



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

**“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 grado previa a la
obtención del título de
Ingeniero Agrónomo.

AUTOR:

Luis David Medina Salinas

DIRECTOR:

Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión, M. Sc.

LOJA- ECUADOR

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
CERTIFICACIÓN

Ing. Ángel Robles Carrión M. Sc.

DIRECTOR DE TESIS.

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium spp.*, ASOCIADOS A LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO *Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentágona*,**” de autoría de del señor egresado de la Carrera de Ingeniería Agronómica: **LUIS DAVID MEDINA SALINAS**, ha sido desarrollada de acuerdo a las actividades de investigación establecidas, las mismas que cumplen a cabalidad con la planificación, cronograma, metodologías y requisitos legales exigidos por el Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja. Por lo expuesto, queda autorizada la presentación para fines legales.

Loja 17 de noviembre del 2015

.....
Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión M. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

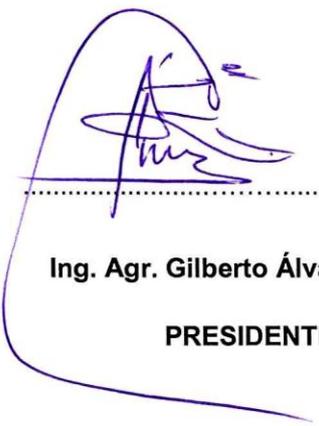


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Una vez cumplida la reunión del tribunal de calificación del trabajo de tesis “ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium spp.*, ASOCIADOS A LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO *Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentágona*.” De la autoría del Señor Egresado LUIS DAVID MEDINA SALINAS, de la Carrera de Ingeniería Agronómica, se propuso algunas correcciones de forma, las mismas que han sido incluidas en el documento final.

En tal virtud, nos permitimos certificar el trabajo final consolidado de investigación está acorde a los requerimientos de la Carrera de Ingeniería Agronómica del Área agropecuaria de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto se autoriza continuar con los trámites correspondientes.

Loja, 15 diciembre del 2015.



.....

Ing. Agr. Gilberto Álvarez Cajas

PRESIDENTE



.....

Ing. Agr. Iván Granda Mg. Sc.

VOCAL



.....

Ing. Agr. Bolívar Peña Mg. Sc.

VOCAL



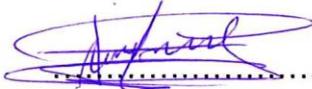
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTORÍA

Yo, **LUIS DAVID MEDINA SALINAS**, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca virtual.

Autor: Luis David Medina Salinas

Firma: 

Cedula: 1104778988

Fecha: 15 de diciembre de 2015

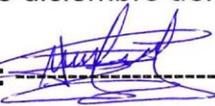
**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR,
PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y
PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA Y TEXTO COMPLETO.**

Yo, **Luis David Medina Salinas**, declaro ser autor de la tesis titulada: **“ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium spp.*, ASOCIADOS A LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO *Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentágona*.”**, como requisita para optar al grado de **INGENIERO AGRÓNOMO**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestren al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para la constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 15 días del mes de diciembre del 2015, firma el autor.

Firma: 

Autor: Luis David Medina Salinas

Numero de Cedula: 1104778988

Dirección: Sucre y Rocafuerte

Teléfono: 2200392

Celular: 0994738228

E-mail: davisms_7@hotmail.com

DATOS COMPLEMENTARIOS.

Director de Tesis: Ing. Agr. Ángel Robles Carrión M. Sc.

Tribunal de Grado: Ing. Agr. Gilberto Álvarez.

Ing. Agr. Bolívar Peña Mg. Sc.

Ing. Agr. Iván Granda Mg. Sc.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, a la **Universidad Nacional de Loja, Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Carrera de Ingeniería Agronómica** por haber logrado mi formación como profesional para el servicio del país.

Agradezco al Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión M. Sc., director de tesis, por su interés, responsabilidad y sus sabios conocimientos dentro del campo de sanidad vegetal, para poder realizar la culminación de este proyecto. También expreso mi agradecimiento a los miembros del tribunal calificador por su aporte para el mejoramiento del presente trabajo.

A todos mis docentes, técnicos quienes con responsabilidad y paciencia, impartieron todos sus conocimientos en toda mi formación académica, administrativos de la Universidad Nacional de Loja quienes me brindaron su apoyo cuando lo requería.

Al departamento de Biotecnología de la universidad Nacional de Loja, que me brindo la apertura y todo el apoyo para poder realizar este proyecto.

DEDICATORIA

Dedico; primeramente adiós por ser guía en mi vida y darme fuerzas por salir adelante, a mis Padres Luis Antonio Medina y Carmen Fabiola Salinas, por sus sabios consejos y apoyo incondicional me ha enseñado a luchar para ser cada día mejor; y mis hermanos que han sabido acompañarnos en los buenos y malos momentos de la vida y han sido la fuente de inspiración para lograr mis metas.

A todos mis familiares, amigos y docentes que me brindaron todo el apoyo cuando lo necesitaba y poder culminar exitosamente mi formación profesional.

INDICE GENERAL

Contenido	Págs.
TEMA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Origen, Evolución y Distribución Geográfica del Babaco (<i>Vasconcellea heilbornii</i> Var. <i>Pentágona</i>).....	4
2.2. Características Generales del Babaco.....	4
2.3. El Cultivo del Babaco en el Ecuador.....	5
2.4. Principales Enfermedades del Babaco.....	6
2.4.1. Enfermedades Fúngicas.....	6
2.4.2. Enfermedades Bacterianas.....	7
2.4.3. Enfermedades causadas por virus.....	8
2.4.4. Enfermedades causadas por Nematodos.....	9
2.5. La Enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB).....	10
2.5.1. Descripción del agente causal <i>Fusarium spp.</i>	11
2.5.2. Clasificación taxonómica.....	13
2.5.3. Caracterización morfológica.....	13
2.5.4. Caracterización molecular.....	14
2.6. Pruebas de patogenicidad.....	15

2.7.	Estudios sobre el progreso de la enfermedad (cinética) en cultivos.	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.	17
3.1.	UBICACIÓN DEL PROYECTO.	17
3.1.1.	Ubicación política.	17
3.1.2.	Ubicación geográfica.	17
3.2.	MATERIALES.	18
3.2.1.	Material de Laboratorio.	18
3.2.2.	Materiales de campo.	18
3.2.3.	Materiales de escritorio.	19
3.3.	METODOLOGÍA.	19
3.3.1.	Metodología del primer objetivo.	19
3.3.1.1.	Aislados de <i>Fusarium spp.</i>	19
3.3.1.2.	Material vegetal.	19
3.3.1.3.	Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Fusarium spp.</i>	20
3.3.1.4.	Preparación de la suspensión de esporas de <i>Fusarium spp.</i>	20
3.3.1.5.	Inoculación de <i>Fusarium spp.</i> , en las raíces de plantas de Babaco.	21
3.3.2.	Metodología del segundo objetivo.	23
3.3.2.1.	Evaluación de la severidad de la enfermedad.	23
3.3.2.2.	Análisis estadístico de los datos.	24
3.3.3.	Metodología del tercer objetivo.	24
3.3.3.1.	Extracción de ADN con el kit comercial “DNeasy plant mini” QIAGEN.	24
3.3.3.2.	Cuantificación y medida de la pureza del ADN extraído.	26
3.3.3.3.	Electroforesis en gel de agarosa.	26
IV.	RESULTADOS	27
4.1.	Realizar pruebas de patogenicidad mediante la combinación de diferentes aislados de <i>Fusarium spp.</i> , asociados a la MVB.	27
4.2.	Evaluar la cinética de la infección de <i>Fusarium</i> en plantas sanas de Babaco mediante el uso de claves.	28
4.3.	Identificar la especie de <i>Fusarium</i> de mayor incidencia mediante la extracción del ADN en plantas de Babaco.	29
V.	DISCUSIONES.	31

VI.	CONCLUSIONES.....	35
VII.	RECOMENDACIONES.	36
VIII.	BIBLIOGRAFIA.	37
IX.	ANEXOS.	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados de <i>Fusarium</i> , utilizados en las pruebas de patogenicidad en Babaco. Loja, 2015.	19
Tabla 2. Distribución de los tratamientos bajo invernadero. Loja, marzo del 2015.	22
Tabla 3. Escala de evaluación (severidad externa) de la Marchitez Vascular del Babaco. Loja, mayo-junio del 2015.	24
Tabla 4. Análisis estadístico de severidad en plántulas de Babaco en condiciones de Invernadero. Loja, 2015.	27

INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** Mapa de ubicación del lugar de realización de la investigación...17
- Figura 2.** Severidad de los tratamientos de *Fusarium spp*, causantes de la Marchitez Vasculare del Babaco en la provincia de Loja. Noviembre del 2015.27
- Figura 3.** Curva de severidad de los cinco tratamientos de *Fusarium sp.*, asociados a la MVB. Loja, noviembre del 2015.29
- Figura 4.** Fotografía del gel de agarosa 1% del producto de PCR de las regiones ITS1 e ITS 3 del tratamiento infectado naturalmente: M = Marcador molecular 1000 bp (Invitrogen Norte América). (1, 2, 3, 4 y 5) T2 = suelo contaminado naturalmente con MVB. Loja noviembre, del 2015.....30

INDICE DE ANEXOS.

Anexo 1.	Esquema del Diseño Experimental en Bloques completamente al Azar (BCA) utilizado en el proyecto, en el invernadero del Área Agropecuaria de la Universidad Nacional de Loja. Marzo del 2015.....	41
Anexo 2.	Datos generales tomados en la evaluación de la incidencia y severidad de la Marchitez Vascular del Babaco. Loja, mayo-junio del 2015.	42
Anexo 3.	Ubicación de los sectores donde se identificó la presencia de la MVB en la provincia Loja y Cantón Saraguro. Junio del 2015 ...	43
Anexo 4.	Tríptico entregado en la socialización de resultados de tesis, Loja, noviembre 2015.	44
Anexo 5.	Fotografías del ensayo realizado tanto en fase de Campo y Laboratorio. Loja, enero-noviembre del 2015	46
Anexo 6.	Registro de asistencia en la socialización de resultados de tesis. Loja, noviembre del 2015.....	48
Anexo 7.	Registro de asistencia en la socialización de resultados de tesis. Loja, 2014.	50

RESUMEN

En los últimos años la producción del Babaco ha disminuido considerablemente en un 75%, debido a la presencia de una enfermedad conocida como la “Marchitez Vascular del Babaco (MVB)”, causada por el hongo *Fusarium oxysporum*. Esta enfermedad rápidamente se diseminó a lo largo y ancho del territorio ecuatoriano, trayendo consigo pérdidas del 100% en su producción, tanto el 50% en plantas en desarrollo y 50% en plantas en producción. Frente a este problema fitosanitario, muchos agricultores optaron por no seguir cultivando este frutal, debido al desconocimiento del agente causal y la ausencia de medidas de control para mitigar la enfermedad. La presente investigación tiene como objetivos evaluar la cinética e interacción de diferentes especies de *Fusarium*., utilizando aislados fúngicos del género *Fusarium*, causante de la marchitez vascular en Babaco (*Vasconcellea heilbornii* Var. Pentágona), en condiciones de invernadero. Para ello se estableció un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos (T1, T2, T3, T4 y T5) y nueve réplicas, resultantes de la inoculación de 6 aislados fúngicos. Se utilizaron 150 plántulas de Babaco de tres meses de edad, sembradas en sustrato estéril (2:1:1 suelo, arena y turba). El método de inoculación fue por inmersión de raíces, para la evaluación de la patogenicidad se utilizó la escala de evaluación propuestas por Veintimilla (2000). Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos T2, T3, T4 y T5 presentaron síntomas típicos de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB). Por lo tanto, siguiendo los postulados de Koch, se ha confirmado que todos los cuatro tratamientos fueron capaces de producir un alto grado de severidad de la enfermedad en el cultivo del Babaco.

Palabras claves; Babaco, *Fusarium oxysporum*, métodos de inoculación, pruebas de patogenicidad.

SUMMARY

In recent years Babaco production has decreased significantly by 75%, due to the presence of a disease known as "Vascular wilt Babaco (MVB)", caused by the fungus *Fusarium oxysporum*. This disease has spread rapidly throughout the Ecuadorian territory, bringing losses of 100% in production, 50% both in growing plants and 50% in production plants. Against this phytosanitary problem, many farmers chose not to continue cultivating this fruit, due to ignorance of the causative agent and the absence of control measures to mitigate the disease. This research aims to evaluate the kinetic and interaction of different species of *Fusarium*., Using fungal isolates of *Fusarium*, which causes vascular wilt in Babaco (*Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentagonal*), under greenhouse conditions. An experimental design was completely randomized with five treatments (T1, T2, T3, T4 and T5) and nine aftershocks, resulting inoculation 6 fungal isolates. 150 seedlings Babaco three months old, grown in sterile soil (1: 1 soil, sand and peat 2) were used. The method of inoculation was dip root, for evaluating the pathogenicity evaluation scale proposed by Veintimilla (2000) was used. The results obtained show that T2, T3, T4 and T5 treatments showed typical symptoms of Vascular Wilt Babaco (MVB). Therefore, following Koch's postulates, it was confirmed that all four treatments were able to produce a high degree of disease severity in growing Babaco.

