

UNIVERSIDAD DE CUENCA



Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

“Evaluación de la germinación y la resistencia de *Vasconcelleas* silvestres a *Fusarium* spp como una alternativa de porta injertos para la producción de (*Vasconcellea* × *heilbornii*) cv babaco”

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

AUTORES: Edwin Patricio Parra Tenesaca

C.I. 0106620966

Edisson Vladimir Tigre Tigre

C.I. 0104107792

DIRECTORA: Msc. Denisse Fabiola Peña Tapia

C.I. 0102501809

CUENCA-ECUADOR

06/06/2019



RESUMEN

El género *Vasconcellea* es considerado el más importante de la familia Caricaceae, con 12 especies silvestres reportadas en el Austro ecuatoriano, que podrían ser consideradas como potenciales portainjertos para babaco (*V. x heilbornii*) a fin de controlar la susceptibilidad al hongo del género *Fusarium*. El problema que presentan las especies silvestres es el bajo porcentaje de germinación a nivel de campo, en este estudio se evaluó la germinación *in vitro* de embriones de *Vasconcelleas* silvestres (*V. candicans*, *V. stipulata* y *V. cundinamarcensis*) a *Fusarium spp.* Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 12 tratamientos (3 especies de *Vasconcelleas* x 4 dosis de ácido giberélico) y 10 repeticiones. En la germinación de embriones, la especie *V. cundinamarcensis*, obtuvo el mejor resultado con un 28,75%, teniendo una relación directamente proporcional a la evaluación de la viabilidad con un 44%. El uso de AG₃ no estimuló la germinación, por el contrario, tuvo una relación inversamente proporcional a la concentración de la fitohormona. Respecto a la resistencia al patógeno, no se observó sintomatología de la enfermedad en las especies silvestres ni en el control de susceptibilidad (babaco) luego de los 60 días de la inoculación. En cuanto al análisis molecular, el *primer* BDTG12 permitió amplificar una región del genoma en todas las especies evaluadas, por lo que no permite confirmar la presencia de genes de resistencia al patógeno.

PALABRAS CLAVES: *Vasconcellea*. *Fusarium*. Ácido giberélico.

**ABSTRACT**

The genus *Vasconcellea* is more important than the Caricacea family, with 12 wild species reported in the Ecuadorian Austro, this is considered as rootstocks for babaco (*V. x heilbornii*) and in order to control the susceptibility to the fungus of the genus *Fusarium*. The problem presented by wild species is the low percentage of germination at field level, in this study was evaluated the in vitro germination of embryos of wild *Vasconcellea* (*V. candicans*, *V. stipulata* and *V. cundinamarcensis*) to *Fusarium spp.* It is a completely randomized design (DCA), with 12 treatments (3 vasconcellin species x 4 doses of gibberellic acid) and 10 repetitions. In germination of embryos the species *V. cundinamarcensis* obtained the best result with 28.75%, taking into account a relation proportional to the evaluation of viability with 44%. The use of AG₃ did not stimulate germination, on the contrary, it had an inversely proportional relation to the concentration of the phytohormone. Regarding the resistance to the pathogen, no symptomatology of the disease is observed in wild species or in the control of susceptibility (babaco) after 60 days of inoculation. Regarding the molecular analysis, the BDTG12 primer broadens a region of the genome in all the evaluated species, so it does not allow the presence of genes of resistance to the pathogen.

KEY WORDS: *Vasconcellea*. *Fusarium*. Gibberellic acid.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GENERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
4. HIPÓTESIS	24
4.1 Germinación	24
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	25
5.1 Vasconcellea x heilbonii cv. “babaco”	25
5.1.1 Origen y Taxonomía	25
5.1.2 Morfología y Propagación	25
5.1.3 Producción y Exportación	25
5.1.4 Plagas y Enfermedades	26
5.2 Germinación y propagación de Vasconcelleas	27
5.3 Parientes silvestres de Vasconcelleas	27
5.3.1 <i>Vasconcellea candicans</i>	27
5.3.2 <i>Vasconcellea stipulata</i>	28
5.3.3 <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	29
5.4 <i>Fusarium spp</i>	30
5.5 Cultivos Monospóricos	32



6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Área de estudio	33
6.2 Diseño de la siembra de embriones	34
6.3 Área de ejecución del proyecto	34
6.4 Recolección de Vasconcelleas	34
6.5 Viabilidad de embriones mediante la prueba de tetrazolio	35
6.6 Elaboración de medios de cultivo	35
6.7 Protocolo de germinación	36
6.7.1 Desinfección de semillas	36
a. Desinfección fuera de cabina de flujo	36
b. Desinfección dentro de cabina de flujo	36
6.7.2 Siembra de embriones	36
6.7.3 Germinación de embriones	37
6.8 Trasplante de Vasconcelleas a turba estéril	37
6.9 Trasplante de Vasconcelleas a sustrato estéril	38
6.10 Aislamiento del hongo Fusarium	38
6.11 Inoculación de Fusarium en sustrato estéril	39
6.12 Amplificación de bandas mediante PCR	39
6.12.1 Extracción de ADN	39
6.12.2 Amplificación por PCR	40
6.12.3 Electroforesis en gel de agarosa	41



6.13	Diseño experimental y análisis estadístico	41
7.	RESULTADOS	43
7.1	Viabilidad de embriones	43
7.2	Germinación de embriones	43
7.3	Resistencia o tolerancia de las especies al patógeno	46
7.4	Amplificación de bandas mediante PCR	47
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
10.	BIBLIOGRAFÍA	54
11.	ANEXOS	60



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de las 3 especies de <i>Vasconcelleas</i> por concentración de AG_3 .	42
Tabla 2. Tratamientos para la resistencia de las 3 especies de <i>Vasconcellea</i>	42



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la marchitez por <i>Fusarium</i>	32
Figura 2. Mapa de la zona de recolección de las accesiones de <i>Vasconcelleas</i>	33
Figura 3. Diseño de la siembra de embriones	34
Figura 4. Porcentaje de viabilidad de cada especie de <i>Vasconcellea</i>	43
Figura 5. Porcentaje de germinación de cada especie de <i>Vasconcellea</i> .	44
Figura 6. Mejor tratamiento para la especie <i>V. candicans</i>	45
Figura 7. Mejor tratamiento para la especie <i>V. stipulata</i>	45
Figura 8. Mejor tratamiento para la especie <i>V. cundinamarcensis</i>	46



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Síntomas de contaminación por <i>Fusarium oxysporum</i> .	30
Imagen 2: Ausencia de sintomatología del patógeno en las especies estudiadas.	47
Imagen 3: Amplificación de bandas en cada especie de <i>Vasconcellea</i> mediante PCR.	48
Imagen 4: Extracción de semilla de <i>V. candidans</i>	65
Imagen 5: Extracción de semilla de <i>V. stipulata</i>	65
Imagen 6: Extracción de semilla de <i>V. cundinamarcensis</i>	65
Imagen 7: Semilla de las 3 especies de <i>Vasconcelleas</i>	65
Imagen 8: Viabilidad de semillas de <i>V. candidans</i>	66
Imagen 9: Viabilidad de semillas de <i>V. stipulata</i>	66
Imagen 10: Viabilidad de semillas de <i>V. cundinamarcensis</i>	66
Imagen 11: Siembra de embriones de las 3 especies de <i>Vasconcelleas</i>	67
Imagen 12: Esterilización de turba para siembra de las plántulas	67
Imagen 13: Monitoreo de las 3 especies de <i>Vasconcelleas</i>	67
Imagen 14: Trasplante a turba estéril	67
Imagen 15: Acondicionamiento de las 3 especies de <i>Vasconcelleas</i>	67
Imagen 16: Establecimiento de las 3 especies de <i>Vasconcelleas</i> al ambiente	67
Imagen 17: Elaboración de medios de cultivo (PDA)	68
Imagen 18: Aislamiento de <i>Fusarium spp</i>	68
Imagen 19: Cepas de cultivo monospóricas de <i>Fusarium spp</i>	68
Imagen 20: Identificación morfológica de <i>Fusarium spp</i>	68



Imagen 21: Elaboración de sustrato	69
Imagen 22: Esterilización del sustrato	69
Imagen 23: Aislamiento de <i>Fusarium spp</i> en sustrato	69
Imagen 24: Trasplante de <i>Vasconcelleas</i> a sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>	69
Imagen 25: Trasplante de <i>Vasconcelleas</i> a sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>	69
Imagen 26: Especies de <i>Vasconcelleas</i> en sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>	69
Imagen 27: Amplificación en termociclador Nexus GSX1	70
Imagen 28: Electroforesis en gel de agarosa	70
Imagen 29: Electroforesis en gel de agarosa	70
Imagen 30: Electroforesis en gel de agarosa	70
Imagen 31: Toma de datos en las especies de <i>Vasconcellea</i>	71
Imagen 32: Toma de datos en las especies de <i>Vasconcellea</i>	71
Imagen 33: Toma de datos en las especies de <i>Vasconcellea</i>	71
Imagen 34: Toma de datos en las especies de <i>Vasconcellea</i>	71



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AG₃: Ácido Giberélico

ppm: unidad de medida (partes por millón)

MVB: Mancha Vasculat del Babaco

PDA: Agar Papa Dextrosa

FIM: Fungi Isolation Medium

UFC: Unidades formadoras de colonias



Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Edwin Patricio Parra Tenesaca, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **Evaluación de la germinación y la resistencia de *Vasconcelleas* silvestres a *Fusarium spp* como una alternativa de porta injertos para la producción de (*Vasconcellea x heilbornii*) cv babaco**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 06 de junio del 2019

Edwin Patricio Parra Tenesaca

C.I: 0106620966



Cláusula de Propiedad Intelectual

Edwin Patricio Parra Tenesaca, autor del trabajo de titulación **Evaluación de la germinación y la resistencia de *Vasconcelleas* silvestres a *Fusarium spp* como una alternativa de porta injertos para la producción de (*Vasconcellea x heilbornii*) cv babaco**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 06 de junio del 2019

Edwin Patricio Parra Tenesaca

C.I: 0106620966



Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Edison Vladimir Tigre Tigre, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **Evaluación de la germinación y la resistencia de *Vasconcelleas silvestres* a *Fusarium spp* como una alternativa de porta injertos para la producción de (*Vasconcellea x heilbornii*) cv babaco**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 06 de junio del 2019

Edisson Vladimir Tigre Tigre

C.I: 0104107792



Cláusula de Propiedad Intelectual

Edisson Vladimir Tigre Tigre, autor del trabajo de titulación **Evaluación de la germinación y la resistencia de *Vasconcelleas* silvestres a *Fusarium spp* como una alternativa de porta injertos para la producción de (*Vasconcellea x heilbornii*) cv babaco**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 06 de junio del 2019

Edisson Vladimir Tigre Tigre

C.I: 0104107792



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos sabiduría y la oportunidad de culminar con una etapa en nuestra vida profesional.

A nuestros padres y nuestra familia por darnos todo el apoyo incondicional y sus consejos para formarnos como seres humanos y excelentes profesionales.

A nuestra directora de tesis Blga. Denisse Peña Msc. por dedicar su tiempo y conocimientos en este trabajo investigativo.

A PhD Eduardo Chica por aportar con sabios consejos y conocimientos en la elaboración de este trabajo.

A PhD Antonio Vallecillo por dedicar su tiempo y conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

A Ing. Walter Larriva por su aporte científico y consejos que nos ayudaron en este trabajo.

A Ing. Paulina Villena por dedicar su tiempo y conocimientos durante la elaboración de la tesis.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por todo su tiempo dedicado y sus conocimientos impartidos para formar profesionales de calidad para la sociedad.

A nuestros amigos, compañeros con quienes hemos compartido anécdotas y experiencias únicas que siempre las recordaremos con alegría durante nuestra carrera profesional.

Parra Tenesaca Edwin Patricio

Tigre Tigre Edisson Vladimir



DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la oportunidad de vivir y poder cumplir mis metas.

A mis padres Rómulo y Julia, por su amor y apoyo incondicional, guiándome con sus sabios consejos para mi crecimiento personal, gracias a ellos he logrado culminar este trayecto de la vida

A mis Hermanos Marcia, Gustavo y Alejandra por el apoyo de perseverancia y compañía durante todo este proceso.

A Belén por su cariño y apoyo incondicional durante mi carrera estudiantil y personal.

A mis sobrinos Fabiana y Christian por ser mi motivación para salir adelante día a día.

Parra Tenesaca Edwin Patricio



DEDICATORIA

A Dios por darme las fuerzas y sabiduría para salir adelante y conseguir este logro en mi vida profesional.

A mis padres Guillermo y Dolores, por brindarme todo el apoyo incondicional y sus sabios consejos que me ayudaron durante mi proceso educativo.

A mi hermana Estefanía por el cariño y apoyo durante mi formación académica.

A mi esposa Belén y mi hijo Christopher Alejandro por ser el motor que me impulsan a salir adelante.

A mi tía Guillermina y mi abuelita Evangelina por el cariño y apoyo brindado.

A toda mi familia por el cariño y apoyo que me han brindado durante mi carrera estudiantil.

