



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



GOBIERNO PARROQUIAL  
"SEIS DE JULIO DE CUELLAJE"  
Fundada el 05 de agosto de 1964

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE  
DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

**Aislamiento e identificación molecular de *Fusarium* spp. a partir de muestras de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) de fincas ubicadas en comunidades de la parroquia 6 de Julio de Cuellaje, Cantón Cotacachi, Provincia de Imbabura.**


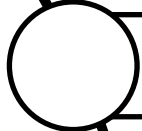
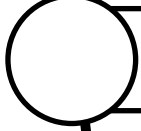
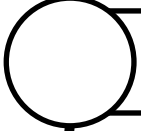
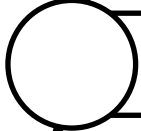
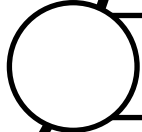

**Autor:** Llano Arteta, Mateo Sebastian.

**Director:** Flores Flor, Francisco Javier

Sangolquí, 4 de septiembre del 2023



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

-  **Introducción**
-  **Objetivos**
-  **Materiales y métodos**
-  **Resultados y discusión**
-  **Conclusiones**
-  **Recomendaciones**
-  **Agradecimientos**



## La Familia *Passifloraceae* en el Ecuador

### Géneros endémicos

*Ancistrothyrsus*

*Dilkea*

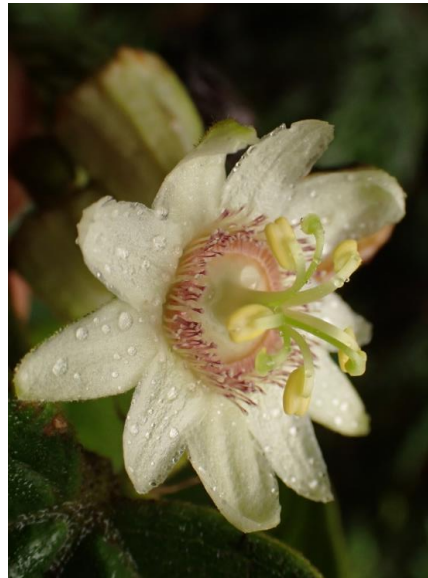
*Passiflora*



*Ancistrothyrsus tessmannii* Harms.  
<https://www.gbif.org/>



*Dilkea retusa* Mast.  
<https://www.gbif.org/>



*Passiflora sodiroi*.  
<https://ecuador.inaturalist.org/observations/74973673>

Número de colección	Provincia	Espécimen	Altura (m.s.n.m)	Coordenadas
3432	Santo domingo de los Tsáchilas	<i>Passiflora edulis</i> Sims	739	00°35'S 079°22'W
3366	Tungurahua	<i>Passiflora ligularis</i> Juss	1800	01°24'S 078°22'W
3452	Pichincha	<i>Passiflora mixta</i> L.f.	3556	00°03'N 078°26'W
3451	Pichincha	<i>Passiflora tripartita</i> (Juss.) Poir.	2900	00°09'S 078°26'W
3397	Santo domingo de los Tsáchilas	<i>Passiflora quadrangularis</i> L.	820	00°33'S 079°15'W
3556	Santo domingo de los Tsáchilas	<i>Passiflora maliformis</i> L.	500	0°0'13,9' S 79°22'43,5 W
3434	Cotopaxi	<i>Passiflora caerulea</i> L.	3178	0°45'6"S 0°45'13"W
3437	Napo	<i>Passiflora ambigua</i> Hemsl.	510	01°04'S 077°36'W
3804	Napo	<i>Passiflora alata</i> Curtis.	420	0°41'11.6"S 78°00'40.0"W
3805	Napo	<i>Passiflora macrophylla</i> Spruce ex Mast.	750	1°04'53.9"S 77°53'11.6"W
3806	Napo	<i>Passiflora tryphostemmatoides</i> Harms	850	1°13'11.7"S 78°05'35.9"W
3807	Pichincha	<i>Passiflora morifolia</i> Mast.	3117	0°04'04.9"N 77°51'04.8"W

Especímenes del género *Passiflora* de la región norte del Ecuador (Miño, 2018).



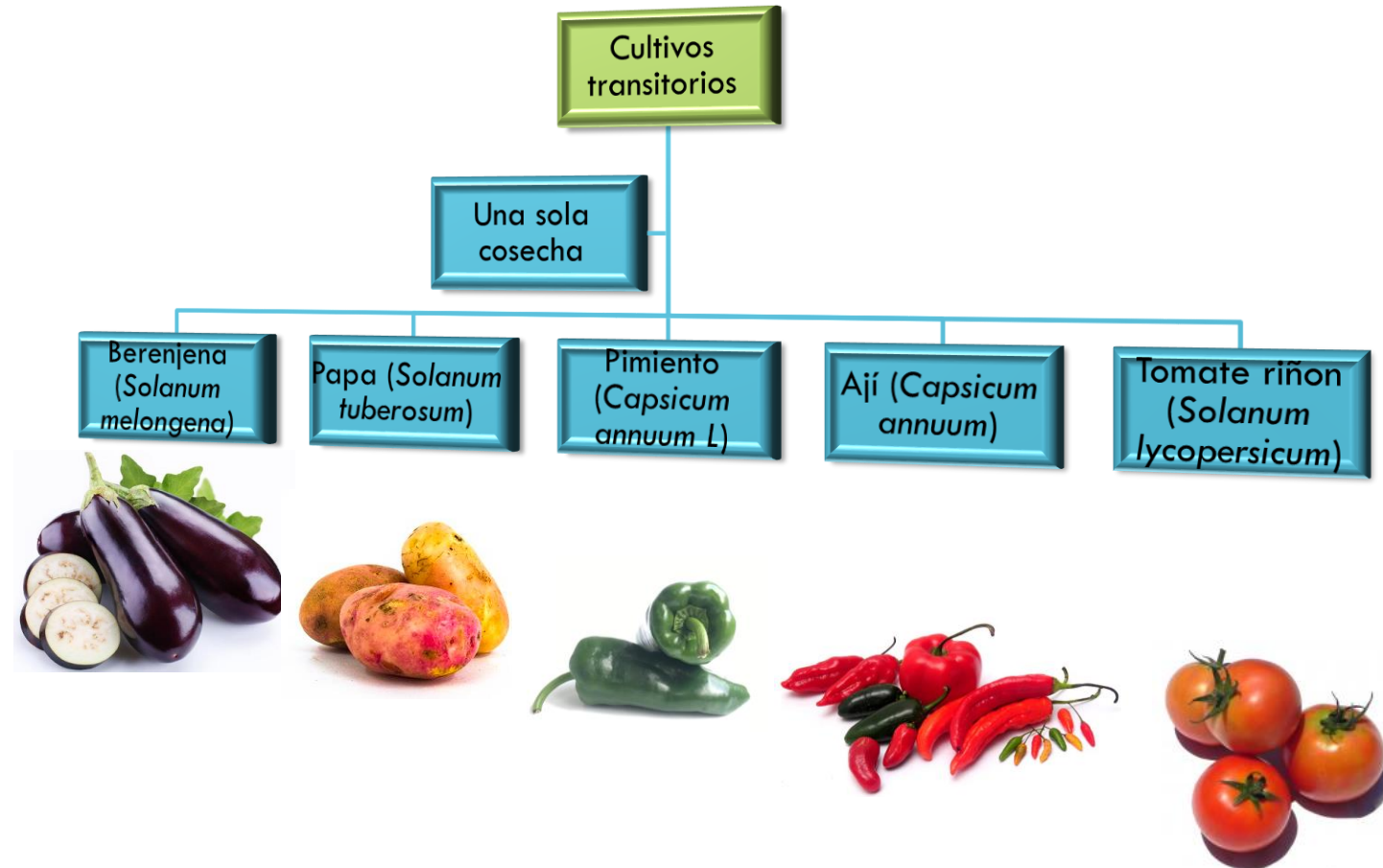
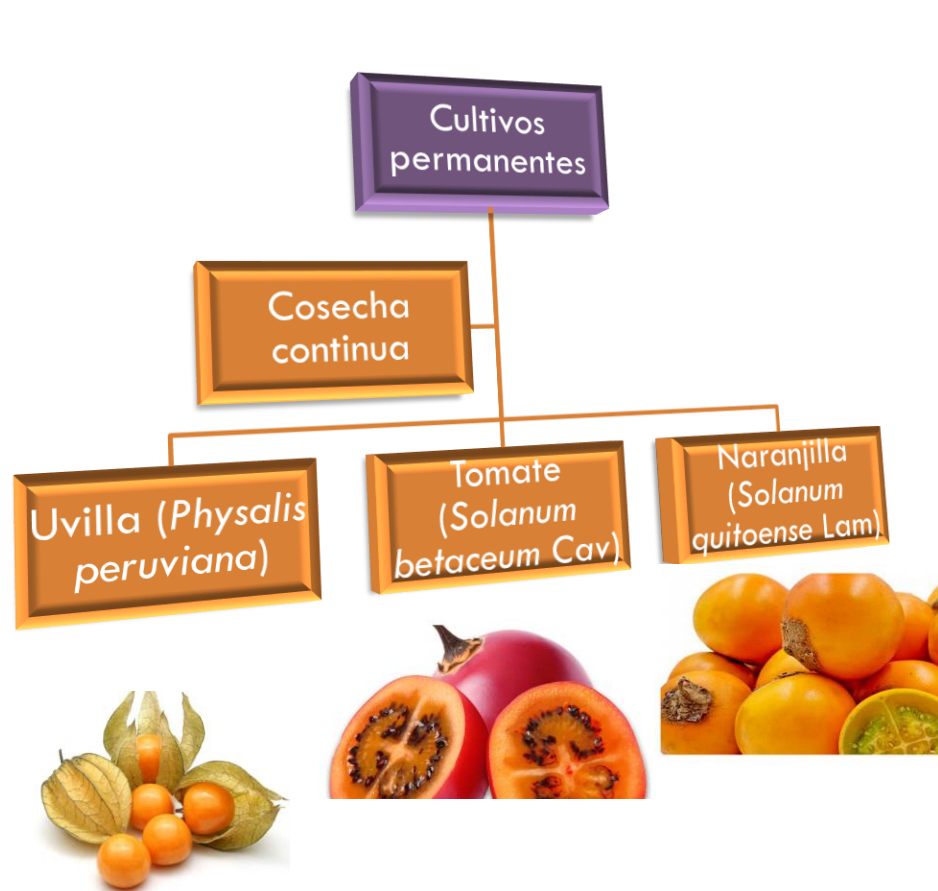
- *P. ampullacea*
- *P. andina*
- *P. anfracta*
- *P. brachyantha*
- *P. carnosisepala*
- *P. colinvauxii*
- *P. condorita*
- *P. deltoifolia*
- *P. discophora*
- *P. eggersii*
- *P. harlingii*
- *P. hirtiflora*
- *P. indecora*
- *P. jamesonii*
- *P. jatunsachensis*
- *P. linda*
- *P. loxensis*
- *P. luzmarina*
- *P. monadelpha*
- *P. montana*
- *P. parvipetala*
- *P. popenovii*
- *P. reflexiflora*
- *P. roseorum*
- *P. sanctae-barbarae*
- *P. smilacifolia*
- *P. sodiroi*
- *P. sprucei*
- *P. subpurpurea*
- *P. telesiphe*
- *P. tina*
- *P. tridactylites*
- *P. trochlearis*
- *P. zamorana*

