipo 2
- Ultracongelador

**B. Instrumental**

- Placa de Petri
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Tubos tipo Falcón
- Frascos Duran Schott
- Probetas
- Espátulas Drigralski
- Desecador
- Pizeta
- Bisturí, tijeras, pinzas,
- Mechero de alcohol,
- Gradillas
- Puntas para micropipetas
- Probetas
- Asa de platino
- Termómetros
- Microtubos eppendorf

**C. Reactivos**

- Medio Extracto de malta
- Medio Papa dextrosa agar
- Medio Czapek_dox_agar
- Medio Clavel agar
- Medio líquido
- Alcohol 75 %
- Alcohol 90 %
- Hipoclorito de sodio 2,5%
- Agua destilada autoclavada
- EDTA
- NaCl
- Sorbitol
- SarKosyl
- Cloroformo
- Tris HCl, pH 8.0
- Tubos de inoculación
- Microplaca FF
- Low Range III
- 1000 pb DNA Ladder
- DNTPs
- Taq polimerasa
- MgCl2
- Buffer PCR
- Solvente T-Go
- Agarosa
- Nitrógeno líquido
- Tampón RTE
- Inóculo
- RNAsa
- Isopropanol

### 3.1.6. Materiales de oficina

- Computador
- Impresora
- Escáner
- Cámara fotográfica
- Libreta de campo
- Papelería
- Bitácora
- Flash memory

### 3.1.7. Materiales de campo

- Macetas
- Fertilizantes
- Etiquetas de identificación
- Alambre galvanizado No 8
- Bandejas plásticas
- Sustrato
- Plástico
- Grapas
- Cinta adhesiva
- Tela sarán

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Factor de estudio

- Factor A: Plantas de frutilla (***Fragaria ananassa***).
- Factor B: Inoculo (***Fusarium sp.*****)**

### 3.2.2. Tratamientos

La combinación de factores A x B

| CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN | TRATAMIENTO |
|---|---|---|
| **AB0** | Planta frutilla sin inóculo | **T0** |
| **AB1** | Planta frutilla+ cepa 1 | **T1** |
| **AB2** | Planta frutilla+ cepa 1 | **T2** |
| **AB3** | Planta frutilla+ cepa 3 | **T3** |
| **AB4** | Planta frutilla+ cepa 4 | **T4** |
| **AB5** | Planta frutilla+ cepa 5 | **T5** |
| **AB6** | Planta frutilla+ cepa 6 | **T6** |
| **AB7** | Planta frutilla+ cepa 7 | **T7** |
| **AB8** | Planta frutilla+ cepa 8 | **T8** |
| **AB9** | Planta frutilla+ cepa 9 | **T9** |
| **AB10** | Planta frutilla+ cepa 10 | **T10** |
| **AB11** | Planta frutilla+ cepa 11 | **T11** |
| **AB12** | Planta frutilla+ cepa 12 | **T12** |
| **AB13** | Planta frutilla+ cepa 13 | **T13** |

### 3.2.3. Procedimiento

| | |
|---|---|
| Tipo de diseño: | Diseño completamente al azar (DCA) |
| Número de localidades: | 5 |
| Número de tratamientos: | 14 |
| Número de repeticiones: | 3 |
| Número de unidades experimentales: | 42 |
| Área neta del ensayo: | 35 $m^2$ (7 m x 5 m) |
| Volumen unidad investigativa: | 2025,3 $cm^3$ |
| Número de plantas por unidad: | 1 |
| Número total de plantas: | 42 |

### 3.2.4. Tipo de análisis

A. Análisis de Varianza (ADEVA) será utilizado solo para la evaluación de la patogenicidad de los aislados.

| FUENTES DE VARIACIÓN | GRADOS DE LIBERTAD |
|---|---|
| Total | 41 |
| Tratamientos | 13 |
| Error experimental | 28 |

B. Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de interacción AxB

### 3.2.5. Métodos de evaluación y datos tomados

**A. Promedio del máximo y mínimo de las longitudes (largo y ancho) de 20 macroconidias**

La identificación del aspecto colonial se realizó mediante el uso de claves taxonómicas, la morfometría se determinó con estadística descriptiva, mediante el análisis de la desviación estándar entre los promedios de las longitudes de macroconidias del patógeno y los de una clave taxonómica.

**B. Porcentaje de absorbancia (750 nm) de la huella digital fenotípica**

En la evaluación bioquímica se utilizaron modelos probabilísticos para la lectura fenotípica, detectando y cuantificando la respuesta de color y

turbidez, mediante los sistemas: Gen III RetroSpect 2.0 Data Management software, el Sistema de Identificación egOmnilog ® Data Collection, y GEN II MicrosStation Data Collection Software.

### C. Concentración del ADN genómico y secuencias de oligonucleótidos

La concentración y pureza del ADN genómico se determinó mediante la absorbancia de la solución homogénea en una longitud de onda de 260/280 nm. En la evaluación a nivel molecular de las secuencias de las regiones del EF-1α y de los ITS del ADNr, se aplico modelos probabilísticos; para el alineamiento múltiple de secuencias se usó el algoritmo MUSCLE y para los árboles filogenéticos se utilizó el software Maximun Likelihood Algorithm. Las secuencias fueron contrastados con probables genes homólogos disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la aplicación de alineamiento local BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

### D. Amplicones de los productos de PCR

El establecimiento de la forma especial se realizó mediante la evaluación de primers específicos, mediante el análisis electroforético del producto de la PCR amplificado; utilizando un control negativo y marcadores de tamaño y peso molecular como referencia para los fragmentos amplificados.

### E. Porcentaje de incidencia de la enfermedad presente en los folíolos de las plantas.

Para la evaluación de la patogénesis se aplicó los postulados de Koch y estadística descriptiva; los datos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA), además se determinó la incidencia de la enfermedad, calculándola como la proporción entre el número de plantas enfermas y el número total de plantas observadas.

### 3.2.6. MANEJO DEL ENSAYO

#### A. Proceso de colecta de muestras

El proceso de evaluación del presunto agente causal de la marchitez vascular en plantas de frutilla se realizó con el antecedente de la presencia de ***Fusarium sp***. en Yaruquí determinado en el año 2013. El muestreo se lo realizó en áreas productores de frutilla ubicadas en las Parroquias de Pifo, Checa, Yaruquí, Puembo, y El Quinche de los cuales se obtuvo 92 plantas con síntomas de enfermedad y 92 asintomáticas; estas plantas se encontraban en fases fenológicas de desarrollo vegetativo y de fructificación (Cuadro 1).

**Procedimiento:**

- Se examinó variaciones a través del campo en términos de color, altura, daño, etc. presentes en las plantas.
- Los patrones de infección fueron establecidos en todo el área de cultivo, estimando el porcentaje de afectación en el área de cultivo.
- El área de cultivo y las muestras fueron fotografiados para su posterior análisis.
- Las condiciones de manejo del cultivo fueron evaluados y consignados en la orden de trabajo.
- Por cada muestra se extrajeron tres plantas; una con síntomas de marchitez vascular y dos plantas adyacentes, cada una con su respectivo sustrato.
- Las muestras fueron colocadas en fundas de papel para que absorba el exceso de humedad contenido en el follaje evitando la proliferación de fitopatógenos; para su manipulación y transporte se dispusieron en fundas plásticas, evitando la contaminación.

- Se registró y etiqueto los datos del cultivo (coordenadas, edad, variedad, etc.) en cada muestra recogida del campo.

- Los implementos se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2 % y alcohol 75% cada vez, que se realizó una nueva colecta.

- Se transportaron las muestras en contenedores refrigerados retardando el accionar de patógenos saprófitos.

**Cuadro 1**. Información de las muestras procesadas durante el proceso de tesis en el laboratorio de Fitopatología. AGROCALIDAD 2015

| Nº | Cod. Vigilancia Sanitaria | Cod. Laboratorio | Parroquia | Nº Muestras Colectadas | Tipo de muestra | Patogenos determinados* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 17-01-85-401 | 2040VF | San vicente/Yaruquí | 1 | Raíz | ***Fusarium sp.*** |
| 2 | 17-01-85-410 | 2049VF | La Victoria/El Quinche | 1 | Raíz | ***Fusarium sp.*** |
| 3 | 17-1 | FP-150013 | La joya/ Yaruquí | 1 | Suelo/Planta | ***Rizoctonia sp.*** (tallo) ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 4 | 17-2 | FP-150014 | Yaruquí | 1 | Suelo/Planta | ***Fusarium sp.*** (suelo) ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 5 | 17-3 | FP-150015 | Yaruquí | 1 | Hoja | ***Mycosphaerella sp.*** |
| 6 | 17-4 | FP-150016 | Yaruquí | 1 | Hoja | ***Mycosphaerella sp.*** |
| 7 | 17-7 | FP-150018 | San Carlos /Yaruquí | 3 | Suelo/Planta | ***Fusarium sp.*** (suelo) ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 8 | 17-8 | FP-150019 | Yaruquí | 1 | Suelo/Planta | ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 9 | 17-9 | FP-150017 | Yaruquí | 2 | Suelo/Planta | ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 10 | 17-10 | FP-150020 | Checa | 3 | Suelo/Planta | ***Fusarium sp*** (suelo, tallo) ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 11 | 17-11 | FP-150021 | Checa | 1 | Hoja | ***Mycosphaerella sp.*** |
| 12 | 17-201 | FP-150315 | Pifo | 10 | Suelo/Planta | ***Fusarium sp.*** (tallo) ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 13 | 17-202 | FP-150316 | Pifo | 3 | Suelo/Planta | ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 14 | 17-203 | FP-150317 | Pifo | 10 | Suelo/Planta | ***Fusarium sp.*** (tallo) ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 15 | 17-205 | FP-150318 | El Quinche | 2 | Suelo/Planta | ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 16 | 17-206 | FP-150319 | El Quinche | 2 | Suelo/Planta | ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 17 | 17-207 | FP-150320 | El Quinche | 4 | Suelo/Planta | ***Pestalotia sp.*** (tallo) |
| 18 | 17-209 | FP-150322 | Puembo | 1 | Hoja | ***Mycosphaerella sp.*** |
| 19 | 17-210 | FP-150321 | Puembo | 4 | Suelo/Planta | ***Fusarium sp*** (tallo) ***Pestalotia sp*** (tallo) |
| | | | **TOTAL** | **52** | | |

* El método de identificación fue por aislamiento en medio de cultivo PDA excepto las muestras de hojas, luego se identificó por observación directa en el microscopio óptico

Los aislados que presentaron estructuras asexuales de ***Fusarium*** **sp**. en el medio PDA fueron seleccionados para continuar con el proceso de identificación y evaluación.

### B. Siembra de material vegetal y de sustrato

Previamente se preparó medio PDA (Anexo 4) para la siembra del material vegetal.

**Procedimiento:**

- El exceso de impurezas adheridas a la muestra (suelo, hojas, y raíces) fueron eliminadas mediante enjuagues con agua destilada esterilizada.
- Se desinfectaron superficialmente los fragmentos vegetales dentro de la cabina de flujo laminar con Hipoclorito de sodio 2% y alcohol al 75% por un minuto respectivamente.
- A continuación se realizaron tres enjuagues de 1 minuto cada uno con agua destilada esterilizada.
- Los fragmentos fueron depositados sobre papel absorbente esterilizado para extraer la mayor cantidad de humedad.
- Se realizaron cortes longitudinales del tallo y se extrajeron segmentos de 1 - 2 cm que contenían zonas con y sin lesión de marchitez vascular.
- Con la ayuda de una pinza estéril se sembraron cuatro segmentos, en la placa Petri con medio PDA; se realizaron tres replicas por cada asilado y posteriormente se procedió a incubar por 7 días a 24 ºC.

Para la siembra de sustrato se preparó previamente agua-peptona (1%) en tubos de ensayo y 90 ml agua destilada en frascos Duran Schott.

**Procedimiento:**

- En los recipientes que contenían los 90 ml de agua destilada esterilizada se añadió 10 g de suelo, agitándolo para obtener una solución homogénea.
- Dentro de la cabina de flujo laminar se extrajo un 1 ml de la disolución del suelo, añadiéndolo a un tubo de ensayo con agua - peptona (-1) repitiendo este procedimiento para obtener una concentración de -2.

- En las placas con medio PDA se añadió 100 µl de cada concentración, con ayuda de la espátula de Digralsky se distribuyó la disolución sobre toda la superficie del medio de cultivo.

- Se realizaron dos replicas por cada dilución obtenida. Posteriormente se procedió a incubarlos por 7 días a 24 ºC.

### C. Purificación y obtención de cultivos monospóricos

Previamente se preparó medio de cultivo MEA (extracto de malta agar) (Anexo 4) y se esterilizo tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada.

**Procedimiento:**

- Para la obtención de cultivos puros se realizaron continuas siembras en medio de cultivo MEA, hasta obtener una colonia que no contenga indicios de contaminación o presencia de otro tipo de patógeno.

- En el proceso de obtención de cultivos monospóricos, se usó cultivos puros de los cuales se extrajo una suspensión del inóculo en agua destilada estéril.

- La suspensión se cargó en hematocímetro o cámara de Neubauer realizando el conteo de propágulos con ayuda del microscopio óptico.

- Partiendo de esta suspensión se realizaron continuas diluciones hasta obtener una concentración de 20 propágulos (macroconidias o microconidias) por cada ml de agua destilada.

- Se sembró 1 ml de esta dilución en el centro de la placa de medio de cultivo MEA.

- Por cada aislado se realizaron tres réplicas, posteriormente se procedió a incubarlas por 7 días a 24 ºC.

## D. Almacenaje de las muestras del campo

**Procedimiento:**

- Las muestras colectadas fueron almacenadas en fundas de papel adjuntando un sobre de silica gel.
- Estos sobres se introdujeron en fundas plásticas con su respectiva rotulación, procediendo a conservarlas en una cámara de desecación.

## E. Conservación del patógeno (cepario)

Previa a la actividad de conservación se dispensó y esterilizó 10 ml de sucrosa (10%) y peptona (20%) en tubos de ensayo. También se esterilizó varios cuadraditos de papel de 0.5 $cm^2$, torundas de algodón, y micro tubos eppendorf.

**Procedimiento:**

- En los placas Petri de los cultivos monospóricos realizados, se añadió 10 ml de sucrosa y 10 ml de peptona, con la espátula de Digralsky se homogenizando el micelio y el líquido vertido.
- Se añadió los cuadraditos de papel en la solución, esperando 8 minutos hasta que el papel absorbiera la mayor cantidad de la suspensión.
- Después en los tubos eppendorf se introdujo la suficiente cantidad de segmentos de papel embebidos de la dilución, cubriéndolos con la torunda de algodón.
- Se etiquetaron los tubos eppendorf y se los refrigero a una temperatura de 6 ºC.

Para el proceso de conservación en agua destilada estéril se procedió a esterilizar tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada.

**Procedimiento:**

- Con el uso de un sacabocado de 0.5 cm de diámetro se realizaron cortes en el agar del cultivo monospórico.
- Los plocs de agar fueron extraídos y colocados dentro de los tubos de ensayo, llenándolo hasta los ¾ de su capacidad.
- Los tubos previamente sellados con Parafilm fueron almacenados a una temperatura entre 25°C y 30°C.

**F. Masificación del micelio en medio líquido**

Con el fin de obtener una cantidad de biomasa necesaria para la extracción de DNA, y poder conservarlo se realizó el cultivo en medio líquido; previo se esterilizo el medio líquido (Anexo 4) en matraces de 250 ml. Además se esterilizo: papel filtro, agua destilada, embudos de vidrio. Kitasatos, pinzas, tubos eppendorf, tubos tipo Falcón.