Tigre Tigre Edison Vladimir



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas de babaco poseen un fruto partenocárpico (sin semillas), por lo que su reproducción se realiza por vía asexual, mediante estacas o injertos (Bazantes, 2016). Esta práctica, favorece la proliferación de enfermedades, siendo la más representativa la llamada Marchitez Vascular del Babaco (MVB), causada por el hongo *Fusarium oxysporum* (Ochoa, Fonseca y Ellis, 2000). La MVB, ocasiona pérdidas significativas en los rendimientos (Robles, Herrera y Torres, 2016), como resultado de la propagación clonal todas las plantas de babaco son genéticamente homogéneas susceptibles. Hasta la fecha, no se han desarrollado plantas con resistencia genética y las tecnologías de control químico no son eficientes cuando la enfermedad se hace evidente, es decir, con síntomas de clorosis foliar superiores al 25% (Bravo, Larriva y Minchala, 2012), además, este tipo de tratamiento, incrementa los costos de producción, disminuye la rentabilidad del cultivo y tiene efecto sobre la salud y el medio ambiente (García, 2011), a estas dificultades, se suma el hecho de que *Fusarium oxysporum*, puede permanecer en el suelo y en los residuos vegetales por décadas, inhabilitando su uso (González, Maruri y González, 2005).

En Azuay, el efecto negativo de este patógeno ha sido tan importante que prácticamente se ha eliminado este cultivo del paisaje, pese a que la demanda de la fruta es permanente y se puede encontrar en los comercios locales, actualmente, éste frutal no se cultiva en la zona, como se hacía antes. El suelo contaminado con el patógeno y la falta de disponibilidad de material vegetal resistente a estas condiciones son actualmente las principales limitantes para el desarrollo de áreas productivas en nuestra provincia.

Los injertos en patrones resistentes han sido una opción analizada por algunos autores (García, 2011; Bravo et al., 2012; Freire, 2015), sin embargo, la dificultad en este caso es



nuevamente la poca disponibilidad de material resistente para ser utilizado como portainjerto. García (2011) y Bravo et al., (2012) reportan tolerancia/resistencia en una sola accesión de *Vasconcellea heilbornii* (cv. 024) y aunque Bravo et al., (2012), sugieren resistencia en la especie *Vasconcellea candidans*, también mencionan serios problemas en los porcentajes y tiempos de germinación de sus semillas. Las *Vasconcelleas* silvestres suelen presentar gran cantidad de semillas, no obstante, su germinación suele ser difícil, lo que sugiere latencia en diferentes grados (Benítez, Lobo, Delgado y Medina, 2013).

La posibilidad de aprovechar la resistencia genética de las *Vasconcelleas* silvestres no debe ser descartada, las técnicas y herramientas con las que contamos actualmente permiten evaluar alternativas para mejorar los sistemas de germinación en condiciones *in vitro*, valorar la resistencia genética del material en ensayos dirigidos e incluso indagar sobre posibles marcadores de genes de resistencia en materiales que presenten ésta característica. La falta de información es actualmente una limitante para el aprovechamiento de las *Vasconcelleas* silvestres y es también una necesidad urgente en nuestro país, considerado centro de diversidad para el género *Vasconcellea* (Scheldeman, et al., 2007).



2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia genética de diferentes especies ha sido aprovechada en la agricultura a través del uso de parentales en mejoramiento genético (García, 2011), o haciendo uso directo del material resistente como portainjerto, especialmente, cuando se trata de controlar enfermedades o patógenos del suelo que infectan la planta a través del sistema radicular (Bravo et al., 2012).

Enfermedades causadas por patógenos del género *Fusarium* han sido afrontadas mediante el uso de patrones resistentes, con muy buenos resultados (Freire, 2015). Esta opción se presenta también como una alternativa viable para el control de la Marchitez Vascolar del babaco, enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* (Ochoa et al., 2000), por tal razón, el uso de patrones resistentes es una alternativa de aplicación relativamente rápida en comparación con el mejoramiento genético tradicional, además, para el agricultor resulta fácil de comprender y aplicar.

Las *Vasconcelleas* silvestres son fáciles de encontrar en zonas rurales de la sierra del sur del país, debido a que éstas forman parte de los huertos familiares (Benítez et al., 2013), la posible tolerancia / resistencia ha sido reportada en accesiones muy puntuales de *V. heilbornii* (cv.024 y 125 de INIAP), no disponibles para su uso masivo como portainjertos, y en la especie *V. candicans*, sin que exista mayor evidencia que respalde lo expuesto, es por ello, que se considera necesario generar información que respalde esta afirmación, así pues, en el caso de *V. candicans* y en la mayoría de las *Vasconcelleas* silvestres se produce gran cantidad de semilla que podrían considerarse potenciales portainjertos, siempre y cuando se superen los problemas de germinación reportados en este género.



En el presente trabajo se evaluó el efecto de cuatro concentraciones de ácido giberélico (incluido el testigo) en la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *V. candicans*, *V. stipulata* y *V. cundinamarcensis*, éstas dos últimas especies seleccionadas por ser relativamente fáciles de encontrar y por los reportes previos de resistencia a *Fusarium* (Espinosa, 2016).

En una segunda fase, se evaluó la resistencia a *Fusarium spp* de los individuos obtenidos de la germinación *in vitro* y finalmente, se usaron *primers* reportados como marcadores de resistencia en otras especies y amplificados previamente en *Vasconcelleas* (Sengupta, Das, Acharyya, Prasad y Ghose, 2014) para amplificar bandas en los materiales obtenidos y asociar la respuesta observada en campo con un posible marcador de resistencia genética, como un ensayo preliminar en la búsqueda de estos marcadores.

El objetivo final de este trabajo fue generar información con el propósito de brindar alternativas de manejo para los cultivadores de babaco y aquellos que han dejado esta actividad por la falta de métodos de control para enfrentar a éste patógeno, perdiendo así una fuente de ingresos y la oportunidad de aprovechar un frutal nativo con potencial de exportación por sus características favorables como la ausencia de semillas, la cutícula delgada y el agradable sabor de su pulpa (Robles, Mora, Herrera, Sánchez y Torres, 2016).



3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la germinación y la resistencia de *Vasconcelleas* silvestres a *Fusarium spp* como una alternativa de portainjertos para la producción de *Vasconcellea* × *heilbornii* cv. 'babaco'

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer protocolos de germinación *in vitro* para las especies en estudio.
- Seleccionar especies e individuos resistentes o tolerantes al patógeno *Fusarium spp.*
- Identificar la presencia de posibles genes de resistencia a *Fusarium spp* mediante un PCR.



4. HIPÓTESIS

4.1 Germinación

H0.- No existe una influencia de las concentraciones de AG_3 en la germinación de ninguna de las 3 especies en estudio.

H1.- Existe una influencia de las concentraciones de AG_3 en la germinación de al menos una de las 3 especies en estudio.

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 *Vasconcellea x heilbonii* cv. “babaco”

5.1.1 Origen y Taxonomía

Vasconcellea heilbornii cv. ‘babaco’ es una planta nativa de Sur América especialmente en países como Ecuador, Colombia y Perú, apreciada por su alta rentabilidad y gran potencial como especie cultivable (Spanic, Lemmens y Drezner, 2010). Según la clasificación de Lim, (2012), la especie *heilbornii* del género *Vasconcellea*, es un híbrido natural partenocárpico y proviene del cruce interespecífico de las especies *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea pubescens*.

5.1.2 Morfología y Propagación

Según su morfología, es un arbusto herbáceo de hasta 2.5 metros de altura, se puede cultivar desde los 800 a 2600 m de altitud (Dhuique et al., 2001), su fruto es climatérico, una baya sin semillas (Partenocárpica) alargada con 5 caras y 5 aristas (Vaca, 2008), su propagación es asexual a través de brotes tiernos, estacas o injertos, sin embargo, este método de propagación tiene múltiples dificultades, entre las principales baja capacidad de enraizamiento y contaminación con agentes patógenos (Jadán, Basantez, Gómez y Bermúdez, 2016).

5.1.3 Producción y Exportación

El cultivo se distribuye a lo largo del país, siendo las provincias más representativas: Imbabura, Tungurahua, Pichincha, Azuay y Loja. La producción de esta fruta ha crecido favorablemente a 252 hectáreas sembradas en invernadero y bajo cielo abierto (Montenegro, 2009), hasta esa fecha existía una superficie sembrada de 150 a 200 hectáreas de cultivo (Núñez, 2008).



Su fruto posee características idóneas para exportación como su olor, sabor, carencia de semillas, una cutícula fina y óptimas condiciones organolépticas de su pulpa (Robles, Salinas, Armijos, Sánchez y Torres, 2013). La exportación de babaco y sus derivados se distribuyen a Alemania y Países Bajos con un total de 5560,62 toneladas en promedio en los años 2002 y 2003 CORPEI (como se citó en Bravo et al., 2012).

5.1.4 Plagas y Enfermedades

Existen agentes fitopatológicos que atacan directamente al cultivo de babaco en diferentes etapas (vegetativas y reproductivas), tales como virus, hongos, nemátodos y bacterias. Siendo los hongos los agentes más importantes debido a su agresividad y los daños ocasionados a la producción (Quillay, 2011).

Alternaria sp provocando clorosis y mancha de anillos hasta su defoliación total, mientras la marchitez vascular del babaco (MVB) causada por *Fusarium oxysporum* provoca pérdida de las raíces, amarillamiento y defoliación de las hojas hasta provocar la muerte (Bravo et al., 2012), éste último, ha causado las mayores pérdidas en la producción y rendimiento del cultivo de babaco desde su descubrimiento hasta la actualidad (Ochoa et al., 2000).

Investigaciones realizadas por Robles et al., (2013), reportan que la propagación del hongo no se debe únicamente al agente fúngico (*Fusarium oxysporum*), sino que también se establece un sistema patológico que interacciona con la planta. Ésta puede ser una de las causas por la cual las estrategias de control de la enfermedad sean poco efectivas (Mendes, Garbeva y Raaijmakers, 2013).



5.2 Germinación y propagación de *Vasconcelleas*

Las especies de *Vasconcelleas* son reproducidas generalmente por propagación vegetal, se limita a la siembra de estacas, entre las principales dificultades que presenta son la baja capacidad de enraizamiento y la contaminación por agentes patógenos, por lo cual, un método alternativo es la propagación *in vitro* (Jadán et al., 2016). La germinación de embriones *in vitro* permite eliminar problemas físicos en la germinación y permite el uso de hormonas, así pues, Espinosa, (2016), en su investigación menciona que *Vasconcellea pubescens* y *Vasconcellea stipulata* poseen un proceso germinativo errático y tardío, mientras que la última presenta diocismo y producción de machos estériles donde la germinación no supera el 10% (Scheldeman, 2002). Sin embargo, en estudios realizados por Benítez et al., (2013), mencionan que al aplicar 1000 ppm de AG₃ + KNO₃ al 2.5% en *Vasconcellea goudotiana* y 600 ppm de AG₃ al 2.5% en *Vasconcellea cundinamarcensis* promovió una mayor germinación en relación con el testigo.

5.3 Parientes silvestres de *Vasconcelleas*

El género *Vasconcellea* ocupa el segundo lugar en importancia económica dentro de la familia Caricaceae, (*Carica papaya* L) como la más importante, posee 21 especies que se distribuyen desde México hasta Chile, las especies de *Vasconcelleas* a excepción del babaco no han adquirido importancia como cultivo y se les encuentra como plantas individuales (Espinosa, 2016).

5.3.1 *Vasconcellea candicans*

Es una planta arbustiva que se encuentra en peligro de extinción, es de gran importancia ecológica y como nicho ecológico de organismos importantes, para mantener



los ciclos naturales de materia y energía Cuya (como se citó en Gutiérrez, Nolasco y Santa, 2017). El fruto posee características organolépticas óptimas para su consumo de forma natural o soasada, en bebidas y mermeladas con grandes propiedades nutritivas. Además, se han realizado estudios preliminares que han demostrado que la papaína una enzima de proteasa del látex de *Vasconcellea candicans* es 1.84 veces superior a la de *Carica papaya* (Gutiérrez y Santa, 2016).

En otro estudio, se utilizó como método alternativo los porta-injertos de *Vasconcellea candicans* presentando resistencia y/o tolerancia a *Fusarium oxysporum* luego de ser infectadas con clamidosporas (Bravo et al., 2012). También se registra una propagación natural deficiente, proponiéndose como opción la germinación *in vitro* como una alternativa para obtener mayores porcentajes de germinación con el cultivo de embriones, siendo esta técnica útil incluso para conservación y reforestación. Felles, (2013) menciona además que *Vasconcellea candicans* y *Vasconcellea cundinamarcensis* son resistentes al virus del mosaico.

5.3.2 *Vasconcellea stipulata*

Llamado comúnmente Toronche, es una especie arbustiva, sus frutos se caracterizan por ser altamente aromáticos. La propagación se la realiza mediante semilla botánica o siembra en viveros el mismo que mejora la calidad de las plantas (Remuzgo, 2011).

Esta especie es utilizada por su resistencia a la mancha anular de la papaya, pero también es un recurso genético utilizado para proporcionar características deseables al babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* cv. “babaco”), es decir, mejorar los problemas fitosanitarios, tolerancia al frío y características organolépticas de interés (Vélez, Armijos y Jordán, 2015).