*Passiflora ligularis* Juss.



En el Ecuador hay más de 5000 hectáreas de granadilla (Palacios, 2019). En Cuellaje, aproximadamente 100 hectáreas (PDOT, 2021).

## La Familia *Solanaceae* en el Ecuador





# Género *Solanum*

# INTRODUCCIÓN

Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam)

## Valor nutricional por cada 100 g

Energía 25 kcal - 105 kJ

Vitamina C 29.4 mg (49%)

Calcio 34.2 mg (3%)

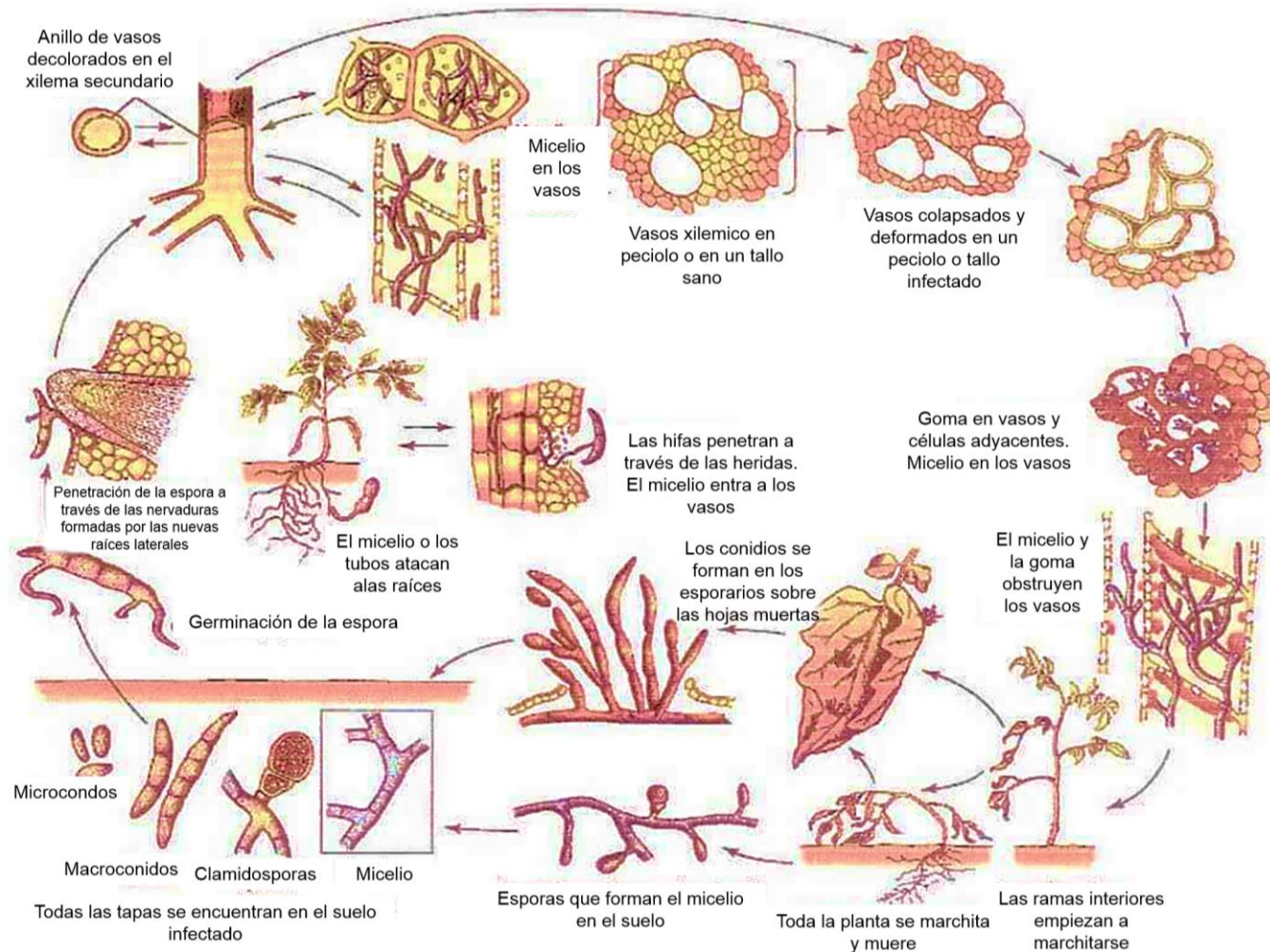
Hierro 1.19 mg (10%)

Sodio 2 mg (0%)

% de la cantidad diaria  
recomendada para adultos.