**Procedimiento:**

- Se introdujo dos plocs del medio de cultivo monospórico en el matraz, realizando dos replicas por cada aislado. Estos medios se conservaron en la obscuridad por 5 días a temperatura ambiente.
- Después de transcurrido el periodo de masificación, la disolución fue filtrada con ayuda de la bomba de vacío, el micelio obtenido se enjuagó con agua destilada, se transfirieron a tubos eppendorf y el exceso a tubos tipo Falcón para poder ser almacenados en el ultracongelador a menos 20°C.

**G. Identificación morfológica y morfométrica del fitopatógeno**.

**Procedimiento:**

- Partiendo de los cultivos monospóricos realizados en medio de cultivo EMA se sembró propágulos del patógeno en un segmento de medio

CLA (Anexo 4) contenido entre el porta y cubre objetos dentro de la placa Petri.

- Se incubó por el lapso de7 días a 24°C.
- Después de este periodo se realizó el análisis microscópico mediante el montaje de los cubre objetos de las placas incubadas sobre un nuevo portaobjetos. Las estructuras asexuales se analizaron en el objetivo 40X y se las registro fotográficamente.
- Se tomaron las lecturas de 20 macroconidias y se las analizo estadísticamente.

**H. Evaluación bioquímica por el sistema de identificación BIOLOG**

**Procedimiento:**

- Se sembró cepas puras y monospóricos en medio de cultivo MEA, y se procedió a incubarlas por 7 días a 24 ºC, evitando contaminación.
- Para la lectura en el espectrofotómetro, el equipo se calibro primero con el tubo de agua pura (transmitancia 100%) y después con el estándar obteniendo una lectura de 75 % de turbidez específica para hongos.
- Partiendo de los cultivos del medio MEA se extrajo el micelio del hongo con ayuda de un isotopo estéril, se introdujo el isotopo en el tubo de caldo para suspensión de hongos (FF).
- Se hicieron las lecturas hasta obtener una turbidez del 75% +/- 2 para cada cepa.
- En cada nueva lectura el espectrofotómetro se calibro con el mismo procedimiento.

- Posteriormente se procedió a inocular el hongo en las placas FF MicroPlate ™ con una pipeta multicanal, dispensando 100 µl en cada uno de los 96 pocillos.

- Por 7 días se dejó incubar la placa, durante los cuales se realizaron las lecturas respectivas en el equipo.

**Tabla 5.** Intervalos de lecturas realizadas en el sistema de identificación BIOLOG.

| 1° Lectura | 2° Lectura | 3° Lectura | 4° Lectura | 5° Lectura |
|---|---|---|---|---|
| **24 Horas** | **48 horas** | **72 Horas** | **96 Horas** | **168 Horas** |
| 8:00 | 8:00 | 8:00 | 8:00 | 8:00 |
| | 10:30 | 10:30 | 10:30 | |
| | 12:00 | 12:00 | 12:00 | |
| | 15:00 | 15:00 | 15:00 | |
| | 17:00 | 17:00 | 17:00 | |

## I. Evaluación a nivel molecular (Análisis filogenético)

**Procedimiento:**

- El primer proceso fue la extracción de ADN usando nitrógeno líquido macerándolo en el mortero (micelio extraído del medio líquido o directamente de la placa de Petri).

- Se depositó el macerado en tubos eppendorf añadiendo 1 ml de tampón de extracción y 0,5 ml de cloroformo: iso amialcohol 24:1.

- Estos tubos se introdujeron en Baño María, a 55ºC por 30 minutos invirtiéndolos cada 10 minutos.

- Después de este proceso se esperó a que los tubos tomen la temperatura ambiente por unos 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos para poder obtener la formación de dos fases.

- El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo limpio y estéril, añadiendo de 1 a 1.5 del volumen de isopropanol.

- Se dejó por 20 minutos en refrigeración (-20ºC) para seguidamente centrifugarlo por 3 minutos a 10000 rpm.

- Al formarse el pellet se realizaron enjuagues con etanol al 70% una o dos veces, posteriormente se dejó secar el pellet por 25 minutos o más.

- Se adiciono al pellet tampón RTE, y RNAsa dejándolo al ambiente por 30 minutos.

- Con el uso del Thermo Scientific NanoDrop 2000 se realizó la cuantificación espectrofotométrica del ADN, la relación 260/280 se utilizó para evaluar la pureza del ADN aceptándose valores cuya relación aproximada sea entre 1,8 a 2,0.

- Posteriormente se ajustó la misma en una concentración entre 5 a 20 nm/μl diluidas en agua tipo PCR libre de DNAs y RNAs concentración necesaria para la reacción PCR.

- Para este proceso se utilizaron los primers EF1, EF2, ITS1, ITS4.

**Tabla 6.** Secuencias nucleotídicas utilizadas para la amplificación de regiones ITS(s) y TEF-1α

| REGIÓN GENÓMICA | PRIMER | SECUENCIA |
|---|---|---|
| Espaciador transcribible interno (ITS) | ITS-1 | 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' |
| | ITS-4 | 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' |
| Factor de elongación de la transcripción (TEF-1α) | EF-1 | 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' |
| | EF-2 | 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3' |

- Para obtener la amplificación del ADN fúngico se realizó para cada reacción PCR un master mix diferente. Para la optimización de los resultados se usó diferentes concentraciones de algunos de los

componentes de la reacción y variaciones de temperatura en los ciclos de desnaturalización.

- El volumen de reacción de la PCR fue de 25µl, con concentraciones de 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada primer, 1.25 U/25 µl Go Taq polimerasa FLEXI, con un buffer PCR Green FLEX 1X de amplificación.

- Para el desarrollo de la PCR se usó un Termociclador con la siguientes secuencia, 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 53°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72ºC por 10 minutos para finalizar la PCR.

- Una vez terminado el proceso de amplificación, todas las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis. Tomando de cada reacción 4 µl de producto de PCR más1µl de 10X BlueJuice.

- Se preparó geles de agarosa al 0.5% disuelta en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA). Se dispenso en los pocillos las reacciones y se corrió a 100 V y 300 mA, aproximadamente por 30 minutos. Como control se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb.

- Los productos de PCR amplificados en gel de agarosa fueron fotodocumentados para su posterior análisis.

- En el caso de los productos de PCR con bandas inespecíficas en los que se usó los primer EF1 y EF2, fueron purificadas por medio del proceso Band-stab PCR hasta que se obtuvo bandas claras.

- Estos productos fueron enviados a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) para ser secuenciados, los resultados fueron comparadas principalmente con la base de datos del GenBank que se encuentran en el NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

- Las secuencias fueron depuradas y comparadas en la base de datos del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) lo que permitió encontrar secuencias significativas para cada tratamiento (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Además permitió una identificación a nivel de género, especie y de la forma especial.

- Las secuencias obtenidas se editaron y registraron en el programa Seaview Versión 4.5.4 para lo cual se inspecciono la calidad de los cromatogramas eliminando las bases que no estuvieron bien definidas; los aislados que no pertenecían al género *Fusarium* fueron enviados a secuenciar, pero no fueron analizados.

### J. Evaluación de primers específicos

Para obtener la amplificación del ADN fúngico se usaron primers específicos para ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** (http://apsjournals.apsnet.org).

**Tabla 7.** Secuencias nucleotídicas utilizadas en la amplificación de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae***

| PATÓGENO ESPECIFICO | PRIMER | SECUENCIA |
|---|---|---|
| ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** | Fofra-F | 5'-CAGACTGGGGTGCTTAAAGTT-3' |
| | Fofra-R | 5'-AACCGCTAGGGTCGTAACAAA-3' |

**Procedimiento:**

- El volumen de reacción de la PCR fue de 25µl, con concentraciones de 1 mM MgCl2, 0.2 mM de dNTP, 1 µM de cada primer, 0.2 U/25 µl Go Taq platinum, con un buffer PCR Green FLEXI 1X de amplificación. Para la optimización de resultados se realizó reacciones con diferentes concentraciones de los componentes de la reacción (MgCl2, dNTPs) y variaciones de temperatura en los ciclos de desnaturalización.

- Las secuencias de los ciclos de PCR en el Termociclador fueron las siguientes: preincubación 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de

amplificación a 94 °C por 1 minuto, anillamiento a 63 °C 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 ºC por 1 minuto para finalizar la PCR.

- Se preparó geles de agarosa al 0.5 % disuelta en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA). Se dispenso en los pocillos las reacciones y se corrió a 100 V, 300 mA, aproximadamente por 30 minutos. Como control se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb.

- Los resultados obtenidos de la PCR amplificados en gel de agarosa fueron fotodocumentados para su análisis posterior.

### K. Evaluación de la patogénesis aplicando los Postulados de Koch

La evolución de la actividad fitopatógena se realizó en plantas de frutilla variedad Albión. Las plantas de frutilla fueron adquiridas con 30 días de anterioridad y se las conservo en refrigeración para promover su estrés, después de este período se sembraron en macetas de 2 kg.

Previo al trasplante se esterilizo el sustrato por una hora a 15 PSI, con una temperatura de 120ºC.

Además se esterilizo las herramientas, macetas, y el área destinada para el experimento.

**Procedimiento:**

- En el suelo se colocó 2g de 12.11.18+2.7MgO+8S+EM en el fondo de la maceta, además las raíces se sumergieron en un regulador de crecimiento plantándolas inmediatamente en las macetas.

- Se regaron las plantas en la mañana por tres días a la semana con 100 ml de agua autoclavada durante todo el ensayo.

- Cuando las plantas habían desarrollado hojas se procedió al proceso de inoculación.

- Siguiendo el proceso de los postulados se utilizó los aislados fúngicos caracterizados morfométrica, bioquímica y molecular, sembrados 7 días antes en medio Czapek_dox_agar (Anexo 4).

- La concentración en la suspensión de microconidias para la inoculación en todos los tratamientos fue ajustada a $10^5$ conidios/ml, mediante el uso de la cámara de Neubauer y usando la formula.

$$\text{Concentración} = \frac{\textbf{\textit{número de células x 10.000}}}{\textbf{\textit{número de cuadrados}}}$$

- Se inoculo mediante laceraciones en el tallo y raíz, usando plocs de medio de cultivo con inóculo, los cuales fueron colocados sobre la superficie.

- Se registró la incidencia de la enfermedad, en las plantas de frutilla usando la formula.

$$\text{Incidencia} = \frac{\textbf{\textit{número de plantas enfermas}}}{\textbf{\textit{número de plantas}}} \; \boldsymbol{x\ 100}$$

- Se fotografío la presencia de síntomas presentes en las plantas comparándolas con el tratamiento testigo absoluto (T0).

- Se procedió con el proceso de re-asilamiento del agente patógeno después de 20 días, tiempo en el cual las plantas empezaron a mostrar clorosis foliar.

- Las plantas fueron llevadas al laboratorio, donde se procedió a sembrarlos en medio PDA, siguiendo el mismo protocolo como con las muestras colectadas.

- Además se realizó la caracterización morfológica y molecular a nivel de laboratorio para determinar que efectivamente es el agente etiológico de la infección.

# IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el aislamiento de las muestras en medio de cultivo PDA confirmados mediante morfología microscópica se evidencio la presencia de esporas pertenecientes al hongo ***Pestalotia*** **sp**. en 46 aislados; solo en 11 aislados se determinó la presencia de estructuras asexuales de ***Fusarium*** ***sp***., representando el 23.9 % del total de las muestras. No obstante la presencia de ***Pestalotia*** ***sp***. es del 100% y solo un mínimo porcentaje (1%) con el hongo ***Rhizoctonia*** ***sp***.

Al igual que *Fusarium* se encuentran reportes del ataque del hongo ***Pestalotia*** ***sp***. en hojas y tallos de frutilla con presencia de lesiones cloróticas (http.//onlinelibrary.wiley.com).

Del total de muestras solo se procesaron 50, las muestras con código 2040VF y 2049VF pertenesen al cepario del laboratorio de Fitopatología. Los aislados con código FP-150015, FP-150016, FP-150021 y FP-150322 se evaluó el área foliar de la frutilla encontrándose ***Mycosphaerella*** ***sp.*** (Cuadro 1).

La incidencia de la enfermedad en las hojas de frutilla ha sido determinada como un problema en temperaturas de 25 - 30°C en hojas de edad media, y viejas propiciadas por el salpique del agua, manteniendo un proceso continuo, que dependiendo de los tratamientos que se realizan en el campo estas pueden invernar como micelio, picnidios o peritecios. (http://www.fagro.edu.uy)

Su diagnóstico se dificulta en el campo debido a la similitud de síntomas producidas por otros habitantes del suelo que están emparentados con la marchitez vascular, observándose a menudo en cultivos muy jóvenes o muy viejos a nivel interno la necrosis sectorial (http://www.virtual.unal.edu.co).

La identificación taxonómica a nivel de género se llevó a cabo a partir de los cultivos monospóricos, utilizando como base metodologíca la clave de

identificación elaborado por Nelson et al., (1983). Los aislados desarrollados en PDA presentaron diferentes características en color y forma del micelio (Domsch, K. et al., 2007).

Hasta cierto punto la acción selectiva entre la planta hospedante y el patógeno debe ser efectiva evidenciándose alteraciones metabólicas en la planta, provocadas por el desarrollo interno del patógeno, esto se evidencia en el cambio de apariencia y/o disminución de su rendimiento. Los patógenos aislados de las plantas y suelo del cultivo de frutilla (Agrios, G. 1995).

### 4.1. Identificación del aspecto colonial y morfometría

**Cuadro 2**. Características de la morfología colonial de los 13 aislados sembrados en PDA

| CÓDIGO TRATAMIENTO | ASPECTO MACROSCÓPICO COLONIAL | | |
|---|---|---|---|
| | Color * | Forma | Crecimiento |
| **T1** | Rosado | Micelio aereo blanquecino-rasáceo | Radial concentrico |
| **T2** | Rosado | Micelio aereo rosáceo | Radial concentrico |
| **T3** | Rosado | Micelio aereo rosáceo | Radial concentrico |
| **T4** | Rosado | Micelio aereo rosáceo | Radial difuso |
| **T5** | Violeta | Micelio aereo blanquecino-rasáceo | Radial difuso |
| **T6** | Violeta | Micelio aereo blanquecino-rasáceo | Radial difuso |
| **T7** | Amarrillento | Micelio aereo amarillento | Radial difuso |
| **T8** | Purpura | Micelio aereo blanquecino | Radial concentrico |
| **T9** | Purpura | Micelio aereo blanquecino | Radial concentrico |
| **T10** | Violeta | Micelio aereo blanquecino-violáceo | Radial difuso |
| **T11** | Violeta | Micelio aereo blanquecino-violáceo | Radial difuso |
| **T12** | Violeta | Micelio aereo blanquecino-violáceo | Radial concentrico |
| **T13** | Violeta | Micelio aereo blanquecino-violáceo | Radial concentrico |

***El color se refiere a la sección del hongo inserto o en contacto directo con el agar**

Los tratamientos T1-T4 presentaron color rosado, sin embargo el T1 presentaba un color blanquecino-rosáceo en su parte aérea y los tratamientos T2, T3, T4 un micelio aéreo rosáceo.

Los tratamientos T5, T6, T11- T13 presentaron un color violeta, con un micelio aéreo blanquecino-violáceo. Los tratamientos T8 y T9 presentaron

un color purpura y en su parte aérea micelio blanquecino. Solo el tratamiento T7 que presento una coloración y micelio aéreo amarillento diferente a los demás. En cuanto a su crecimiento se visualizó en los tratamientos T4, T5, T6, T7, T10 y T11 un crecimiento concéntrico, en el resto se observó un crecimiento radial difuso (Anexo 5).

Las estructuras presentadas por los aislados fueron (Anexo 5):

- Micelio con hifas hialinas septadas.
- Microconidias sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, formadas sobre fiálides laterales simples. Macroconidias fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con 3 y 5 septas transversales.
- Además presentaron clamidósporas con pared gruesa sostenidas en falsas cabezas de pequeñas monofiálides.

De estas estructuras solo las macroconidias fueron dimensionadas.