Se han reportado algunas características interesantes en *Vasconcellea stipulata* como la producción de látex con actividad proteolítica hasta 17 veces más que *Carica papaya* y en propagación por injertos, posee mayor longevidad, vigor y resistencia a nemátodos (Vaca, 2008), la germinación en *Vasconcelleas* son limitadas debido a la latencia de semillas, con una baja tasa de germinación y a largo plazo hasta 240 días (Ribeiro et al., 2008), sin embargo, Vélez et al., (2015) en su trabajo realizado con *Vasconcellea stipulata*, mencionan que la germinación *in vitro* aumenta en un 53% en presencia de peróxido de hidrogeno, además, señalan que al incluir ácido giberélico se reduce un 50% el trastorno fisiológico de retención de agua para así obtener 80% de plantas viables en estas condiciones.

5.3.3 *Vasconcellea cundinamarcensis*

Conocida como papaya o papayuela de montaña, es un frutal que está obteniendo gran importancia en el sur de América, se encuentra en regiones tropicales, originaria de los andes ecuatorianos. En Chile, es un cultivo de exportación, con un área aproximada de 225 hectáreas Carrasco et al (como se citó en Benítez et al., 2013).

No existen estudios relacionados con la resistencia a plagas y enfermedades en esta especie de *Vasconcellea* ni como portainjerto para babaco, sin embargo, Lemos et al., (2018) en su investigación, menciona a la actividad curativa de la actividad proteolítica (P1G10) como reparador de tejidos en la piel y lesiones gástricas.

Esta especie es relativamente común en el austro del país, se encuentra en forma natural y en huertos caseros (Espinosa, 2016), y por sus características es interesante evaluarla en cuanto a su germinación y resistencia.

5.4 *Fusarium spp*

Fusarium, es un grupo de hongos ascomicetos filamentosos de gran importancia económica que se transmiten por el suelo y se distribuyen en todo el mundo debido a su gran facilidad de propagación en agua, viento y suelo (Lombard, Sandoval, Lamprecht y Crous, 2019). En la imagen 1 se observa los principales síntomas por *Fusarium* incluyendo el retraso del crecimiento, marchitamiento, defoliación, pudrición y la muerte (Koike y Gordon, 2015).



Imagen 1. Síntomas de contaminación por *Fusarium oxysporum* presentes en *Vasconcellea* × *heilbornii* cv. 'babaco'.

Fuente: Bravo et al., (2012)

Este hongo tiene la cualidad de ser un patógeno facultativo siendo capaz de sobrevivir en suelos de varias partes del mundo, como saprofita o como huésped en las plantas Laurence, Burgess, Summerell y Liew (como se citó en Heredia, 2018). En otros estudios, mencionan que *Fusarium oxysporum* puede sobrevivir durante más de 20 años en los desechos vegetales y suelo e infectar fácilmente, debido a que forma clamidosporas en los tejidos de las plantas huéspedes en las etapas finales de la enfermedad (Pérez y Dita, 2014).



El hongo puede subsistir a manera de micelio o esporas en el suelo, hasta que encuentre una planta hospedera con las condiciones necesarias para su desarrollo, iniciando la infección desde la raíz (Ma et al., 2013). En la Figura 1 se observa el ciclo que empieza con el ingreso del patógeno a través de las raíces y crece en los vasos del xilema reduciendo el flujo vascular del agua y nutrientes, luego el micelio se expande por todos los tejidos de la planta y por último llega a la superficie de los tejidos muertos formando macroconidias (Jiménez, Castillo, Jiménez, Landa y Navas, 2015).

Fusarium oxysporum causa daños graves durante la producción y almacenamiento (Gullino, Daughtrey, Garibaldi y Elmer, 2015), por lo cual, el causante del marchitamiento vascular y podredumbre de la raíz es considerado entre los 10 principales patógenos fúngicos en la patología molecular de las plantas (Dean et al., 2012; Aoki, O'Donnell y Geiser, 2014).

Según Koike y Gordon (2015), en su investigación mencionan que para reducir la gravedad y la incidencia causadas por *Fusarium oxysporum* se realiza la rotación de cultivos de 1 a 3 años en condiciones de barbecho, sin embargo, el mejor método de manejo de las enfermedades se realiza con la selección de variedades resistentes, siempre que existan líneas disponibles (Lecomte, Alabouvette, Edel, Robert y Steinberg, 2016).

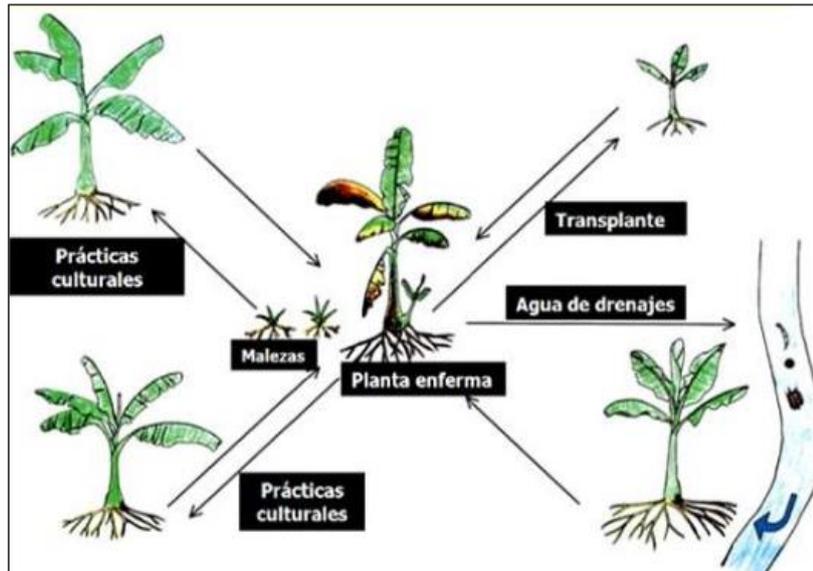


Figura 1. Ciclo de la marchitez por *Fusarium* y transmisión de la enfermedad.

Fuente: Hwang y Ko, (2004)

5.5 Cultivos Monospóricos

Los cultivos monospóricos, usados en ensayos de resistencia, se realizan con la finalidad de obtener hongos desarrollados a partir de una espora simple, con el objetivo de que la producción del patógeno sea confiable y pura, es necesario realizar aislamientos monospóricos que garanticen la pureza del hongo. Los aislamientos monospóricos se pueden propagar mediante colonia o por punta de hifa. Para esto previamente se debe realizar la identificación morfológica en un microscopio. Con la ayuda de una punta o una solución de esporas se procede a aislar la espora y sembrarla en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) para el crecimiento del micelio y su esporulación (Cañedo y Ames, 2004).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

La recolección de las accesiones de *Vasconcelleas* se realizó en las provincias de Azuay y Loja, *Vasconcellea candicans* se le recolectó en Sozoranga-Loja, *Vasconcellea stipulata* en Santa Isabel y *Vasconcellea cundinamarcensis* en Cuenca.

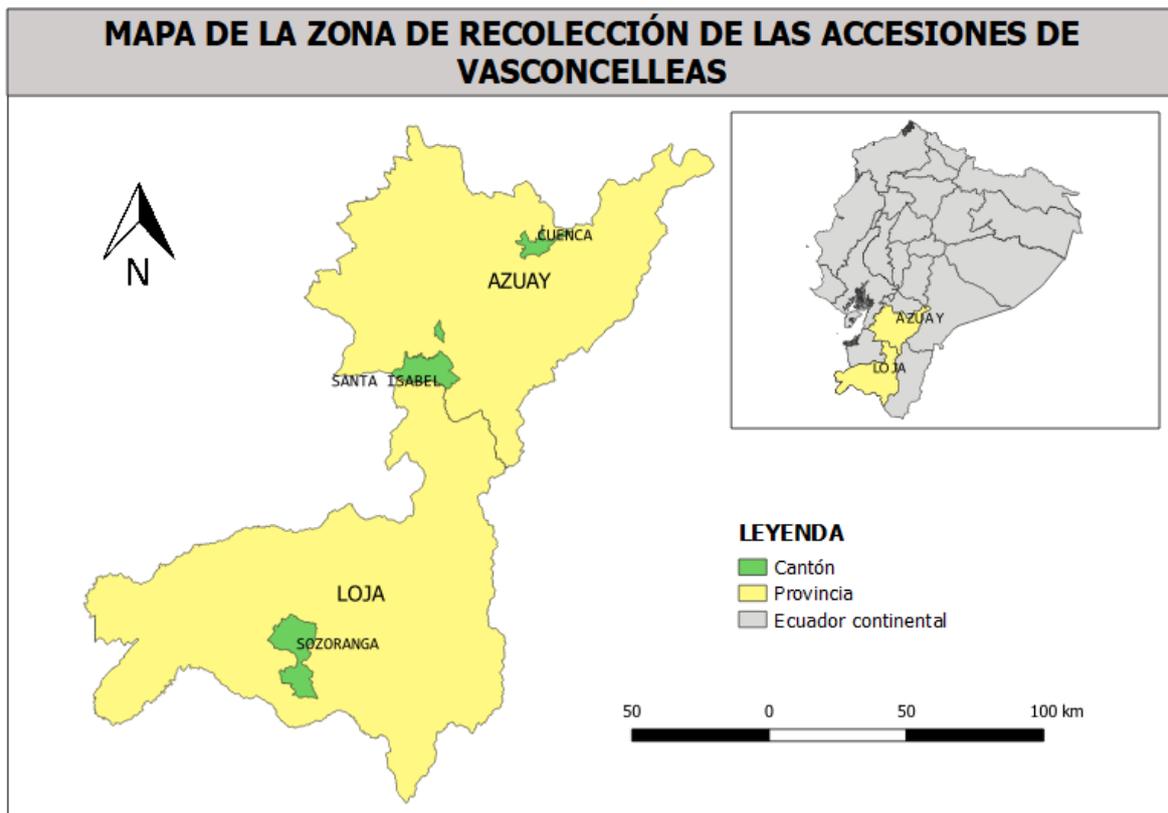


Figura 2. Mapa de la zona de recolección de las accesiones de *Vasconcelleas* (*Vasconcellea candicans*, *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea cundinamarcensis*).

Fuente: QGIS 3.4.

6.2 Diseño de la siembra de embriones

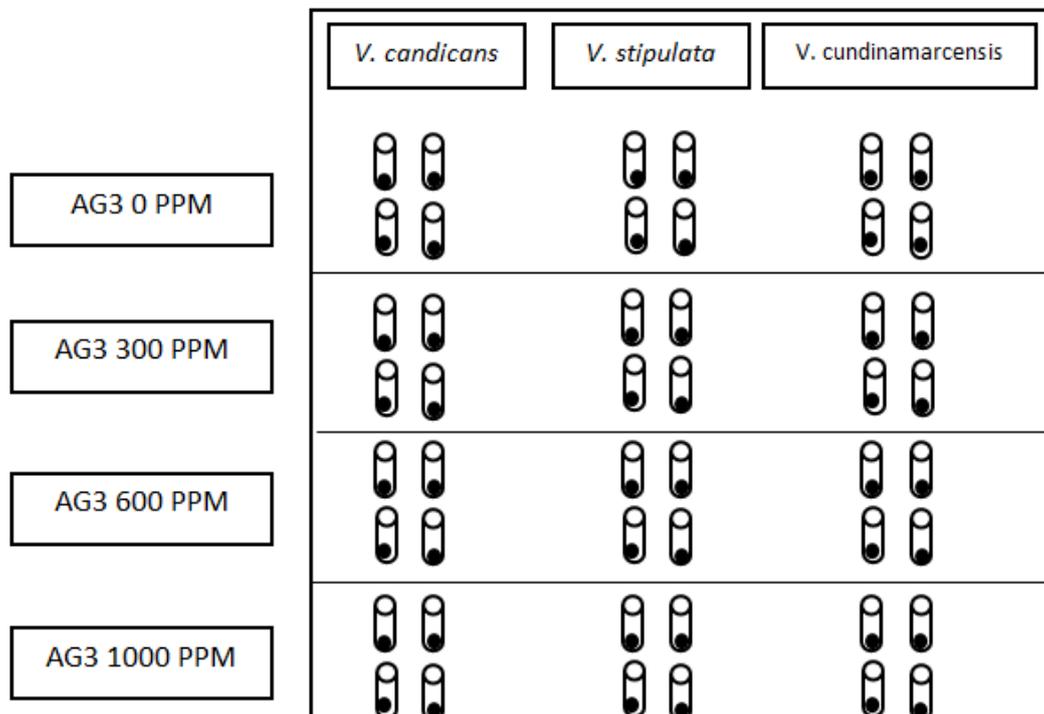


Figura 3. Diseño de la siembra de embriones en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) por repetición.
Fuente: Parra y Tigre, (2019)

6.3 Área de ejecución del proyecto

Los diferentes ensayos se desarrollaron en el laboratorio de propagación *in vitro* de plantas, en el laboratorio de biología molecular y en el invernadero de fitopatología de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicada a 2590 m s.n.m con una temperatura ambiental entre 20 a 28°C y una humedad relativa de 70 a 80% (Gutiérrez y Pomaquiza, 2018).