Reportes de Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en el Ecuador.  
(<https://ecuador.inaturalist.org/>)



Esporas y micelio de *Fusarium* 1000X

## Ciclo de la enfermedad de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

(Joan E. Rodríguez-Grimaldo, 2022). (Tudela, 2012). (Gilberto Manzo Sánchez, 2005).





## Fusariosis



Crecimiento en el tejido vascular

Infección radicular

Patógeno activo durante  
varios años

Marchitamiento  
general de la planta



## Identificación Molecular

Uso de regiones genéticas útiles para estudios filogenéticos y taxonómicos

Gen TEF-1 $\alpha$

FUSARIUM-ID

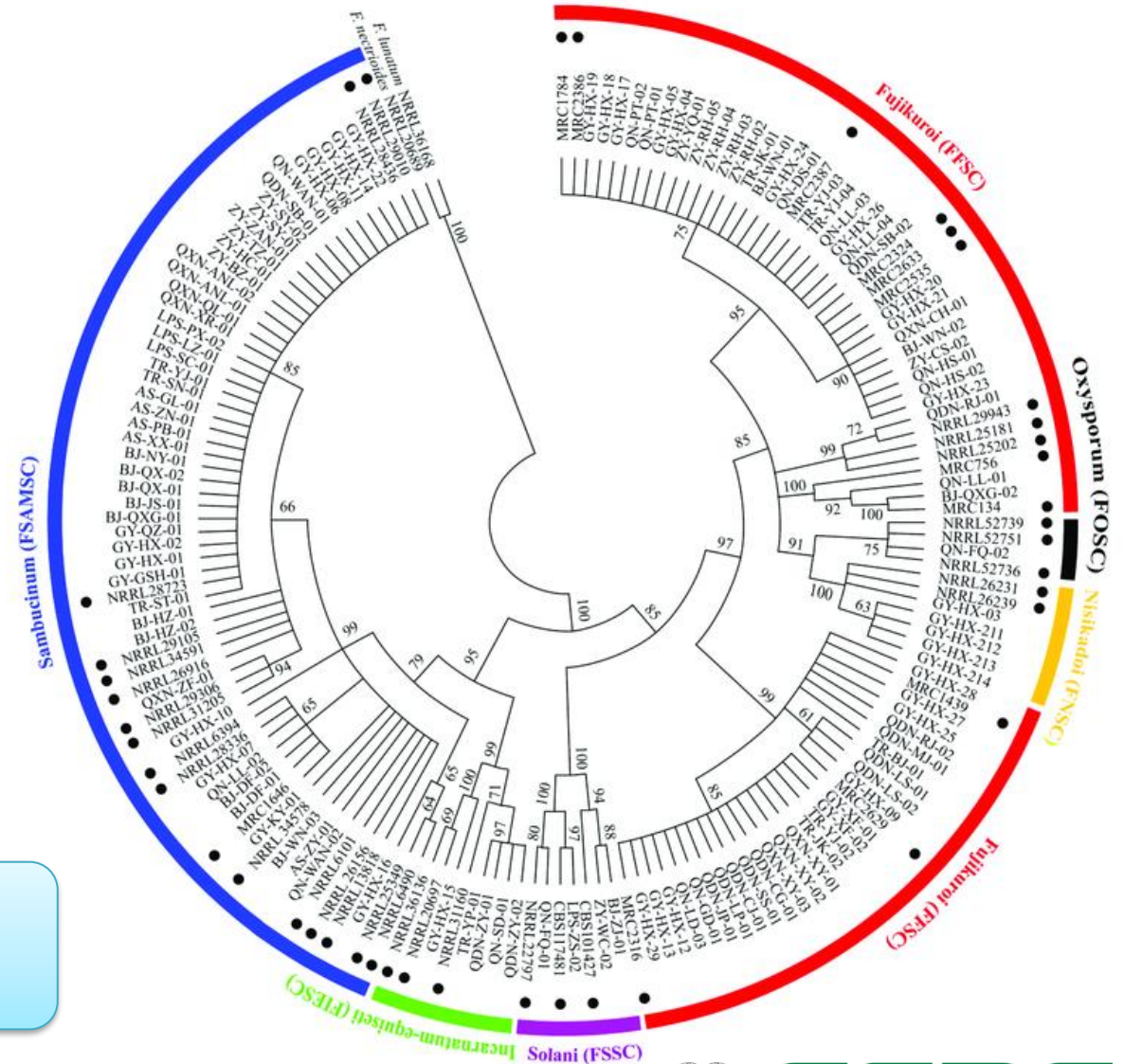
Región polimórfica

Discriminación a nivel de especies


Amplificación de un segmento de 750 pb

Elementos claves

Traducción de proteínas eucariotas



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
-  **Objetivos**
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos





## Objetivo General

Aislar e identificar molecularmente *Fusarium* spp. a partir de muestras de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) obtenidas de fincas ubicadas en comunidades de la parroquia 6 de Julio de Cuellaje, Cantón Cotacachi, Provincia de Imbabura.

## Objetivos Específicos

Aislar *Fusarium* spp. a partir de muestras de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) de fincas de comunidades de la parroquia 6 de Julio de Cuellaje.

Identificar molecularmente los hongos aislados mediante la amplificación de la región del gen del factor de elongación 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ).

Analizar filogenéticamente los resultados obtenidos mediante secuenciación molecular.

## Hipótesis

$H_0$ : *Fusarium* spp. es un agente fitopatógeno que no se encuentra presente en los cultivos de las fincas de comunidades de la parroquia Seis de julio de Cuellaje.

$H_i$ : *Fusarium* spp. es un agente fitopatógeno que se encuentra presente en los cultivos de las fincas de comunidades de la parroquia Seis de Julio de Cuellaje.





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
-  **Materiales y métodos**
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



## Seleccionamiento de plantaciones con problemas

Plantaciones con baja producción

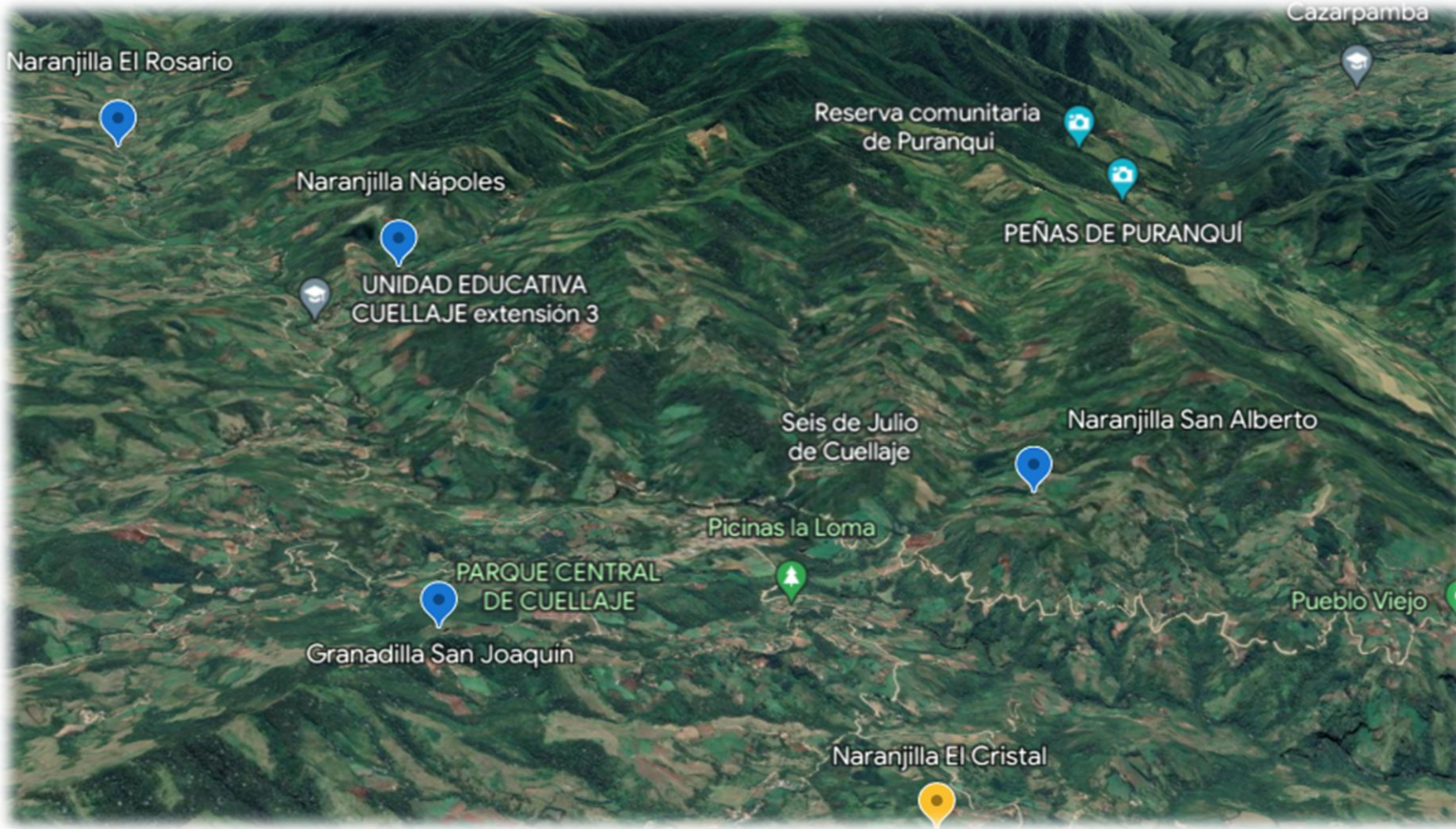
Visualización de parches sin vegetación en el cultivo