**Cuadro 3**. Medidas de las macroconidias realizadas a las 13 aislados que fueron sembrados en medio de cultivo CLA.

| TRATAMIENTOS | MEDIDAS DE MACROCONIDIAS | | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | |
|---|---|---|---|---|
| | LARGO | ANCHO | LARGO | ANCHO |
| **T1** | 42,51 | 4,79 | 0,93 | 0,07 |
| **T2** | 40,39 | 4,26 | 0,75 | 0,29 |
| **T3** | 50,82 | 4,54 | 0,69 | 0,74 |
| **T4** | 30,32 | 3,84 | 0,81 | 0,89 |
| **T5** | 35,66 | 3,01 | 0,65 | 0,56 |
| **T6** | 38,60 | 3,65 | 0,90 | 0,91 |
| **T7** | 44,85 | 3,35 | 0,85 | 0,75 |
| **T8** | 43,60 | 4,92 | 0,79 | 0,15 |
| **T9** | 25,40 | 3,27 | 0,89 | 0,63 |
| **T10** | 30,57 | 3,52 | 0,77 | 0,58 |
| **T11** | 48,33 | 4,90 | 0,91 | 0,75 |
| **T12** | 58,43 | 4,78 | 0,97 | 0,09 |
| **T13** | 51,65 | 3,98 | 0,79 | 0,31 |

*Fuente de referencia Nelson et al. 1983

El análisis exploratorio de datos obtenidos por morfometría del promedio de ancho y largo de las macroconidias, determinados por desviación estándar, muestran que los resultados tienen valores cercanos con respecto al valor central (promedio clave taxonómica) estableciendo que las medidas de las macroconidias de los 13 aislados son estadísticamente semejantes entre ellas y con la clave taxonómica. (Cuadro 3).

Los tratamientos T2, T3 y T5 se acercan más al promedio y los tratamientos, T1, T6, T11 y T12 se alejan mucho más del promedio de la clave taxonómica.

La desviación estándar calculada del ancho de los tratamientos T1 y T12 es el más cercano a la clave taxonómico, por otro lado los tratamientos T4, T3, T6, T7, T9, T10 y T11 tienden a distanciarse más del promedio de la clave taxonómica.

El polimorfismo presente en las estructuras asexuales de los diferentes tratamientos posiblemente se deba a las mutaciones que ocurre al aislar *Fusarium* en cultivos artificiales, pero cuando se realizo en medio agar-hojas de clavel (medio CLA) se redujo la variación fenotípica ya que se asemeja a las condiciones naturales facilitando la formación de macroconidias uniformes en forma y tamaño (Leslie y Summerell 2006).

## 4.2. Evaluación bioquímica mediante el sistema de identificación BIOLOG

La lectura de las densidades de color en los pocillos de las pruebas de sensibilidad, fueron positivas en los tratamientos T2, T5, T6 y T11 para ***Fusarium oxysporum***, evidenciándose una leve diferencia en las lecturas entre los tratamiento T5, T6 y T11 debido a la diferencia de absorbancia. En los tratamientos T1, T7, T8, T12 y T13, el límite de detección solo indica a nivel del género *Fusarium* pero no de especie. El tratamiento T3 y T9 presentan un porcentaje de identidad del 97% para ***Fusarium lateritium*.** Los resultados de porcentaje pertenecen a las lecturas de la

turbidez y colorimetría durante las reacciones bioquímicas entre el sustrato y el patógeno.

Por otro lado también se obtuvo un porcentaje de identidad del 99% para ***Fusarium sacchari*** y un 94 % para ***Fusarium udum*** en el tratamiento T4 (Cuadro 4).

**Cuadro 4**. Lecturas de las microplacas correspondientes a los 13 aislados para ***Fusarium sp***.

| TARTAMIENTO | IDENTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA | IDENTIFICACIÓN BIOLOG | PROBABILIDAD (%) |
|---|---|---|---|
| T1 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium* sp. | * |
| T2 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium oxysporum* | 0,99 |
| T3 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium lateritium* | 0,97 |
| T4 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium udum* | 0,94 |
| T5 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium oxysporum* | 0,77 |
| T6 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium oxysporum* | 0,78 |
| T7 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium* sp. | * |
| T8 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium* sp. | * |
| T9 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium lateritium* | 0,97 |
| T10 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium sacchari* | 0,99 |
| T11 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium oxysporum* | 0,79 |
| T12 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium* sp. | * |
| T13 | *Fusarium oxysporum* | *Fusarium* sp. | * |
| *Sin absorbancia | | | |

El método del sistema de identificación BIOLOG permite diagnosticar los posibles patrones metabólicos del perfil bioquímico y la relación filogenética entre distintos aislados, mientras el patógeno oxida las distintas fuentes de carbono. Este diagnóstico está directamente relacionado con la manipulación y con la propia naturaleza de los microorganismos (http://onlinelibrary.wiley.com). Aunque en el estudio se repitió las pruebas cuando el resultado fue negativo para ***Fusarium oxysporum***, no se evidencio cambio en el resultado, comprobando el desempeño de este sistema.

## 4.3. Evaluación a nivel molecular (análisis filogenético)

**Cuadro 5**. Concentración del ADN de los patógenos aislados de plantas de frutilla ***Fragaria ananassa*** Duch.

| TRATAMIENTO | Concentracion de Ac. Nucleicos (ng/µl) | 260/280 |
|---|---|---|
| T1 | 4196.25 | 2.14 |
| T2 | 1542.9 | 2.19 |
| T3 | 1867.25 | 2.15 |
| T4 | 2475.7 | 2.08 |
| T5 | 555.85 | 2.11 |
| T6 | 4695.4 | 2.14 |
| T7 | 6546.45 | 2.05 |
| T8 | 696.05 | 2.08 |
| T9 | 84.4 | 1.87 |
| T10 | 1693.7 | 2.06 |
| T11 | 4598.75 | 2.09 |
| T12 | 119.95 | 1.97 |
| T13 | 2573.45 | 2.07 |
| *Pestalotia sp.** | 1536.55 | 2.00 |
| *Rhizoctonia sp.** | 3255.4 | 2.19 |

*Posibles géneros

El ADN de cada asilado se cuantifico por espectrofotometría dando como resultado un rango de concentración de 84.4 – 6546.45 ng/µl y una relación de absorbancia promedio de 2.0 (260/280). Este promedio se encuentra enmarcada en la relación entre 1.7 y 2.0 (260/280) (Maniatis, T. et al., 1982) para definir que el ADN es puro (Cuadro 5).

Las concentraciones de ADN fueron diluidas y llevadas a una concentración entre 20 y 30 ng/µl.

- **ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN BASE A FRAGMENTOS ITS**

El primer paso fue realizar la PCR con los oligonucleótidos ITS1 - ITS4, ADN de los 13 tratamiento y dos posibles patógenos caracterizados por microscopia óptica como ***Pestalotia sp***. y ***Rhizoctonia sp***. obteniéndose los siguientes resultados; se visualizó en gel de agarosa al 1.5 % bandas equivalentes a un peso molecular de 570 pares de bases para los 13

tratamientos, incluyendo ***Pestalotia sp***. En el caso de ***Rizhoctonia sp***. la banda tiene un peso molecular levemente mayor equivalente a 650 bp. Además se observó las siguientes concentraciones de ADN: 40 ng/µl (T1, T2, T3, T4, T5, T10, T11, P y R), 60 ng/µl (T10, T12 y T13), 80 ng/µl (T6) y de 100 ng/µl (T7) (Figura 3) de acuerdo a lo indicado en el marcador de 100 bp (https://worldwide.promega.com).

El tratamiento T8 y el control negativo (C-) no mostraron banda visible.

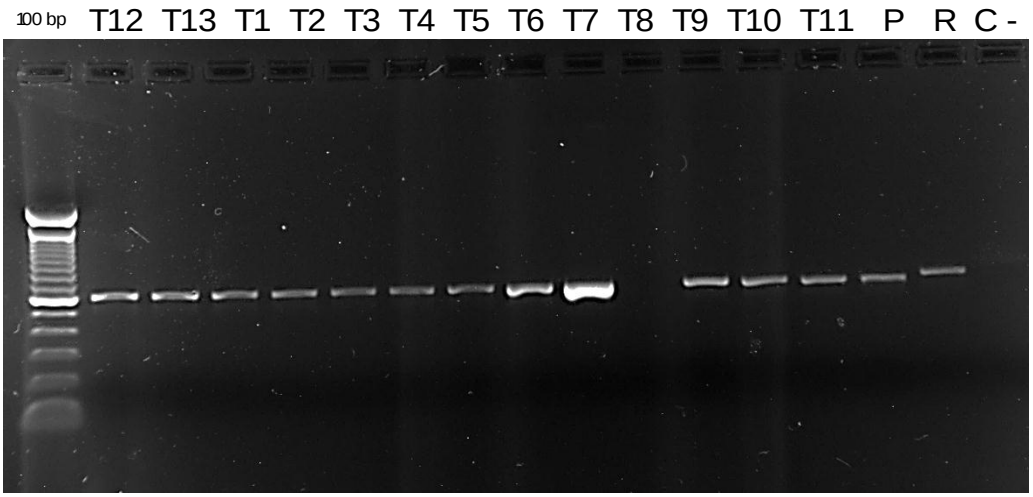



**Figura 3.** Análisis electroforético del producto PCR de regiones ITS amplificado de 13 tratamientos (T1-T13), más un marcador de peso molecular de 100pb y los posibles hongos ***Pestalotia sp***. (P) y ***Rhizoctonia sp***. (R) más un control negativo.

El alineamiento de secuencias realizado en el software SeaView representa las zonas de similitud de nucleótidos entre los tratamientos determinando que existe un ancestro en común, se visualiza leves diferencias puntuales en dos tratamientos, pero el grado de similitud entre los aminoácidos contiene caracteres idénticas o similares.

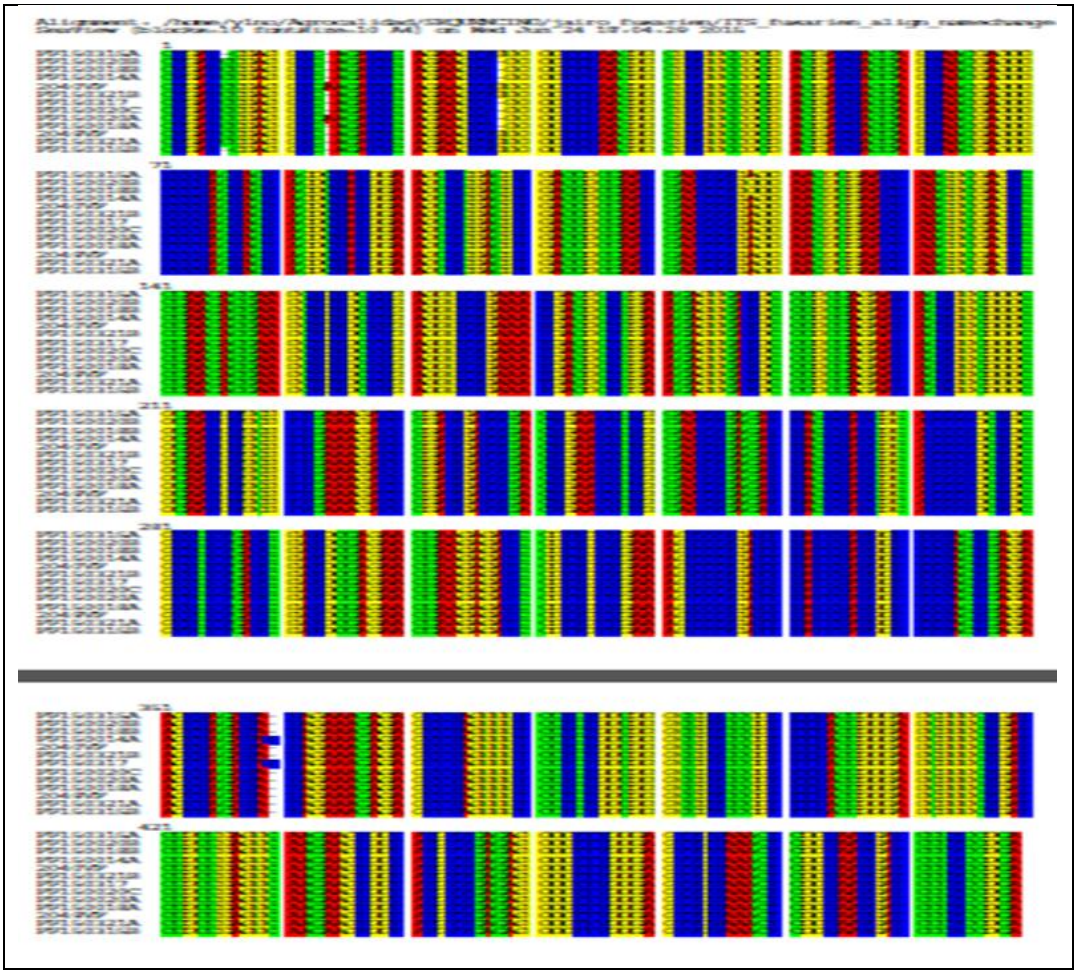


**Figura 4.** Alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE en base a codones de las secuencias en estudio**.**

La topología del árbol condensado obtenido en base a la región ITS, inicio con la formación de un solo grupo y un divergente único (politomia), en el grupo se incluyen 25 taxones, algunos de ellos agrupados con un buen soporte y separados por pequeñas ramas internas, sobresaliendo también ramas condensadas que resultaron politómicas.

El enraizamiento del árbol se consiguió incluyendo como grupos externos a secuencias de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** (90436908), ***Fusarium oxysporum*** (827206934, 514825685 y 514825683). Secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) que se encuentran en la base de datos del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Toll).

Las relaciones recibieron un soporte bootstrap moderado-alto (0.83-0.92) en el análisis de máxima verosimilitud (Figura 5).

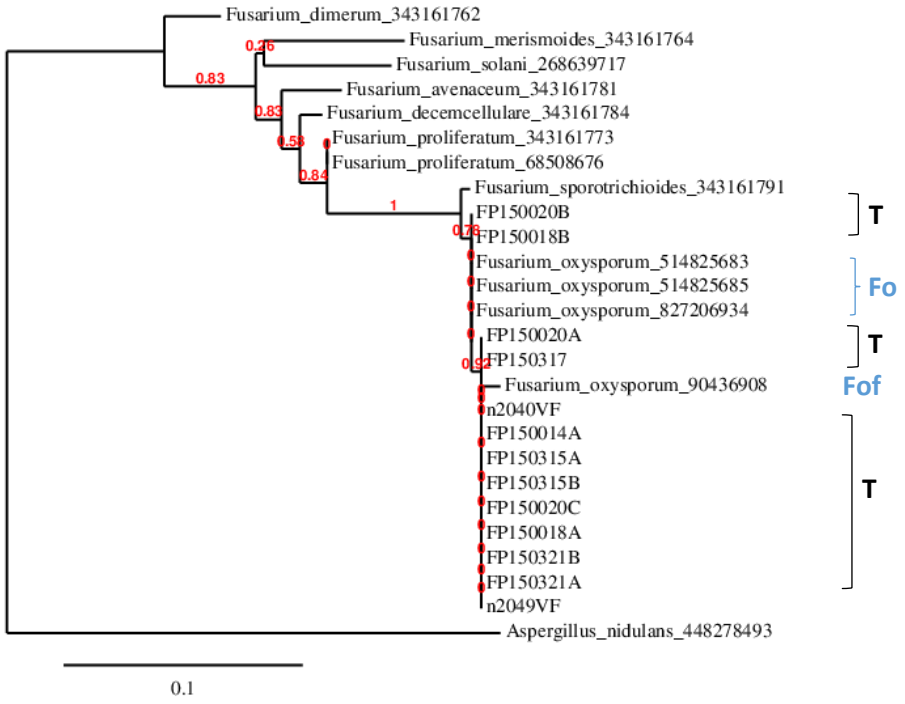



**Figura 5.** Árbol consenso construido con el método de máxima verosimilitud, basado en las distancias de las secuencias de las regiones del espaciador transcribible interno (ITS) en el ADN ribosómico**;** (T) tratamientos, (Fo) ***Fusarium oxysporum***, (Fof) ***Fusarium oxysporum*** f. sp**.** ***fragariae.***

También se puede observar que las 9 secuencias referencia se agruparon en un solo clado con ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** **(**90436908). El enraizamiento muestra que ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** y las cepas son monofiléticas en base a las secuencias a las regiones ITS.