6.4 Recolección de *Vasconcelleas*

Se recolectaron frutos de *Vasconcellea candicans*, *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea cundinamarcensis*, con porcentajes de maduración entre 70 y 80%. Posteriormente se realizó la extracción de la semilla con la ayuda de una cernidera y agua común hasta quitar todo el mucílago que la recubre, usando paños absorbentes se retiró el



exceso de humedad y finalmente se colocaron en un lugar fresco por 7 días hasta que la semilla este completamente seca.

6.5 Viabilidad de embriones mediante la prueba de tetrazolio

Con el propósito de ablandar la testa, la semilla de las 3 especies de *Vasconcelleas* se sumergió en 50 ml de agua destilada. Con la ayuda de un bisturí se extrajeron los embriones para realizar la prueba de tetrazolio, la misma, consistió en sumergir 100 embriones de cada especie de *Vasconcellea* (300 en total) en una solución de 40 ml cloruro trifenil tetrazolum chlorideal 1% y 40 µl de Tween 20 e incubarlas a 26°C por 24 horas en oscuridad.

Luego se observó y se contabilizó el número de embriones teñidos (viables) y no teñidos (no viables), para realizar el cálculo del porcentaje de viabilidad de embriones para cada especie de *Vasconcelleas*.

En esta prueba solo las células vivas se tiñen de color rojo mientras que las células muertas permanecen sin colorear, la intensidad de la tinción también indica cuan viable está el embrión (Ruiz, 2009).

6.6 Elaboración de medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para el ensayo de germinación de embriones de fue el MS Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tres concentraciones de ácido giberélico 300, 600 y 1000 ppm (Anexo 1). Para el aislamiento de *Fusarium* a partir de raíces de babaco (Anexo 2) se utilizó medio de aislamiento de hongos FIM por sus siglas en inglés, Fungi Isolation Medium (Angle, McGrath y



Chaney, 1991). Para el cultivo de cepas puras y su mantenimiento (Anexo 3) se utilizó medio PDA Potato Dextrose Agar (DIFCO, 2009).

6.7 Protocolo de germinación

Para la germinación de las especies de *Vasconcelleas* se siguieron los siguientes pasos:

6.7.1 Desinfección de semillas

Las semillas de las tres especies de *Vasconcelleas* fueron sometidas a la metodología de desinfección descrita por Criollo (2008), la que se divide en dos etapas, que se describen a continuación:

- a. **Desinfección fuera de cabina de flujo.** – Se lavaron las semillas en frascos de vidrio, usando agua y Tween 20 por 5 minutos, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada, repitiendo esta acción por 3 ocasiones y finalmente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% por 30 minutos.
- b. **Desinfección dentro de cabina de flujo.** - Las semillas sumergidas en hipoclorito de sodio se sometieron a 3 enjuagues con agua destilada estéril para retirar residuos del hipoclorito utilizado, por último, se realizó la inmersión en etanol al 70% por 1 minuto seguida de dos enjuagues con agua destilada estéril para posteriormente realizar la siembra.

6.7.2 Siembra de embriones

La siembra de los embriones empieza con la extracción de la testa, con la ayuda de una pinza y un bisturí se va retirando segmento a segmento, la testa que recubre el embrión, con mucho cuidado de no lastimar los cotiledones. Una vez extraído el embrión, lo sembramos colocándolo en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) previamente



elaborado y contenido en tubos de vidrio, finalmente, los tubos se sellaron con parafilm para evitar su contaminación.

Para cada especie de *Vasconcellea* se sembraron 4 embriones por tratamiento (MS+AG₃ 0ppm, MS+AG₃ 300ppm, MS+AG₃ 600ppm, MS+AG₃ 1000ppm), y este procedimiento se repitió 10 veces, obteniéndose un total de 480 embriones en el ensayo.

6.7.3 Germinación de embriones

Los embriones sembrados fueron colocados en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas con 16 horas de luz y 8 de oscuridad, una temperatura promedio de 23°C y una humedad relativa del 60%. El monitoreo de la germinación se realizó a los 20 días de la siembra y luego se fue tomando datos diariamente.

6.8 Trasplante de *Vasconcelleas* a turba estéril

El trasplante se realizó a los 60 días de la siembra en vasos plásticos con tapa, los mismos que contenían la turba y se esterilizaron previamente en autoclave por 30 minutos a 120°C.

Las plántulas se extrajeron del medio MS y se realizaron 2 lavados, luego se trasplantaron en vasos con turba estéril y se colocaron en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas con 16 horas de luz y 8 de oscuridad, una temperatura promedio de 23°C y una humedad relativa del 60%. El riego se realizó 3 veces por semana, mientras que las plantas se destaparon parcialmente hasta quedar totalmente expuestas al ambiente.



6.9 Trasplante de *Vasconcelleas* a sustrato estéril

El trasplante a sustrato estéril se realizó a los 60 días del trasplante a turba, se utilizaron tarrinas esterilizadas previamente en autoclave por 30 minutos a 120°C.

El sustrato se preparó en una proporción de 1- 1- 0,5- 0,25 equivalente a 25 kg de compost, 25 kg de suelo, 12,5 kg de humus 6,25 kg de cascarilla de arroz. Las tarrinas con sustrato se regaron y se esterilizaron en autoclave por 30 minutos a 120 °C, dentro de fundas plásticas.

6.10 Aislamiento del hongo *Fusarium*

El procedimiento se realizó en medio de cultivo dentro de cabina de flujo adaptando el procedimiento descrito por Zettler, Mincer y Amaral (2013).

Se colectaron raíces de babaco con síntomas del hongo y se desinfectaron con agua, etanol 96% y cloro 5% durante 1 minuto, después se realizó el picado y macerado de las muestras en cajas petri y se adicionaron 20 ml de medio FIM. Transcurridos 24, 48, 72 horas se aislaron segmentos de agar y se cultivaron individualmente, luego se purificaron a través de repiques sucesivos y se identificaron morfológicamente cepas del hongo del género *Fusarium*.

Para suministrar similares condiciones de afección del hongo a las especies en estudio se realizó el cultivo monospórico. Esta técnica se elaboró de la siguiente manera:

Se extrajo un segmento del medio de cultivo del hongo y se homogenizo en 200 ml de agua destilada por 15 segundos, luego se tomaron 0,5 µl de solución anterior con 100 µl de agua destilada y se homogenizaron, después se tomó una muestra de la mezcla y se comprobó la presencia de 1 espora, finalmente se dispense en el medio PDA y se colocaron en estufa a 26 °C por 7 días para su colonización. Para obtener la solución final



de *Fusarium* se licuó las cepas del hongo con 200 ml de agua destilada, y con la cámara de Neubauer se determinó la concentración total de esporas en la solución y se ajustó a la concentración de 1×10^6 UFC.

6.11 Inoculación de *Fusarium* en sustrato estéril

Se tomó 3,12 ml que correspondía a la concentración de 1×10^6 UFC y se fue distribuyendo por toda la tarrina para la colonización del hongo durante 14 días, luego las tres especies en estudio más la especie susceptible al patógeno se trasplantaron en el sustrato inoculado. Finalmente, las plantas se ubicaron en el invernadero de Fitopatología para su respectivo monitoreo y toma de datos.

6.12 Amplificación de bandas mediante PCR

La amplificación de bandas en las tres especies de *Vasconcelleas* se realizó a los 90 días del trasplante al sustrato inoculado con el patógeno. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

6.12.1 Extracción de ADN

El procedimiento para la extracción de ADN de las 3 especies de *Vasconcellea*, el ADN de la muestra susceptible al patógeno (babaco) y el ADN del control positivo (arroz), se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Morales, Medina y Yaguache, 2004), con la combinación de los protocolos de Ferreira y Grattapaglia, (1998). Las soluciones utilizadas fueron preparadas previamente.

- a. Se tomaron 0,5 gr de tejido previamente desinfectado y macerado de las tres especies y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml.



- b. Se adicionó 100 µl de tampón de extracción (CTAB 2X) en cada tubo y agitaron hasta homogenizar totalmente las muestras.
- c. Se incubaron las soluciones durante 2 horas a 65°C en baño maría agitando cada 10 minutos para homogenizar las suspensiones.
- d. Se retiraron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos.
- e. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se adicionaron 600 µl de cloroformo alcohol isoamílico 24:1 (CIA), se agitaron suavemente los tubos y se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 rpm.
- f. En todos los tubos se capturó la fase superior con una pipeta sin perturbar la interfase y transfirió a tubos nuevos.
- g. Se adicionaron 1000 µl de la solución tampón de precipitación 2X
- h. Se mezclaron suavemente e incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a velocidad tope por 5 minutos y se eliminaron el sobrenadante.
- i. Se lavaron las pastillas formadas con 1 ml de etanol 95% agitándolo constantemente durante 1 minuto, se eliminó el etanol y se dejaron secar los tubos durante toda la noche.
- j. A las pastillas formadas y secas se adicionaron de 100 µl de TE 0,1 M y se incubaron a 65°C hasta la suspensión.

6.12.2 Amplificación por PCR

Se seleccionó el *primer* nombrado como marcador BDTG12 5' - TGTTCTTTTCTCAGGGCCAC – 3', 5' -AGTTTGGAATCACAGGCCAC – 3 en el estudio de Sengupta et al., (2014).



La amplificación, se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l, compuesto por 22 μ l de la solución Platimun PCR supermix Invitrogen Cat N° 11306-016, 3 μ l del *primer* (5' -TGTTCTTTTCTCAGGGCCAC – 3', 5' -AGTTTGGAATCACAGGGCCAC – 3) y 2 μ l del ADN genómico de la muestra, finalmente, la reacción se realizó en un termociclador Nexus GSX1 con la siguiente programación: 97° C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 58° C y 2 minutos a 72° C. La extensión final fue de 72° C por 10 minutos.

6.12.3 Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de las 3 especies de *Vasconcelleas*, el testigo positivo del *primer* (arroz) y la muestra susceptible al patógeno (babaco), se migraron en geles de agarosa al 1% (0,5 gr de agarosa, 50 ml de buffer TAE) que contenían 2 μ l de bromuro de etidio. Se migraron 4 μ l del producto de PCR + 1 μ l de buffer de carga, la electroforesis se llevó a cabo durante 20 minutos a 100 voltios, luego se fotografiaron los geles utilizando el software Image lab 5.2.1.

6.13 Diseño experimental y análisis estadístico

En el ensayo para la evaluación de la germinación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 12 tratamientos incluido el testigo y 10 repeticiones, cada unidad experimental consta de 4 embriones obteniendo un total de 480 individuos. Se utilizaron un total de 120 unidades experimentales (Tabla 1). Para la evaluación de la resistencia, se utilizó un análisis descriptivo entre las 4 especies de *Vasconcellea* y la sintomatología ocasionada por el efecto de la inoculación de *Fusarium spp.* (Tabla 2).

**Tabla1.** Tratamientos de las 3 especies de *Vasconcelleas* por 4 concentraciones de AG₃.

Especie de <i>Vasconcellea</i>	Tratamiento	Concentración de AG ₃	Nº de repeticiones
<i>Vasconcellea candicans</i>	T1	0 ppm	10
	T2	300 ppm	10
	T3	600 ppm	10
	T4	1000 ppm	10
<i>Vasconcellea stipulata</i>	T5	0 ppm	10
	T6	300 ppm	10
	T7	600 ppm	10
	T8	1000 ppm	10
<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	T9	0 ppm	10
	T10	300 ppm	10
	T11	600 ppm	10
	T12	1000 ppm	10

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Tabla 2. Tratamientos para la resistencia de las 3 especies de *Vasconcellea* + un control positivo de susceptibilidad a *Fusarium spp.*

Especie de <i>Vasconcellea</i>	Nº de plantas	Descripción
<i>Vasconcellea candicans</i>	20	Sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>
<i>Vasconcellea stipulata</i>	20	Sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>
<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	20	Sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>
<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> cv. 'babaco'	20	Sustrato inoculado con <i>Fusarium spp</i>

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

7. RESULTADOS

Los datos obtenidos en la investigación, se analizaron mediante medidas de tendencia, medias y comparación de varianza, además se utilizó una Prueba de Levene y Shapiro Wilks para verificar que existe una distribución normal ($p > 0.05$). Se identificó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos mediante el test de Tukey.

7.1 Viabilidad de embriones

Realizado el análisis estadístico, para determinar la viabilidad de embriones, se observa el porcentaje para cada una de las especies, donde, *Vasconcellea cundinamarcensis* posee la mejor viabilidad en la prueba de trifenil tetrazolum chlorideal 1% con un 44% (Figura 4).