Fruta con daños visuales





## Distribución de las muestras



5 muestras

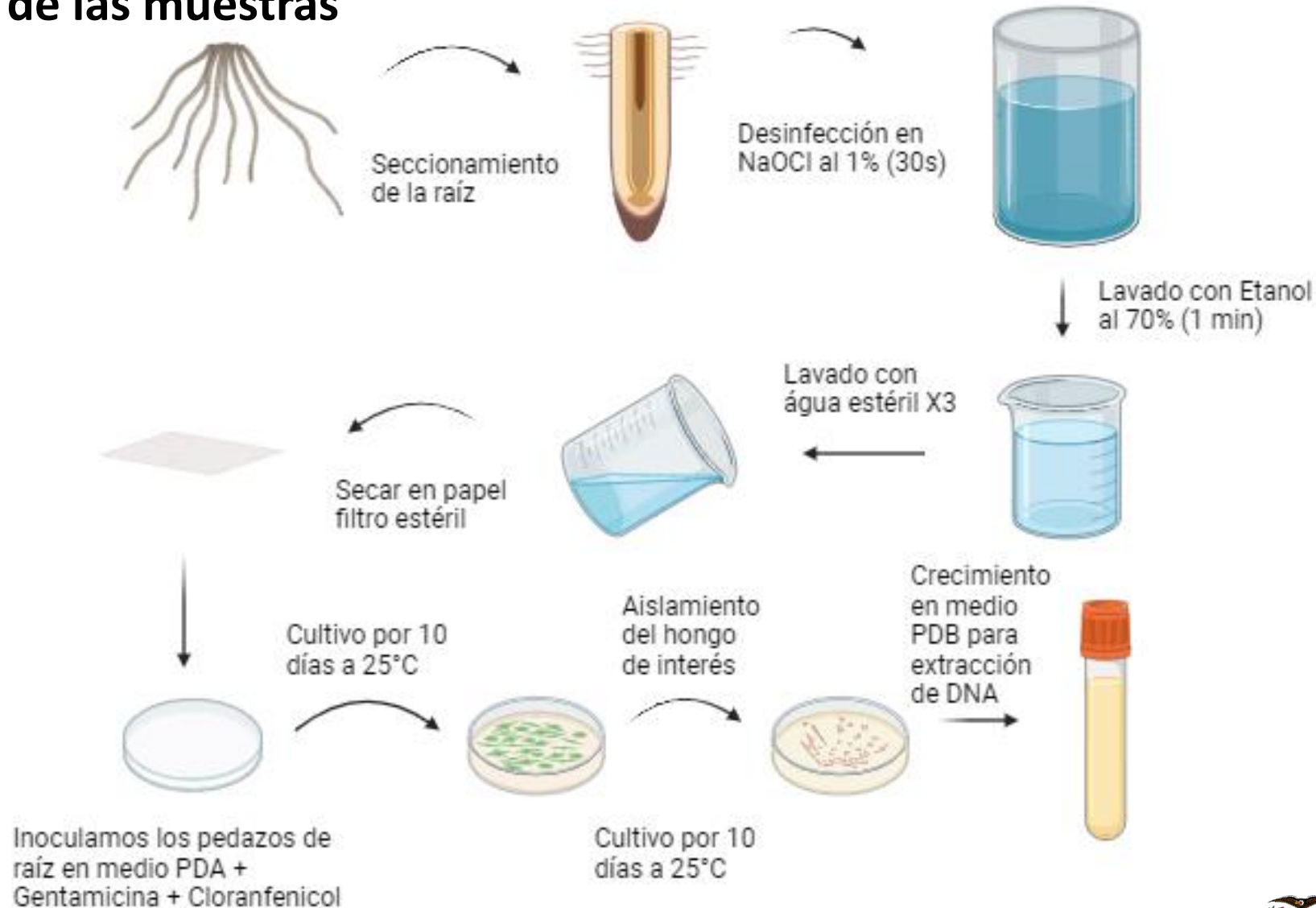
4 comunidades internas  
y una comunidad  
colindante