- **ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN BASE A LA REGIÓN EF-1α**

La amplificación y secuenciación de la región EF-1α se realizó con los primers EF1 – EF2 mas el ADN de los 13 tratamientos obteniéndose los siguientes resultados.

El resultado de la amplificación en gel de agarosa al 1.5 % de los productos PCR se visualizó bandas de 570 pares de bases para los 13 tratamientos con las siguientes concentraciones de ADN: 40 ng/µl (T1, T2, T3, T4, T5, T6 yT7), 60 ng/µl (T8, T9, T11, T12 y T13), 80 ng/µl (T10), En la amplificación se observó la presencia de bandas inespecíficas en cada uno de los aislados, por lo que se procedió a realizar la técnica Band-stab PCR en todos los aislados. El control negativo no arrojo banda visible (Figura 6).

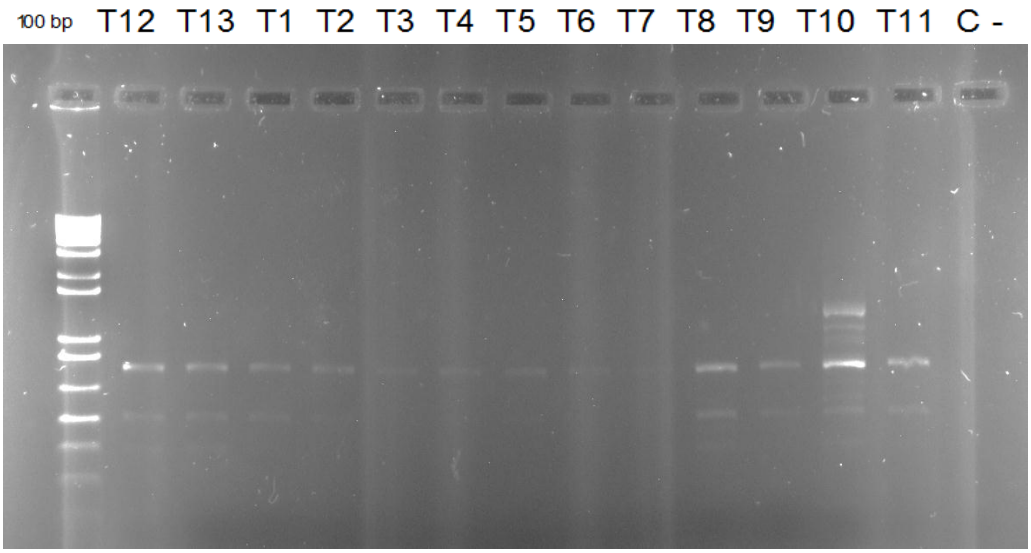



**Figura 6.** Visualización del producto PCR de la región EF - 1 α amplificado de 13 muestras de ADN (T1 - T13), un marcador de peso molecular de 100pb y un control negativo.

La amplificación en gel de agarosa al 1.5 % de los productos extraídos con la técnica Band-stab PCR permitieron visualizar bandas de 680 pares de bases en los 13 Tratamientos (T1- T13), con las siguientes concentraciones de ADN: 80 ng/µl (T2, T3, T4, T5, y T8), 100 ng/µl (T1, T6, T7, T9, T10, T11, T12 y T13). El control negativo no arrojo banda visible (Figura 7).

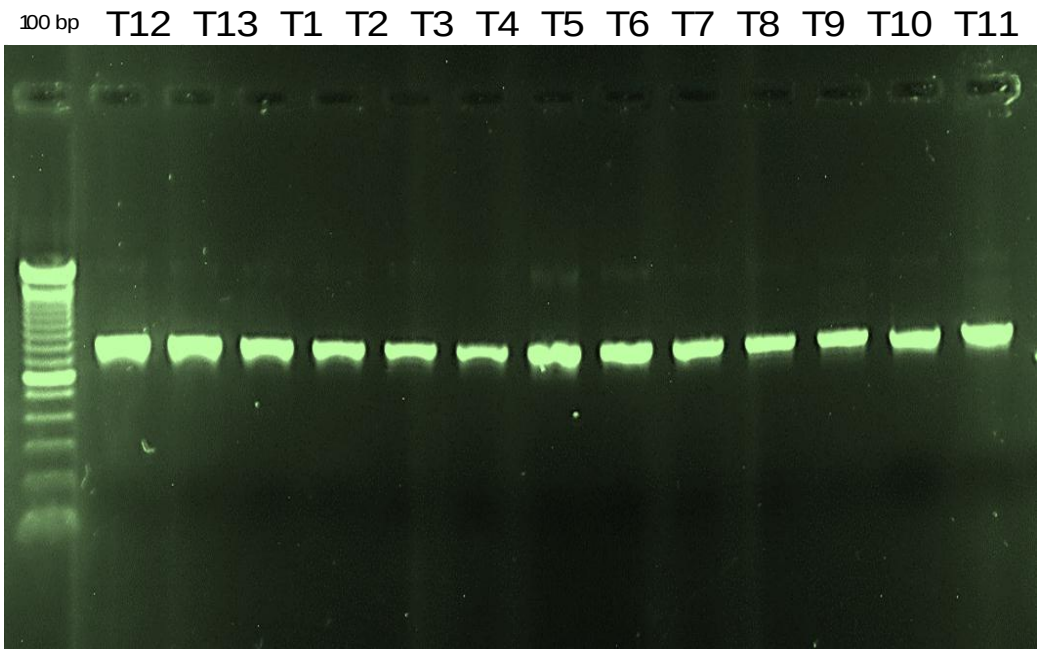



**Figura 7.** Visualización del producto PCR de la región EF - 1 α amplificado de 13 aislados de ADN (T1 - T13), un marcador de peso molecular de 100pb y un control negativo. Previa aplicación de la técnica Band-stab PCR;

Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar en MACROGEN (Seúl, Corea), el reporte de los resultados se editó y registró en el programa SeaView. La calidad de los cromatogramas se examinaron eliminando bases que no estén bien definidas y el resultado obtenido fue de 631 bp de calidad aceptable.

Se procedió al alineamiento múltiple, aplicando el algoritmo MUSCLE, bajo la configuración predeterminada en el programa SeaView demostraron similitud en los nucleótidos, salvo pequeñas diferencias en la secuencia en los tratamientos T2, T3, y T12, pero una diferencia muy significativa en el alineamiento de los nucleótidos del tratamiento T4 (Figura 8).

El alineamiento entre los tratamientos, establece que el tratamiento T4 presenta diferentes zonas de nucleótidos con los otros tratamientos determinando que no existe un grado de similitud entre los aminoácidos.

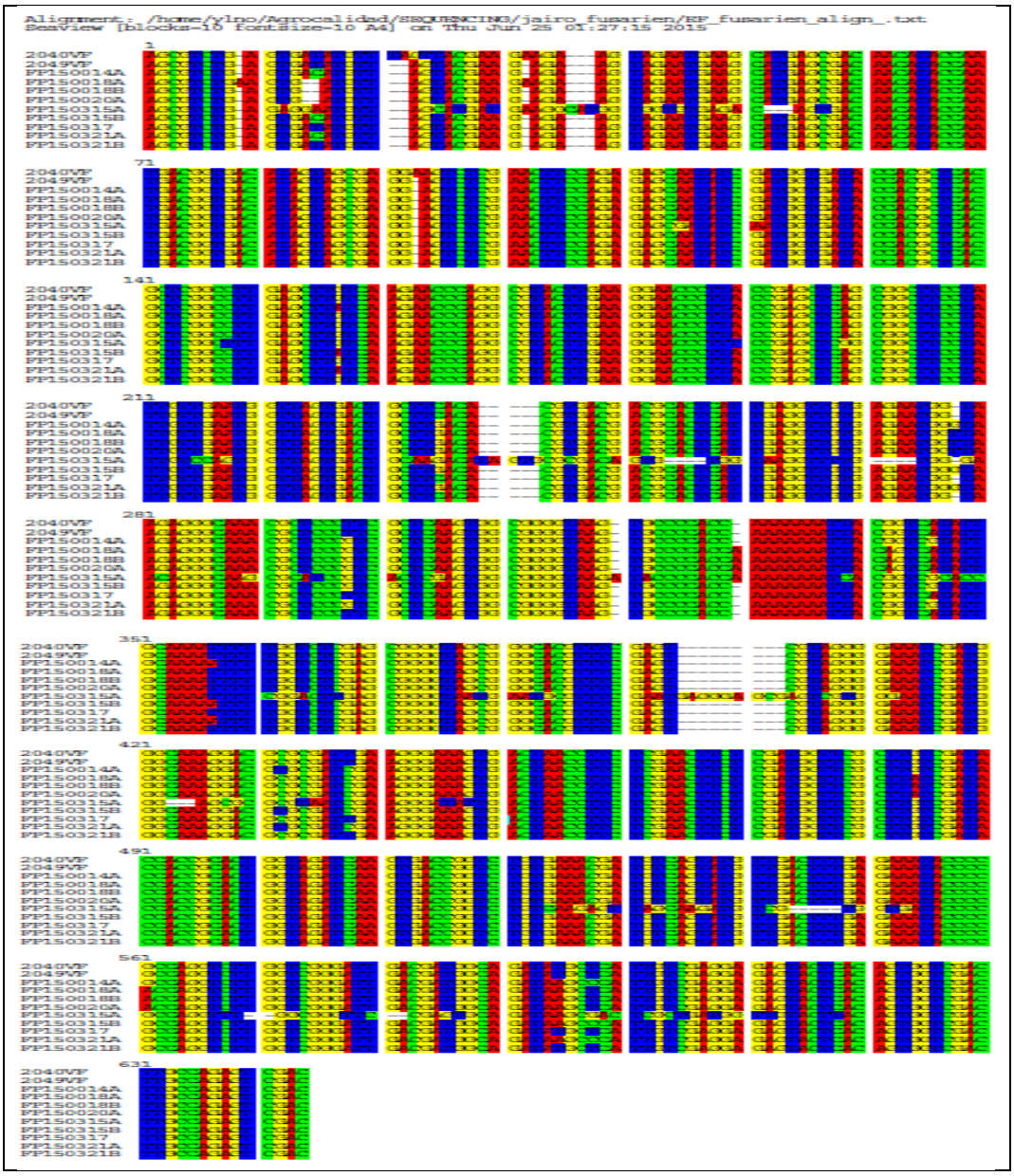


**Figura 8.** Alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE en base a codones de las secuencias en estudio**.**

El cladograma se construyó en base a las secuencias de las regiones EF-1 α, con el método de máxima verosimilitud visualizándose 2 clados iniciales, en la formación de un solo grupo inicial y un divergente único (politomia), en el grupo se incluyen 25 taxones, algunos de ellos agrupados con un buen soporte y separados por pequeñas ramas internas, sobresaliendo también ramas condensadas que resultaron politómicas.

En la formación de los clados se usaron secuencias de otros géneros y secuencias de ***Fusarium oxysporum*** **f. sp.** ***fragariae*** (90436922, 641739695, 2478921999), secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Figura 9).

En este cladograma fueron excluidas las secuencias de los tratamientos T5 y T6 debido a que sus secuencias decaen rápidamente existiendo pocas pares de bases. Las relaciones recibieron un soporte bootstrap moderado-alto (0.89 - 0.94) en el análisis de máxima verosimilitud.

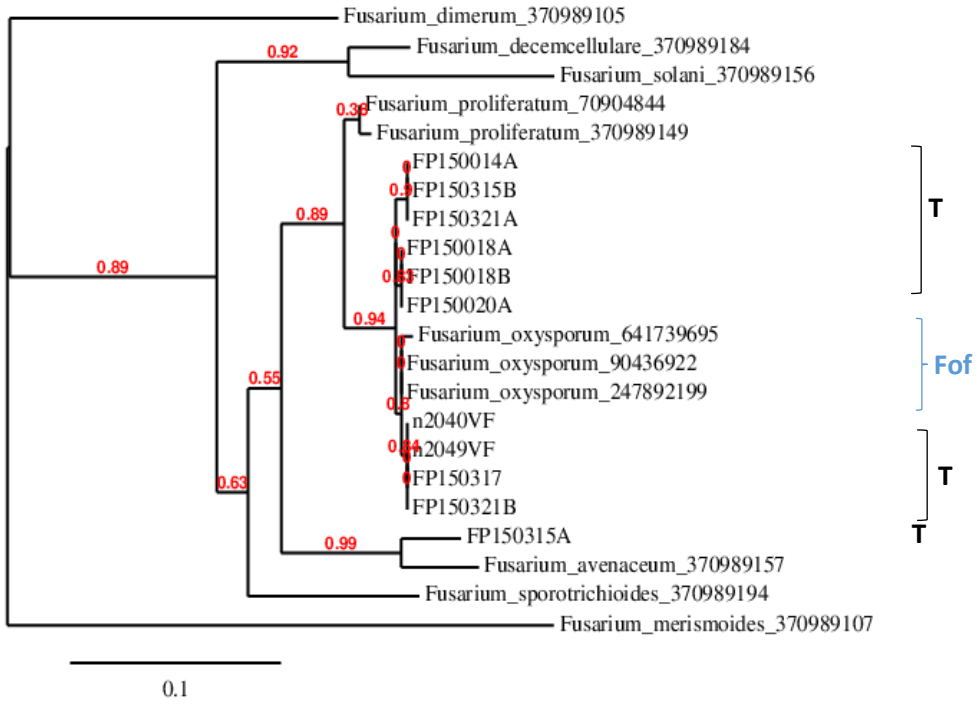



**Figura 9.** Árbol consenso construido con el método de máxima verosimilitud, basado en las distancias de las secuencias de la regio EF 1α del ADN: (T) tratamientos, (Fof) ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae.***

Otros autores ya han estudiado previamente las regiones ITS y EF-1α, demostrando su eficacia para resolver algunas ambigüedades generadas y ubicar taxonómicamente nuevas especies del género *Fusarium* (http://link.springer.com). Si bien la utilización de primers universales

permite estudiar la variabilidad inter-específica y establecer identificaciones al comparar las secuencias obtenidas con otras previamente depositadas en la base de datos GenBank, hay que resaltar que la mejor herramienta para identificar de forma rápida, inequívoca y menos costosa las diferentes especies de hongos asociados a la marchitez vascular son el uso de primers específicos (http://apsjournals.apsnet.org), pero todo dependerá de la pureza de los aislados y de los productos PCR por lo que se realizaron varios procedimientos hasta alcanzar el mejor resultado (http://stud.epsilon.slu.se).

### 4.4. Evaluación de la forma especial de *Fusarium oxysporum* con primers específicos

Los oligonucleótidos específicos diseñados para ***Fusarium oxysporum*** f sp. ***fragariae*** Fofra-1 y Fofra-2 (http://apsjournals.apsnet.org), utilizados en la reacción de la PCR, no mostraron amplificación en los 13 muestras de ADN (Figura 10).