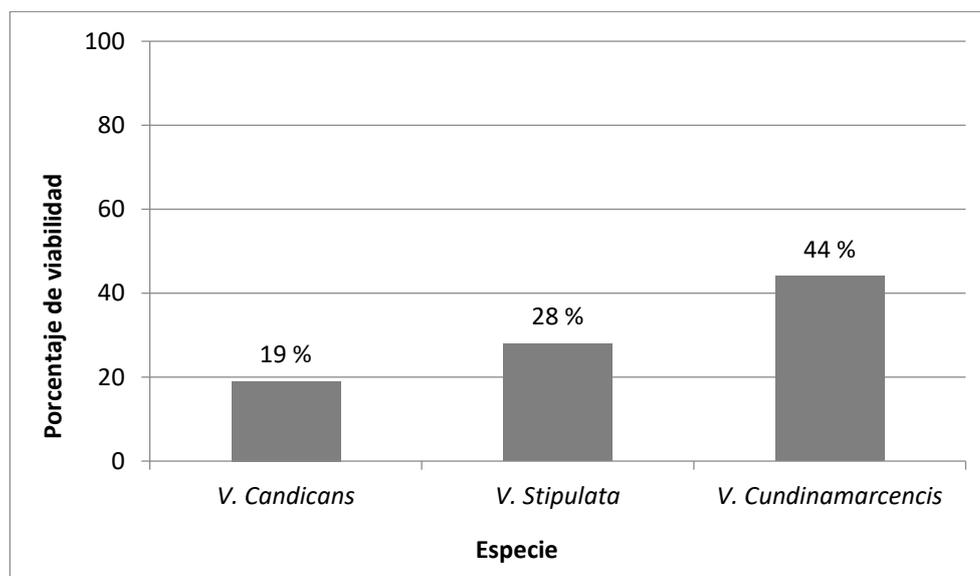


Figura 4. Porcentaje de viabilidad de cada especie de *Vasconcellea*, después de 24 horas de incubación con trifenil tetrazolum chlorideal 1% (Tetrazolio).

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

7.2 Germinación de embriones

Al realizar el análisis de porcentaje de germinación a los 60 días, los embriones de cada especie se comprobaron que *V. cundinamarcensis* es la especie que tuvo mayor

germinación, por lo tanto, se puede afirmar que tiene una relación directa con el análisis realizado para viabilidad con tetrazolio (Figura 5).

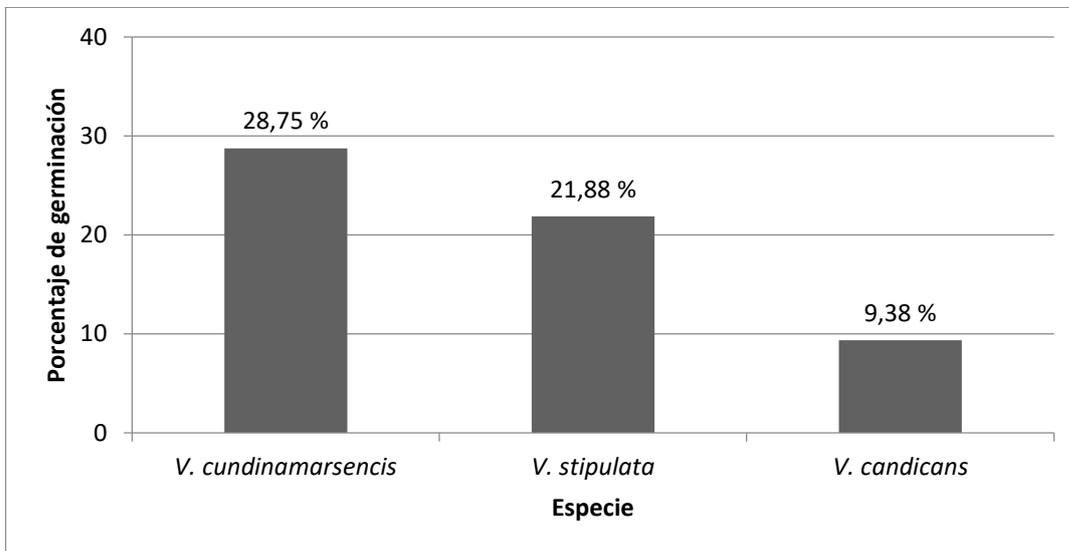


Figura 5. Porcentaje de germinación de cada especie de *Vasconcellea*.
Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Además, mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Anexo 4), se comprobó que posee una distribución normal ($p > .05$) y a través de la prueba de Levene (Anexo 5), se demostró la homocedasticidad de sus varianzas comprobando una normalidad de los datos obtenidos ($p > .05$). Además, se realizó una transformación de datos (raíz cuadrada + 1), debido a que se ha encontrado valores de germinación = cero.

Realizado el ADEVA (Anexo 6), para el porcentaje de germinación se encontraron diferencias significativas entre especies [$F(3, 108) = 34.67, p < 0.0001$]. Mediante la prueba de Tukey, se obtuvo como resultado 2 rangos de significancia (A y B) en cada especie de *Vasconcellea*. Obteniendo como mejor resultado para las 3 especies el testigo 0 ppm (Figura 5, 6 y 7). Las medias para el rango A en cada especie fueron: *V. Stipulata*: $M = 1,95$ (Anexo 7); *V. cundinamarsensis*: $M = 1,84$ (Anexo 8) y *V. Candidans*: $M = 1,48$ (Anexo 9).

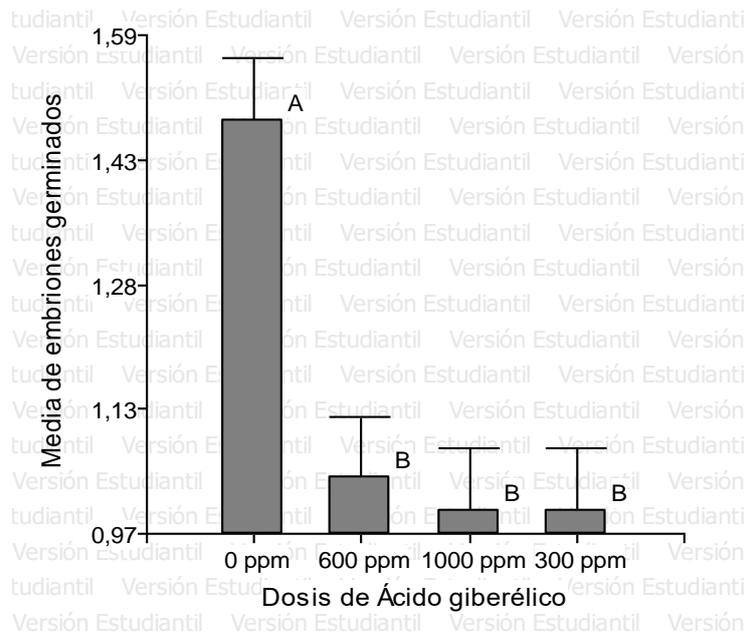


Figura 6. Mejor tratamiento (Rango A) para la especie *V. candidans*, a los 60 días fue el testigo (0 ppm). **Fuente:** Parra y Tigre, (2019)

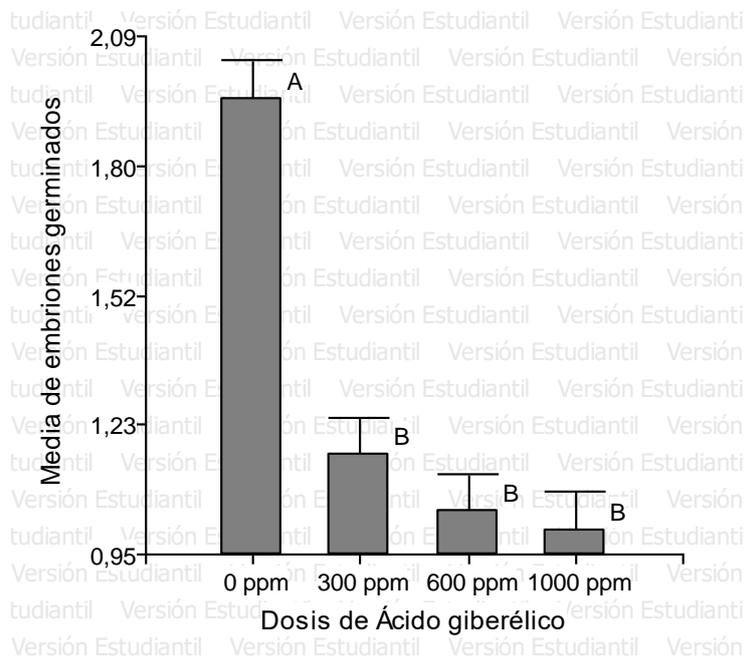


Figura 7. Mejor tratamiento (Rango A) para la especie *V. stipulata*, a los 60 días fue el testigo (0 ppm). **Fuente:** Parra y Tigre, (2019)

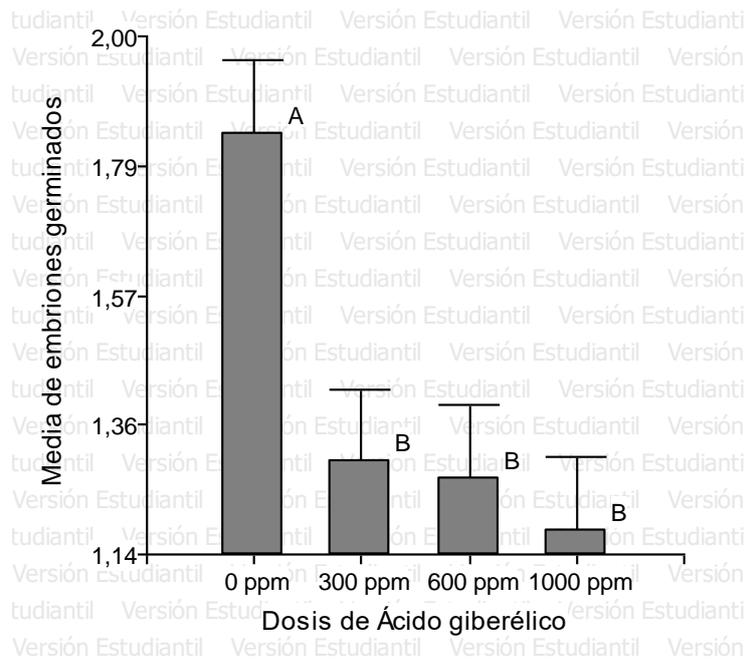


Figura 8. Mejor tratamiento (Rango A) para la especie *V. cundinamarcensis*, a los 60 días fue el testigo (0 ppm).

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

7.3 Resistencia o tolerancia de las especies al patógeno

En cuanto a los resultados de la resistencia de las especies de *Vasconcelleas* al patógeno *Fusarium spp* se evaluó el porcentaje de acuerdo al nivel de afección del patógeno obteniendo como resultado un comportamiento similar entre las 3 especies de *Vasconcelleas* y el testigo susceptible a la enfermedad (*V. x heilbornii*) careciendo de sintomatología que demuestre resistencia o susceptibilidad del patógeno durante las 8 semanas de monitoreo bajo invernadero (Imagen: 2).



Imagen 2: Ausencia de sintomatología del patógeno en las especies estudiadas.
Fuente: Parra y Tigre, (2019)

7.4 Amplificación de bandas mediante PCR

Al realizar la prueba de re-amplificación mediante una PCR con el *primer* que según Sengupta et al., (2014) nombraron como marcador BDTG12 se obtuvo una amplificación de bandas en las 3 especies en estudio; también se amplificó ADN de babaco como control negativo de resistencia y ADN de arroz como control positivo de resistencia. Por tal razón, se puede definir que dicho *primer* sirve para una amplificación de bandas genómicas.

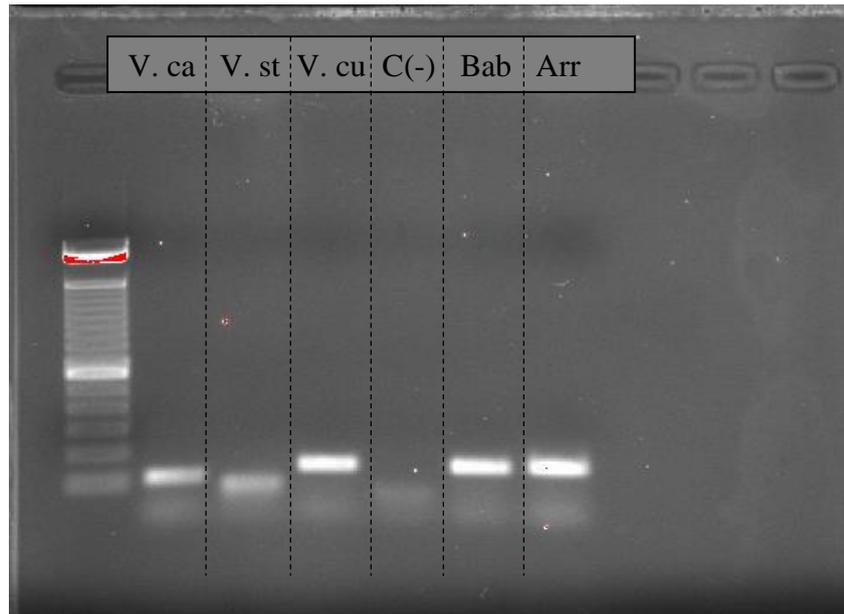


Imagen 3: Amplificación de bandas en cada especie de *Vasconcellea* mediante PCR. V. ca (ADN de *V. Candicans*); V. st (ADN de *V. stipulata*); V. cu (ADN de *V. cundinamarcensis*); C (-) (*Primer*); Bab (ADN de Babaco); Arr (ADN de Arroz).

Fuente: Parra y Tigre, (2019)



8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la germinación de embriones mostraron, en las tres especies (*V. candicans*, *V. stipulata* y *V. cundinamarcensis*) una relación inversamente proporcional a la concentración de ácido giberélico, evidenciándose que, a mayor cantidad de AG₃ menor es la germinación de los embriones, por lo tanto, los mejores resultados fueron de los testigos de las 3 especies de *Vasconcelleas*.