1 muestra de granadilla  
y 4 de naranjilla

Cultivos con grandes  
afectaciones



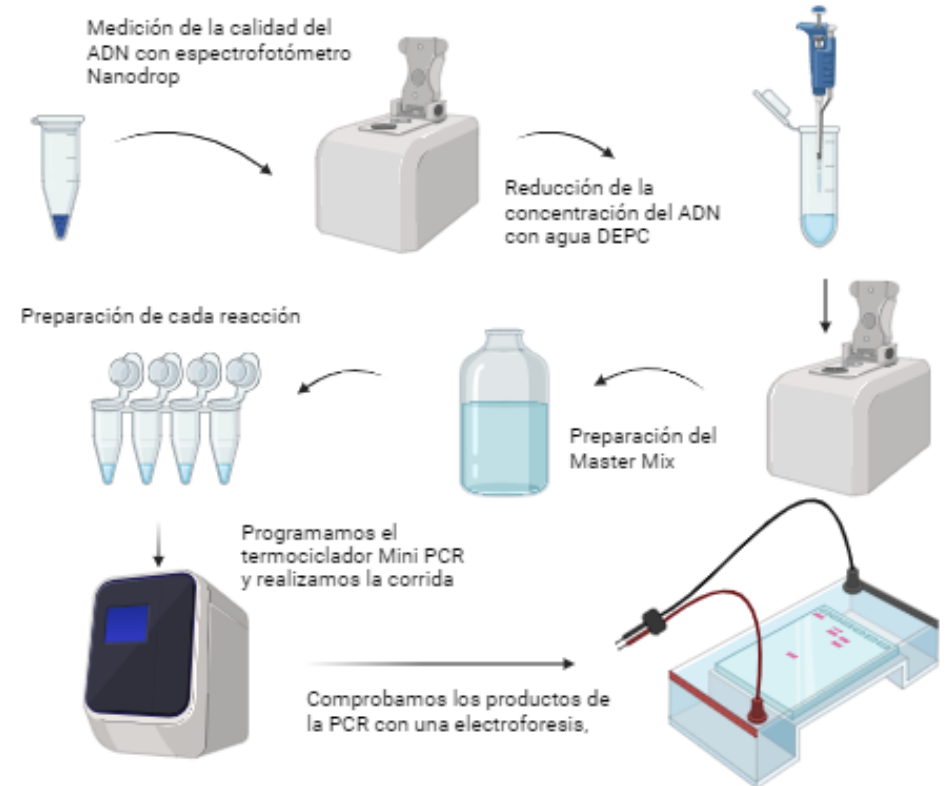
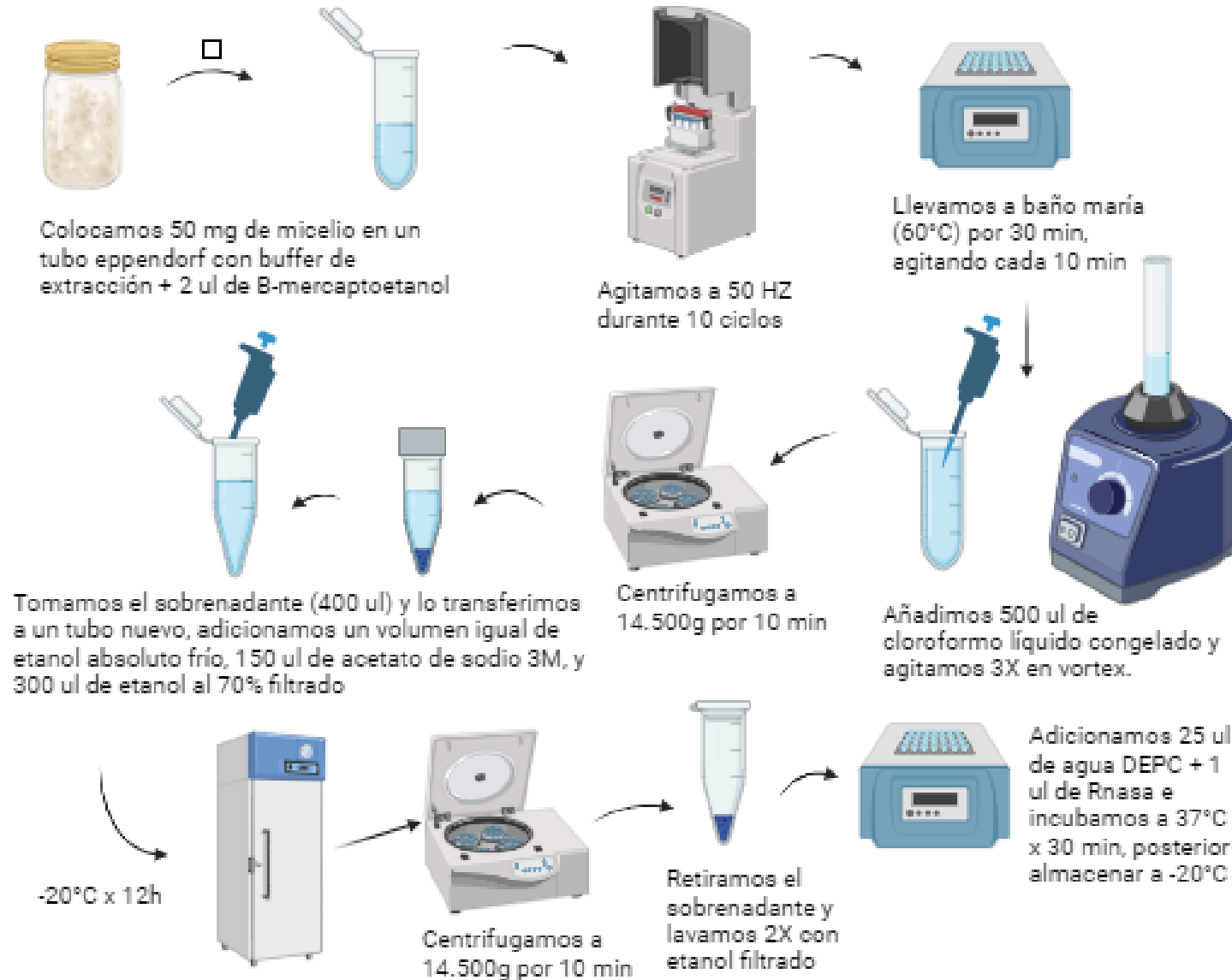
## Procesamiento de las muestras



(Geiser, 2004), (Lopera-Barrero 2008).



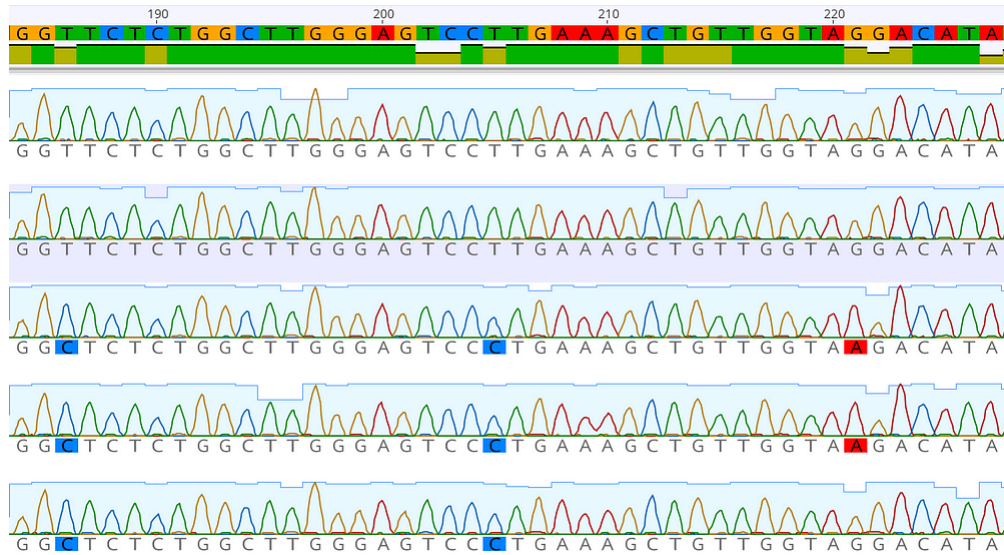
## Extracción de DNA y amplificación de región de interés



Región	Primer	Secuencia
EF-1α	EF-1	5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'
EF-1α	EF-2	5'- GGARGTACCAAGTSATCATG-3'

(Geiser, 2004), (Promega, 2021) (O'Donnell K. W., 2015), (Lopera-Barrero 2008).