Key words; Babaco, *Fusarium oxysporum*, inoculation methods, pathogenicity tests.

**“ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DE DIFERENTES
ESPECIES DE *Fusarium spp.*, ASOCIADOS A LA MARCHITEZ
VASCULAR DEL BABACO *Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentágona*.”**

I. INTRODUCCIÓN.

En el Ecuador la actividad agrícola tiene mucha importancia y trascendencia, se ha convertido en una actividad económica que se proyecta muy fuertemente, marcando índices y pautas en nuestra economía; en este contexto se ha tomado en cuenta el nuevo auge que existe en la producción de cultivos agrícolas exóticos y no tradicionales, uno de éstos es el Babaco, considerado desde épocas pasadas como una fruta de óptimas características ya que posee ventajas como el no poseer semillas, tener una cáscara delgada y el agradable sabor de su pulpa (Uzcátegui, 2007).

La producción nacional del Babaco ha sido representada en huertos caseros y bajo invernadero, algunos cultivos ubicados en Imbabura (Atuntaqui, Perucho); Tungurahua (Patate y Baños); Pichincha (Tumbaco); Azuay (Gualaceo, Santa Isabel). Loja constituyen las provincias más representativas en la producción de Babaco (Ampuero, 2004).

La producción del Babaco en los últimos años ha disminuido considerablemente, debido a la presencia de una enfermedad conocida como la "Marchitez Vascular del Babaco (MVB)", causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, reportada por primera vez en el país por Ochoa y Fonseca (2000). Esta enfermedad rápidamente se diseminó a lo largo y ancho del territorio ecuatoriano, trayendo consigo pérdidas en su producción de un 100% (Ampuero, 2004); frente a este problema fitosanitario, muchos agricultores optaron por no seguir cultivando esta fruta, debido al desconocimiento del agente causal y la ausencia de medidas de control para mitigar la enfermedad (Tobar, 2008).

Una de las principales características de *Fusarium spp.*, es su sobrevivencia en el suelo por varios años, mediante sus estructuras reproductivas llamadas clamidosporas, las mismas que germinan cuando el cultivo es establecido en el campo, la penetración del hongo se realiza en la zona de crecimiento de la raíz a través de heridas causadas por herramientas de uso agrícola (Hernández, 2004). Así tenemos, que *Fusarium spp.*, cumple dos fases

importantes: una saprofítica muy activa durante la que le permite vivir en el suelo y en los residuos vegetales por espacio de 20 años (Robles et al., 2014). Bajo estos argumentos la causa más frecuente de la pérdida económica registrada en el Babaco son las enfermedades de origen fúngico, esto es un gran problema para los pequeños y medianos agricultores pues la mayoría poseen escasos recursos económicos para el control de este tipo de enfermedades y desconocen las técnicas de prevención y control de enfermedades en el Babaco (AIAIC, 2003). Las posibles causas para el incremento de enfermedades radiculares en el Babaco son: la falta de esterilización de los sustratos utilizados para el enraizamiento de los esquejes, falta de control fitosanitario (inspección y supervisión constante) para recolectar y destruir plantas enfermas, desinfección permanente de invernaderos y falta de invernaderos con condiciones adecuadas de humedad y aireación (García, 1998).

A pesar, que la enfermedad de la MVB ha sido atribuida a *Fusarium oxysporum*, estudios recientes llevados en la Universidad Nacional de Loja, Ecuador; han demostrado una interacción patógeno-patógeno entre diferentes especies de hongos del género *Fusarium spp.*, asociados a la MVB. La complejidad en el estudio de las interacciones moleculares que resultan de la asociación de las diferentes especies de *Fusarium spp.*, hace que exista el desconocimiento total de la patogenicidad de la interrelación entre las diferentes especies de *Fusarium spp.* Este estudio permitirá sentar las bases para determinar las especies fúngicas patógenas y las oportunistas para contribuir a diseñar una estrategia de control biológico para mitigar esta importante enfermedad del Babaco (Robles, 2013).

Debido que en el Ecuador las investigaciones relacionadas con esta temática son muy escasas y se conoce poco acerca de la patogenicidad de estas especies, se consideró conveniente llevar a cabo esta investigación para determinar el grado de daño que produce en los tallos la MVB y la necesidad de determinar los microorganismos causantes de esta enfermedad, razón por la cual se formularon los siguientes objetivos en esta investigación.

- Realizar pruebas de patogenicidad mediante la combinación de diferentes aislados de *Fusarium spp.*, asociados a la MVB.
- Evaluar la cinética de la infección de *Fusarium spp.*, en plantas sanas de Babaco mediante el uso de claves.
- Identificar la especie de *Fusarium spp.*, de mayor incidencia mediante la extracción del AND, en plantas de Babaco.

II. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Origen, Evolución y Distribución Geográfica del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentágona*).

La diversidad florística y vegetal del Ecuador ha llamado la atención de botánicos y naturalistas desde hace varios siglos, a partir de las exploraciones de La Condamine (1736-1743) y Jussieu (1735-1747) (Ministerio del Ambiente, Ecuador, 2010). Es así que el Ecuador es uno de los pocos lugares del planeta donde aún es posible descubrir y describir plantas vasculares nuevas para la ciencia. En ese contexto el Babaco, es considerado como un híbrido natural partenocárpico originario de la hibridación interespecífica de *las V. stipulata* (Toronche) y *V. pubescen* (Chamburo) y su origen radica en los valles de la provincia de Loja (Scheldeman, 2002).

2.2. Características Generales del Babaco.

El Babaco es un arbusto herbáceo pequeño que puede llegar alcanzar una altura de hasta 4 m (Uzcátegui, 2007). Su sistema radical lo conforman raíces carnosas verticales de las cuales se desprenden raíces absorbentes muy superficiales (Jácome, 2011).

Tiene un tallo recto de color verde cuando es joven y marrón grisáceo cuando la planta es adulta, presenta ramificaciones, los brotes aparecen alrededor de la base. (Jácome, 2011). Las hojas son grandes insertadas al tronco alternadamente, limbo lobulado con cinco a siete lóbulos; nervadura marcada, peciolo largo que puede medir hasta 30 cm (AIAIC, 2003).

Las flores aparecen sobre el tronco recientemente desarrollado durante la fase de crecimiento de la planta. En su totalidad son femeninas (Ávila, 2010). De pétalos blanco-amarillento-verdoso; y sépalos verde oscuro (Jácome, 2011).

Los frutos son bayas sin semillas (su desarrollo es partenocárpico), no necesita polinización para su desarrollo, de color amarillo cuando ha llegado a la maduración completa, miden entre 18 y 34 cm de largo, de 7-11 cm de diámetro y con un peso que va de 425 a 1269 g (Ávila, 2010). Cada planta

puede llegar a producir has 50 kg por metro cuadrado; su pulpa es blanca, muy jugosa, ligeramente ácida cuando madura y baja en azúcar (Jácome, 2011).

2.3. El Cultivo del Babaco en el Ecuador.

El Babaco es una fruta cultivada en el Ecuador a mediados de los años 80, originaria de las zonas altas de Ecuador, precisamente en los valles abrigados del callejón interandino (Jácome, 2011). Inicialmente se tenían cultivos al aire libre pero posteriormente se los cultivaron bajo invernadero, debido a que se obtenían mejores rendimientos y calidad de los mismos (Ávila, 2010). La superficie ocupada para la producción de Babaco en el país oscilaba entre las 120-200 hectáreas aproximadamente (Ávila, 2010).

Las principales zonas de cultivo para este frutal en el Ecuador son: Imbabura (Atuntaqui, Perucho) en el callejón interandino (Tumbaco, Patate, Baños, Gualaceo, Santa Isabel), y las provincias más representativas en producción de Babaco son Loja y Tungurahua (Ampuero, 2004).

La altitud ideal para la producción del Babaco está entre 1800 a 2400 msnm, además asevera que el principal factor para este cultivo son las bajas temperaturas conocidas como heladas (Scheldeman, 2002).

La producción es de 25 a 45 frutos/planta /año, lo que con una densidad de 2500 plantas por hectárea produce entre 50 y 80 toneladas por año. Dentro del invernadero se puede llegar a obtener un rendimiento de 320 ton/ha (32 kg de fruta/m²), con un total de 8,000 plantas por hectárea (0.8 plantas/m²) e inclusive se ha llegado a obtener 600 ton/ha con densidades de (0.6 a 1 planta/m²), sistema en el que el peso del fruto llegó a ser muy alto (Jácome, 2011).

La fruta de este cultivo es principalmente usado en el Ecuador en la preparación de jugo, almibares y es extensamente usado en cocina para preparar dulces, salsas y una variedad de postres (Ampuero, 2004).

2.4. Principales Enfermedades del Babaco.

El Babaco se reproduce de forma asexual lo que además de causar problemas de pérdida de variabilidad genética, está directamente relacionado con el desarrollo de enfermedades causadas por cualquier microorganismo Fito patógeno (hongos, bacterias, virus, nematodos y actinomicetos), y la condición del hospedante susceptible, teniendo en cuenta sus etapas fenológicas y metabólicas y el último es el medio ambiente especialmente referido a las condiciones edafoclimáticas, en las cuales establecemos los cultivos (Guzmán-Piedrahita et al., 2009; Robles, 2011).

2.4.1. Enfermedades Fúngicas.

Los hongos son microorganismos eucarióticos generalmente microscópicos se distinguen por la carencia de clorofila, se encuentran ampliamente distribuidos, la mayor parte de las pérdidas económicas de los cultivos a nivel mundial son ocasionadas por enfermedades de origen fúngico (Agrios, 2005). Las enfermedades fúngicas han provocado varias catástrofes importantes en diversas partes del mundo, y son los responsables de una baja producción y calidad de alimentos para el consumo humano (AIAIC, 2003).

Es así que, las enfermedades de origen fúngico son responsables de las mayores pérdidas en las cuales podemos mencionar al Babaco que es una fruta no tradicional ampliamente aceptada en el mercado internacional (Ampuero, 2004). Las enfermedades más importantes son:

Cenicilla.- Esta enfermedad inicia su ataque en las hojas específicamente en el envés, presentando manchas irregulares y difusas de aspecto grasoso, que pueden ser vistas a trasluz. Posteriormente las manchas se vuelven blanquecinas de naturaleza polvosa (Coyago et al., 2010). En el haz aparecen manchas cloróticas que se agrandan y se agrupan, reduciendo el área fotosintética de la hoja. Esto produce una baja sustancial de la producción y de la calidad del fruto (Agrios, 2005)

Lancha temprana (*Alternaria sp.*)- Esta enfermedad, presenta síntomas en forma de manchas necróticas de forma redondeadas que varían de color café

claro al inicio a café oscuro al madurar, las manchas en el haz son de color café claro con abundantes y finos anillos concéntricos (Coyago et al., 2010). En el envés las manchas son idénticas a las del haz, pero su color es café oscuro; el tamaño de las manchas puede variar de 3 a 5 cm de diámetro. Generalmente las manchas se unen cuando el ataque es severo en la zona necrosada, llegando a causar defoliación de la planta y la caída de las partes reproductivas (Cotacachi, 2013).

Antracnosis (*Colletotrichum sp.*)- Es una enfermedad muy generalizada dentro de la familia *Caricaceae* (AIAIC, 2003). Presenta síntomas variados principalmente manchas de color marrón irregulares y los bordes foliares amarillos debido al necrosamiento del tejido; el tamaño de la mancha puede alcanzar como máximo 3 cm de diámetro y se presenta tanto en el haz como en el envés (Coyago et al., 2010).

Cuando los frutos del Babaco son infectados, los síntomas aparecen cuando maduran, pequeñas cantidades de látex son exudados del fruto. Al inicio se observan lesiones circulares, hundidas, blandas y limitadas con bordes café claro y traslucidos que se desarrollan en la superficie del fruto. Conforme avanza la enfermedad, las lesiones aumentan de tamaño, algunas de ellas se unen entre si destruyendo grandes áreas del fruto y alrededor de la lesión la epidermis se endurece y cambia a una coloración negruzca (Estupiñan, et al., 2007).