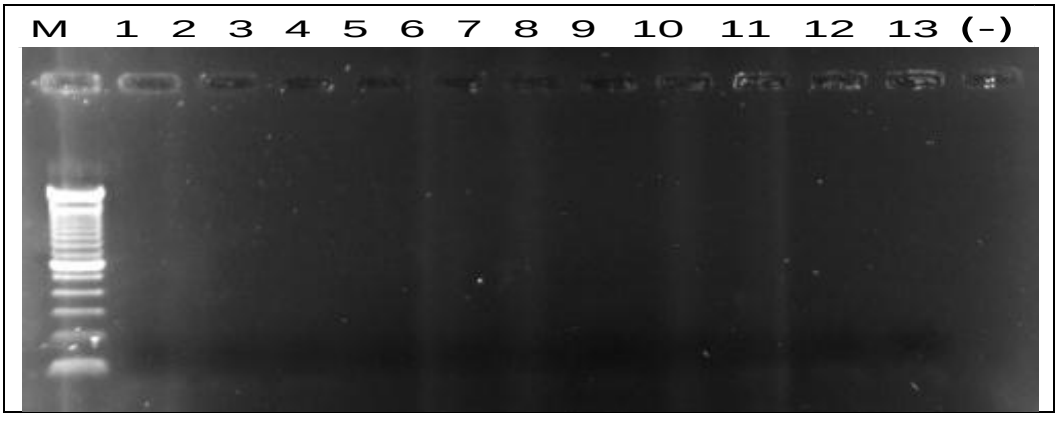



**Figura 10.** Visualización del producto PCR de ***Fusarium oxysporum*** f sp. ***fragariae*** amplificado con primers específicos Fofra-F y Fofra-R, de 13 aislados de ADN (No. 1-13); marcador de peso molecular de 100 pb (M) y un control negativo (-).

El uso de primers específicos para la identificación de fitopatógenos está determinado al fragmento de ADN diseñado (amplificación inespecífica),

además hay que tomar en cuenta que los aislados utilizados en esta investigación no amplificaron debido a que existen diferencias de evolución entre especies de una localidad a otra (Sambrook y Rusell. 2001).

### 4.5. Evaluación de la patogénesis aplicando los Postulados de Koch

En cuanto al ANOVA se obtuvo los siguientes resultados:

**% Foliolos sanos**

| Variable | N | R² | R² Aj | CV |
|---|---|---|---|---|
| % FOLIOLOS SANOS | 42 | 0,05 | 2,1E-04 | 48,35 |

**Cuadro 6. Análisis de la Varianza para los 13 tratamientos (SC tipo III)**

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo. | 2187,90 | 2 | 1093,95 | 1,00 | 0,3755 |
| REPETICION | 2187,90 | 2 | 1093,95 | 1,00 | 0,3755 |
| Error | 42477,74 | 39 | 1089,17 | | |
| Total | 44665,64 | 41 | | | |

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=30,39006**

*Error: 1089,1727 gl: 39*

| REPETICION | Medias | n | E.E. | |
|---|---|---|---|---|
| III | 73,37 | 14 | 8,82 | A |
| I | 73,36 | 14 | 8,82 | A |
| II | 58,06 | 14 | 8,82 | A |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

No se detectó en el análisis de varianza diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para la distribución, determinándose que no existen diferencias entre las variables. El coeficiente de variación es de 19,46% tolerable, aceptable para la evaluación en campo.

Mediante el análisis del ANOVA se establece que la inoculación en las plantas fue efectiva tanto por la concentración del inoculo como el método realizado (http://ciat.cgiar.org). La incidencia de la enfermedad se determinó en base a sintomatología visual. De esta forma aquellas plantas que presentaron, marchitez, necrosamiento y muerte de foliolos, fueron consideradas infectas por el patógeno.

En las pruebas de actividad fitopatógena, se observó que las plantas de control inoculadas con agua estéril no presentaron ningún síntoma, ni contaminación por hongos o bacterias, resultado que valida las pruebas realizadas y así mismo da confiabilidad los resultados obtenidos.

**Cuadro 7**. Datos de sintomatología obtenidos de las plantas inoculadas con los aislados de los 13 tratamientos.

| TRATAMIENTO | HOJAS SANAS | | | MARCHITEZ | | | INCIDENCIA % | | | PRESENCIA DE MARCHITEZ* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| T0 | 5 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 5 | 5 | 5 | 2 | 2 | 2 | 40 | 40 | 40 | 1 | 1 | 0 |
| T2 | 4 | 4 | 4 | 1,1 | 1 | 1 | 27,5 | 25 | 25 | 1 | 1 | 0 |
| T3 | 5 | 5 | 5 | 1,1 | 2 | 2 | 22 | 40 | 40 | 1 | 1 | 0 |
| T4 | 5 | 5 | 5 | 0,4 | 2 | 2 | 8 | 40 | 40 | 0 | 1 | 1 |
| T5 | 5 | 5 | 5 | 0,4 | 2 | 2 | 8 | 40 | 40 | 1 | 1 | 0 |
| T6 | 5 | 5 | 5 | 1,2 | 2 | 2 | 24 | 40 | 40 | 0 | 1 | 1 |
| T7 | 4 | 5 | 5 | 0,2 | 2 | 2 | 5 | 40 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| T8 | 3 | 5 | 5 | 3 | 2 | 2 | 100 | 40 | 40 | 1 | 1 | 1 |
| T9 | 5 | 5 | 5 | 2 | 2 | 2 | 40 | 40 | 40 | 1 | 1 | 1 |
| T10 | 5 | 5 | 5 | 2 | 2 | 2 | 40 | 40 | 40 | 1 | 1 | 0 |
| T11 | 5 | 5 | 5 | 2 | 2 | 2 | 40 | 40 | 40 | 1 | 1 | 0 |
| T12 | 5 | 5 | 5 | 2 | 2 | 2 | 40 | 40 | 40 | 1 | 0 | 1 |
| T13 | 5 | 5 | 5 | 2 | 2 | 2 | 40 | 40 | 40 | 1 | 0 | 0 |

* 0 = Ausencia de marchitez o cambio de color en el tallo, 1 = Presencia de marchitez o cambio de color en el tallo

La medición de la incidencia (%) registrada a después de 17 días de la inoculación muestra que en todos los tratamientos se evidencio la presencia de síntomas en las plantas de frutilla, lo que fue verificado mediante el re-aislado del patógeno en el laboratorio.

El género ***Fusarium oxysporum*** es uno de los hongos más especializados tanto como saprófito del suelo o como patógeno (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) siendo necesario determinar la patogénesis en el hospedero (Domsch, K. et al., 2007). Para este caso las plantas inoculadas con los diferentes aislamientos, no mostraron sintomatología significativa que permita evidenciar la enfermedad, en algunos casos se observó marchitez, coloración rojiza en los tallos o muerte total de la planta, la ausencia de síntomas pudo deberse a que estos solamente aparecen cuando el sistema vascular de los peciolos y las hojas han sido invadidos, fenómeno que sucede después de la colonización del tallo después de un periodo de 3 meses o más (Agrios, G. 1995).

# V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1. CONCLUSIONES

La muestras obtenidas de las Parroquias Pifo, Checa, Yaruquí y Puembo identificadas y evaluadas morfológica, bioquímica y molecular, establece la presencia de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** con ligeras diferencias morfológicas y filogenéticas, muy posiblemente debido a la presencia de diferentes razas patogénicas y que están asociadas con la marchitez vascular del cultivo de frutilla.

En el proceso de evaluación de la microbiota de aislados vegetales y sustrato en muestras de campo extraídas del cultivo de frutilla se identificó, por morfometría a ***Fusarium oxysporum*** en 13 tratamientos; ***Pestalotia sp***. en todos los tratamientos y ***Rhizoctonia sp.*** en un tratamiento, determinados por observación directa en el microscopio óptico.

Mediante la evaluación bioquímica, se identificaron los tratamientos T2, T5, T6 y T11 como ***Fusarium oxysporum***, los tratamientos T1, T7, T8, T12 y T13 como ***Fusarium sp***., T3 y T9 fueron ***Fusarium lateritium***, el T4 se identificó como ***Fusarium udum*** y el tratamiento T10 como ***Fusarium sacchari***.

La amplificación y secuenciación de las regiones ITS y EF-1α de los tratamientos permitió observar fragmentos de aproximadamente de 570 bp y 680 pb correspondientemente. En el alineamiento múltiple de las secuencias de regiones ITS se evidencio un alto porcentaje de homología entre las secuencias de los tratamientos T1, T2, T4, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12 y T13, con la secuencia de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** de origen Coreano (90436908) y para la región EF-1α los tratamientos T1, T2, T3, T4, T8, T9, T10, T11, T12 y T13 presentaron alta homología con ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** (641739695_Turquía, 90436922_Corea del Sur y 247892199_USA) al ser

contrastadas con cepas relacionadas con la marchitez vascular en las plantas de frutilla.

La evaluación mediante primers específicos FofraF, y FofraR provenientes de Japón correspondientes a la especie de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** resultaron negativos para todos los tratamientos.

En la evaluación de la patogénesis, la definición de comportamiento especializado del patógeno ***Fusarium oxysporum*** f. sp**.** ***fragariae*** en el cultivo de frutilla se evidencio mediante la visualización de marchitez, cambio de color en el interior de los tallos o muerte de la planta en algunos casos, por lo que en los 13 tratamientos se presentó la sintomatología de marchitez vascular.

## 5.2. RECOMENDACIONES

Realizar la evaluación con plantas germinadas, y con plantas en desarrollo vegetativo para comparar el desarrollo de la enfermedad en la todo el ciclo de vida del vegetal.

Evaluar la capacidad del patógeno para formar propágulos en diferentes temperaturas y medios de cultivo.

Para garantizar una buena calidad en el servicio del cepario se recomienda que este posea su propia existencia de medios de cultivo, reactivos y material de vidrio.

Establecer periodos sistémicos para el seguimiento de las características de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica para cada cepa.

Evaluar la capacidad enzimática de los patógenos en las pruebas que permiten medir la actividad del proceso enzimático de las fuentes de carbono.

Se sugiere tener acceso a un control positivo garantizando el proceso de PCR.

Es necesario proveerse de plantas para evaluar la patogénesis de los patógenos.

Es importante desarrollar estudios de la capacidad multihospedera, de los patógenos aislados.

# VI. RESUMEN Y SUMMARY

## 6.1. RESUMEN

El cultivo de frutilla ha adquirido internacionalmente gran demanda en su consumo, promoviendo el incremento de su producción. Sin embargo, el proceso de importación del material vegetal hacia países productores con fines de propagación o producción, posiblemente ha contribuido con la diseminación del hongo ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae***. El presente estudio se planteó identificar la presencia del patógeno en nuestro país, mediante la identificación morfométrica y la aplicación de métodos bioquímicos y moleculares a aislados de *Fusarium*. El muestreo se realizó en zonas productoras de frutilla localizadas en las Parroquias de Checa, El Quinche, Pifo, Yaruquí y Puembo. De dichas muestras de campo fueron identificados 13 hongos con las características del genero *Fusarium*. Adicionalmente se encontró ***Pestalotia sp***. Seguidamente se evaluaron los aislados por morfometría y BIOLOG. Por morfometría las 13 cepas fueron identificadas como ***Fusarium oxysporum*****.** Sin embargo utilizando BIOLOG se determinaron 4 cepas como ***Fusarium oxysporum*****,** 5 cepas *Fusarium* sp., 2 cepas ***Fusarium lateritium***, 1 cepa ***Fusarium udum*** y 1 cepa como ***Fusarium sacchari*****.** Seguidamente, se procedió a la evaluación a nivel molecular analizando las secuencias de las regiones ITS del ADNr y de la región EF-1α, identificando 12 cepas como ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae***. No obstante, con referencia a la especificidad como fitopatógeno se realizaron pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch) en condiciones de invernadero inoculando los asilados en plantas de frutilla, observando sintomatología en los 13 aislados, corroborando la presencia mediante el re-aislamiento en el laboratorio. Los resultados obtenidos en los procesos de identificación y evaluación ratifican la presencia de ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*** en cultivares de frutilla de las Parroquias de Pifo, Checa, Yaruquí y Puembo.

**Palabra clave:** ***Fusarium oxysporum*** f. sp**.** ***fragariae,*** BOLOG, ITS, EF-1α

## 6.2. SUMMARY

Strawberry cultivation has gained great demand internationally in consumption, promoting increased production. However, the import process plant material into producing countries for propagation or production may have contributed to the spread of the fungus ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae*****.** This study was planned to identify the presence of the pathogen in our country, through identification morphometric and the application of biochemical and molecular methods *Fusarium* isolates. Sampling was done in strawberry production areas located in parishes in Checa, El Quinche, Pifo, Yaruquí and Puembo. Such field samples were identified 13 fungi with the characteristics of the genus *Fusarium*. Additionally it was found ***Pestalotia sp***. Then they isolated by morphometric and BIOLOG were evaluated. By morphometric the 13 strains were identified as ***Fusarium oxysporum***. However it using BIOLOG 4 strains as ***Fusarium oxysporum****,* 5 strains *Fusarium sp.,* 2strains***Fusarium lateritium****,* 1 strain ***Fusarium udum*** and 1 strain were determined as ***Fusarium sacchari****.* He then proceeded to the evaluation at the molecular level by analyzing the sequences of the ITS regions of rDNA and EF-1α region, identifying 12 strains as ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae***. However, with reference to the specificity fitopatógeno Pathogenicity tests (Koch's postulates) were performed under greenhouse conditions by inoculating the refugees in strawberry plants, observing symptoms in the 13 isolates, confirming the presence by re-isolation in the laboratory. The results obtained in the process of identification and evaluation confirms the presence of ***Fusarium oxysporum*** f. sp***. fragariae*** in strawberry cultivars of Pifo, Checa, Yaruquí and Puembo.

**Keyword: *Fusarium oxysporum*** f. sp. ***fragariae,*** BOLOG, ITS, EF-1α

## VII. BIBLIOGRAFÍA


**1.** AGRIOS, G. 1995. Fitopatología 2ª Ed. Edit. Limusa. México. Pp. 425-452

**2.** AGRIOS, G. 1998. Fitopatología. 3ª Ed. Edit. Limusa. México. P. 717

**3.** BEJARANO, W. 1993. Nuevos productos de exportación. Manual de la frutilla. 1ª Ed. PROEXANT, Quito, EC. Pp. 1-17

**4.** DÁVALOS, P. et al. 2011. Tecnología para sembrar viveros de fresa. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SIGARPA), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigaciones Regional Centro, Campo Experimental Bajío (CEBAJ), Celaya. Guanajuato. México. 1ª. Ed. P.158

**5.** DELIDOW, B. et al. 1993. Polymerase chain reaction: Basic protocols. Methods in molecular biology, 15. Pp. 1-30

**6.** DOMSCH, K. et al. 2007. Compendium of soil fungi 2da. Ed. Die Deutsche Bibliothek- CIP-Einheitsaufnahme. Pp. 222-224

**7.** FERNÁNDEZ, J. 2005. Enciclopedia Práctica De La Agricultura Y Ganadería 2ª Ed. Editorial Océano/Centrum. México. Pp. 609-615

**8.** HARRIS, A. Y FERRIS, M. 1991. Interaction between ***Fusarium oxysporum*** f. sp. ***tracheiphilum*** and ***Meloidogyne spp***. In ***Vignia unguiculata***; effects of different inoculum densities of *Fusarium* wilt. Plant Pathology (U.S.A.) 40 (5): Pp. 445 – 456

**9.** HENSON, J. Y FRENCH, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31. Pp. 81 - 109

**10.** HOLDRIDGE, L. 1979. Ecología basada en zonas de vida. Trad. Por Humberto Jiménez Saa. San José C.R. IICA. Libros y materiales educativos No. 34. P. 216

**11.** KRISTENSEN, R. et al. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological Research 109 Pp.173 - 186

**12.** LESLIE, J. Y SUMMERELL, B. 2006. *Fusarium* laboratory manual. 1ª. Ed. UK. Blackwell Publishing Ltd. Pp. 212 - 219

**13.** LIU, Z. et al. 1992. Genetic diversity of ***Rhizoctonia solani*** anastomosis group 2. Phytopathology 82. Pp. 778 - 787