En las especies *V. stipulata*, *V. cundinamarcensis* y *V. candicans* 0 ppm de AG₃ fue el mejor tratamiento para la germinación de embriones, no se reportan estudios indicando el efecto inhibitorio de las hormonas en procesos de germinación, por lo contrario, Romero et al., (2013), en su investigación reportan estimulación de la germinación en semillas de *Carica papaya* con la aplicación de ácido giberélico a 600 ppm obteniendo 31,40%, valores estadísticamente superiores al tratamiento sin la hormona, que presentó el 17,75%, además, reporta que el coeficiente de velocidad de germinación también fue superior al testigo. En éste caso se muestran resultados opuestos, probablemente, la metodología utilizada, los tratamientos evaluados y la siembra en sustrato influyeron en los resultados. Espinosa, (2016), realizó otro experimento en semillas sin sarcotesta de *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea pubescens* y describe que la aplicación de ácido giberélico a 600 ppm + (KNO₃) a una concentración de 1.5% por 48 horas favorece la germinación de semillas, pues existe una diferencia significativa que permitió aumentar el porcentaje de germinación a un 53% frente al testigo que presentó el 8,97%. Además, menciona que las especies estudiadas presentan dificultades en su germinación describiéndola como tardía y errática, similares resultados se describen en nuestra investigación, evidenciándose un efecto inducido por la viabilidad de las semillas, *V. candicans* presentó el 9,38 % de germinación, resultado que concuerda con el porcentaje de viabilidad obtenido en la prueba de tetrazolio (19%) con esto se puede evidenciar que



los problemas de germinación en estas especies están asociados a la viabilidad de sus semillas. Bravo et al., (2012), indican que la semilla puede germinar hasta en 10 meses con un 2% de germinación y en estacas hasta en 7 meses. En la presente investigación, se obtuvo 9,38% de germinación a los 2 meses, los resultados obtenidos muestran un efecto físico favorable al retirar la sarcotesta, ya que el efecto del AG₃ fue inversamente proporcional a la germinación.

Por el contrario, Constantino, Gómez, Álvarez, Pat y Espín, (2010), mencionan otro estudio en *Carica papaya* variedad Maradol en vivero, donde se evaluó la germinación y el crecimiento vegetal, siendo el tratamiento AG₃ a 500 ppm el mejor resultado, aumentando el porcentaje, velocidad y tiempo de germinación en comparación con el testigo, aunque no se encontraron diferencias significativas frente a los demás tratamientos con biofertilizantes, en ese caso, las semillas sin sarcotesta fueron sumergidas directamente al AG₃ y sembradas en sustrato, mientras que en la presente investigación, la hormona se adicionó al medio de cultivo (MS) permaneciendo constante su concentración, lo que indujo un efecto inhibitor, en contraste al estudio realizado por estos autores quienes al evaluar la germinación en sustrato observan una diferencia estadísticamente significativa frente al control, lo cual nos hace suponer que al regar las semillas se “lava” la hormona dando como resultado una menor concentración final, lo que fue suficiente para estimular la germinación de las semillas. Otro factor a considerar es la semilla colectada de frutos en distintos estados de madurez. Baskin y Baskin, (2001) indican que las semillas de muchas especies exhiben latencia en el estado de madurez completa de los frutos y que no presentan germinación. En esta investigación, la semilla se extrajo de frutos con el 70 al 80% de madurez, lo cual se puede relacionar a los bajos porcentajes de germinación obtenidos de las 3 especies de *Vasconcelleas*, sin embargo, no se puede confirmar con certeza esta aseveración.



Respecto al ensayo de resistencia, en los 60 días de monitoreo no se observaron síntomas de afección de las especies de *Vasconcelleas* ni del testigo susceptible (babaco) a la inoculación de *Fusarium spp*, sin embargo, presentaron amarillamiento de las hojas bajas en todas las especies de *Vasconcelleas*, pero este efecto se atribuyó a la fenología de las plantas y no a síntomas de Fusariosis.

Medina, (2015) realizó un estudio sobre inoculación de *Fusarium spp* en plantas de babaco y describe un daño temporal sin causar mortalidad de las plantas, similares resultados se obtuvieron en la presente investigación debido que las 3 especies evaluadas no presentaron síntomas frente al patógeno, lo cual, nos lleva a formular nuestras propias hipótesis: como una metodología de inoculación poco eficiente o cepas de *Fusarium* con bajo grado de patogenicidad. Hay que tener en cuenta todos estos aspectos debido a que en ésta investigación, la inoculación del hongo se realizó al sustrato estéril y a través de pequeñas heridas en el tallo, de acuerdo a la metodología descrita por Agrios, (2005) quien reporta como un método de inoculación eficiente. No obstante, ésta metodología de inoculación no ayudó a la proliferación de la enfermedad en las especies en estudio. Ochoa (comunicación personal), menciona que el riego es un factor importante a considerar durante la inoculación, y que éste debe realizarse en bandejas para permitir la absorción el agua por capilaridad y con ello evitar el lavado de las esporas del patógeno; además, el sustrato debe tener características óptimas (textura, estructura y humedad) para el desarrollo de las cepas de patógeno.

Por su parte, García, (2011) realizó un experimento en 5 especies de *Vasconcelleas* para determinar la resistencia frente a *Fusarium oxysporum* y describe que los mejores tratamientos, los que no presentaron síntomas, fueron *V. candidans* y *V. heilbornii* 024, frente a los demás tratamientos que presentaron síntomas tempranamente, en la



investigación propuesta, no se presentaron síntomas en ninguna de las especies de *Vasconcelleas* y tampoco en el control susceptible (babaco) lo cual no nos permite concluir la presencia de posibles genes de resistencia.

En cuanto a la identificación de bandas genómicas mediante PCR, se obtuvo amplificación en las 3 especies de *Vasconcelleas*, similares resultados reportaron Sengupta et al., (2014), quienes realizaron un estudio para comprobar posibles genes de resistencia a partir de la homología de genes entre especies de la familia Caricaceae utilizando el primer (BDTG12) que amplifica genes de resistencia al tizón bacteriano de la hoja en arroz, obteniendo como resultado la amplificación de bandas en especies de *Vasconcelleas*: *Carica papaya*, *V. goudotiana*, *V. microcarpa*, *V. parviflora*, *V. pubescens*, *V. stipulata*, *V. quercifolia* y *Jacaratia spinosa*.

En la presente investigación, al realizar la prueba de PCR con el primer (5' - TGTTCTTTTCTCAGGGCCAC – 3', 5' -AGTTTGGAATCACAGGCCAC – 3) se observó la presencia de bandas en todas las especies estudiadas, incluido el control negativo (*Vasconcellea x heilbornii* cv. “babaco”) y en el control positivo (*Oriza sativa*), teniendo como resultado una amplificación de una región genómica, pero la misma no es evidencia para que se pueda establecer que la secuencia amplificada tenga una relación directa con genes de resistencia.



9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presencia de la fitohormona (AG₃) no fue estimulante para la germinación de los embriones en ésta investigación, es decir, se obtuvieron resultados inversamente proporcionales a la concentración de AG₃, ya que, mientras más alta la concentración de dicha hormona, menor fue el porcentaje de germinación de los embriones.

En la evaluación de la resistencia o tolerancia de las especies de *Vasconcelleas* al patógeno, no se observaron síntomas de afección en ninguna de las especies evaluadas.

En cuanto a la amplificación de genes, la PCR generó la presencia de bandas en todas las especies de *Vasconcelleas* incluyendo al testigo susceptible (babaco), por lo que tampoco se puede acreditar que dicha amplificación esté relacionada con genes de resistencia, sino solo como una amplificación de una región genómica.

Para futuras investigaciones, se recomienda utilizar concentraciones bajas de AG₃ (rangos entre 0 ppm – 300 ppm) para la estimulación de la germinación de embriones, por lo que, al utilizar concentraciones altas se produce un efecto inhibitorio, además, reduciría costos de producción debido al gasto innecesario de la fitohormona en concentraciones altas.



10. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). *Fitopatología*. Mexico: Limusa.
- Angle, J. S., McGrath, S. P., y Chaney, R. L. (1991). New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3674–3676.
- Aoki, T., O'Donnell, K., y Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 189–201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
- Baskin, C., y Baskin, J. (2001). Seeds, Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy, and Germination. *Vegetatio*, 152, 759–760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1011465920842>
- Bazantes, K. (2016). *Establecimiento in vitro y multiplicación de brotes de babaco (Vasconcellea x heilbornii) mediante el uso de reguladores de crecimiento*. *Biotechnología vegetal* (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Benítez, S., Lobo, M., Delgado, O., y Medina, C. (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*. *Corpoica*, 14(2), 187–197.
- Bravo, C., Larriva, W., y Minchala, L. (2012, June). Manejo integrado de la marchitez vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de babaco. *ResearchGate*, 15p. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16252.13448>
- Cañedo, V., y Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Retrieved from www.cipotato.org
- Carrasco, B., Avila, P., Perez, J., Muñoz, P., García, R., Lavandero, B., ... Caligari, P. (2009). Genetic structure of highland papayas (*Vasconcellea pubescens* (Lenné et C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(3), 331–337. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9367-1>
- Constantino, M., Gómez, R., Álvarez, J., Pat, J., y Espín, G. (2010). Efecto de la biofertilización y los biorreguladores en la germinación y el crecimiento de Carica papaya L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 103–115.
- CORPEI. (2006, July 21). Babaco. <http://www.sierraexportadora.gob>.
- Criollo, D. (2008). "Evaluación de dos técnicas para la microinjertación de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. *pentagona*) y Chihualcán (*Vasconcellea heilbornii* cv. *chrysopetaia*) en patrones de Papaya (*Carica papaya*) bajo condiciones de laboratorio, Santa Catalina-Iniap" (tesis de pregrado). Escuela Politecnica del



Ejercito.

- Cuya, O. (1992). *Carica candicans* (Mito): Una papaya de zonas áridas que urge se revalore. *ResearchGate*, 82, 75–80.
- Dean, R., Van kan, J. L., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.2011.00783.x>
- Dhuique, C., Caro, Y., Pina, M., Ruales, J., Dornier, M., y Graille, J. (2001). Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*). *Biotechnology Letters*, 23(13), 1021–1024.
<https://doi.org/10.1023/A:1010552605097>
- DIFCO. (2009, October). Ficha técnica: Potato Dextrose Agar, pp. 1–2. Retrieved from http://f-soria.es/Inform_soria/Difco_Fichas_tecnicas/TUBOS_DIFCO/FT_POTATO_DEXTROSE_AGAR.pdf
- Espinosa, I. (2016). *Germinación, microinjertación y cultivos de callos in vitro de Vasconcellea stipulata V.M. Badillo y Vasconcellea pubescens A.DC* (tesis de magister). Universidad Nacional de la Plata.
- Felles, D. (2013). Diversidad biológica, cultural y *Vasconcellea candicans* “mito”, como especie subutilizada, en el distrito de Pachangara - Oyon – Lima. *Repositorio José Faustino Sánchez*, 14p. Retrieved from https://documentslide.org/the-philosophy-of-money.html?utm_source=diversidad-biologica-cultural-y-Vasconcellea-candicans-mito-como-especie-subutilizada-en-el-distrito-de-pachangara-oyon-lima
- Ferreira, M., y Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Brasília - Brasil.
- Freire, D. (2015). *Reproducción asexual del banco (Vasconcellea x heilbornii Cv.) sobre portainjertos de chamburo (Vasconcellea cundinamarcensis) y toronche (Vasconcellea stipulata)* (tesis de pregrado). Universidad de Quevedo.
- García, P. (2011). “Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de *Vasconcellas a Fusarium sp.* como posible portainjertos para Babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) bajo cubierta plástica en la estación experimental del austro de INIAP.” (tesis de magister). Universidad Técnica de Ambato.
- González-Cárdenas, J., Maruri-García, J., y González-Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma spp.* contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya L.*) en Tuxpan, Veracruz, México, 5(1), 45–47.



- Gullino, M., Daughtrey, M., Garibaldi, A., y Elmer, W. (2015). *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. *Crop Protection*, 73, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.003>
- Gutiérrez, A., Nolasco, O., y Santa, C. (2017). Purification and preliminary characterization of latex proteases of *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC (Mito). *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 7–17. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.01>
- Gutiérrez, A., y Santa, C. (2016). Actividad de papaína del látex de *Vasconcellea candicans* (a. Gray) a. Dc 1864 “mito” y análisis biométrico del fruto. *The Biologist*, 14(2), 327–337.
- Gutiérrez, C., y Pomaquiza, L. (2018). *Evaluación de 4 cepas de hongos endófitos rizosféricos de solanáceas en la germinación y desarrollo de plántulas de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav)* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca.
- Heredía, M. (2018). *Análisis transcripcional de genes PR (Pathogenesis Related) en hojas de Vasconcellea stipulata infectadas con Fusarium oxysporum* (tesis de pregrado), Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Hwang, S., y Ko, W. (2004). Cavendish Banana Cultivars Resistant to *Fusarium* Wilt Acquired through Somaclonal Variation in Taiwan, 88(6).
- Jadán, M., Basantez, K., Gómez, R., y Bermúdez, I. (2016). Establecimiento in vitro de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnología Vegetal*, 16(2), 67–72.
- Jiménez, R., Castillo, P., Jiménez, M. del M., Landa, B., y Navas, J. (2015). *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection*, 73, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- Koike, S., y Gordon, T. (2015). Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Protection*, 73, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.003>
- Laurence, M., Burgess, L., Summerell, B., y Liew, E. (2012). High levels of diversity in *Fusarium oxysporum* from non-cultivated ecosystems in Australia. *Fungal Biology*, 116(2), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.011>
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel, V., Robert, F., y Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum* : a review. *Biological Control*, 101, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- Lemos, F., Dittz, D., Santos, V., Pires, S., Andrade, H., Salas, C., y Lopes, M. (2018). Cysteine proteases from *v. Cundinamarcensis* (*C. Candamarcensis*) inhibit melanoma metastasis and modulate expression of proteins related to proliferation, migration and differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10).