2.4.2. Enfermedades Bacterianas.

Las bacterias son microorganismos simples que presentan células procariotas individuales unicelulares, microscópicas y no producen esporas, se encuentran en el suelo formando parte de la rizósfera de las plantas, cuando habitan en el suelo, las bacterias viven principalmente sobre los órganos vegetales y con menos frecuencia libre o saprofiticamente, o en su mucílago bacteriano natural el cual las protege de varios factores adversos; no pueden producir su energía y dependen de un hospedero para obtenerla y realizar sus funciones vitales, las enfermedades de las plantas asociadas a las bacterias pueden causar una reducción significativa en la producción del cultivo,

problemas reproductivos y hasta la muerte de la planta, así tenemos que hay cinco géneros principales de bacterias patógenas: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

Tumor del cuello (*Agrobacterium sp.*). Es una bacteria Gram negativa, comúnmente forman sus poblaciones en el interior de las plantas hospedantes, pero estas poblaciones sólo disminuyen gradualmente cuando se liberan en el suelo, no forman esporas, poseen forma de bacilo se mueven por medio de 1 a 6 flagelos, es una enfermedad que inicia su ataque a través de heridas producidas por herramientas de trabajo o insectos, su sintomatología se caracteriza por la formación de tumores en forma de roseta provocados por la hipertrofia de las células del hospedero (Agrios, 2005).

Pudrición radicular (*Erwinia sp.*). Es una bacteria Gram negativa, flagelada y móvil que habita en el suelo, ataca aisladamente y su efecto es muy grave, ya que ocasiona la muerte de las plantas, especialmente durante los primeros estadios, los síntomas se caracterizan por una pudrición suave de color negro o pardo en la base del tallo, como consecuencia el follaje se torna flácido, amarillento (Madigan, *et al.*, 2008). Los frutos maduran prematuramente y se desprenden en la mayoría de los casos, los síntomas se presentan en una porción longitudinal de la planta, que corresponde a la zona de raíz afectada, pero luego involucran a toda la planta, conforme avanza la enfermedad, el tejido se vuelve flácido y progresa hacia una pudrición húmeda, donde la base del tallo no se descompone sino hasta la etapa final de la enfermedad que culmina en la muerte de la planta y finalmente la planta muere (AIAIC, 2003; Agrios, 2005).

2.4.3. Enfermedades causadas por virus.

Los virus son agentes infecciosos se caracterizan por tener una composición química muy simple, su material genético se compone ya sea por ADN o ARN, cubiertas por una o varias capas de proteína o lipoproteína capaces de replicarse en las células de un hospedante susceptible (Hull, 2009); no tienen órganos reproductivos son parásitos obligados, es decir que utilizan a las

plantas que infectan para poder replicarse, penetran en las plantas a través de varios tipos de heridas producidas por sus vectores (Agrios, 2005). Por esta razón el metabolismo de las plantas hospederas de virus altera diversas funciones vitales que indican al desarrollo de síntomas, que pueden variar desde cambios de color hasta necrosis severa o infectan los tejidos nuevos de una planta al reproducirse con gran rapidez y al aumentar su número de manera considerable en los tejidos que infectan; pueden causar la muerte súbita de la planta (Hull, 2009).

El Virus del mosaico de la papaya en Babaco (*VMP*), es un virus aproximadamente 533 X 1113 nm con un ARN genómico de 6 656 nucleótidos y que pertenece al género *Potexvirus*, tiene un amplio rango de hospederos, dentro de los cuales está el Babaco (Hull, 2009).

Es una alteración que se presenta desde los primeros meses de desarrollo del cultivo, las plantas infectadas poseen la presencia de un moteado verde claro que se observa en las hojas jóvenes, y son ligeramente más pequeñas que las normales, la enfermedad se transmite por utilizar estacas provenientes de plantas viróticas (Hull, 2009).

2.4.4. Enfermedades causadas por Nematodos.

Los nematodos son parasitarios por otros microorganismos, generalmente microscópicos (0,5 mm de largo), su cuerpo es delgado cilíndrico y alargado, con el diámetro reducido en los extremos, las hembras son más grande que los machos, en algunas especies toman diferentes formas, penetran en las raíces y producen los típicos nódulos (Agrios, 2005). Las hembras al ser fecundadas se llenan de huevos tomando un aspecto globoso dentro de las raíces. Esto causa una malformación de las raíces produciendo típicos “Rosarios” que impiden la absorción de los nutrientes causando luego marchitez, enanismo y clorosis de las plantas (Guzmán-Piedrahita et al., 2009). Los nematodos se transmiten con facilidad por el agua de riego, herramientas y cualquier medio de transporte de tierra, el principal nematodo que ataca al Babaco es: *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* (Agrios, 2005; Guzmán-Piedrahita et al., 2009).

Meloidogyne sp.

Se encuentra ampliamente distribuido en las cuatro regiones del país (Costa, Sierra, Oriente y Galápagos), causan las agallas en las raíces, interrumpen el paso de la solución mineral proveniente del suelo y causan el retraso del crecimiento de la planta, flacidez de los tallos, amarillamiento y marchitamiento en general afectando a la producción. Además, se puede observar florecimiento precoz y la disminución en el peso de la hoja y el tamaño del fruto (Cotacachi, 2013).

2.5. La Enfermedad de la Marchitez Vasculares del Babaco (MVB).

La Marchitez Vasculares (llamada también traqueomicosis o traqueobacteriosis) se la define como un complejo de trastornos vasculares que causan un estado general de la planta que casi siempre termina con la muerte de la misma; además las enfermedades vasculares se producen por la invasión del fitoparásito en el sistema vascular de las plantas (xilema y floema), los cuales provocan necrosis de las células que conforman los tejidos conductores, la necrosis es originada por la acción directa del fitoparásito o por las toxinas que este libera, algunas veces la marchitez ocasiona la obstrucción de los vasos cribosos del xilema, lo que impide la normal circulación de agua y nutrientes (Hernández, 2004).

Los primeros síntomas que aparecen en las plantas debido a los marchitamientos vasculares son: las afectaciones en el sistema vascular de la planta en la cual se puede observar la pérdida de turgencia en la célula, seguido de clorosis, decaimiento general de la planta y finalmente la muerte; según la naturaleza del fitoparásito se consideran dos tipos de marchitez vascular en plantas: la traqueobacteriosis, causadas por bacterias y la traqueomicosis, por hongos; como ejemplo de cada una de ellas podemos citar la traqueobacteriosis del maíz, conocida como marchitez bacteriana o enfermedad de Stewart y la traqueomicosis del Babaco, conocida como: la Marchitez Vasculares del Babaco (MVB) (Agrios, 2005).

Bajo estos antecedentes la enfermedad de la Marchitez Vasculares del Babaco (MVB), se origina en los años de 1990 con el auge en la producción y

exportación del Babaco hacia mercados internacionales. En el año de 1996 se observaron la presencia de una enfermedad que atacaba al sistema radicular del Babaco en invernaderos de la sierra centro del país; esta enfermedad produjo la reducción del cultivo en un 100%. Al cabo del corto tiempo esta enfermedad se diseminó a lo largo y ancho del país debido principalmente: al intercambio del material vegetativo entre las diversas zonas productoras del país, al desconocimiento total del microorganismo que ocasionaba la MVB, a la falta de estrategias de control de dicha enfermedad y a la forma de propagación del Babaco (por estacas e injertos) (Tobar, 2008; Ochoa y Fonseca, 2000).

En el año 1999 la MVB pasó de ser una enfermedad en aisladas zonas productoras de Babaco a ser una epifiticia de grandes dimensiones que ocasionaba la destrucción total de las plantaciones en todo el Ecuador. Es así que investigadores del INIAP (Instituto de Investigaciones Agropecuarias), comenzaron a indagar sobre las condiciones en que se desarrollaba la enfermedad de la MVB y descubrir el microorganismo causante de la misma (Ochoa y Fonseca, 2000).

En el año 2000, los investigadores del INIAP Ochoa y Fonseca, lograron aislar y caracterizar morfológicamente el microorganismo causante de la MVB, designándole el nombre de *Fusarium oxysporum f. sp. caricae*, los mismos investigadores en el año 2004 cambian el nombre del microorganismo *Fusarium oxysporum f. sp. Vasconcellae*, debido a que los taxónomos reorganizaron el nombre del Babaco que anteriormente se llamaba *Carica heilbornii var. Pentágona* en *Vasconcellea heilbornii var. Pentágona* (Badillo, 2000; O'Brien, 2009, Argotti et al., 2011).

2.5.1. Descripción del agente causal *Fusarium spp.*

Estudios realizados en la Universidad Nacional de Loja dentro del proyecto de investigación **“ESTUDIOS DE LAS INTERACCIONES PATÓGENO – PATÓGENO QUE SE ESTABLECEN DURANTE EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii. Var. Pentágona*)”**. Se han logrado caracterizar

morfológica, cultural y genéticamente doce aislados diferentes del género *Fusarium*; lo cual presentaron características morfo-culturales indicativas del género *Fusarium*., lo que nos indica que podría existir una interacción hongo – hongo (Armijos y Salinas, 2013).

El género *Fusarium* constituye la enfermedad más importante del Babaco debido a su amplia distribución, incidencia y severidad, que se disemina mediante el material vegetativo contaminado o por sistemas de riego por surcos o por aspersión. Muchas especies son saprofitas en algunas fases de su crecimiento y patógenas de cultivos en otras fases (Alexopoulos y Mims, 2000).

Fusarium es un hongo que presentan macroconidios fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada; con micro conidios y clamidosporas terminales o intercalares, que pueden estar ausentes o presentes, habita en el suelo, infecta a las plantas a través de sus raíces, en las que penetran directamente o a través de heridas. Tan pronto como llega a la raíz de la planta, el micelio del hongo se extiende hasta los vasos xilemáticos, donde forman microconidios (en el caso de *Fusarium*), y subsecuentemente el micelio y las esporas del hongo ascienden en la planta a través de sus vasos xilemáticos, siendo llevadas las esporas por la corriente de transpiración. Los que causan la obstrucción de los vasos, dando como resultado una alteración en el volumen del agua disponible para las hojas y el funcionamiento de toda la planta, esto trae consigo el cierre de los estomas, las hojas se marchitan y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 2005).

2.5.2. Clasificación taxonómica.

Según (Agrios, 2005; Leslie y Summerell, 2006; Argotti et al, 2011). La clasificación taxonómica de este patógeno es:

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase:	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Hypocreaceae</i>
Género:	<i>Fusarium</i>
Especies:	<i>F. oxysporum, F. solani, F. verticillioides, F. brachygibbosum, f. sp. Vasconcellae, caricae, lycopersici, gladioli, etc.</i>

2.5.3. Caracterización morfológica.

Teniendo en cuenta los criterios de muchos autores (Gerlach y Nirenberg (1982); Singh et al. (1991); Nelson et al. (1993); y Leslie et al., (2006) relacionados con las características de las especies del género *Fusarium* sobre diferentes medios de cultivos, se seleccionó el medio PDA (papa, dextrosa, agar) y medio CLA para realizar la caracterización morfológica de las especies aisladas.

En medios de cultivo tradicionales, las colonias presentan un crecimiento rápido, que ocupan toda la placa (8-9 cm de diámetro en una semana). El color que desarrolla este hongo va de blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo hasta púrpura; eso depende de la especie y el medio de cultivo que se emplee. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. Los medios de cultivo que más se utilizan para su identificación son: agar extracto

de malta (MEA), agar papa dextrosa (PDA), Medio harina de avena (HA), agua agar (WA), suelo agar (SA) (Leslie y Summerell, 2006; Gómez 2008).

Las estructuras que hay que tener en cuenta para la identificación morfológica de especies del género *Fusarium* son: micro y macro conidios, los que contienen una estructura llamada esporoquio, y las monofiálides y polifiálides. Además de los mesoconidios y los conidióforos y clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

2.5.4. Caracterización molecular.

Las características morfológicas que a nivel de género y especies distinguen a un hongo se limitan con frecuencia a permitir su identificación; a ello también se aplican las técnicas fisiológicas y bioquímicas; avances técnicos importantes han estimulado el uso de técnicas moleculares que son universalmente aplicables, como la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido el análisis molecular de las células fúngicas o aún esporas, material seco, u organismos extintos, como también a la selección de oligonucleótidos específicos para hongos, almacenado en bancos de genes (Leslie and Summerell, 2006).

Se han utilizados diferentes técnicas para la caracterización molecular, específicamente el aislamiento de los genes de la subregión ITS (Subregión Espaciadora Transcriptora Interna) la cual es una región específica y conservada del genoma de los microorganismos fúngicos (Córdova et al., 2014) .Esta técnica se basa en el aislamiento del ADN de las colonias, amplificación de los genes de la subregión ITS mediante los primers universales ITS fu-f (5`-CAACTCCCAAACCCCTGTGA-3`) e ITS fu-r (5`-GCGACGATTACCAGTAACGA-3`) y secuenciación de los genes de la subregión (Rincón-Sandoval, 2010 y Dinolfo, 2014) .En lo que consistió en la extracción de ADN se sembraron en medio PDA líquido (2 Erlenmeyer de 250 ml de capacidad por cada aislado), tomando dos discos de 5 a 6,5 mm de diámetro con crecimientos activos (Hill et al., 2011).