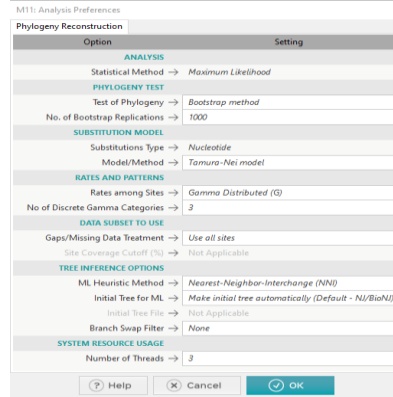


## Comparación en BLAST (GENBANK) con otras secuencias

Species/Abbrv	Accession	Length	Identical	Positives	Score	E-value	Bit score	Max. Identity
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium foetens</i> strain CBS:110286 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium foetens</a>	1570	1570	100%	0.0	99.77%	1773	<a href="#">MT011001.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium globosum</i> strain CBS:428.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium globo...</a>	1548	1548	100%	0.0	99.30%	1768	<a href="#">MT010993.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium xyloarioides</i> strain NRRL 25486 translation elongation factor 1-alpha (TEF1).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium xyloari...</a>	1548	1548	100%	0.0	99.30%	1763	<a href="#">MN193874.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium dlamini</i> strain NRRL 13164 translation elongation factor 1-alpha (TEF1)mRNA_complete cds	<a href="#">Fusarium dlamini</a>	1548	1548	100%	0.0	99.30%	1383	<a href="#">KU171721.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium ramigenum</i> strain CBS:418.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium ramig...</a>	1543	1543	100%	0.0	99.18%	1766	<a href="#">MT011012.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium pseudoanthophilum</i> strain CBS:414.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_compl...	<a href="#">Fusarium pseud...</a>	1543	1543	100%	0.0	99.18%	1765	<a href="#">MT011006.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium brevicatenulatum</i> strain CBS:404.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete...	<a href="#">Fusarium brevic...</a>	1543	1543	100%	0.0	99.18%	1768	<a href="#">MT011005.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium ramigenum</i> strain NRRL 25208 translation elongation factor 1-alpha (TEF1).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium ramig...</a>	1543	1543	100%	0.0	99.18%	1766	<a href="#">MN193867.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium napiforme</i> strain CBS:748.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium napifo...</a>	1543	1543	100%	0.0	99.18%	1768	<a href="#">MT011011.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium lactis</i> strain NRRL 25200 translation elongation factor 1-alpha (TEF1).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium lactis</a>	1543	1543	100%	0.0	99.18%	1770	<a href="#">MN193862.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium nygamai</i> strain CBS:749.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium nygamai</a>	1537	1537	100%	0.0	99.07%	1770	<a href="#">MT011009.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium pseudonygamai</i> strain CBS:417.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete...	<a href="#">Fusarium pseud...</a>	1537	1537	100%	0.0	99.07%	1767	<a href="#">MT011008.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium denticulatum</i> strain CBS:407.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium dentic...</a>	1537	1537	100%	0.0	99.07%	1768	<a href="#">MT011002.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium guttiforme</i> strain CBS:409.97 translation elongation factor 1 alpha (tef1a).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium guttifo...</a>	1537	1537	100%	0.0	99.07%	1764	<a href="#">MT010999.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium begoniae</i> strain NRRL 25300 translation elongation factor 1-alpha (TEF1).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium begon...</a>	1537	1537	100%	0.0	99.07%	1764	<a href="#">MN193858.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium tjaetaba</i> translation elongation factor 1-alpha (TJAE_6232).partial mRNA	<a href="#">Fusarium tjaetaba</a>	1537	1537	100%	0.0	99.07%	1383	<a href="#">XM_037352823.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium phyllophilum</i> strain NRRL 13617 translation elongation factor 1-alpha (TEF1).gene_complete cds	<a href="#">Fusarium phyllo...</a>	1531	1531	100%	0.0	98.95%	1769	<a href="#">MN193864.1</a>

Limpieza de los fragmentos de DNA con el programa Genious (2023).

Realización del árbol filogenético en base al mejor modelo posible (TN93 + G)



Species/Abbrv	Sequence
1. G1 SJOGEF1 2218R.ab1	G A G G G C C A G C C C G G T G A C A A C G T T G G T T C A A C G T G A A G A A C G T C C C G T C A A G G A C A T C C G A C
2. N1 CRS EF1 2.2 reads from N1 EF1 assembled using Geneious	G A G G G T C T T C C C G G T G A C A A C G T C G G T T C A A C G T G A A G A A C G T C C C G T C A A G G A G A T C C G A C
3. N2 SALN EF1 983F.ab1	G A G G G C C A G C C C G G T G A C A A C G T T G G T T C A A C G T G A A G A A C G T C C C G T C A A G G A C A T C C G A C
4. N4 NAPN EF1 983F.ab1	G A G G G C C A G C C C G G T G A C A A C G T T G G T T C A A C G T G A A G A A C G T C C C G T C A A G G A C A T C C G A C
5. N5 ROSN EF1 2.2 reads from N5 EF1 assembled using Geneious	G A G G G C C A G C C C G G T G A C A A C G T T G G T T C A A C G T G A A G A A C G T C C C G T C A A G G A C A T C C G A C

Alineamiento con secuencias descargadas a través del algoritmo MUSCLE en MEGA X

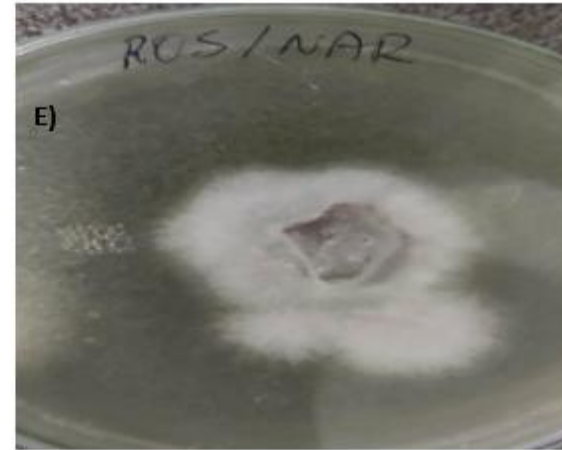
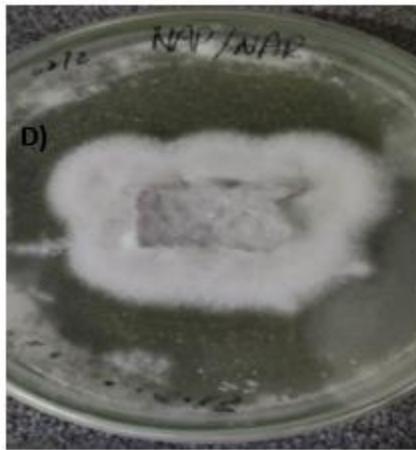
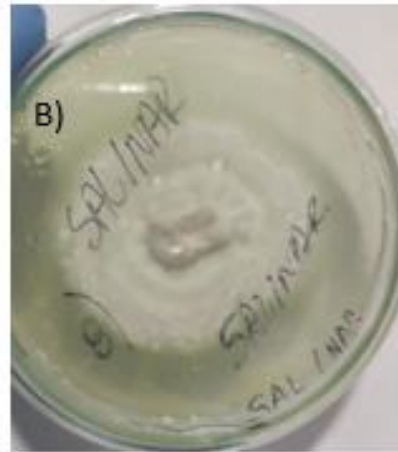
# ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión**
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Crecimiento  
No Uniforme