<https://doi.org/10.3390/ijms19092846>

- Lim, T. (2012). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (1st ed.). New Delhi: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7>
- Lombard, L., Sandoval, M., Lamprecht, S., y Crous, P. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, 1–47. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.01>
- Ma, X., Yang, L., Yang, Y., Li, M., Li, W., y Xue, L. (2013). DUEv1a modulates TNF-JNK mediated tumor progression and cell death in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 380(2), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.05.013>
- Medina, L. (2015). “*Estudio de la cinética de la interacción de diferentes especies de Fusarium spp., asociados a la marchitez vascular del Babaco Vasconcellea heilbornii var. pentágona.*” (tesis de pregrado). Universidad de Loja. <https://doi.org/10.1017/S0010417500000463>
- Mendes, R., Garbeva, P., y Raaijmakers, J. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Montenegro, F. (2009). *Manejo de cultivos hortícolas y frutales bajo invernadero (tomate de riñón, pimiento y babaco) implementación de riego presurizado goteo, micro aspersión y aspersión* (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Morales, A., Medina, D., y Yaguache, B. (2004). Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus *Vasconcellea* in Southern Ecuador. *Lyonia*, 7(2), 15–27.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised Medium For Rapid Growth And Bio Assays With Tobacco Tissue Cultures. In *Physiologia plantarum*.
- Núñez, D. (2008). “*Optimización del proceso de elaboración de pulpa de babaco (Carica pentagona), con incorporación de su corteza y maximizando la retención de ácido ascórbico*” (tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja.
- Ochoa, J. (2019). *Comunicación personal*.
- Ochoa, J., Fonseca, G., y Ellis, M. (2000). First report of *Fusarium* wilt of Babaco (*Carica x heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Plant Disease*, 84, 199p.
- Pérez, L., y Dita, M. (2014). *Fusarium* wilt of banana or panama disease by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: a review on history, symptoms, biology, epidemiology and management. *Workshop on Diagnosis of Fusarium Wilt*, 4, 1–74.



- Quillay, N. (2011). *Determinación de la capacidad embriogénica de babaco (Vasconcellea x heilborni) a partir de óvulos y hojas multiplicadas in vitro vía embriogénesis somática* (tesis de magister). Universidad Técnica de Ambato.
- Remuzgo, J. (2011). *Cultivo de papayo de altura: Vasconcellea stipulata*.
- Ribeiro, M., Dias, R., Lopes, H., Ribeiro, A., Junqueira, M., Lopes, C., y Pinto, R. (2008). *Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMSIMS2: a cysteine proteinase from Carica candamarcensis latex*. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidad Federal de Minas.
<https://doi.org/doi:10.1107/S174430910801172X>
- Robles, A., Herrera, L., y Torres, R. (2016). El babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). Major plant pathogens and control strategies. *SciELO*, 43(2), 83–92.
- Robles, A., Mora, M., Herrera, L., Sánchez, A., y Torres, R. (2016). Morphological and molecular identification of *Fusarium* species associated with vascular wilt of babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). *Revista de Protección Vegetal*, 31(3), 184–193.
- Robles, Á., Salinas, D., Armijos, W., Sánchez, A., y Torres, R. (2013). Estudio de la variabilidad morfológica de aislados fúngicos asociados con la enfermedad de la marchitez vascular del babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona) en Loja, Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 2(1), 34–44. Retrieved from <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/biotecnologia/article/view/86/84>
- Romero, J., Mejía, J., Carballo, A., López, A., Ávila, C., y Rangel, J. (2013). Latencia y longevidad de *Carica papaya* L. y *Vasconcellea cauliflora* Jacquin. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 1(1), 7–13.
- Ruiz, M. (2009, March). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. *Inta*, 20p.
- Scheldeman, X. (2002). *Distribution and Potential of Cherimoya (Annona Cherimola Mill.) and Highland Papayas (Vasconcellea Spp.) in Ecuador Verspreiding En Potentieel Van Cherimoya (Annona Cherimola Mill.) En Ecuador* (tesis de doctorado). Universidad Nacional de Loja.
- Scheldeman, X., Willems, L., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Romeijn, E., Restrepo, M., Romero, J., ... Goetgebeur, P. (2007). Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodiversity and Conservation*, 16(6), 1867–1884.
<https://doi.org/10.1007/s10531-006-9086-x>
- Sengupta, S., Das, B., Acharyya, P., Prasad, M., y Ghose, T. (2014). Genetic diversity



analysis in a set of Caricaceae accessions using resistance gene analogues. *BMC Genetics*, 15(137).

Spanic, V., Lemmens, M., y Drezner, G. (2010). Morphological and molecular identification of *Fusarium* species associated with head blight on wheat in East Croatia. *Journal Plant Pathologic*, 128, 511–516. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9682-1>

Vaca, I. (2008). *Incremento del número de brotes de Babaco (Vasconcellea x heilbornii cv babaco) in vitro mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas* (tesis de pregrado). Universidad Politecnica del Ejercito.

Vélez, D., Armijos, R., y Jordán, M. (2015). Mejoramiento de la germinación, control de la hiperhidricidad y formación de brotes en *Vasconcellea stipulata* Badillo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 16–21. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.43611>

Zettler, E., Mincer, T., y Amaral, L. (2013). Life in the ‘Plastisphere’: Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology*, 47, 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>



11. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de componentes para la elaboración de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog)

Elaboración de medio MS			
Stocks	Reactivos	Peso del reactivo en 100 ml usado para el stock	Volumen en ml o mg de stock o reactivo usado para preparar 1L
1	NO ₃ (NH ₄)	16500	10
	NO ₃ K	19000	
2	SO ₄ Mg	1807	10
	SO ₄ Mn	169	
	SO ₄ Zn	86	
	SO ₄ Cu	0,25	
3	IK	8,3	10
	Cl ₂ Co	0,25	
	Cl ₂ Ca	3320	
4	PO ₄ H ₂ K	1700	10
	BO ₃ H ₃	62	
	MoO ₄ Na ₂	2,5	
5	SO ₄ Fe	278	10
	EDTA	372	
6	NO ₃ Na	17500	10
7 vitaminas	Thiamina	10	
	Glicina	20	
	Piroxidina	10	10
	A. Nicotinico	5	
8	Myo Inositol		10
	Agar	7000	7000
	Azúcar	30000	30000
	A. Giberélico	300, 600, 1000 ppm	300, 600, 1000 ppm

Fuente: Murashige y Skoog, (1962)



Anexos 2. Tabla de componentes para la elaboración de medio de cultivo FIM (Fungal Identification Medio)

Elaboración de medio FIM		
Reactivos	Peso del reactivo en gr en 500 ml	Volumen en ml
NO ₃ Na	0,15	
PO ₄ H ₂ K	0,1	
SO ₄ Mg	0,05	
CIK	0,05	
Extracto de levadura	0,05	500 ml
Sucrosa	1,25	
Agar	4	
Streptomicina	0,15	

Fuente: Angle, McGrath y Chaney, (1991)

Anexos 3. Tabla de componentes para la elaboración de medio PDA (Papa Dextrosa Agar)

Elaboración de medio Papa Agar Dextrosa (PDA)		
Reactivo	Peso en gr	Volumen en ml
Extracto de papa	200	
Agar	12	1000
Dextrosa	18	

Fuente: DIFCO, (2009)

Anexo 4. Prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos en la variable germinación.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO germitransf	120	0.00	0.28	0.98	0.4263

Fuente: Parra y Tigre, (2019)



Anexo 5. Prueba de Levene para comprobar la normalidad de los datos en la variable germinación según las especies de *Vasconcelleas* por la dosis de Ácido Giberélico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS germitransf	120	0,32	0,19	78,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,26	20	0,06	2,35	0,0029
<i>Vasconcellea</i>	0,17	2	0,08	3,15	0,0474
dosis	0,58	3	0,19	7,21	0,0002
rep	0,34	9	0,04	1,43	0,1851
<i>Vasconcellea</i> *dosis	0,17	6	0,03	1,04	0,4060
Error	2,64	99	0,03		
Total	3,90	119			

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Anexo 6. Análisis de varianzas para comprobar presencia de diferencias significativas entre especies y entre dosis.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
germitransf	120	0,54	0,50	23,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11,76	11	1,07	11,63	<0,0001
<i>Vasconcellea</i>	1,42	2	0,71	7,74	0,0007
dosis	9,57	3	3,19	34,67	<0,0001
<i>Vasconcellea</i> *dosis	0,77	6	0,13	1,40	0,2217
Error	9,93	108	0,09		
Total	21,70	119			

Fuente: Parra y Tigre, (2019)



Anexo 7. Análisis de varianzas para comprobar presencia de diferencias significativas entre especies.

<i>Vasconcellea</i>	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
V. Stipulata	germitransf	40	0,70	0,68	20,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,99	3	2,00	28,06	<0,0001
dosis	5,99	3	2,00	28,06	<0,0001
Error	2,56	36	0,07		
Total	8,55	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,32120

Error: 0,0711 gl: 36

dosis	Medias	n	E.E.	
0	1,95	10	0,08	A
300	1,17	10	0,08	B
600	1,04	10	0,08	B
1000	1,00	10	0,08	B

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

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Anexo 8. Análisis de varianzas para comprobar presencia de diferencias significativas entre concentraciones de Ácido giberélico.

<i>Vasconcellea</i>	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
V. Cundinamarsencis	germitransf	40	0,34	0,28	27,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,68	3	0,89	6,12	0,0018
dosis	2,68	3	0,89	6,12	0,0018
Error	5,26	36	0,15		
Total	7,94	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,46039

Error: 0,1461 gl: 36

dosis	Medias	n	E.E.	
0	1,84	10	0,12	A
300	1,30	10	0,12	B
600	1,27	10	0,12	B
1000	1,18	10	0,12	B

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

Fuente: Parra y Tigre, (2019)



Anexo 9. Líneas de tendencia en la germinación de cada especie de *Vasconcellea* según la concentración de AG₃.

<i>Vasconcellea</i>	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
V. Candicans	germitransf	40	0,44	0,39	21,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,67	3	0,56	9,49	0,0001
dosis	1,67	3	0,56	9,49	0,0001
Error	2,11	36	0,06		
Total	3,78	39			

Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29181

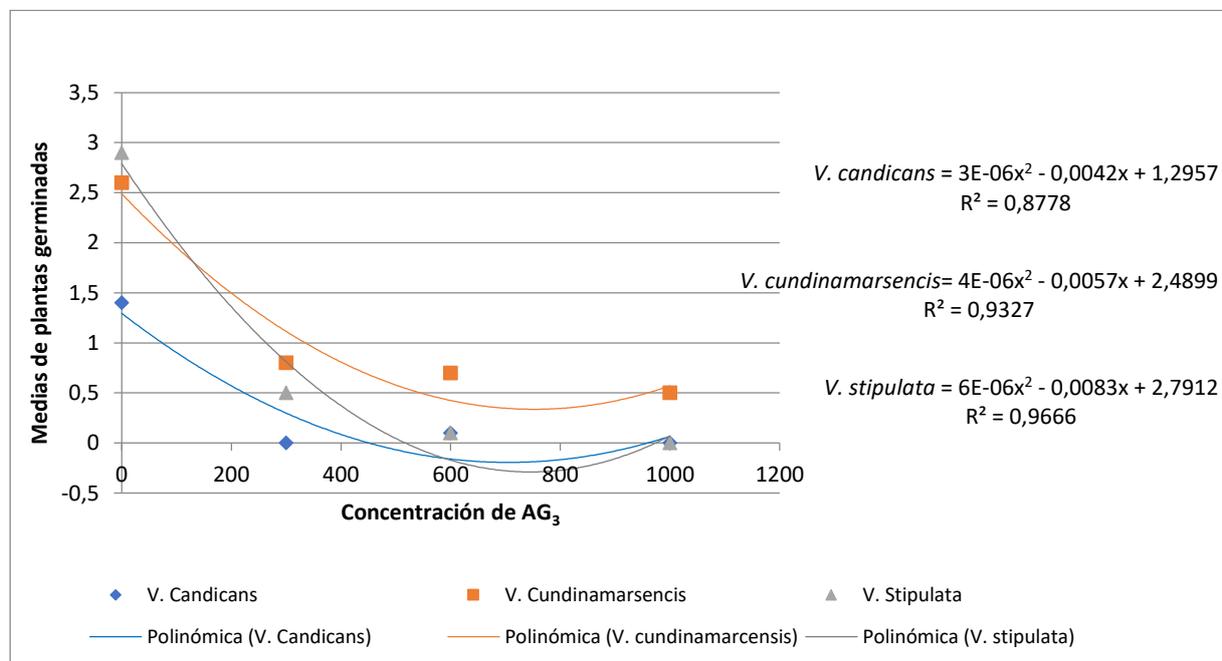
Error: 0,0587 gl: 36

dosis	Medias	n	E.E.	
0	1,48	10	0,08	A
600	1,04	10	0,08	B
1000	1,00	10	0,08	B
300	1,00	10	0,08	B