2.6. Pruebas de patogenicidad.

Volcy (2008), al realizar pruebas de patogenicidad a partir de diferentes cepas del hongo activo (*Fusarium spp.*), siguiendo un protocolo específico, permitió conocer el periodo de incubación del microorganismo inoculado y de esta manera determinar si el hongo inoculado es capaz de ocasionar los síntomas de marchitamiento y necrosis vascular.

Por su parte Sarango y Palta (2011), al realizar pruebas de patogenicidad de diferentes cepas de *Fusarium spp.* sobre plantas de tomate de mesa *var* Caribe, los resultados obtenidos permitieron conocer que las plantas afectadas presentan los primeros síntomas como una ligera aclaración de las nervaduras en los folíolos jóvenes externos, esta ligera aclaración va del verde claro al amarillo verdosos, las hojas decaen, finalmente se marchitan y tornan amarillas, oscuras y mueren. Las hojas marchitas pueden estar extendidas o bien enrollarse.

2.7. Estudios sobre el progreso de la enfermedad (cinética) en cultivos.

Volcy (2008), al realizar el estudio de las interacciones de los elementos estructurales de las epifitias influenciadas a través del tiempo, por los factores ambientales y la acción del hombre, expresados en índices de la cantidad de tejido dañado o el número de plantas enfermas, el mismo que está dado por una curva que muestra el desarrollo (avance) de la epifitia con el transcurso del tiempo. Esta curva se denomina como desarrollo o avance de la enfermedad. El punto de origen y la forma de dicha curva dan información acerca del período de aparición y de la cantidad de inóculo, los cambios que ocurren en la susceptibilidad del hospedante durante su período de crecimiento, los eventos importantes del estado del tiempo y la efectividad de las medidas culturales y de control.

Según Agrios (2005), las curvas de progreso de la enfermedad varían debido a que son afectadas por el clima, la variedad del cultivo, la localidad y el tiempo, pero en general son características para algunos grupos de enfermedades, por ejemplo, una curva del tipo de saturación es característica de las enfermedades monocíclicas; una curva sigmoide es característica de

las enfermedades policíclicas y una curva bimodal es característica de las enfermedades que afectan a diferentes órganos (flores, frutos) de la planta.

Figueroa (2011), realizó un estudio sobre la cinética de crecimiento del hongo *Fusarium* para observar el comportamiento del tejido fúngico y establecer los tiempos de duración del experimento. En este ensayo se utilizaron tres diferentes concentraciones de conidios 1×10^4 ; 1×10^5 y 1×10^6 , los resultados mostraron que la utilización de 1×10^5 y 1×10^6 conidios generan una biomasa fúngica similar después de 36 h de incubación. La concentración de 1×10^4 microconidios produjo menos tejido fúngico durante las primeras 36 h y se incrementa hasta las 48 h, produciendo una fluorescencia similar a la de 1×10^5 conidios. A las 72 h se observa un decremento en las unidades de fluorescencia en las concentraciones de 1×10^4 y 1×10^6 de conidios, lo cual se esperaba continuara el aumento en biomasa y por ende en fluorescencia. Este comportamiento atípico se le atribuye a las dificultades técnicas que presenta el tejido fúngico para ser manipulado, debido a la gran cantidad de éste en las celdas de 2 ml, a las 72 h de incubación provocando que nos e forme una pastilla solida al centrifugarlo; en consecuencia, se origina pérdida de material al transferirlo de la placa multicelda de 2 ml a la placa multicelda óptica, para la lectura de fluorescencia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. UBICACIÓN DEL PROYECTO.

La presente investigación se desarrollará en las instalaciones de la Universidad Nacional de Loja; la fase de campo se la realizará en el invernadero (estructura de hormigón armado, ventanales de vidrio y cubierta de fibra de vidrio) del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y la segunda fase se realizó en el laboratorio del Centro de Biotecnología.



Figura 1. Mapa de ubicación del lugar de realización de la investigación.

3.1.1. Ubicación política.

Provincia: Loja
Cantón: Loja
Parroquia: San Sebastián
Barrio: La Argelia.

Fuente: (CINFA, 2012)

3.1.2. Ubicación geográfica.

Ubicación geográfica del invernadero.

Latitud: 04° 08' 04" Sur
Longitud: 79° 12' 4,3 "Oeste
Altitud: 2170 msnm

Ubicación geográfica del Centro de Biotecnología.

Latitud: 04° 08' 00" Sur

Longitud: 79° 12'00 "Oeste

Altitud: 2134 msnm (CINFA ,2013)

Ubicación ecológica.

Posee una precipitación de 800 milímetros de promedio anual, 16° C de Temperatura media anual y una zona de vida, según Holdridge, bosque seco montano bajo (bs-MB).

3.2. MATERIALES.

3.2.1. Material de Laboratorio.

Medio de cultivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar), agua destilada, hipoclorito de sodio, lactofenol, tubos de ensayo, estufa, varilla de agitación, espátula, masking, algodón, alcohol potable, alcohol industrial, plato caliente, balanza analítica, bisturí, haza microbiológica, pinzas, parafina, vortex, incubadora orbital, gradillas para tubos de ensayo, lápiz graso, Matraz Erlenmeyer, vasos de precipitación, cajas de Petri, papel aluminio, guantes quirúrgicos, mascarillas, papel de filtro, mango de bisturí, cobre y porta objetos, tubos eppendoff, gasa, ligas, cámara de Neubauer, cámara de flujo laminar, mecheros, autoclave, embudos, microscópicos, cámara fotográfica, equipo personal de laboratorio, incubadora, vasos plásticos de 1000 ml, vasos plásticos de 250 ml, guantes plásticos, fundas plásticas, etiquetas, marcadores, navajas, tijeras, pipetas, probetas y escalas de evaluación de severidad externa (Veintimilla , 2007).

3.2.2. Materiales de campo.

GPS, libreta, cámara, palas, podadora, fundas plásticas, baldes plásticos de 12, carretilla, sacos, material de aseo, bombas de fumigar, insumos químicos, regaderas, carretilla de desinfección al vapor, umbráculo 10 m x 1,5 m, invernadero, tierra, arena sílica y turba, escalas de evaluación (Evaluación interna y externa) propuestas por (Veintimilla, 2007).

3.2.3. Materiales de escritorio.

Computadora, libreta de campo, registros y documentos digitales.

3.3. METODOLOGÍA.

3.3.1. Metodología del primer objetivo.

“Realizar pruebas de patogenicidad mediante la combinación de diferentes aislados de *Fusarium spp.*, asociados a la MVB”

3.3.1.1. Aislados de *Fusarium spp.*

Se utilizaron seis aislados puros de *Fusarium* causantes de la Marchitez Vascular del Babaco, estos aislados fueron seleccionados por presentar mayor y menor patogenicidad en estudios anteriores (Armijos y Serrano, 2014; Gómez y Macas, 2014). (Tabla 1).

Tabla 1. Aislados de *Fusarium*, utilizados en las pruebas de patogenicidad en Babaco Loja 2015.

Código	Localidad del Aislado	Caracterización molecular
AML 1	Loja	<i>Fusarium sp.</i>
AML 2	Loja	<i>Fusarium oxysporum</i>
CHA 1	Loja	<i>Fusarium oxysporum</i>
COC 1	Saraguro	<i>Fusarium oxysporum</i>
COC 2	Saraguro	<i>Fusarium oxysporum</i>
TUN1	Saraguro	<i>Fusarium temperatum</i>

Leyenda: Amable María (AML), Chantaco (CHA), Cochapamba (COC) y Tuncarta (TUN) Loja, 2014.

3.3.1.2. Material vegetal.

Se utilizaron 150 plantas de Babaco de 60 días después de la siembra (DDS). Todas las plantas se las sometieron a un periodo de cuarentena de 60 días.

3.3.1.3. Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Fusarium spp.*

Se cultivaron colonias puras de los aislados **AML, CHA, COC y TUN** pertenecientes al género *Fusarium.*, en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), conservadas en aceite mineral; mediante la extracción aséptica de las estructuras infectivas (microconidias, macroconidias y clamidosporas) de *Fusarium* causante de la Marchitez Vascular del Babaco.

Las estructuras infectivas del patógeno fueron transferidas para inocular en cajas de Petri que contenían el PDA, a continuación cada caja fue rotulado, registrado y sellado con papel de para film en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente almacenado a 28°C por dos semanas en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Fusarium.* Al cabo de este período, se procedió a la inoculación de los seis aislados en medio líquido Caldo-Papa-Dextrosa (CPD). En primer lugar, se realizó un pre-inóculo en 10 cm³ de medio de cultivo Caldo-Papa-Dextrosa (CPD) en tres tubos de ensayo de 20 cm³ cada uno de los aislados, luego se las incubó por 10 días a ±30°C y a 300 rpm en una incubadora tipo Shaker. Después de observar un buen crecimiento de cada una de las cepas se transfirió todo el contenido de los tubos de ensayo a un matraz de 800 cm³ con medio de cultivo CPD y se incubaron por 10 días más, en constante agitación.

3.3.1.4. Preparación de la suspensión de esporas de *Fusarium spp.*

Trascurrido los 10 días de incubación, se filtró 2 ml de cada una de las cepas en tubos eppendorff. Una vez obtenida la suspensión de esporas, se prosiguió al conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando un hematocímetro de Neubauer en un microscopio Olympus Serie: 1D81617, Japón con aumento de 40X. Donde se realizó el conteo de la cantidad de conidios en la cámara de Neubauer. Para ello se utilizó la fórmula propuesta por Rojas-Triviño (2011):

$$CC = \sum n (5 \times 10\ 000)$$

CC = Concentración en la cámara

$\sum n$ = Sumatoria de células en los cinco cuadrantes

(5 X 10 000) = Constante.

Se ajustaron todas las concentraciones en una proporción de 1×10^6 por ml-1 UFC (Unidades Formadoras de Colonias), aplicando la fórmula citada por Castellanos et al. (2011):

$$V_{\text{inicial}} \times C_{\text{inicial}} = V_{\text{final}} \times C_{\text{final}}$$

V_{inicial}= Volumen inicial del inóculo que deseamos preparar.

C_{inicial}= Concentración inicial del inóculo.

V_{final}= Volumen final del inóculo que deseamos preparar.

C_{final}= Concentración final deseada del inóculo (1×10^6).

3.3.1.5. Inoculación de *Fusarium spp.*, en las raíces de plantas de Babaco.

Se utilizaron 150 plantas de 60 días después de la siembra (DDS), en invernadero fueron inoculadas las raíces con suspensiones conidiales de cada una de las cepas de *Fusarium* (Tabla 1) y un testigo (agua destilada estéril). El ensayo de patogenicidad se realizó bajo un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 9 repeticiones (1 planta por tratamiento). Los tratamientos utilizados fueron:

T1 = BLANCO (Inoculación con agua destilada estéril)

T2 = SUELO CONTAMINADO NATURALMENTE CON MVB

T3 = GRUPO HETEROGÉNIO (COC1 [crecimiento lento], AML1 [crecimiento rápido], CHA1 [muy patogénico], AML2 [poco patogénico])

T4 = GRUPO CRECIMIENTO LENTO CON EL CRECIMIENTO RÁPIDO (COC1 [crecimiento lento], AML1 [crecimiento rápido], COC2 [crecimiento rápido])

T5 = GRUPO PATOGENICIDAD ALTA CON PATOGENICIDAD BAJA (CHA1 [patogenicidad alta], TUN1 [patogenicidad alta], AML2 [patogenicidad baja]).

Tabla 2. Distribución de los tratamientos bajo invernadero. Loja, marzo del 2015.