Micelio en medio  
líquido PDB

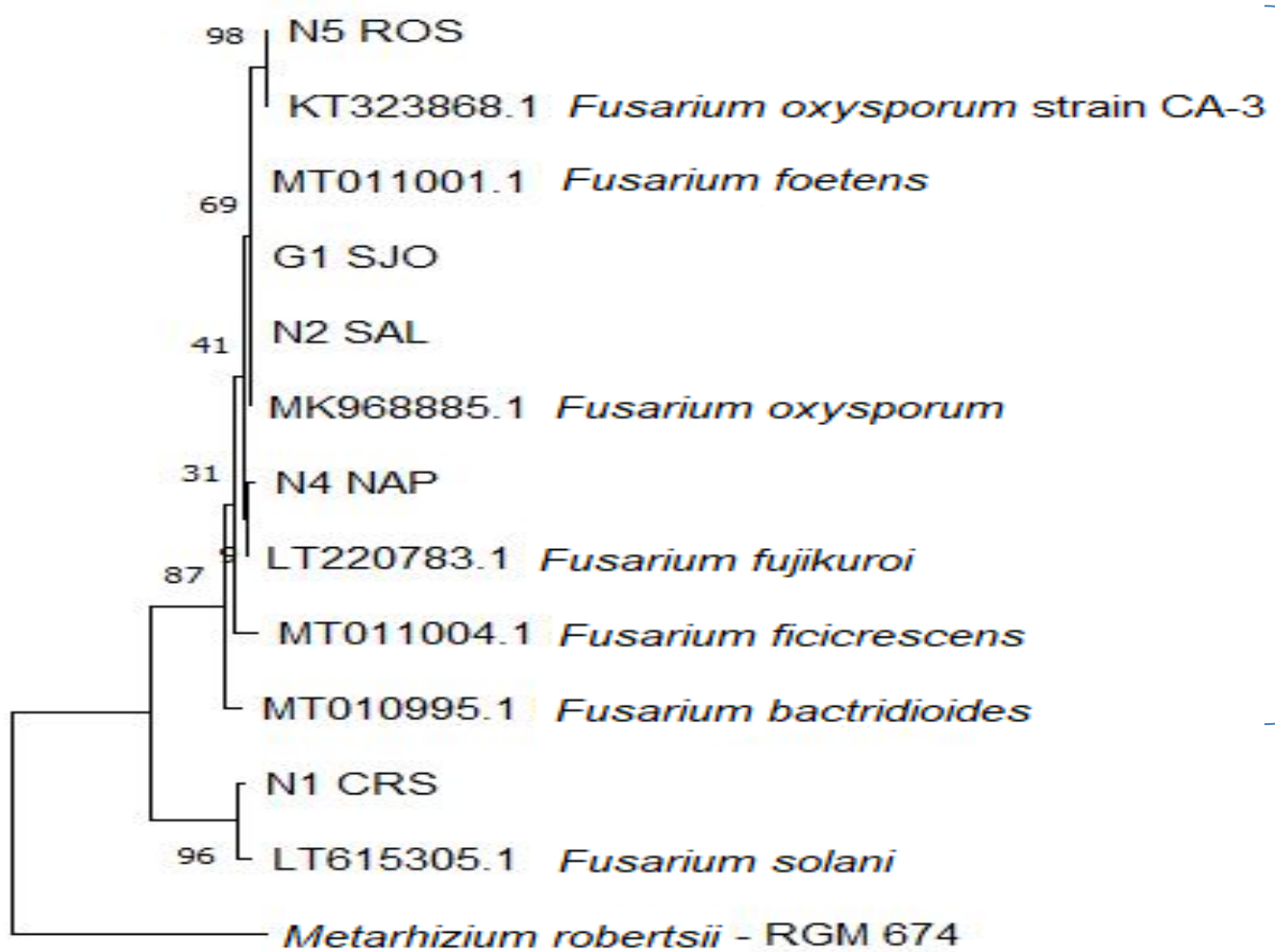


Los aislados A, B y C presentan un micelio algodonoso de color rosado en los bordes y blanco en el centro a diferencia de los aislados D y E, los cuáles presentaron únicamente coloración blanca.

## Identificación de los aislados

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Código de la muestra	Especie Tipo	Material	Porcentaje de identidad	Número de accesión	Especie no Material Tipo	Porcentaje de identidad	Número de accesión
G1_SJO	Fusarium foetens		99.77 %	MT011001.1	Fusarium oxysporum	99.88 %	MK968885.1
N1_CRS	Fusarium ficicrescens		95.33 %	MT011004.1	Fusarium solani	99.22 %	LT615305.1
N2_SAL	Fusarium foetens		99.78 %	MT011001.1	Fusarium oxysporum	99.89 %	MK968885.1
N4_NAP	Fusarium bactridioides		99.18 %	MT010995.1	Fusarium fujikuroi	99.46 %	LT220783.1
N5_ROS	Fusarium foetens		99.36 %	MT011001.1	Fusarium oxysporum	99.89 %	KT323868.1



Clado 1: Formado por FOEC y FFEC.

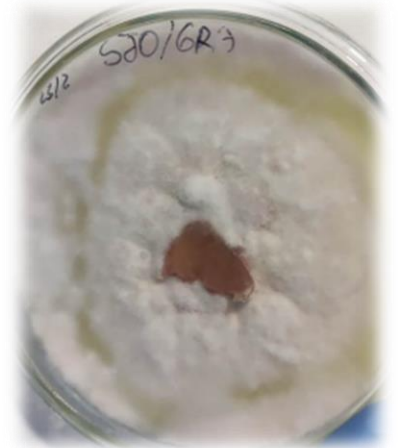
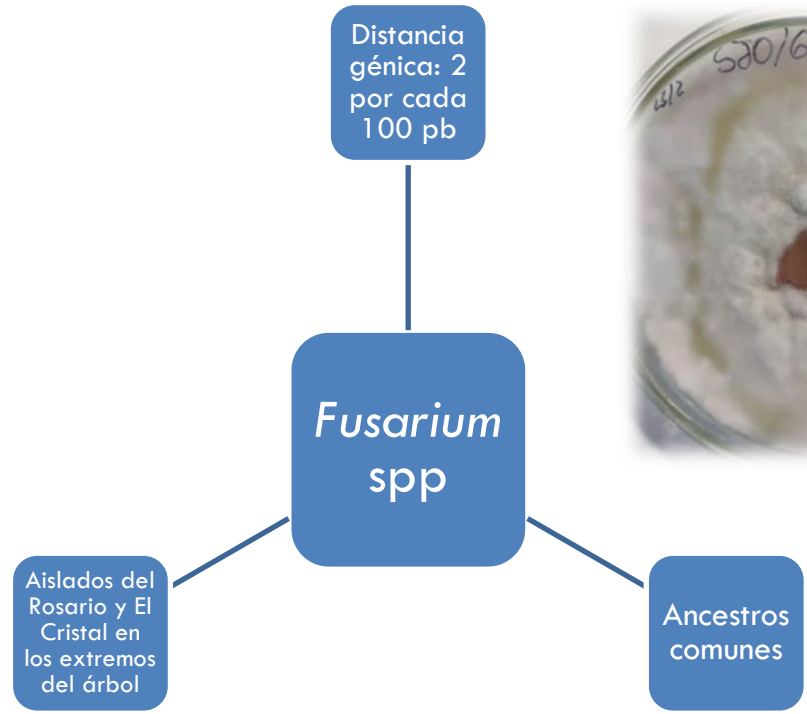
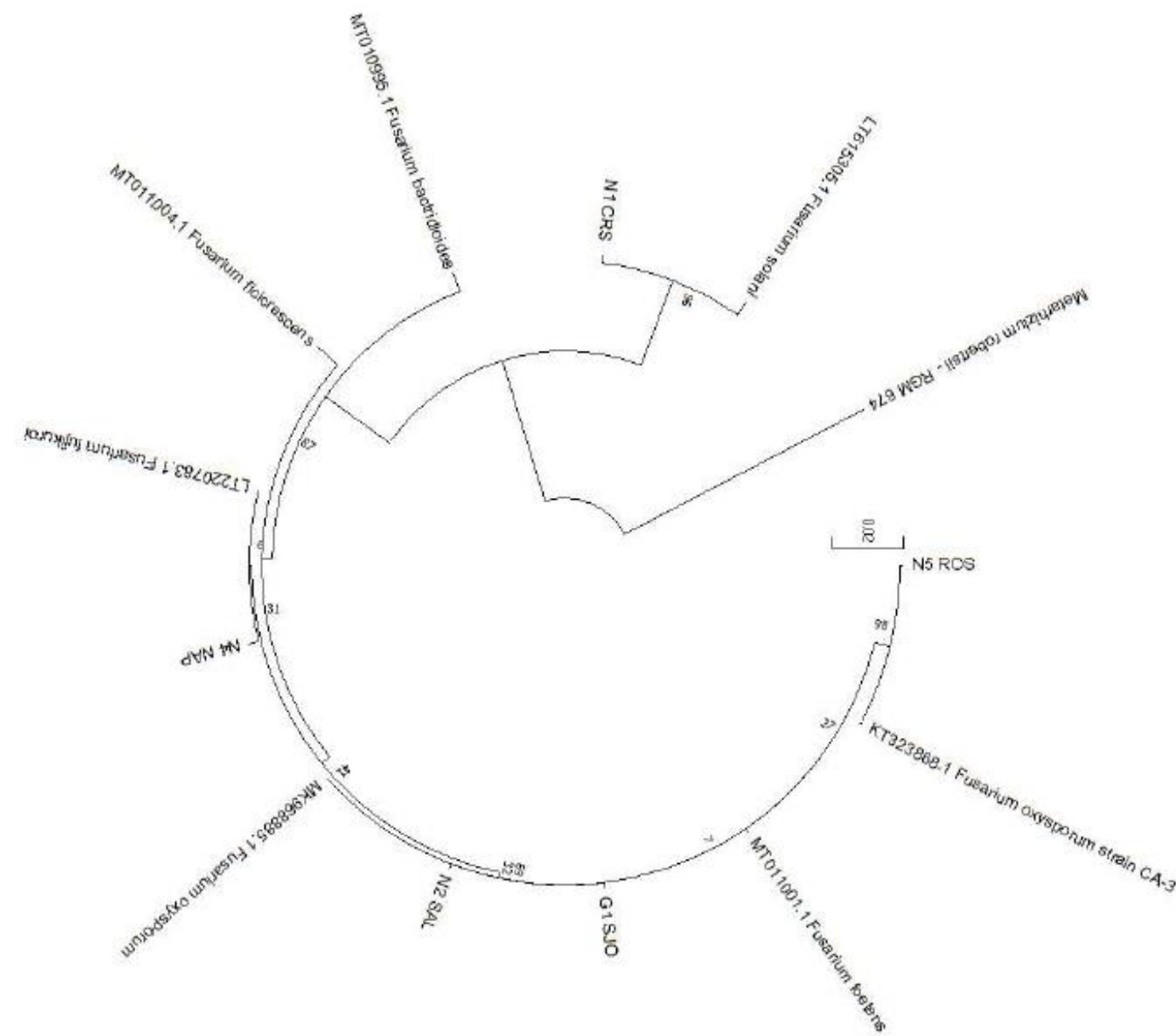
Clado 2: Formado por FSEC.