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

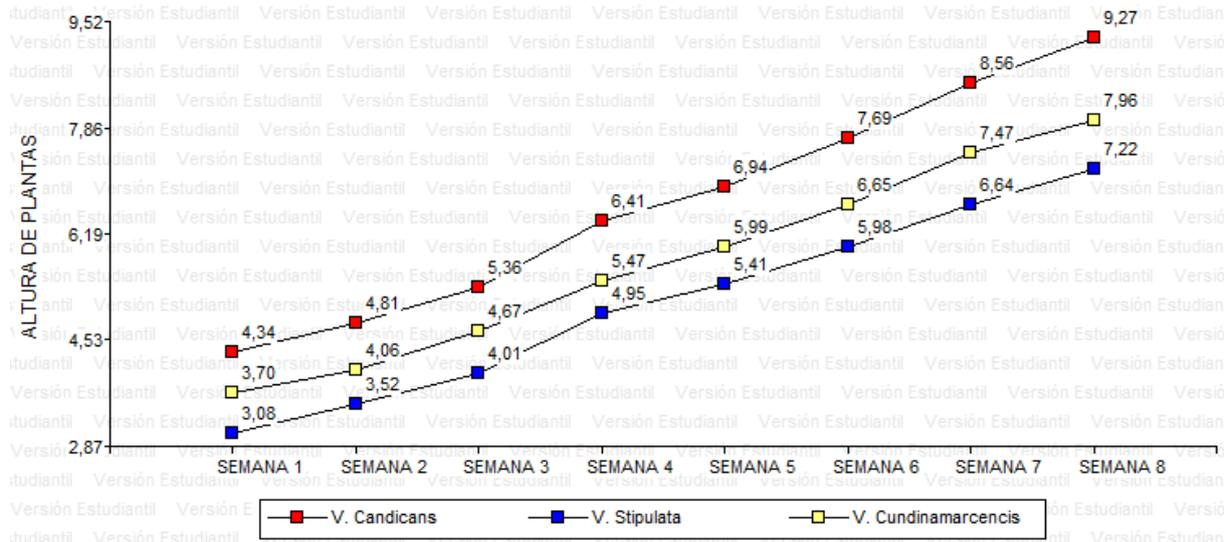
Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Anexo 10. Líneas de tendencia en la germinación de cada especie de *Vasconcellea* según la concentración de AG₃.



Fuente: Parra y Tigre, (2019)

Anexo 11. Escala de crecimiento de cada especie de *Vasconcellea* durante 8 semanas.



Fuente: Parra y Tigre, (2019)

A continuación, se detalla el trabajo de campo durante la elaboración de la investigación

Anexo 12. Extracción de semilla de las 3 especies de *Vasconcelleas*

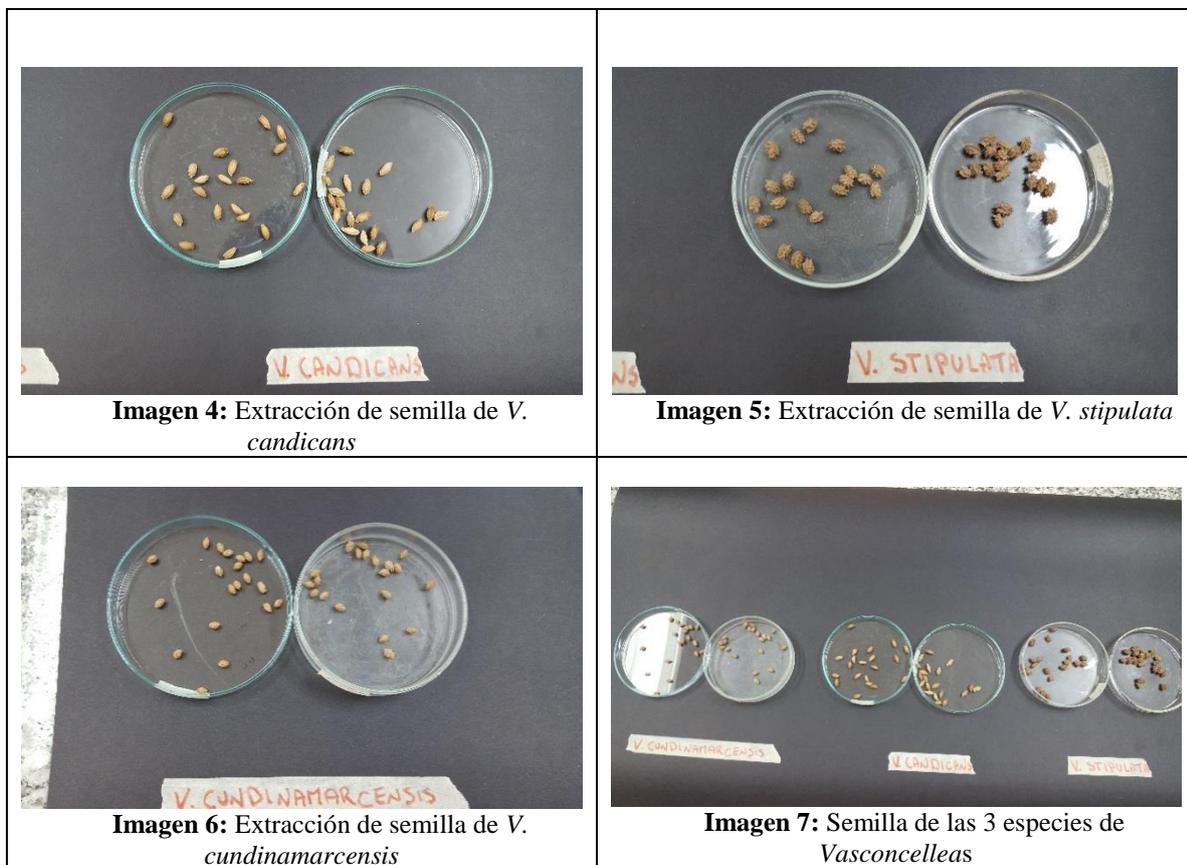


Imagen 4: Extracción de semilla de *V. candicans*

Imagen 5: Extracción de semilla de *V. stipulata*

Imagen 6: Extracción de semilla de *V. cundinamarcensis*

Imagen 7: Semilla de las 3 especies de *Vasconcelleas*

Anexo13. Vialidad de semillas a través de la prueba de tetrazolio



Imagen 8: Viabilidad de semillas de *V. candicans*

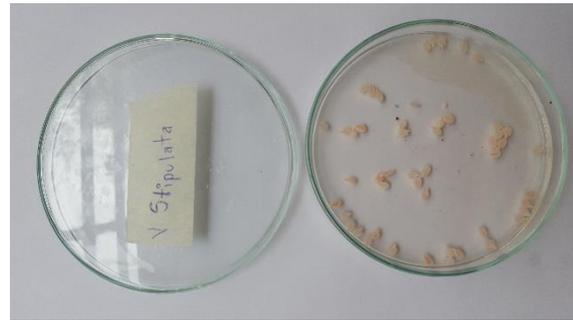


Imagen 9: Viabilidad de semillas de *V. stipulata*

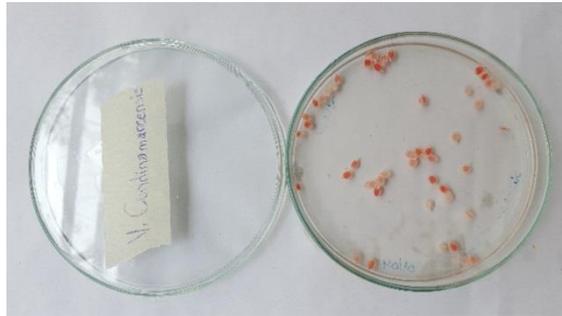
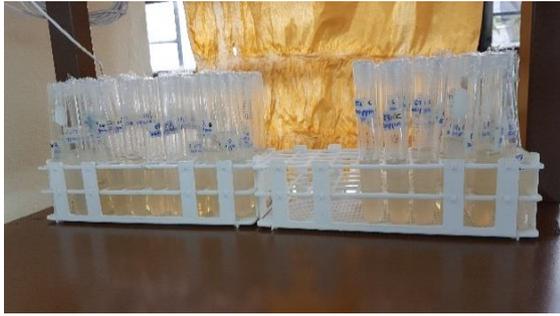


Imagen 10: Viabilidad de semillas de *V. cundinamarcensis*

Anexo14. Germinación y trasplante a turba estéril.**Imagen 11:** Siembra de embriones de las 3 especies de *Vasconcelleas***Imagen 12:** Esterilización de turba para siembra de las plántulas**Imagen 13:** Monitoreo de las 3 especies de *Vasconcelleas***Imagen 14:** Trasplante a turba estéril**Imagen 15:** Acondicionamiento de las 3 especies de *Vasconcelleas***Imagen 16:** Establecimiento de las 3 especies de *Vasconcelleas* al ambiente

Anexo15. Elaboración de medios de cultivo e inoculación de *Fusarium spp*



Imagen 17: Elaboración de medios de cultivo (PDA)

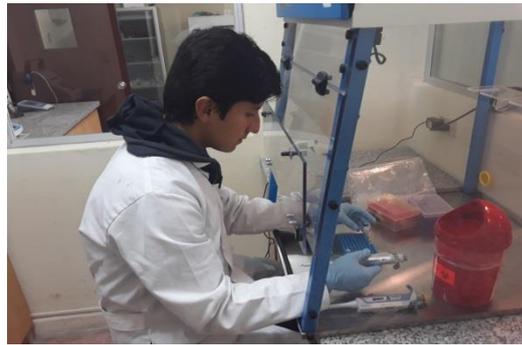


Imagen 18: Aislamiento de *Fusarium spp*

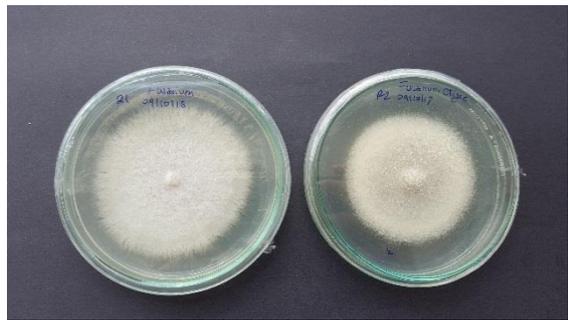


Imagen 19: Cepas de cultivo monospóricas de *Fusarium spp*



Imagen 20: Identificación morfológica de *Fusarium spp*

Anexo16. Inoculación de *Fusarium spp* y trasplante a sustrato estéril**Imagen 21:** Elaboración de sustrato**Imagen 22:** Esterilización del sustrato**Imagen 23:** Aislamiento de *Fusarium spp* en sustrato**Imagen 24:** Trasplante de *Vasconcelleas* a sustrato inoculado con *Fusarium spp***Imagen 25:** Trasplante de *Vasconcelleas* a sustrato inoculado con *Fusarium spp***Imagen 26:** Especies de *Vasconcelleas* en sustrato inoculado con *Fusarium spp*

Anexo17. Amplificación de posibles genes de resistencia



Imagen 27: Amplificación en termociclador Nexus GSX1



Imagen 28: Electroforesis en gel de agarosa



Imagen 29: Electroforesis en gel de agarosa

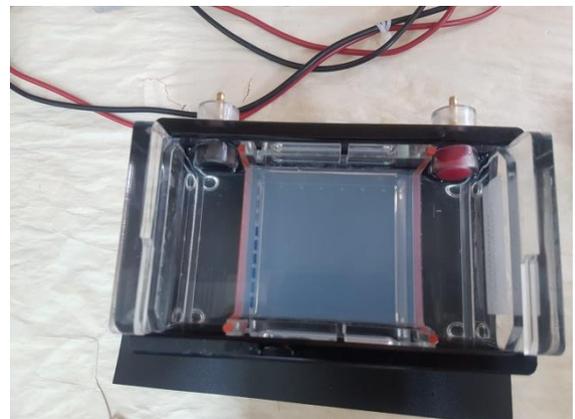


Imagen 30: Electroforesis en gel de agarosa durante 20 minutos

Anexo18. Monitoreo y toma de datos en las especies de *Vasconcellea*



Imagen 31: Toma de datos en las especies de *Vasconcellea*



Imagen 32: Toma de datos en las especies de *Vasconcellea*



Imagen 33: Toma de datos en las especies de *Vasconcellea*



Imagen 34: Toma de datos en las especies de *Vasconcellea*