TRATAMIENTOS								
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
T1	T3	T5	T2	T4	T2	T5	T3	T1
T3	T5	T2	T4	T1	T4	T2	T5	T3
T5	T2	T4	T1	T3	T1	T4	T2	T5
T2	T4	T1	T3	T5	T3	T1	T4	T2
T4	T1	T3	T5	T2	T5	T3	T1	T4

La inoculación se la realizó de la siguiente manera: El sistema radical de las plántulas de Babaco del tratamiento **(T1)**, se sumergió en un balde que contenía 2000 ml de agua destilada estéril durante 10 minutos testigo, de igual manera el **(T2)** fue sembrada directamente en el contenedor de plástico que contenía suelo infectado naturalmente. Asimismo, el sistema radical del tratamiento **T3** fueron inoculadas por sumersión en 2000 ml de suspensión conidial con una mezcla de cepas de *Fusarium* (**COC1** [crecimiento lento], **AML1** [crecimiento rápido], **CHA1** [muy patogénico], **AML2** [poco patogénico]). Igualmente, el tratamiento **T4** se realizó la combinación de cepas de *Fusarium* (**COC1** [crecimiento lento], **AML1** [crecimiento rápido], **COC2** [crecimiento rápido]). Finalmente, el tratamiento **T5** se realizó la combinación de cepas de *Fusarium* (**CHA1** [patogenicidad alta], **TUN1** [patogenicidad alta], **AML2** [patogenicidad baja]). Los tres últimos tratamientos contaron con inóculos de 1×10^6 UFC/ml⁻¹ durante 10 minutos, de acuerdo a los tratamientos y a la distribución de los mismos (Tabla 2). Finalmente, las plantas de Babaco inoculadas fueron trasplantadas en contenedores plásticos de 2 kg de

capacidad que contenían una mezcla esterilizada de tierra, arena y tuba en una relación 2:1:1. El sustrato se esterilizó mediante vapor húmedo a una temperatura de $\pm 120^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas.

Todas las unidades experimentales se regaron con 400ml de agua destilada al momento de la inoculación y posterior a esta, siguiendo el calendario previamente establecido, bajo condiciones de invernadero.

3.3.2. Metodología del segundo objetivo.

“Evaluar la cinética de la infección de *Fusarium* en plantas sanas de Babaco mediante el uso de claves.”

3.3.2.1. Evaluación de la severidad de la enfermedad.

Para evaluar la severidad, se generó una escala cualitativa provisional para poder determinar los porcentajes de daño ocasionados por la enfermedad. Esta escala cualitativa de severidad, consistió en cinco clases según el progreso que presentó la enfermedad en el cáliz. Los grados son presentados en el cuadro 4, donde se utilizaron indicadores numéricos para la severidad de la Marchitez Vascular del Babaco, similares a los utilizados por Cueva (2007). La severidad fue calculada con la siguiente fórmula:

$$S (\%) = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} 100$$

Dónde: **S (%)** = Incidencia, **a** = total de plantas en cada grado de la escala; **b** = grado de la escala correspondiente; **N** = número de plantas total evaluadas **K**= grado máximo de la escala (K=5) (Townsend y Heuberger 1943).

Tabla 3. Escala de evaluación (severidad externa) de la Marchitez Vascular del Babaco. Loja, mayo-junio del 2015.

Nivel	Síntomas
0	Planta sana.
1	Clorosis inicial de las primeras hojas bajas.
2	Clorosis intensa de aproximadamente el 50 % del follaje. Defoliación moderada.
3	Clorosis total del follaje. Defoliación severa. Bandas oliváceas longitudinales y deprimidas en el tallo.
4	Plantas completamente defoliadas. Necrosis descendente desde el ápice del tallo (muerte de la planta).

3.3.2.2. Análisis estadístico de los datos.

Se realizó el análisis estadística con pruebas paramétricas y no paramétricas, utilizando el programa IBM-SPSS versión 22.

3.3.3. Metodología del tercer objetivo.

“Identificar la especie de *Fusarium* de mayor incidencia mediante la extracción del ADN en plantas de Babaco.”

3.3.3.1. Extracción de ADN con el kit comercial “DNeasy plant mini” QIAGEN.

Se realizaron siete puntos de muestreo de raíces en los cinco tratamientos, el primer muestreo a los cinco días después de la infección (DDI), los siguientes después de cada 5 días. Seguidamente las muestras colectadas se trasladaron al laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja; para realizar la desinfección de las mismas en cada punto de muestreo. Las muestras seccionadas se

depositaron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % por un minuto, luego en alcohol al 70% durante un minuto y finalmente se realizaron tres lavados intensos con agua destilada estéril. Posteriormente cada una de las muestras desinfectadas se rotularon y se colocaron en bolsas ziploc, para su conservación a -80°C , hasta la extracción de ADN genómico. En total se colectaron 35 muestras de raíz de Babaco.

Después, de completar el periodo de evaluación y de colecta de las muestras, se procedió a realizar la homogenización mecánica con nitrógeno líquido. La homogeneización, mecánica con nitrógeno líquido, consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético. Este procedimiento consiste en macerar aproximadamente 100 g de raíz de Babaco con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo muy fino. El nitrógeno líquido, congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. Este procedimiento, se puede utilizar en tejido fresco o congelado. Es importante considerar que si la muestra ya está congelada, se deberá disgregar con nitrógeno líquido para evitar la degradación del ADN por acción de las DNasas (Hill et al., 2011).

Seguidamente, se utilizó el kit de extracción de QIAGEN, este kit utiliza 2 tipos diferentes de membranas para la extracción y purificación del ADN. Se utilizó 20 mg del macerado del Babaco, a la cual se le añadió 400 μl del tampón de lisis AP1 y 4 μl de ARNasa A ($100\text{mg}/\text{ml}^{-1}$) y se incubó 10 minutos a 65°C mezclando por inversión cada 5 minutos. Posteriormente se añaden 130 μl del tampón AP2 de precipitación y se mezcló e incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y se añadió el sobrenadante a la columna QIA Shredder mini spin, y se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm. Se recogieron 450 μl , a los cuales hay que añadir 1.5 volúmenes del buffer AP3 (675 μl). Se pipeteó en la columna DNeasy mini spin y se centrifugó a 8000 rpm. Se descarta la fracción que atraviesa la columna y se añaden 500 μl del buffer AW centrifugándose 8000 rpm durante 1 minuto. Se añadió a la columna otros 500 μl del buffer AW y se centrifugó 13000 rpm

durante 2 minutos. Una vez centrifugado se cambia la columna a un tubo nuevo y se añaden 100 μ l del buffer AE, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm Rojas-Triviño (2011).

3.3.3.2. Cuantificación y medida de la pureza del ADN extraído.

La cuantificación del ADN total extraído se realizó por la medida de la absorbancia a 260 nm, dado que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 ng/ μ l. La medida de la pureza se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, siendo el coeficiente de absorbancias 260/280 el que nos indica la pureza de la solución. Un cociente de 1,8 indica que la solución es de ADN puro, valores inferiores indican una contaminación por proteínas o polifenoles mientras que si la relación es de 2,0 se trata de ARN puro.

3.3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa.

Seguidamente, se evaluaron las muestras de ADN mediante electroforesis, usando 10 μ l de cada muestra y 2 μ l de Buffer de Carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25 % azul xilencianol y 30 % glicerol), empleando los marcadores Mass Ruler (Fermentas) y DNA 1Kb Ladder (Sigma-Aldrich), y se corrió en una electroforesis de gel de agarosa al 1%, a 100 V durante 1 hora.

IV. RESULTADOS

4.1. Realizar pruebas de patogenicidad mediante la combinación de diferentes aislados de *Fusarium* spp., asociados a la MVB.

Como se observa en la tabla 4. el análisis estadístico muestra que los tratamiento T1 no presentó ningún grado de severidad esto debido a que no se inoculo el patógeno y solo se utilizó agua destilada estéril, mientras que los demás tratamientos en los que se inoculó diferentes cepas de *Fusarium* si presentan grados de severidad considerables por lo que los tratamientos si difieren significativamente entre ellos.

Tabla 4. Análisis estadístico de severidad en plántulas de Babaco en condiciones de Invernadero Loja, 2015.

Tratamientos	sev1	sev5	sev10	sev15	sev20	sev25	sev30	sev35	sev40
T1	0	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
T2	0	8 b	24,68a	19,06b	41,64 b	62,42a	60,4a	73,08a	77,2a
T3	0	0 b	21,18a	26,26ab	46,94ab	54,4a	58,02a	74,84a	77 a
T4	0	19,98a	17,02a	26,4ab	51,58a	57,34a	62,54a	74,92a	71,48a
T5	0	25,86a	17,6a	30,26a	48,54ab	57,18a	60,02a	72,54a	76,74a

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según TUKEY $p < 0,05$.

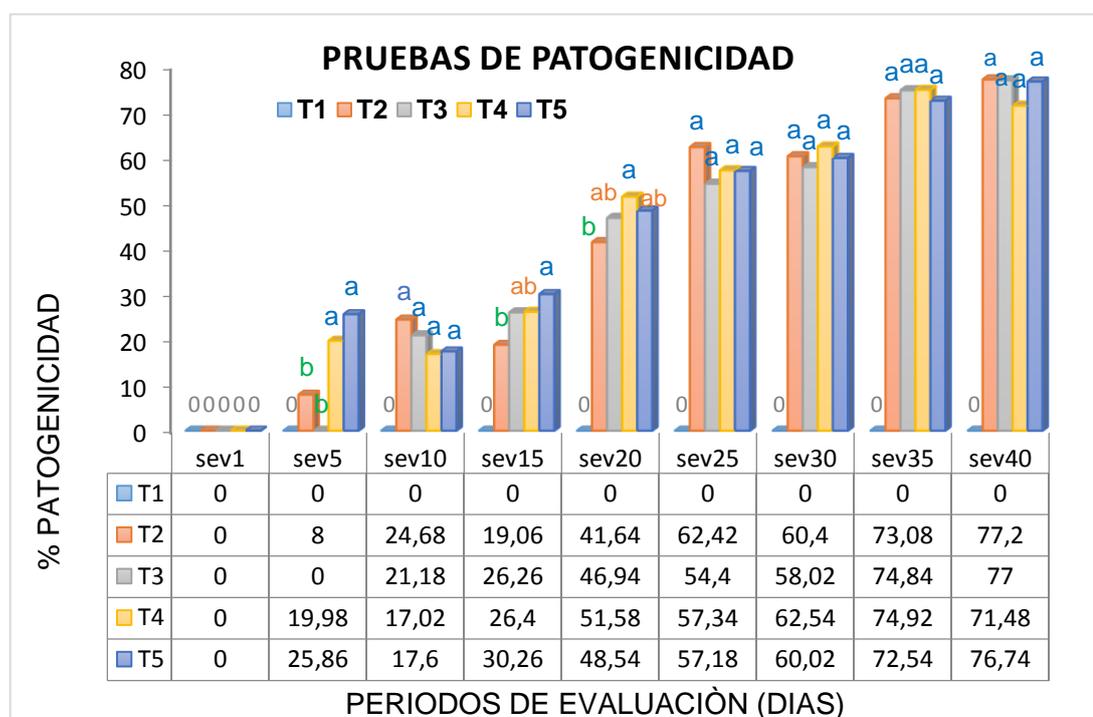


Figura 2. Severidad de los tratamientos de *Fusarium* spp, causantes de la Marchitez Vascular del Babaco en la provincia de Loja. Noviembre del 2015.

Leyenda: Severidad 1 (Sev 1), Severidad 5 (Sev 5), Severidad 10 (Sev 10), Severidad 15 (Sev 15), Severidad 20 (Sev 20), Severidad 25 (Sev 25), Severidad 30 (Sev 30), Severidad 35 (Sev 35), Severidad 40 (Sev 40), *Fusarium sp.* Amble María (AML 1), *Fusarium oxysporum.* Amble María (AML 2), *Fusarium oxysporum.* Chantaco (CHA1), *Fusarium oxysporum.* Cochabamba (COC1, COC2), *Fusarium temperatum.*Tuncarta (TUN1).

En la figura 2, se observa que en la severidad, se encontraron diferencias estadísticas en los nueve periodos de evaluación, además, el porcentaje de severidad en los últimos periodos de evaluación fue extremadamente alta en los cinco tratamientos. El tratamiento **T5** (combinación de las cepas (**CHA1** [patogenicidad alta], **TUN1** [patogenicidad alta], **AML2** [patogenicidad baja]), presentó una severidad en un rango comprendido de **25,86 a 76,74%**, respecto al tratamiento **T1** (testigo), el cual presentó una severidad **0%**. Asimismo, el tratamiento **T2 (suelo contaminado naturalmente con MVB)**, mostro una severidad de **8,0 a 72,2%**; respecto, a los demás tratamientos. Asimismo, claramente se puede observar que el tratamiento **T2** es el que contiene mayor severidad respecto a los otros tratamientos (Figura1).

4.2. Evaluar la cinética de la infección de Fusarium en plantas sanas de Babaco mediante el uso de claves.

En la figura 3, identificamos los tratamientos que presentaron mayor tasa de severidad es el tratamiento T2 (0-77,2%) y T3 (0-77%), estos presentan una diferencia bien marcada con respecto a los tratamientos restantes, considerándolos estadísticamente como los tratamientos con el mayor grado de severidad.

Los dos tratamientos antes indicados llegar a un estado de necrosamiento en que la plantas es muy difícil que se recupere.