**14.** MAG. 1986. Ministerio de Agricultura y Ganadería, EC. Inventario de plagas, enfermedades y malezas del Ecuador. Programa Nacional de Sanidad Vegetal del MAG, con la cooperación de la Deutsche. GesellschaftFürTechnischeZusammenmabert (GTZ), Quito, EC. P. 86

**15.** MANIATIS, T. et al. 1982 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, X + 545. S., 61 Abb., 28 Tab. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory. 2ª Ed. P.16

**16.** MORALES, I. Y ÁLVAREZ, P. 2007. Guía de cultivo de la frutilla, 1ª. Ed. El Agro. Riobamba, EC. Pp. 2-26

**17.** PICCA, A. et al. 2004. Marcadores moleculares. *In* Echenique V. Rubinstein C. Mroginski L. Eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología Argentina, Ediciones INTA. Pp. 61-68

**18.** PROEXANT. 1993. Promoción De Exportaciones Agrícolas No Tradicionales. Manual de frutilla. Quito, EC. Imprenta PROEXANT. P. 115

**19.** RAMALLO J. et al. 1994. Viveros de frutilla. Experiencias y resultados alcanzados por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. EEAOC. Avances Agroindustriales. Vol. 15. No. 59. Pp. 25-27

**20.** SAMBROOK, J. Y RUSELL, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. Pp. 38-56

**21.** TORRES, A. Y BACA, B. 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. Elementos, 3 (23) Pp. 233 - 245

**22.** WHITE, T. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academics Press, Inc. New York. Pp. 315-322.

**23.** http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-3-0323B

**24.** http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-10-1077A

**25.** http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-05-11-0130

**26.** https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=S0Djy-X2GTcC&oi=fnd&pg=PP1&dq=fungal+wilt+diseases+of+plant&ots=LN0VTxGt2g&sig=Nz8kyWoxBLwUHs4HaXXY4G8f77U&redir_esc=y#v=onepage&q=fungal%20wilt%20diseases%20of%20plant&f=false

**27.** https://books.google.com.ec/books?id=t1iEGCciqckC&pg=PA297&lpg=PA297&dq=Gherbawy+y.+Molecular+identification+of+fungy&source=bl&ots=vC7ooPD_2&sig=u10_tjoN2DthKQaJ1HttP9zJ9mI&hl=es&sa=X&ei=j_BEVdOoCcOoNomVgbgO&redir_esc=y#v=onepage&q=Gherbawy%20y.%20Molecular%20identification%20of%20fungy&f=true

**28.** http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/04/guia_practica4.pdf

**29.** http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S

**30.** http://inta.gob.ar/documentos/posibilidades-de-produccion-de-frutillas-en-bariloche/at_multi_download/file/frutillas.pdf

**31.** http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0042-1#page-1

**32.** http://micologia.uv.cl/images/stories/article/17/2.2fusarium_frutilla.pdf

**33.** http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Fusarium%20oxysporum%20f.%20sp.%20fragariae&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes

**34.** http://stud.epsilon.slu.se/1921/1/ElKhosht_f_101013.pdf

**35.** http://ocean.kisti.re.kr/downfile/volume/kspp/E1PPBG/2004/v20n4/E1PPBG_2004_v20n4_264.pdf

**36.** http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00003.x/pdf

**37.** http.//onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12226/abstract

**38.** https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/dna-ladders/

**39.** http://www2.inia.cl/medios/rayentue/boletines/NR38765.pdf

**40.** http://www.actahort.org/books/626/626_15.htm

**41.** http://www.ecotips.com.mx/Bioconservacion/EguarteFlujogenetico.pdf

**42.** http://www.fagro.edu.uy/~eefas/docs/frutillaenfermedades08.pdf

**43.** http://www.ica.gov.co/getattachment/8e77ea74-12cd-485d-94e1-0b5a19b52384/Publicacion-19.aspx

**44.** http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/$webindex/69399A4146EAEC0E06256ABF0057DF16/$file/Fertilizaci%C3%B3n+de+Fresa.pdf

**45.** http://www.jebas.org/wp-content/uploads/2014/09/Juber-et-al-JEBAS.pdf

**46.** http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=187336&Fields=All

**47.** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358338/

**48.** http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1408734343Frutillas2014.pdf

**49.** http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219203

**50.** http://www.researchgate.net/publication/226322338_A_DNA_sequence_database_for_identifying_Fusarium._Eur_J_Plant_Pathol

**51.** http://www.revistaelagro.com/2012/01/18/manejo-integrado-del-cultivo-de-frutillas/

**52.** http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538

**53.** http://www.revistaelagro.com/2013/12/18/agricultores-le-apuestan-al-cultivo-de-fresas/

**54.** http://www.serviciometeorologico.gob.ec/biblioteca/

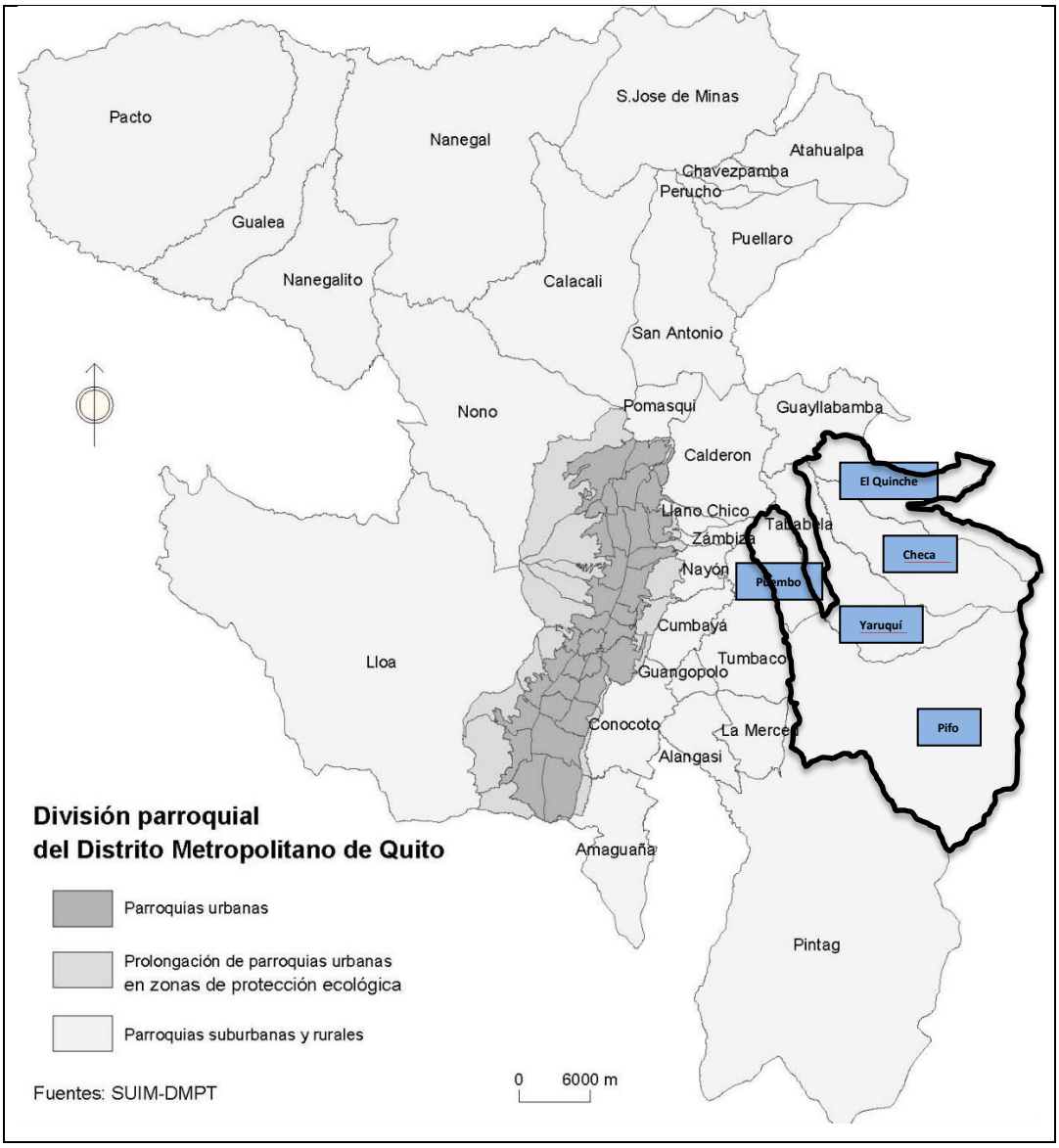
**55.** http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/42009/jbg1de1.pdf;jsessionid=9111AD3C2DAE6FA11B6B8AD3FD5908D2.tdx1?sequence=1

**56.** http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF%27s/V6N1/Art1V6N1.pdf

# ANEXOS

# ANEXO 1

## Ubicación de zonas de muestreo



# ANEXOS 2

Cronograma de actividades

| ACTIVIDADES | SEMANAS | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| **1. PROYECTO DE TESIS** | | | | | | | | | | |
| • Elaboración del proyecto | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | |
| • Aprobación del proyecto | | ■ | ■ | ■ | | | | | | |
| **2. PROCESOS DE CAMPO** | | | | | | | | | | |
| • Muestreo | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| **3. PROCESOS DE LABORATORIO** | | | | | | | | | | |
| • **Fase 1 Morfometría** | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| • **Fase 2 BIOLOG** | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| • **Fase 3 Molecular** | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| • **Fase 4 Evaluación** | ■ | | | | | | | | | |
| • Conservación | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |
| **4. PROCESOS DE INVERNADERO** | | | | | | | | | | |
| • Adecuación y limpieza de invernadero | ■ | ■ | | | | | | | | |
| • Labores culturales | ■ | | | | | | | | | |
| • **Fase 5 Postulados de Koch** | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| • Visita de tesis | ■ | | | | | | | | | |
| **5. PROCESO DE TESIS** | | | | | | | | | | |
| • Recopilación e interpretación de datos | ■ | ■ | | | | | | | | |
| • Redacción del proyecto final | ■ | ■ | | | | | | | | |
| • Presentación final de la investigación | ■ | ■ | ■ | | | | | | | |

# ANEXO 3

## Presupuesto de Tesis

| Cod. | Equipo | Marca | Precio (USD) | Depreciación* (USD) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Autoclave | MARKET FORGE | 12000 | 600 |
| 2 | Autoclave | Tufinaver | 12000 | 600 |
| 3 | Balanza analítica | OHDUS | 8000 | 400 |
| 4 | Balanza de Precisión 250 g | AE ADAM | 8000 | 400 |
| 5 | Balanza de Precisión 250 g | METTLER TOLEDO | 8000 | 400 |
| 6 | Baño María | PRECISION SCIENTIFIC | 8000 | 400 |
| 7 | Baño María | VWR | 1200 | 60 |
| 8 | Bomba de vacío | GAST | 800 | 40 |
| 9 | Cabina de Bioseguridad Tipo 2 | LABCONCO | 15000 | 750 |
| 10 | Cabina de Flujo Laminar | LABCONCO | 15000 | 750 |
| 11 | Cabina PCR | LABCONCO | 8000 | 400 |
| 12 | Cámara electroforesis horizontal grande | Bio-RAD | 9000 | 450 |
| 13 | Cámara electroforesis horizontal pequeña | Bio-RAD | 9000 | 450 |
| 14 | Cámara de Neubauer | DEPTH | 300 | 15 |
| 15 | Centrifuga para tubos 1.5 -2 ml | EPPENDORF | 6000 | 300 |
| 16 | Centrifuga Refrigerada | EPPENDORF | 15000 | 750 |
| 17 | Congelador (-20°C) | Selecta | 18000 | 900 |
| 18 | CPU | OLYMPUS | 800 | 80 |
| 19 | CPU | HP | 800 | 80 |
| 20 | CPU (Lector de placa) | HP | 800 | 80 |
| 21 | Destilador de agua | YOUGLIN | 8000 | 400 |
| 22 | Espectrofotómetro | Thermo Scientific | 25000 | 1250 |
| 23 | Estéreo Microscopio | OLYMPUS SD30 | 1200 | 60 |
| 24 | Esterilizador | ELEKTROWERK DR GRUB KG | 8000 | 400 |
| 25 | Esterilizador de asa bacteriológica | MC CORNICK SCIENTIFIC | 200 | 10 |
| 26 | Estufa | Binder | 8000 | 400 |
| 27 | Foto documentador | Majorscience | 15000 | 750 |
| 28 | Incubadora | PRECISION SCIENTIFIC | 8000 | 400 |
| 29 | Computador portátil | DELL | 1200 | 60 |
| 30 | Computador portátil | HP | 1200 | 60 |
| 31 | Lector de placa | BIOLOG Microstation | 60000 | 3000 |
| 32 | Microondas | Panasonic | 800 | 40 |
| 33 | Micropipeta 10 - 100 µl | BUECO | 120 | 6 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 34 | Micropipeta 100 - 1000 µl | BUECO | 900 | 90 |
| 35 | Micropipeta 10 µl | BRAND | 900 | 45 |
| 36 | Micropipeta 100 µl | BRAND | 700 | 35 |
| 37 | Micropipeta 1000ml | BRAND | 700 | 35 |
| 38 | Micropipeta 100ml | BRAND | 700 | 35 |
| 39 | Micropipeta 10ml | BRAND | 700 | 35 |
| 40 | Micropipeta 200ml | BRAND | 700 | 35 |
| 41 | Micropipeta 20ml | BRAND | 1200 | 60 |
| 42 | Micropipeta 5 - 10 ml | OXFORD | 1200 | 60 |
| 43 | Micropipeta multicanal 0,5 - 10 µl | BRAND | 1500 | 75 |
| 44 | Micropipeta multicanal 25-1250 µl | OVATION | 1500 | 75 |
| 45 | Microscopio bifocal | LEITZ WETZLAR | 1200 | 60 |
| 46 | Microscopio binocular | FISHER SCIENTIFIC | 1200 | 60 |
| 47 | Microscopio Claro/Obscuro | OLYMPUS DP73 | 34000 | 1700 |
| 48 | Mini spin plus | EPPENDORF | 3000 | 150 |
| 49 | Monitor | LG | 150 | 7.5 |
| 50 | Monitor | HP | 150 | 7.5 |
| 51 | Monitor (Lector de placa) | VIEWSONIC | 20000 | 1000 |
| 52 | Plancha agitadora | EDMUND BUSHLER | 1200 | 60 |
| 53 | Plancha Agitadora y calentamiento | THERMO SCIENTIFIC | 1500 | 75 |
| 54 | Purificador de Agua Tipo 1 | Millipore | 12000 | 600 |
| 55 | Refrigerador | DUREX | 500 | 25 |
| 56 | Refrigerador | LABLINE | 500 | 25 |
| 57 | Refrigerador | INDURAMA | 500 | 25 |
| 58 | Refrigerador | POOL-EKO | 2500 | 125 |
| 59 | Refrigeradora (-20°C) | General Electric | 1200 | 60 |
| 60 | Refrigeradora (4°C) | INDURA | 500 | 25 |
| 61 | Sellador para plásticos | KAPAK | 80 | 4 |
| 62 | Sorbona | LABCONCO | 20000 | 1000 |
| 63 | Termociclador de gradiente | Bio-RAD | 10000 | 500 |
| 64 | Turbidímetro | BIOLOG | 10000 | 500 |
| 65 | Ultra congelador | ILSHIN BIO BASE | 2000 | 100 |
| 66 | Ultra congelador | SNIDJERS LABS | 2500 | 125 |
| 67 | Vortex | DIAGGER | 800 | 40 |
| 68 | Vortex | Genie 2 | 150 | 7.5 |
| | | | **Total** | **21437,5** |