0.02



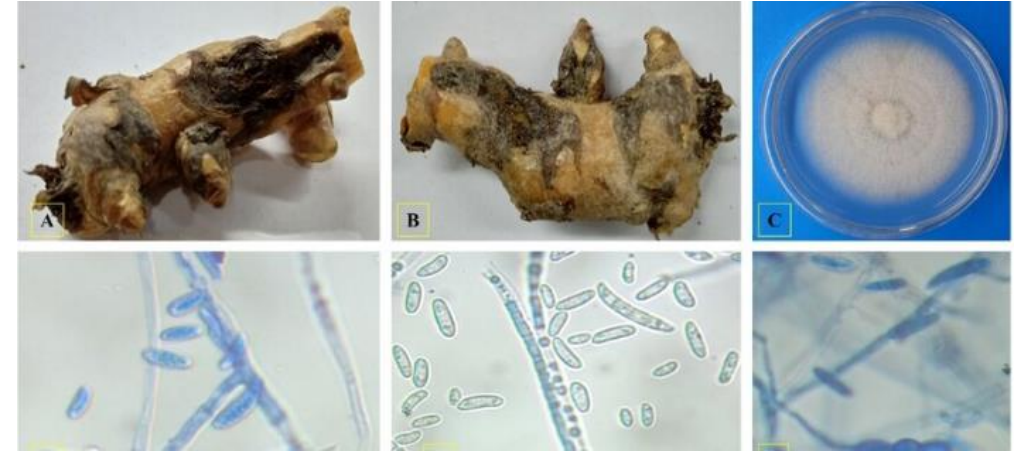
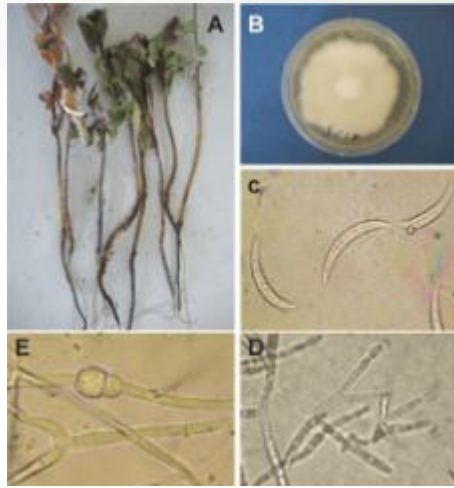
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Árbol Filogenético Circular

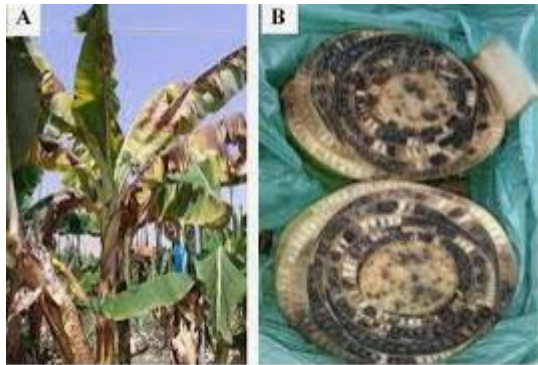


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

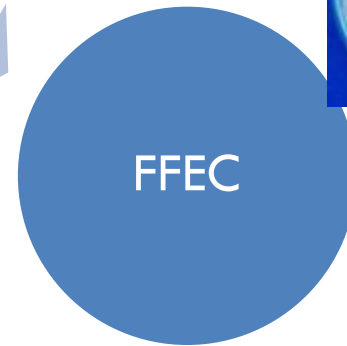
Marchitamiento en Pistacho (*Pistacia vera* L).



Marchitamiento en cúrcuma (*Curcuma longa* L)




Bananas Cavendish afectadas por *Fusarium oxysporum*.



Plantas de maíz (*Zea mays*) con pudrición basal generada por miembros del FFEC.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
-  **Conclusiones**
- Recomendaciones
- Agradecimientos





# CONCLUSIONES

• Se logró el aislamiento de *Fusarium* spp. a partir de muestras de 5 comunidades de la parroquia 6 de Julio de Cuellaje, 4 provinieron de plantaciones de naranjilla y una provino de una plantación de granadilla.


• La identificación molecular permitió conocer las especies de *Fusarium* presentes en las muestras estudiadas, los resultados obtenidos fueron analizados filogenéticamente, lo que permitió establecer la relación evolutiva entre los aislados obtenidos y otros hongos del género *Fusarium*.

• Se identificaron varias especies de *Fusarium* en plantaciones de granadilla y naranjilla en la parroquia 6 de Julio de Cuellaje, la presencia de las mismas puede tener un impacto negativo en la producción y calidad de los cultivos, ya que las especies de *Fusarium* pueden causar daños en los tejidos de las plantas, afectando su crecimiento y desarrollo. Se encontraron especies preocupantes como integrantes del FSEC, de FFEC, así como de FOEC que han sido reportados como patógenos importantes en otros cultivos y de alta importancia para los cultivos de granadilla y naranjilla.

• El estudio proporciona información valiosa sobre la diversidad y distribución de las especies de *Fusarium* en cultivos de granadilla y naranjilla en la parroquia Seis de Julio de Cuellaje. Los resultados pueden ser útiles para implementar medidas de control de plagas y enfermedades en estas plantaciones y para futuros estudios relacionados con la biología y ecología de estos hongos fitopatógenos.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
-  **Recomendaciones**
- Agradecimientos




# RECOMENDACIONES

- Implementar prácticas de manejo integrado de plagas: Dado que las especies de Fusarium pueden causar enfermedades en las plantas, es importante implementar prácticas de manejo integrado de plagas para reducir su impacto. Esto puede incluir el uso de fungicidas, rotación de cultivos y mejora de las condiciones de cultivo. .
- Se sugiere realizar estudios más amplios que incluyan más áreas geográficas y especies de plantas, con el fin de conocer la diversidad y distribución de las especies de Fusarium en la región. Asimismo, se recomienda evaluar la virulencia de las especies identificadas en plantas hospederas y la resistencia de las plantas a la infección por Fusarium.
- Realizar monitoreo regular de las plantas: El monitoreo regular de las plantas puede ayudar a detectar tempranamente la presencia de enfermedades y plagas, lo que puede evitar la propagación de enfermedades.
- Continuar la investigación: Es importante continuar la investigación para entender mejor la ecología y el comportamiento de las especies de Fusarium, así como para desarrollar estrategias de manejo de plagas más efectivas.
- Promover la diversidad de cultivos: La promoción de la diversidad de cultivos puede ayudar a reducir la propagación de enfermedades y plagas al reducir la concentración de plantas susceptibles en un área determinada.





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
-  **Agradecimientos**



# AGRADECIMIENTOS

Dr Francisco Flores Flor



Lic. Silvana Granda



Querida Familia & Amigos