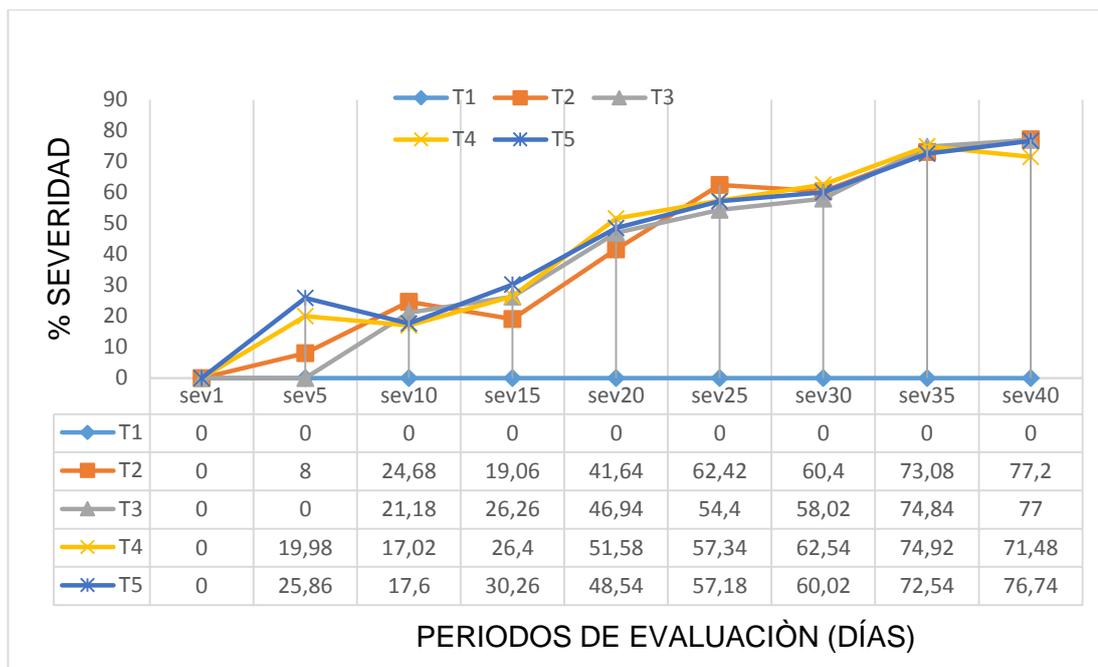


Figura 3. Curva de severidad de los cinco tratamientos de *Fusarium sp.*, asociados a la MVB. Loja noviembre del 2015.

Legenda: Severidad 1 (Sev 1), Severidad 5 (Sev 5), Severidad 10 (Sev 10), Severidad 15 (Sev 15), Severidad 20 (Sev 20), Severidad 25 (Sev 25), Severidad 30 (Sev 30), Severidad 35 (Sev 35), Severidad 40 (Sev 40), *Fusarium sp.* Amable María (AML 1), *Fusarium oxysporum.* Amble María (AML 2), *Fusarium oxysporum.* Chantaco (CHA1), *Fusarium oxysporum.* Cochabamba (COC1, COC2), *Fusarium temperatum.*Tuncarta (TUN1).

4.3. Identificar la especie de Fusarium de mayor incidencia mediante la extracción del ADN en plantas de Babaco.

Sobre la base de los resultados patogénicos se seleccionó al tratamiento T2 (**SUELO CONTAMINADO NATURALMENTE CON MVB**), el mismo se extrajo ADN genómico por cinco repeticiones, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de ADN genómico y enviar a secuenciar mediante la técnica de secuenciación de Nueva generación (Next Generation Sequencing). El análisis comparativo de las secuencias de ADN amplificadas de la región ITS fue de aproximadamente 200 bp (Figura 3).

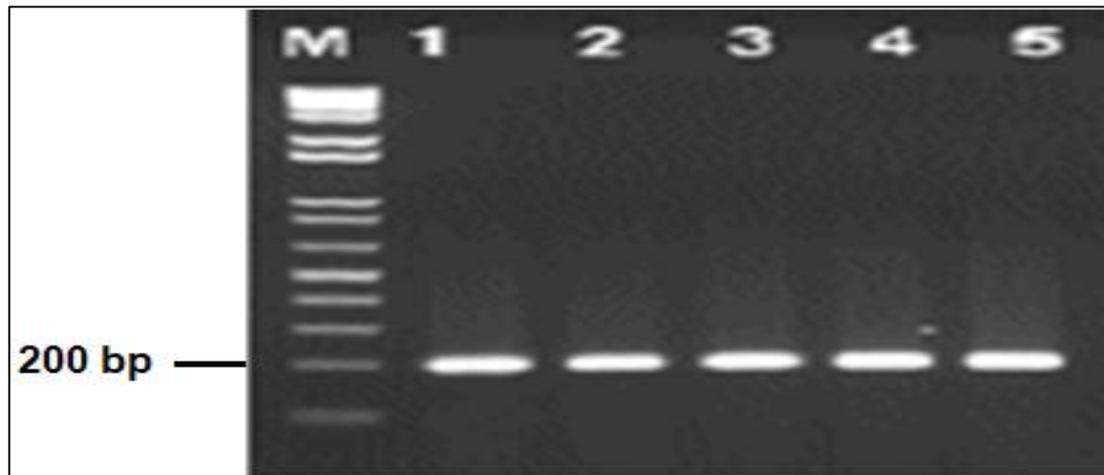


Figura 4. Fotografía del gel de agarosa 1% del producto de PCR de las regiones ITS1 e ITS 3 del tratamiento infectado naturalmente: M = Marcador molecular 1000 bp (Invitrogen Norte América). (1, 2, 3, 4 y 5) T2 = suelo contaminado naturalmente con MVB. Loja noviembre del 2015.

Leyenda: *Fusarium sp.* Amble María (AML 1), *Fusarium oxysporum.* Amble María (AML 2), *Fusarium oxysporum.* Chantaco (CHA1), *Fusarium oxysporum.* Cochabamba (COC1, COC2), *Fusarium temperatum.*Tuncarta (TUN1).

V. DISCUSIONES.

Realizar pruebas de patogenicidad mediante la combinación de diferentes aislados de *Fusarium* spp., asociados a la MVB.

Todos los tratamientos (T2, T3, T4, T5, excepto el T1) fueron sometidos a ensayos de patogenicidad. Los cuatro tratamientos provocaron síntomas típicos que causaron síntomas de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) los que variaron entre sí en cuanto al grado de severidad y fueron re-aislados a partir del material inoculado. Por lo tanto, siguiendo los postulados de Koch, se ha confirmado que todos los aislados monospóricos de los tratamientos en estudio, son patógenos del Babaco.

Es necesario recalcar que todos los aislados llegaron a un rango de severidad de 71-77,2%; pero no causaron la mortalidad de las plántulas de Babaco. Este resultado podría explicarse debido a que en el proceso de inoculación no se realizaron pequeñas heridas para permitir el ingreso de *Fusarium*, respecto a esto. Agrios (2005), indica que las inoculaciones con heridas inducidas en el cuello de la raíz o natural a través de los puntos de formación de raíces laterales, juega un rol importante en el desarrollo de esta enfermedad. Observaciones similares fueron realizadas por Fang et al., (2012), quienes realizaron pruebas de patogenicidad con *F. oxysporum* sobre cultivares de fresa, encontraron que solamente las plantas inoculadas con herida colapsaron. Al respecto Jamiolkowska et al., (2011), reportan que las heridas incrementan la susceptibilidad a la invasión de *Fusarium* y que en campo las labores de trasplante inevitablemente conducen a daños en raíces y tallo. Hafizi et al., (2013), sugieren que un proceso infeccioso es favorecido por las lesiones provocadas por la emergencia de las raíces laterales, implementos agrícolas o nematodos.

Un aspecto importante de resaltar en esta investigación es el mayor porcentaje de severidad obtenida con el tratamiento T2 (**suelo contaminado naturalmente con *Fusarium* causante de la MVB**), esto podría deberse a que en condiciones naturales el o los microorganismos que producen el marchitamiento no se encuentran influenciados por los diversos factores

(temperatura de incubación, pH del medio de cultivo y el fotoperíodo) que determinan el crecimiento y esporulación en condiciones *in vitro*. Sin embargo, los síntomas fueron muy similares en plántulas con inoculaciones inducidas por *Fusarium*. Los síntomas producidos en Babaco inoculadas con suelo naturalmente infectado con la MVB incluyeron la clorosis de las hojas inferiores, pudrición de la base del tallo, decoloración de los haces vasculares del tallo (color vinoso) y decaimiento generalizado. Asimismo, la infección natural de las raíces del Babaco en el campo no se debe tanto al estado conidial sino más bien al ataque provocado por las clamidósporas (Agrios, 2005). Igualmente, Leslie y Summerell (2006). Afirman que las clamidósporas de *Fusarium* germinan más consistentemente en el suelo cuando se hallan cerca de la raíz principal y raíces secundarias del Babaco, pues las partes subterráneas de la planta parecen proveer los nutrientes necesarios y crear un ambiente favorable para la patogénesis. Finalmente, los resultados de la presente investigación coinciden con los publicados por otros investigadores (Cueva, 2007; Gómez y Macas 2014).

Evaluar la cinética de la infección de *Fusarium* en plantas sanas de Babaco mediante el uso de claves.

Hasta la presente fecha no existen reportes científicos sobre el estudio del progreso de la MVB en comunidades patogénicas, sin embargo, existen algunos reportes sobre el estudio de la patogenicidad de *F. oxysporum* en Babaco como los realizados por Cueva, (2007). De los anteriores demuestra que hay variación patogénica entre los diversos tratamientos inoculados a través de comunidades patogénicas lo cual puede estar relacionado con la capacidad de la especie de generar los síntomas de la enfermedad de acuerdo a la variedad del hospedero (Agrios, 2005). Lo cual concuerda con lo reportado por Córdova Albores et al. (2014) quienes señalan algunos aislados de *Fusarium* como el agente con mayor índice de severidad y a su vez reportan aislados de *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y a *F. solani* con menor capacidad patogénica.

Las diferencias en la sintomatología en cada uno de los tratamientos descrita por diferentes autores se debe probablemente a la constitución anatómica y

fisiológica del Babaco y no a la variación de las comunidades patogénicas de *Fusarium* inoculados como indican los resultados en este estudio, razón por la cual Ochoa y Fonseca (2000) la denominó como la Marchitez Vascular del Babaco, quizás fue debido al hecho de que el síntoma predominante encontrados por ellos fueran el marchitamiento debido al hipoplasia o hipertrofia causada por *Fusarium* lo cual se observa en el último periodo de evaluación.

Otra explicación que se le pudiera dar al progreso de la enfermedad en el tratamiento T2, sería la presencia en suelos naturales todo un complejo de hongos saprofitos que muchas veces contribuyen al deterioro del sistema radical del Babaco y en ocasiones podrían exacerbar los síntomas causados en si por MVB. Entre ellos podrían citarse a *Phythium* y *Phytophthora* (Varma et al., 2007). Finalmente, la demostración de la patogenicidad de comunidades patogénicas de *Fusarium* en Babaco, permitirá la dirección de nuevas investigaciones para el control de la Marchitez Vascular del Babaco.

Identificar la especie de *Fusarium* de mayor incidencia mediante la extracción del ADN en plantas de Babaco.

A pesar de los grandes logros obtenidos en la secuenciación de los genomas por el método Sanger y su imprescindible papel durante la era genómica, en los últimos años está siendo relevado por los procedimientos denominados de “nueva generación”. Estas nuevas tecnologías permiten una secuenciación más barata y eficiente, a pesar de obtener fragmentos (reads) de menores tamaños. Estas secuencias aisladas obtenidas requieren el empleo de potentes herramientas bioinformáticas informáticas para el ensamblaje de genomas. Por esta razón y debido a la caracterización patogénica se decidió realizar productos de PCR al mejor tratamiento en este caso es el tratamiento T2 (**SUELO CONTAMINADO NATURALMENTE CON MVB**) (Xu, 2011).

Son escasos los estudios patogénicos con inoculaciones inducidas con comunidades patogénicas de *Fusarium*, sin embargo, podemos citar los estudios realizados por Abd-Elsalam et al. (2003), emplearon los iniciadores ITS1 e ITS4 para identificar a *F. oxysporum f. sp. vasinfectum*, *F. oxysporum*,

F. moniliforme y *F. solani*, obteniendo bandas con tamaño molecular de entre 550 a 570 pb, las cuales coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo; sin embargo, estos autores no realizaron la secuenciación de los productos de PCR, sino que diseñaron los iniciadores selectivos ITS Fu Fwd-ITS Fu-Rev para la identificación rápida del género *Fusarium*. Estos iniciadores mostraron buena especificidad para el género *Fusarium* amplificando una región con un tamaño molecular de 389 pb. En esta investigación los productos de PCR obtenidos con estos iniciadores mostraron un tamaño molecular calculado de entre 410 a 429 pb.