*****Depreciación calculada para un periodo de 6 meses.

| Cod. | Reactivos | Unidad | Precio Unitario (USD) | Precio Final (USD) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 100bp DNA Ladder | 250ul | 149.2 | 14,0 |
| 2 | Ácido etilendiaminotetraacético EDTA | 50g | 20,0 | 3,5 |
| 3 | Agarosa, LE, Analytical Grade | 500g | 708.4 | 35,0 |
| 4 | Alcohol | 96% | 4,0 | 4,0 |
| 5 | Alcohol | 70% | 4,0 | 4,0 |
| 6 | Blue/Orange Loading Dye, 6X | 3ml (3x1ml) | 49.3 | 5,0 |
| 7 | b-mercaptoethanol | 5g | 10,0 | 2,5 |
| 8 | Cloroformo:isoamilalcohol 24:1 | 10ml | 15,0 | 2,5 |
| 9 | CTAB | 10ml | 15,0 | 2,5 |
| 10 | DNA Ladder, 1kb | 500ul | 158.1 | 10,0 |
| 11 | dNTP Mix | 1000ul | 69.9 | 8,0 |
| 12 | Ethanol al 70% | 1L | 20,0 | 5,0 |
| 13 | GoTaq(R) qPCR Master Mix | 200Rx | 436.4 | 50,0 |
| 14 | GoTaq® G2 Hot Start Polymerase | 500u | 362.0 | 50,0 |
| 15 | Hipoclorito de sodio | 10% | 2,5 | 2,5 |
| 16 | Isopropanol | 1 L | 4,0 | 0,9 |
| 17 | Malt Extract | 500 g | 280,0 | 280,0 |
| 18 | Medio de cultivo CZAPEK_DOX_Agar | 100 g | 180,0 | 180,0 |
| 19 | Medio de cultivo Peptone Water | 500 g | 40,0 | 40,0 |
| 20 | Medio de cultivo Potaton Dextrose Agar | 500 g | 180,0 | 180,0 |
| 21 | Medio de cultivo Potaton Dextrose BrotH | 500 g | 200,0 | 200,0 |
| 22 | MgCl2 | 5g | 10,0 | 2,0 |
| 23 | Microplate FF | 1U | 8,0 | 88,0 |
| 24 | NaCl | 50g | 45,0 | 15,0 |
| 25 | Primers EF1 | 50Rx | 36,0 | 11,0 |
| 26 | Primers EF2b | 50 Rx | 36,0 | 11,0 |
| 27 | PureLink PCR Purification Kit | 50Rx | 154,0 | 35,0 |
| 28 | RNaseZap® | 250mL. | 104,0 | 45,0 |
| 29 | Sarkosyl o SDS | 5g | 10,0 | 10,0 |
| 30 | Solvente T-Go | 5% | 110,0 | 110,0 |
| 31 | Sorbitol | 5g | 80,0 | 10,0 |
| 32 | SYBR® Green PCR Master Mix x 500mL | 200Rx | 612,0 | 25,0 |
| 33 | Trisborato, EDTA TBE 1X | 50g | 20,0 | 20,0 |
| 34 | TrisHCl,pH 8.0 | 5g | 20,0 | 20,0 |
| 35 | Tubos de inoculación FF | 30 ml | 6,0 | 66,0 |
| 36 | Water, DEPC-Treated | 10 x 50 ml | 66.0 | 15,0 |
| | | | **Total** | **1562,4** |

| Cod. | Materiales | Cantidad | Precio unitario (USD) | Precio total (USD) |
|---|---|---|---|---|
| | **Material de vidrio** | | | |
| 1 | Placas Petri | 100U | 2,5 | 250,0 |
| 2 | Frascos Duran Schott x 250 ml | 5U | 5,0 | 25,0 |
| 3 | Frascos Duran Schott x 100 ml | 20U | 8,0 | 160,0 |
| 4 | Frascos Duran Schott x 1000 ml | 4U | 10,8 | 920,0 |
| 5 | Vasos de precipitación 10 ml | 5U | 2,2 | 11,0 |
| 6 | Vasos de precipitación 50 ml | 5U | 2,5 | 12,5 |
| 7 | Vasos de precipitación 25 ml | 5U | 2,4 | 12,0 |
| 8 | Vasos de precipitación 100 ml | 5U | 4,5 | 22,5 |
| 9 | Vasos de precipitación 250ml | 5U | 5,5 | 27,5 |
| 10 | Vasos de precipitación 500 ml | 5U | 6,5 | 32,5 |
| 11 | Vasos de precipitación 1000 ml | 5U | 7,3 | 36,5 |
| 12 | Matraz Erlenmeyer 250 ml | 20U | 7,3 | 14,6 |
| 13 | Matraz Erlenmeyer 1400 ml | 2U | 10,5 | 21,0 |
| 14 | Matraz Erlenmeyer 2000 ml | 1U | 15,5 | 15,5 |
| 15 | Probetas | 2U | 12,3 | 24,6 |
| 16 | Tubos de ensayo | 40 U | 1,06 | 42,4 |
| 17 | Porta objetos | 1U | 0,25 | 0,3 |
| 18 | Espátulas Drigralski | 1U | 1,2 | 1,2 |
| 19 | Lámpara de alcohol | 2U | 6,0 | 12,0 |
| 20 | Desecador | 2U | 50,0 | 100,0 |
| | **Material de Plástico** | | | |
| 21 | Microtubo eppendorf 2 ml. | Bolsa de 500 | 20,0 | 8,0 |
| 22 | Tubo para PCR. 0,2 ml. Tapón plano | Bolsa de 1000 | 15,0 | 3,0 |
| 23 | Puntas para micropipeta, azul 100 - 1000 µl. | Bolsa de 1000 | 12,0 | 6,0 |
| 24 | Puntas para micropipeta, amarilla 5 - 200 µl. | Bolsa de 1000 | 12,0 | 6,0 |
| 25 | Puntas c/filtro 10 ul. | Bolsa de 960 | 20,0 | 6,0 |
| 26 | Rack de puntas c/filtro 0,5 - 10 µl. | 96 puntas | 10,0 | 3,0 |
| 27 | Rack de puntas c/filtro 0,1 - 10 µl. | 96 puntas | 10,0 | 3,0 |
| 28 | Rack de puntas c/filtro 1 - 20 µl. | 96 puntas | 8,0 | 3,0 |
| 29 | Rack de puntas c/filtro 1 - 100 µl. | 96 puntas | 8,0 | 3,0 |
| 30 | Rack de puntas c/filtro 1 - 200 µl. | 96 puntas | 8,0 | 3,0 |
| 31 | Parafilm | 38 m x10 cm | 20,0 | 10,0 |
| 32 | Guantes | 1U | 18,0 | 9,0 |
| 33 | Gradillas | 7U | 5,0 | 35,0 |
| 34 | Atomizadores | 1U | 1,5 | 1,5 |
| 35 | Piceta | 2 U | 2,5 | 5,0 |
| 36 | Macetas | 60 | 0,6 | 36,0 |
| 37 | Fundas plásticas | 100 | 1,5 | 1,5 |
| 38 | Plástico de invernadero | 3 m | 6,0 | 18,0 |

| | Varios | | | |
|---|---|---|---|---|
| 39 | Papel de copia | 100 | 4,0 | 4,0 |
| 40 | Papel Aluminio | 1U | 4,2 | 4,2 |
| 41 | Papel filtro | 1 U | 2,5 | 2,5 |
| 42 | Fundas de papel | 100 | 1,36 | 1,4 |
| 43 | Rollo celulosa 2 Capas | 900 m | 3,45 | 10,4 |
| 44 | Servilletas | 3 U | 0,6 | 1,8 |
| 45 | Mortero con pistilo | 5U | 10,0 | 50,0 |
| 46 | Asa de platino | 1U | 13,0 | 13,0 |
| 47 | Tijeras | 1U | 5,0 | 5,0 |
| 48 | Mascarillas | 20U | 8,0 | 2,0 |
| 49 | Pinzas | 1U | 3,0 | 3,0 |
| 50 | Bisturí | 20 U | 0,5 | 10,0 |
| 51 | Fósforos | 2U | 0,05 | 0,1 |
| 52 | Plantas de frutilla | 60 | 0,2 | 12,0 |
| 53 | Empastado de Tesis | 5 | 12,0 | 48,0 |
| 54 | Impresiones | | 0,1 | 40,0 |
| 55 | Visita Técnica | 1 | 200 | 200,0 |
| | | | **Total** | **407,3** |

# ANEXO 4

Composición de los medios de cultivo

**AGAR PAPA DEXTROSA (OXOID)**

| **INGREDIENTE** | **g/l** |
|---|---|
| Extracto de patata | 4.0 |
| Glucosa | 20 |
| Agar agar | 15 |
| pH | 5.6 |

**CZAPEK-DOX AGAR (CDA)**

| **INGREDIENTE** | **g/l** |
|---|---|
| Sacarosa | 30.0 |
| $NaNO_3$ | 2.0 |
| $KH_2PO_4$ | 1.0 |
| $MgSO_4$ – 7 $H_2O$ | 0.5 |
| KCl | 0.5 |
| $FeSO_4$ – 7 $H_2O$ | 0.01 |
| Agar | 15.0 |
| pH | 5.6 |

**EXTRACTO DE MALTA AGAR**

| **INGREDIENTE** | **g/l** |
|---|---|
| Extracto de malta | 20.0 |
| Peptona | 1.0 |
| Glucosa | 20.0 |
| Agar | 20.5 |
| pH | 5.6 |

**MEDIO LÍQUIDO**

| **INGREDIENTE** | **g/l** |
|---|---|
| Dextrosa o sucrosa | 20.0 |
| Extracto de levadura | 5.0 |
| Peptona | 5.0 |
| pH | 5.6 |

**CLAVEL AGAR**

| **INGREDIENTE** | |
|---|---|
| Agar | 20.0 **g/l** |
| Hojas de clavel | 3 – 5 $mm^2$ |

# ANEXO 5

Características morfológicas de *Fusarium*

TRATAMIENTO 4



TRATAMIENTO 7



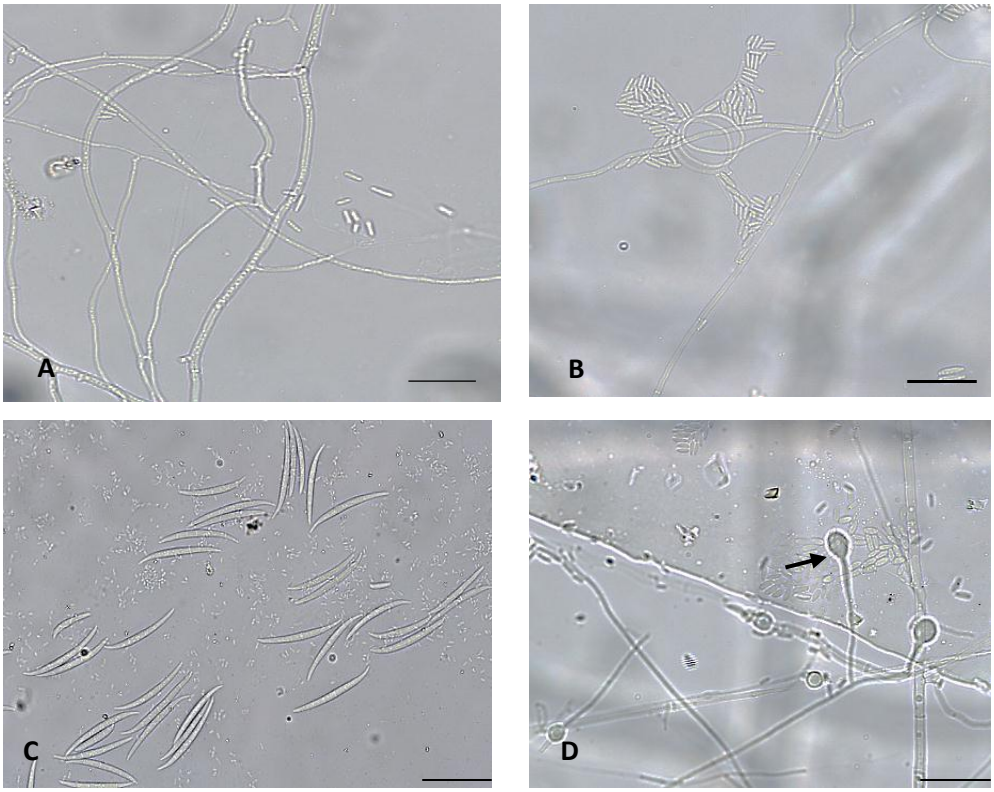
TRATAMIENTO 8



TRATAMIENTO 13



Colonias de *Fusarium* presentando diferentes aspectos de color en medio PDA




Estructuras asexuales de *Fusarium* sp. aislados de en medio PDA (40X), A: Micelio, B: Microconidias, C: Macroconidias, D: Clamidóspora (40μm)

# ANEXO 6

Fotografías del manejo y evaluación de la investigación

**PROCESO DE CAMPO**



Muestreo



Manejo



Ingreso laboratorio



Sintomas presentes en tallo

PROCESO LABORATORIO



Siembra de tallo y sustrato

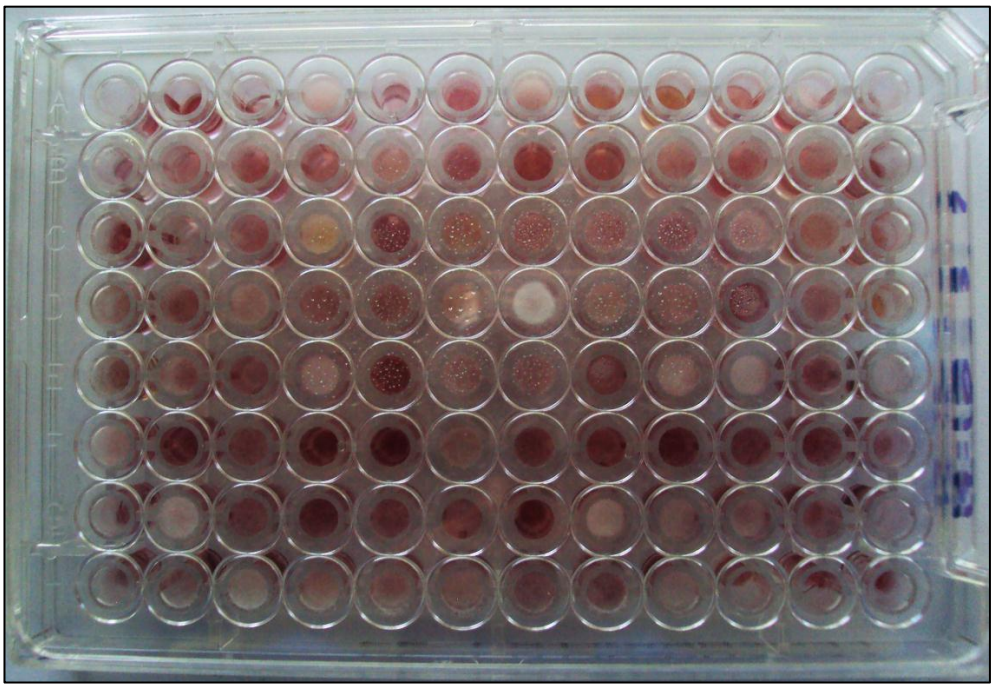


Cultivo monospórico

## PROCESO LABORATORIO

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 Water | A2 Tween 80 | A3 N-Acetyl-D-Galactosamine | A4 N-Acetyl-D-Glucosamine | A5 N-Acetyl-β-D-Mannosamine | A6 Adonitol | A7 Amygdalin | A8 D-Arabinose | A9 L-Arabinose | A10 D-Arabitol | A11 Arbutin | A12 D-Cellobiose |
| B1 α-Cyclodextrin | B2 β-Cyclodextrin | B3 Dextrin | B4 i-Erythritol | B5 D-Fructose | B6 L-Fucose | B7 D-Galactose | B8 D-Galacturonic Acid | B9 Gentiobiose | B10 D-Gluconic Acid | B11 D-Glucosamine | B12 α-D-Glucose |
| C1 α-D-Glucose-1-Phosphate | C2 Glucuronamide | C3 D-Glucuronic Acid | C4 Glycerol | C5 Glycogen | C6 m-Inositol | C7 2-Keto-D-Gluconic Acid | C8 α-D-Lactose | C9 Lactulose | C10 Maltitol | C11 Maltose | C12 Maltotriose |
| D1 D-Mannitol | D2 D-Mannose | D3 D-Melezitose | D4 D-Melibiose | D5 α-Methyl-D-Galactoside | D6 β-Methyl-D-Galactoside | D7 α-Methyl-D-Glucoside | D8 β-Methyl-D-Glucoside | D9 Palatinose | D10 D-Psicose | D11 D-Raffinose | D12 L-Rhamnose |
| E1 D-Ribose | E2 Salicin | E3 Sedoheptulosan | E4 D-Sorbitol | E5 L-Sorbose | E6 Stachyose | E7 Sucrose | E8 D-Tagatose | E9 D-Trehalose | E10 Turanose | E11 Xylitol | E12 D-Xylose |
| F1 γ-Aminobutyric Acid | F2 Bromosuccinic Acid | F3 Fumaric Acid | F4 β-Hydroxybutyric Acid | F5 γ-Hydroxybutyric Acid | F6 p-Hydroxy-phenylacetic Acid | F7 α-Ketoglutaric Acid | F8 D-Lactic Acid Methyl Ester | F9 L-Lactic Acid | F10 D-Malic Acid | F11 L-Malic Acid | F12 Quinic Acid |
| G1 D-Saccharic Acid | G2 Sebacic Acid | G3 Succinamic Acid | G4 Succinic Acid | G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester | G6 N-Acetyl-L-Glutamic Acid | G7 L-Alaninamide | G8 L-Alanine | G9 L-Alanyl-Glycine | G10 L-Asparagine | G11 L-Aspartic Acid | G12 L-Glutamic Acid |
| H1 Glycyl-L-Glutamic Acid | H2 L-Ornithine | H3 L-Phenylalanine | H4 L-Proline | H5 L-Pyroglutamic Acid | H6 L-Serine | H7 L-Threonine | H8 2-Aminoethanol | H9 Putrescine | H10 Adenosine | H11 Uridine | H12 Adenosine-5'-Monophosphate |