Asimismo, los estudios realizados por Córdova-Albores et al. (2014), mediante el uso de iniciadores universales SU 1, ITS2 y ITS5 para identificar especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani* y *F. proliferatum*) en gladiolos, logrando un tamaño molecular de 500 pb. Además, también se utilizan cebadores específicos (ITS-Fu-Fwd y ITS-Fu-Rev) para la identificación de especies de *Fusarium*, lo que generó un tamaño molecular de aproximadamente 410-429 pb. Estos resultados no coinciden con los presentados en esta investigación. Actualmente este es el primer reporte sobre la caracterización patogénica con inoculaciones inducidas mediante comunidades patogénicas de *Fusarium* causantes de la MVB.

VI. CONCLUSIONES.

- ✓ El tratamiento T2 de (suelo contaminado con *Fusarium* causante de la MVB) fue el que se obtuvo los mayores porcentajes de severidad con el 77,2%.
- ✓ El tratamiento que presentó mayor cinética de infección fue el tratamiento T2 (suelo contaminado con *Fusarium*).
- ✓ Mediante las técnicas de Extracción de ADN, el tratamiento T2 (suelo contaminado con *Fusarium*), presentó una infestación mayor de 200 bp.
- ✓ Para que exista un daño de *Fusarium spp*, a plantas de Babaco debe haber una herida en la parte de la planta para que pueda ingresar directamente.

VII. RECOMENDACIONES.

- ✓ Evaluar en condiciones *in vitro* y a nivel de campo el efecto de la interacción de diferentes especies de *Fusarium spp*; mediante pruebas de patogenicidad, en diferentes especies de *Vasconcellea* , con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en esta investigación.

- ✓ Efectuar estudios sobre la interacción de *Fusarium* con otros microorganismos para identificar la especie oportunista o la que se beneficia del tejido necrosado del Babaco.

- ✓ En trabajos posteriores debe completarse la identificación molecular de las diferentes especies de *Fusarium spp.*, utilizando otras caricáceas.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. ABD, E., ALY, I., ABDEL, M., KHALIL, M., VERREET, J. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. Journals African Journal of Biotechnology. 2(4): 82 – 85.
2. AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. Published Elsevier. 5 ed. United States of America. 948 p.
3. AMPUERO, P. 2004. Elaboración de mermelada de Babaco como producto no tradicional de exportación al mercado Europeo. Tesis de Economista con Mención en Gestión Empresarial Especialización Marketing. Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
4. ASOCIACIÓN DE AGRÓNOMOS INDÍGENAS DE CAÑAR (AAIC). 2003. El cultivo de Babaco en invernadero. Editorial Abya Yala. Quito, Ecuador. 45 p.
5. AVILA, A. (2010). Situación fitosanitaria y evaluación de productos alternativos y convencionales para manejar *Fusarium oxysporum* en *Vasconcella sp.*
6. ARGOTTI, E., CAZAR, M., MOTTE, E., CEDEÑO, V. 2011. Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium spp.*, agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador. Revista ESPE Ciencia y Tecnología. 3(1): 25 – 36.
7. BADILLO, V. M. (2000). Carica L. vs. *Vasconcella St. Hil.* (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10(2), 74-79.
8. BADILLO, V. M. 2001. Nota correctiva *Vasconcellea St. Hill.* Y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11(1): 75-76.
9. COTACACHI, R. 2013. Evaluación agronómica del desarrollo de plantas de babaco (*Carica pentágona*) con tres dosis de bioestimulante radicular orgánico y tres combinaciones de sustratos en la parroquia de Yaruquí, Provincia De Pichincha. Universidad Estatal De Bolívar. Tesis De Grado Previo A La Obtención Del Título De Ingeniera Agrónoma. 160 p.
10. COYAGO, R.; LEÓN, F. & PATIÑO, V. 2010. Evaluación del comportamiento del babaco (*Vasconcella x heilbornii* var. pentagona) en tres tipos de alturas de podas en plantas de seis años de producción en la parroquia Bulán, Cantón Paute, Provincia Del Azuay. Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario Industrial. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca Ecuador 105 p.
11. CUEVA D. 2007. Producción de inoculantes a base de *Trichoderma spp.* Para el control de *Fusarium oxysporum sp.* Caricae en injertos de babaco

- (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco). Tesis de Ingeniería Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército-ESPE. Sangolquí-Quito-Ecuador. 114 p.
12. CHEHRI, K.; SALLEH, B.; YLI-MATTILA, T.; REDDY, K.; ABBASI, S. 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Journals Saudi Journal of Biological Sciences*. 18. 341 – 351.
 13. CINFA. 2012. Centro Integrado de Geomática Ambiental. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.
 14. ESTUPIÑAN, H.; OSSA, J. 2007. Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) El hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 89 p.
 15. FANG, X., KUO, J., PEI, M., FINNEGAN, M., BARBETTI, M. 2012. Coparative root colonisation of strawbwrry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxisporum* f,sp. *fragariae*. *Spinger Science+Business Media B.V.*
 16. FIGUEROA A. 2011. Escrutinio masivo de un banco de germoplasma, para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticillioides*. Tesis para obtener el grado de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa.
 17. GÓMEZ R. Y MACAS F. 2013. Estudios de las interacciones patógeno – patógeno que se establecen durante el desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco.
 18. GUZMÁN. O., CASTAÑO, J., VILLEGAS, B. 2009. Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. *Agronomía*, 17(2), 7 – 24.
 19. HAFIZI, R., SALLEH, B., LATIFFAH, Z. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium. solani* and *F. oxysporum* associated with crow disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (3). Brazil.
 20. HERNÁNDEZ, L. 2004. Rizobacterias y hongos micorrízicos como agentes de control biológico del Damping-off en plántulas de *Carica papaya* L. Tesis de Maestro en Ciencias, Área Biotecnología. Universidad de Colima, México. 112 p.
 21. HULL R. 2009. Comparative. Plant Virology. Science & Technology books. Department of Disease and Stress Biology John Innes Centre Norwich, UK.

22. JÁCOME, J. 2011. Evaluación de tres mezclas de sustratos y tres fitohormonas en enraizamiento de brotes laterales de Babaco (*Carica pentágona*), barrio Pinllocruz, cantón Mejía, provincia de Pichincha. Tesis Previa a la Obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador. 96 p.
23. JAMIOLKOWSKA, A., WAGNER, A., SAWICKI, K. 2011. Fungi colonizing roots of zucchini (*Cucurbita pepo* L. var *giromontina*) plants and pathogenicity of *Fusarium* spp. To Zucchini seedlings. Acta Arobotánica. 64 (1).
24. LESLIE, J., SUMMERELL, B. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. Published, Blackwell. Manhattan, United States of America. 387 p.
25. MADIGAN, M.; MARTINKO, J; PARKER, J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall. México DF. 1089 p.
26. OCHOA J., & FONSECA G. 2000. First Report of Fusarium Wilt of Babaco (*Carica x heilbornii* var. *pentágona*) in Ecuador. Revista Plant Disease.84 (2): 199-199.
27. ROBLES A. 2012. Estudio de las interacciones patógeno-patógeno, que se establecen durante el desarrollo de la enfermedad de la marchitez vascular en el babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentágona*). Proyecto de investigación; componente patógeno-patógeno. Universidad Nacional de Loja; Centro de Biotecnología. Ecuador. 38 p.
28. ROBLES, A., SALINAS, D., ARMIJOS, W., SÁNCHEZ, A Y TORRES, R. 2014. Estudio de la variabilidad morfológica en aislados fúngicos asociados con la enfermedad de la Marchitez Vascular Del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentágona*) en Loja, Ecuador. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja.
29. ROJAS., A. 2011. Conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 161 p.
30. SCHELDEMAN X. 2002. Distribution and potential of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. Thesis of Doctor in Applied Biological Sciences. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Ghent University, Belgium. 190 p.
31. SARANGO S. Y PALTA M. 2011. Biocontrol de *Fusarium* spp. En el cultivo de tomate de mesa con *Trichoderma* spp. Tesis de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador. 96 p.
32. TOBAR M. 2008. Análisis de competitividad de los productores de babaco de San Pablo de Tenta (Saraguro, Loja) con enfoque de agrocadena. Tesis Magister en Estudios Sociales y Globales. Programa de Estudios

Latinoamericanos. Mención en Estudios Agrarios. Universidad Andina Simón Bolívar, Ecuador. 109 p.

33. UZCÁTEGUI C. 2007. Estudio de factibilidad para la implementación de una empresa dedicada a la industrialización del babaco. Tesis de Ingeniería Empresarial. Escuela Politécnica Nacional, Ecuador. 185 p.
34. VOLCY, CH. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Revisión Agronomía Colombiana, vol. 26, núm. 1, 2008, pp. 107-115 Universidad Nacional de Colombia
35. VEINTIMILLA J. 2007. Escala de severidad interna y externa in Producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp. Para el control de *Fusarium oxysporum* spp. Caricae en injertos de Babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco). Por Cueva, R. 2007. Escuela Politécnica del Ejército-ESPE. Informe técnico del proyecto de investigación presentado como requisito para optar el título de Ing. Agropecuaria. Sangolquí-Ecuador.
36. XU, L. 2011. Soil fungal communities associated with plant health as revealed by next-generation sequencing. AARHUS UNIVERSITY.

IX. ANEXOS.

Anexo 1. Esquema del Diseño Experimental en Bloques completamente al Azar (BCA) utilizado en el proyecto, en el invernadero del Área Agropecuaria de la Universidad Nacional de Loja. Marzo del 2015.

TRATAMIENTOS								
I	II	III	IV	V	VI	VII	VII	IX
T1	T3	T5	T2	T4	T2	T5	T3	T1
T3	T5	T2	T4	T1	T4	T2	T5	T3
T5	T2	T4	T1	T3	T1	T4	T2	T5
T2	T4	T1	T3	T5	T3	T1	T4	T2
T4	T1	T3	T5	T2	T5	T3	T1	T4

Anexo 2. Datos generales tomados en la evaluación de la incidencia y severidad de la Marchitez Vascular del Babaco. Loja, mayo-junio del 2015.

Datos Generales:

Muestra No:	Cultivo hospedero:
Localidad:	Edad del cultivo:
Coordenadas geográficas	Cultivos anteriores:
Fecha de observación:	Dueño del predio:

Apariencia general del cultivo

Marchitez:	Tizones:
Amarillamiento:	Desarrollo anormal:
Áreas muertas:	Otros:
Manchas foliares:	

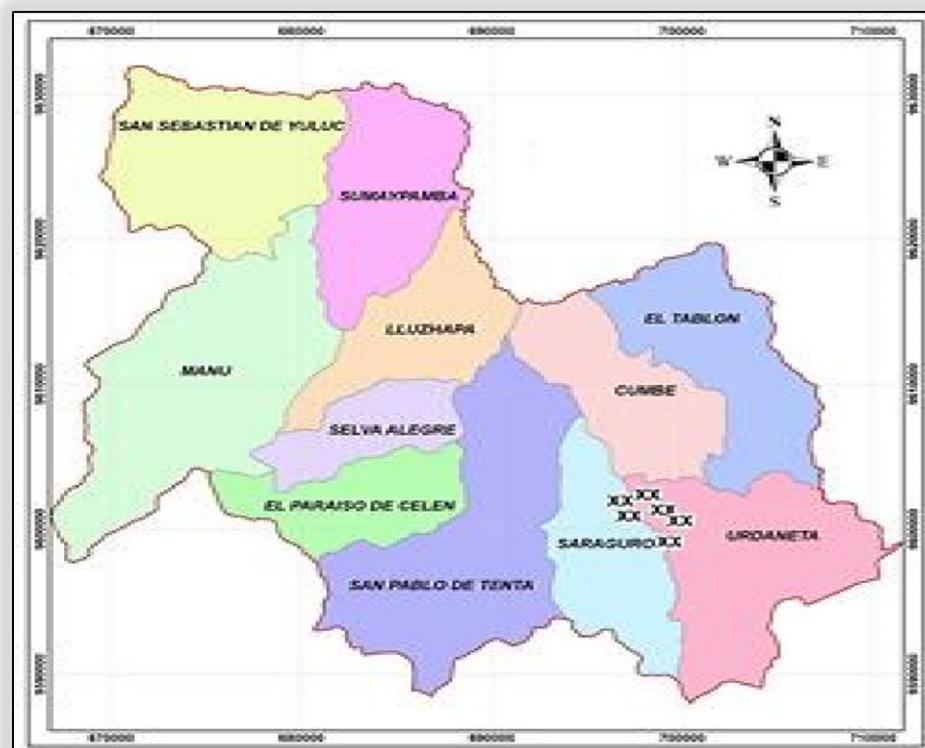
Distribución de la enfermedad

Raíz:	Brotos o tallos:
Hojas:	Flores
Frutos:	

Partes atacadas de las plantas.

Plantas aisladas:	Manchones o grupos de plantas:
Áreas Grandes:	Áreas pequeñas
Bandas o franjas:	Borde de cultivo

Anexo 3. Ubicación de los sectores donde se identificó la presencia de la MVB en la provincia Loja y Cantón Saraguro. Junio del 2015.



Anexo 4. Tríptico entregado en la socialización de resultados de tesis. Loja, noviembre 2015.



PROBLEMÁTICA

En la actualidad en el Ecuador la actividad agrícola tiene mucha importancia y trascendencia, se ha convertido en una actividad económica que se proyecta muy fuertemente, marcando índices y pautas en nuestra economía. En este contexto se ha tomado en cuenta el nuevo auge que existe en la producción de cultivos agrícolas exóticos y no tradicionales, uno de éstos es el Babaco, considerado desde épocas pasadas como una fruta de óptimas características ya que posee ventajas como el no poseer semillas, tener una cáscara delgada y el agradable sabor de su pulpa. La producción del Babaco en los últimos años ha disminuido considerablemente, debido a la presencia de una enfermedad conocida como la "Marchitez Vascular del Babaco (MVB)", causada por el hongo *Fusarium oxysporum* (reportada por primera vez en el país por Ochoa y Fonseca 2000).

JUSTIFICACIÓN

Sin una apropiada identificación de los agentes patógeno, no es posible desarrollar métodos de control para el manejo integrado de la MVB, con el estudio de la patogenicidad se pretende reducir la incidencia y severidad de la enfermedad, contribuir a la reducción de uso de plaguicidas que afectan a la salud de los productores y consumidores.

Además, con la presente investigación, se pretende estudiar los microorganismos asociados a la MVB, a través de las pruebas de patogenicidad para confirmar la acción de estos microorganismos que afectan a este cultivo, ya que es de gran importancia económica para la provincia y el país.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la cinética de la interacción de diferentes especies de *Fusarium* spp., asociados a la Marchitez Vascular del Babaco

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pruebas de patogenicidad mediante la combinación de diferentes aislados de *Fusarium* spp., asociados a la MVB.
- Evaluar la cinética de la infección de *Fusarium* en plantas sanas de Babaco mediante el uso de claves.
- Identificar la especie de *Fusarium* de mayor incidencia mediante la extracción del ADN en plantas de Babaco.

HIPÓTESIS

Todos los aislados de *Fusarium* spp., asociados a la MVB tienen un nivel de patogenicidad bajo, según la evaluación con escalas y mediante la extracción de ADN de la planta de Babaco.

UBICACIÓN DEL PROYECTO

La presente investigación se realizó en el laboratorio del Centro de Biotecnología.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Latitud: 04° 08' 04" Sur
 Longitud: 79° 12' 4,3 "Oeste
 Altitud: 2170 msnm

TRATAMIENTOS

Cuadro 1. Descripción de los aislados de *Fusarium* causantes de la MVB, por presentar mayor y menor patogenicidad

Código	Localidad del Aislado	Caracterización molecular
AML 1	Loja	<i>Fusarium</i> sp.
AML 2	Loja	<i>Fusarium oxysporum</i>
CHA 1	Loja	<i>Fusarium oxysporum</i>
COC 1	Saraguro	<i>Fusarium oxysporum</i>
COC 2	Saraguro	<i>Fusarium oxysporum</i>
TUN1	Saraguro	<i>Fusarium temperatum</i>

Leyenda: Amable María (AML), Chantaco (CHA), Cochapamba (COC), Tuncarta (TUN)

METODOLOGIA

Se sometió a 60 días de cuarentena a las plantas de babacose, de las cuales se seleccionó 45 plántulas sanas para cada inoculación. Para cada ensayo, se utilizaron 45 unidades experimentales

Cuadro 2. Actividades desarrolladas en la etapa de cuarentena

Tiempo	Objetivo	Producto	Dosis
10 días	Insectos (mosca blanca)	Bala 55	1,5-2 Kg/ha
15 días	Enfermedades	Oidium (Azufre 80% cup) Fusarium (Carbelac 500)	1,5-2 Kg/ha 1,5-2 Kg/ha
30 días	Fertilización	Abonagro	1 Kg/200l agua
7 días	Riego 2 veces/semana	Agua	0,5 l/planta

Cuadro 3. Distribución espacial de los tratamientos.

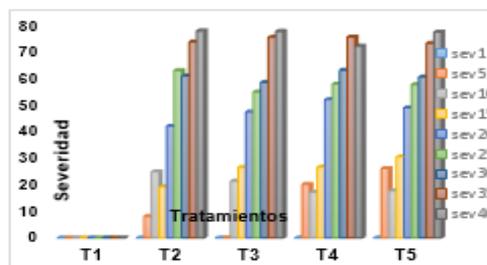
TRATAMIENTOS								
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
T1	T3	T5	T2	T4	T2	T5	T3	T1
T3	T5	T2	T4	T1	T4	T2	T5	T3
T5	T2	T4	T1	T3	T1	T4	T2	T5
T2	T4	T1	T3	T5	T3	T1	T4	T2
T4	T1	T3	T5	T2	T5	T3	T1	T4

(T1), el sistema radical se sumergió en un balde que contenía 2000 ml de agua destilada estéril durante 10 minutos. (T2) fue sembrada directamente en la funda plástica con suelo infectado naturalmente. T3 fueron inoculadas con una mezcla de cepas de *Fusarium* COC1 AML1, CHA1, AML2. (T4) se realizó la combinación de cepas de *Fusarium* (COC1, AML1, COC2). (T5) se utilizó cepas de *Fusarium* (CHA1, TUN1, AML2).

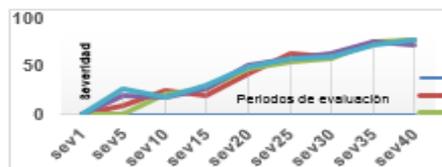
Leyenda: Crecimiento lento (COC1). Crecimiento rápido (COC2). Crecimiento rápido (AML1). Muy patogénico (CHA1). Poco patogénico (AML2). Patogenicidad alta (TUN1).

RESULTADOS PRELIMINARES

Severidad de los tratamientos de *Fusarium* spp, causantes de la Marchitez Vascular del Babaco en la provincia de Loja.



Curva de severidad de los cinco tratamientos de *Fusarium* sp., asociados a la MVB.



Gel de agarosa 1% del DNA extraído de raíces de Babaco en los cinco tratamientos.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 ÁREA AGROPECUARIA Y DE
 RECURSOS NATURALES RENOVABLES
**CARRERA DE INGENIERÍA
 AGRONÓMICA**

PROYECTO DE TESIS
 "ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN
 DE DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium* sp.,
 ASOCIADOS A LA MARCHITEZ VASCULAR DEL
 BABACO.



AUTOR

Luis David Medina Salinas

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Ángel Robles Carrión Mg. Sc.

Anexo 5. Fotografías del ensayo realizado tanto en fase de Campo y Laboratorio. Loja, enero-noviembre del 2015

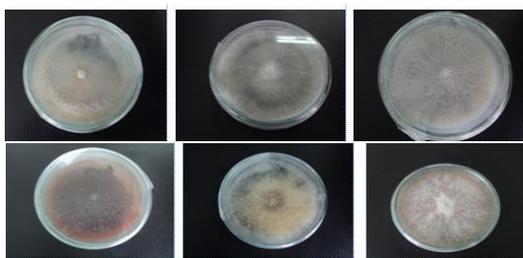
Fotografía 1. Plantas de Babaco antes de realizar la inoculación. Loja enero del 2015.



Fotografía 2. Cuidado de las plántulas en cuarentena. Loja, enero-marzo, del 2015.



Fotografía 3. Seis aislados purificados de *Fusarium spp.*, Causantes de la MVB. Loja, febrero del 2015.



Leyenda : (AML 1), *Fusarium sp.* (AML2, CHA, COC1, COC 2), *Fusarium oxysporum*, (TUN1). *Fusarium Temperatum*.

Fotografía 4. Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Fusarium spp.* Loja, Marzo del 2015.



Fotografía 5. Preparación para los aislados inoculados. Marzo del 2015.



Fotografía 6. Solución para la inoculación en plantas sanas de Babaco. Marzo del 2015.



Fotografía 7. Inoculación mediante el método de inmersión de raíces. Loja, abril del 2015.



Fotografía 8. Inoculación mediante el método de inoculación del sustrato. Loja, abril del 2015.



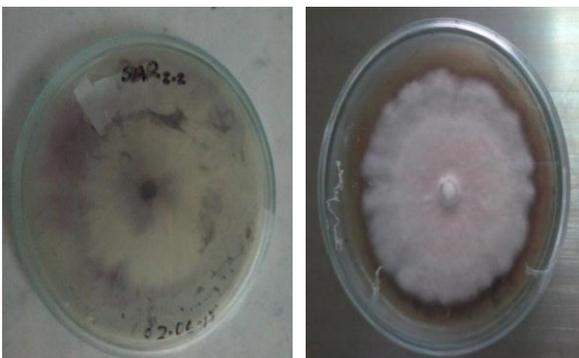
Fotografía 9. Resultados de la inoculación después de los 45 días de inoculación a las raíces. Loja, junio del 2015.



Fotografía 10. Resultados de la inoculación después de los 45 días de inoculación al sustrato. Loja, junio del 2015.



Fotografía 11. Colonias puras de *Fusarium*. Loja, julio del 2015.



Fotografía 12. Exposición de resultados obtenidos. Loja, noviembre 2015.



Anexo 6. Registro de asistencia en la socialización de resultados de tesis. Loja, noviembre del 2015.

SEMINARIO TALLER DE SOCIALIZACION DE RESULTADOS.DE TESIS. (TERCERA VISITA)

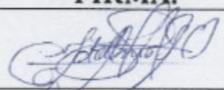
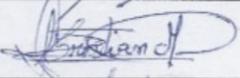
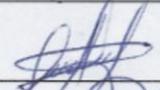
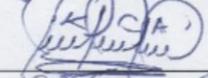
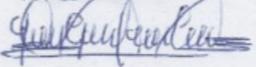
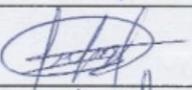
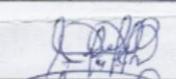
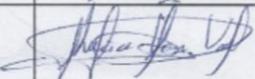
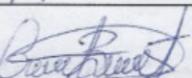
TITULO: "ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium sp.*, ASOCIADOS A LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO.

Autor: LUIS DAVID MEDINA SALINAS

Director: Ing. Agr. Angel robles. Mg. Sc.

MODULO: VI Carrera Ingeniería Agronómica.

REGISTRO DE ASISTENCIAS.

Nº	NOMBRES Y APELLIDOS	CATEGORÍA.	FIRMA.
1	Julius Romina León Choca	Estudiante	
2	Cristian Eduardo Minga Zamora	Estudiante	
2	Fernanda Patricia Laguarda Ulay	Estudiante	
4	Karina Yolanda Congo Ambulodi	Estudiante	
5	Yomara Gabriela Ferrández Cuenca	Estudiante	
6	Richard Daniel Quezada Vera	Estudiante	
7	Marlon Vinicio Eróez Aguilera	Estudiante	
8	Byron Manuel Vega Vargas	Estudiante	
9	Dinson Alexander Espejo Abendaño	Estudiante	
10	Tania Yamin Soranzo Acaro	Estudiante	
11	Robertth Estuardo Aguilera Paín	Estudiante	
12	Roberto Patricio Achupallas España	Estudiante	
13	Edita Lucio Vinces Vidal	Estudiante	
14	Glenia Elizalde Granda	Estudiante	

15	Alex Xavier Guzmán Pucha	Estudiante	[Signature]
16	Gabriela Jara Samaniego	Egresada	[Signature]
17	Claudia Chiriqui Cuadras	Egresada	[Signature]
18	Andrea Castillo S	Egresada	[Signature]
19	Ruth Espinoza Bude	Egresada	[Signature]
20	JAVIER AVAYLATA G.	Docente	[Signature]
21	Angel Robles	Docente	[Signature]
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			

Anexo 7. Registro de asistencia en la socialización de resultados de tesis, Loja, 2014.

HORA	ACTIVIDAD
3:00	Bienvenida a la exposición del proyecto de tesis a todos los presentes.
3:15	Registro de los presentes por medio de la hoja estadística.
3:30	Exposición de los resultados del proyecto.
4:15	Comentarios y observaciones por parte de los presentes.
4:30	Finalización y agradecimiento a los presentes por su participación en el día de exposición.
5:00	Refrigerio