Codificación fuentes de carbono FF MicroPlaca™

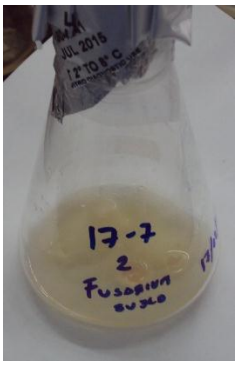


Resultado de la oxidación de los fuentes de carbono (72 Horas)

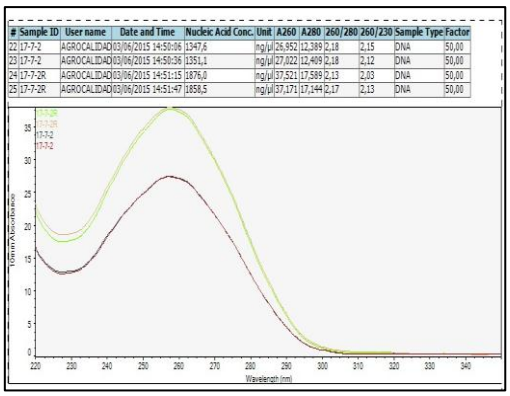
# PROCESO LABORATORIO



Conservación

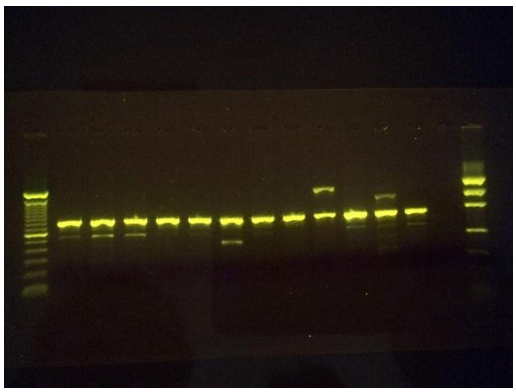



Masificación de micelio

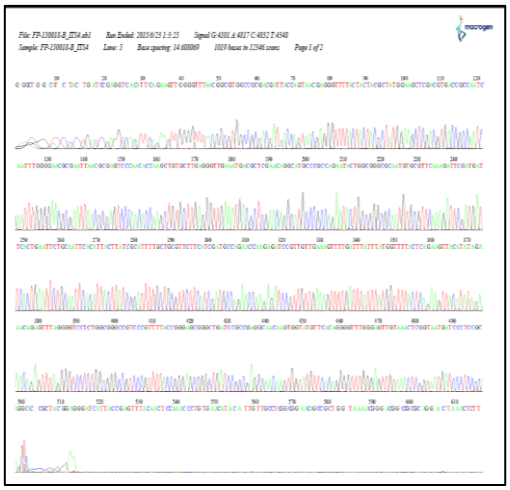


| # | Sample ID | User name | Date and Time | Nucleic Acid Conc. | Unit | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Sample Type | Factor |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22 | 17-7-2 | AGROCALID | 03/06/2015 14:50:06 | 1347,6 | ng/µl | 26,952 | 12,389 | 2,18 | 2,15 | DNA | 50,00 |
| 23 | 17-7-2 | AGROCALID | 03/06/2015 14:50:36 | 1351,1 | ng/µl | 27,022 | 12,409 | 2,18 | 2,12 | DNA | 50,00 |
| 24 | 17-7-2R | AGROCALID | 03/06/2015 14:51:15 | 1876,0 | ng/µl | 37,521 | 17,589 | 2,13 | 2,03 | DNA | 50,00 |
| 25 | 17-7-2R | AGROCALID | 03/06/2015 14:51:47 | 1858,5 | ng/µl | 37,171 | 17,144 | 2,17 | 2,13 | DNA | 50,00 |

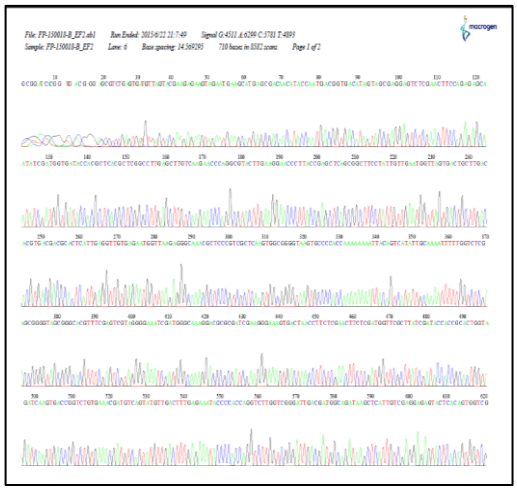
Cuantificación



Amplificación



Secuenciación ITS

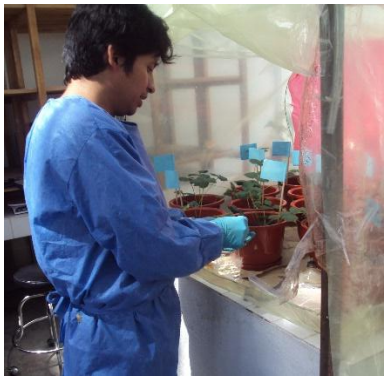


Secuenciación EF -1 α

PROCESO INVERNADERO



Transplante invernadero



Inoculación en plantas sanas



Inoculación




Sintomatología




Manejo de muestras extraidas del invernadero



Sintomatología en plantas del invernadero

# ANEXO 7

## GLOSARIO DE TÉRMINOS TÉCNICOS

**18S.-** Gen que codifica el ARNr de 1900 nucleótidos que forma parte de la SSU del ribosoma eucariota.

**28S.-** Gen que codifica el ARNr de 4 700 nucleótidos que forma parte de la LSU del ribosoma eucariota.

**5.8S.-** Gen que codifica el ARNr de 160 nucleótidos que forma parte de la LSU del ribosoma eucariota.

**Absorbancia.-** Es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica tras haber atravesado una muestra.

**Actinomorfa.-** Que tiene simetría radial, polisimétrico o multilateral.

**Agarosa.-** Polisacárido formado por galactosa alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria.*

**Amplicón.-** Una sección de ADN o ARN que es la fuente y/o el producto de amplificación de eventos de replicación o naturales o artificiales.

**Barbecho.-** Técnica por la cual se deja sin sembrar o cultivar durante uno o varios ciclos vegetativos.

**Beta-tubulina.-** Subunidad esencial de los microtúbulos, de las proteínas globulares (tubulina).

**Biofumigación.-** Técnica que permite utilizar materia orgánica y los residuos agrarios en control de los patógenos vegetales de origen edáfico.

**Bioquímicos.-** Parte de la química que estudia la composición y las transformaciones químicas de los seres vivos.

**Buffer.-** O tampón químico, es un sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada, o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad tamponante.

**Calmodulina.-** Proteína acídica intracelular, de bajo peso molecular y termoestable que se localiza principalmente en el cerebro y el corazón y es expresada en todas las células eucarioticas.

**Cebador.-** Oligonucleótido o primer e un péptido corto de entre 18 y 25 nucleótidos necesarios para que la enzima polimerasa comience a sintetizar copias de ADN.

**Cepa.-** Grupo de individuos derivados por ascendencia de un único individuo dentro de una especie.

**Clorosis.-** Amarillamiento de las plantas consecuencia de su incapacidad de sintetizar clorofila o una destrucción de la misma.

**Codificación.-** Especificación de una secuencia de péptidos en el código que contiene las moléculas de AND.

**Codón.-** Secuencia de tres nucleótidos consecutivos en el ARN m que presenta una unidad de codificación genética al especificar un aminoácido particular durante la síntesis de polipéptidos en una célula.

**Cofia.-** Grupo de células reforzadas que cubren y protegen el meristemo apical de la raíz.

**Conductividad eléctrica.-** Propiedad natural de los cuerpos que consiste en transmitir el calor o la electricidad.

**Conidióforo.-** Estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios.

**Corona**.- eje corto de forma cónico.

**Desnaturalización.-** Es un cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.

**Diana.-** En pruebas de diagnósticas, la molécula o secuencia de ácidos nucleicos que se analiza en una muestra.

**Diferenciación.-** Proceso por el cual las células no especializadas desarrollan estructuras y funciones, características de un tipo particular de célula, normalmente tiene lugar durante el proceso de desarrollo de una o varias células.

**Electroforesis.-** Técnica de biología molecular, se usa para separar los componentes de mezclas complejas de macromoléculas, sometiéndolas a un campo electromagnético, donde las moléculas migran según sus cargas eléctricas o pesos moleculares.

**Endodermis.-** Capa de células de la raíz, dispuestas de modo completo, de aspecto parenquimático y se encuentra en la parte interior del córtex, alrededor del tejido vascular.

**Enfermedad.-** Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo, por causas en general conocidas, manifestada por síntomas y signos características, y cuya evolución es más o menos previsible.

**Espora.-** Célula reproductora que genera un individuo sin necesidad de unirse a otras células.

**Especificidad.-** En pruebas de diagnóstico, es la capacidad de una sonda de reaccionar de forma precisa y específica con su molécula diana.

**Estípula.-** Estructura, usualmente laminar, que se forma a cada lado de la base foliar de una planta vascular.

**Estolones.-** Rama rastrera que nace de la base del tallo de algunas plantas y echa raíces que producen nuevas plantas, como en la fresa.

**Estomas.-** Cada una de las aberturas microscópicas que hay en la epidermis delas hojas para facilitar los intercambios de gases entre la planta y el exterior.

**Exón.-** Segmento de un gen eucariótico que es transcrito como parte del transcrito primario y que, después del procesado, es retirado con otros exones para formar una molécula de ARNm maduro.

**Fasciculado.-** Que está formado por elementos agrupados en pequeños haces.

**Fenotipo.-** Aspecto observable de un individuo que refleja la interacción de su genotipo con un medio determinado.

**Fiálide.-** Célula conidiógena que produce conidios blásticos de manera basípeta.

**Folíolo.-** Pinna o foliolo es cada una de las piezas separadas en que a veces se encuentra dividido el limbo de una hoja.

**Gene homólogo.-** Genes de especie distintos con expresiones fenotípicas similares

**Glicoproteínas.-** Son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos.

**Heladas.-** Fenómeno atmosférico que se produce al congelarse el agua por un descenso persistente de las temperaturas: las heladas han destrozado los cultivos.

**Hexosaminas.-** Son amino azúcares formados por la adición de un grupo amina a una hexosa.

**Hialinos.-** Tejidos u órganos que muestran aspecto transparente o traslúcido.

**Hifa.-** Elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que se conforman su estructura vegetativa.

**Hibridación.-** En ecología, hibridación es el proceso de mezclar diferentes especies o variedades de organismos para crear un híbrido.

**Hipanto.-** Receptáculo cóncavo de las flores con ovario ínfero sobre el cual aparentemente nace el cáliz, corola y los estambres.

**Histona.-** Proteína básica de bajo peso molecular, muy conservado entre los eucariotas y en algunos procariotas.

**Inflorescencia.-** Orden o forma con que aparecen agrupadas las flores en una misma rama: inflorescencia en espiga; inflorescencia en umbela.

**Intrón.-** Segmento del transcrito primario de un gen eucariota, que se elimina (antes de que se produzca el ARNm maduro) en el proceso que se conoce como corte y empalme de intrones.

**Inóculo.-** Suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación.

**Macerar.-** Desintegrar un tejido para romper sus células.

**Marchitez.-** Estado de las plantas que se caracteriza por la flaccidez de los tejidos.

**Micelio.-** Red de filamentos que constituyen la pared vegetativa del talo de los hongos.

**Microflora.-** Flora micro orgánica de un medio determinado.

**Morfología.-** Es el estudio de la forma de un organismo o sistema.

**Mucilago.-** Sustancia orgánico de textura viscosa, semejante a la goma, que contienen algunos vegetales.

**Necrosis.-** Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

**Nicho.-** Término que describe la posición relacional de una especie o población en un ecosistema.

**Nucleótido.-** Nucleósido con uno o más grupos fosfato unidos al hidroxilo 3´- o 5´de una pentosa.

**Oligonucleótido.-** Oligómero de nucleótidos. Su interés radica en su utilización como cebadores en el proceso de síntesis de ADN *in vitro*

**Parafilm.-** Película de parafina elástica, utilizada para sellar tubos o placas de Petri.

**Parásito.-** Organismo que obtiene sus nutrientes de otro organismo vivo

**Patogénesis.-** Describe el origen y evolución de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella.

**Pecíolos.-** Pedúnculo o especie de rabito de la hoja mediante el cual se une al tallo.

**Perenne.-** Es una planta que vive más de dos años. Se les dice también vivaz.

**Plasmodesmos.-** Filamento protoplásmicos que conectan células vegetales contiguas pasando a través de sus paredes celulares.

**Polifenoloxidasa.-** Enzima tetramérica que contiene cuatro átomos de cobre por molécula, y posee sitios de unión para compuestos aromáticos y oxígeno

**Polimorfismo.-** Variación alélica en un locus, el polimorfismo de las secuencias de nucleótidos proporciona herramientas de diagnóstico muy potentes.

**Polisacárido.-** Polímero lineal o ramificado compuesto por monosacáridos unidos por enlaces covalentes.

**Propágulo.-** Cualquier estructura capaz de originar una nueva planta por reproducción asexual o sexual, incluyendo bulbillos, yemas vegetativas, etc.

**Septas.-** Es una pared que divide de un modo completo o incompleto una cavidad o estructura en otras más pequeñas.

**Saprófito.-** Que vive sobre materia orgánica en descomposición y se alimenta de ella.

**Tílides.-** Estructura que frecuentemente obstruye la cavidad de los elementos conductores del xilema

**Turbidez.-** Falta de transparencia de un líquido debido a la presencia de partículas en suspensión

**Virulencia.-** Grado de la capacidad de un microorganismo para producir una enfermedad.