



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

### **CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA**

Proyecto de Investigación previo  
a la obtención del título de  
Ingeniero Agrónomo.

#### **Título del Proyecto de Investigación:**

“Actividad antagonista de PGPR en nematodos fitoparásitos *Pratylenchus spp.*  
y *Radopholus similis* en *Musa acuminata* (cavendish)”

#### **Autor:**

Jorge Abel Crespo Avila

#### **DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

**Quevedo – Los Ríos - Ecuador.**

**2019**

## **DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **JORGE ABEL CRESPO AVILA** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

---

**JORGE ABEL CRESPO AVILA**  
050405878-5

# CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresado **Crespo Avila Jorge Abel** realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado “Actividad antagonista de PGPR en nematodos fitoparasitos *Pratylenchus spp.* y *Radopholus similis* en *Musa acuminata* (Cavendish)”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

---

**Dr. Hayron Canchignia Martínez**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO



## Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis Crespo CTM.docx (D49119809)  
Submitted: 3/14/2019 5:33:00 PM  
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec  
Significance: 6 %

### Sources included in the report:

Marco Teorico.docx (D36794224)  
review PGPR HFCM.docx (D14962280)

### Instances where selected sources appear:

7

---

**Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

**“Actividad antagonista de PGPR en nematodos fitoparásitos *Pratylenchus spp.* y *Radopholus similis* en *Musa acuminata* (cavendish)”**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

**Aprobado por:**

---

Ph.D. Favio Herrera Equez  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

---

Ph.D. Víctor Guamán Sarango  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ph.D. Marisol Rivero Herrera  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Quevedo – Los Ríos- Ecuador**  
**2019**

## AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación:

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos durante los 5 años de estudio.

Al Director de tesis, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, por su amistad, enseñanza, apoyo, confianza y el seguimiento constante para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A todos los docentes que compartieron sus conocimientos en mi carrera universitaria en manera especial al Ing. Cesar Varas, Ing. Ignacio Sotomayor, Ec. Flavio Ramos, Ing. Leonardo Matute, por brindarme su amistad.

A los Ingenieros Ángel Verdesoto, Ángel Cedeño, Jorge Rodríguez y Luis Vera por brindarme su amistad, e impartir sus conocimientos cada vez que les preguntaba cualquier duda y su apoyo incondicional.

A mis dos amigos y compañeros de aula y de investigación durante los 5 años Gabriel y Byron por su amistad, confianza y apoyo durante el proyecto de investigación y toda mi carrera Universitaria.

A mis amigos Milton Pilaguano, Jenny Morales por su amistad, confianza, apoyo y más que todo siempre sacarme una sonrisa.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología: Ricardo Romero, Deivy Guevara, Javier Auhing, Paulina Cruz, Víctor Tubay, Víctor García, Carolina Carranza, María Cobeña, Antonio Mendoza, Jhon gracias por brindarme su amistad y apoyo.

Y de manera muy especial a mi novia Tamara Castro quien es la motivación en mi vida encaminada al éxito, fue el ingrediente perfecto para poder lograr esta dichosa y muy merecida victoria en la vida, el poder haber culminado esta tesis con éxito, y poder disfrutar del privilegio de ser agradecido, ser grato con esa persona que se preocupó por mí en cada momento y que siempre quiso lo mejor para mi porvenir.

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios por darme la vida, sabiduría, valentía para permitirme lograr esta meta en mi vida, de igual manera a mis padres maravillosos, que siempre estuvieron ahí, con sus palabras de ánimo, consejos para mi bien, por brindarme confianza, amor y apoyo incondicional, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional. Este logro se los dedico a mis padres Jorge Humberto Crespo Avila y Dolores Victoria Avila Avila

A mis hermanas Judith y Digna, que siempre me apoyaron emocionalmente y estuvieron pendientes de mí sacándome una sonrisa en todo momento.

## RESUMEN

La constante aplicación de nematicidas en el cultivo de banano al control de *Pratylenchus spp.* y *R. similis*, ha conllevado una reducción considerable de los microorganismos benéficos del suelo, generando la proliferación de patógenos y contaminación ambiental. El uso de controladores biológicos como Rizobacterias que promueven el desarrollo en plantas (PGPR) en la agricultura es una alternativa que beneficia los aspectos fisiológicos de las plantas y a su vez la reducción de nematicidas. Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ). El presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar la actividad antagonista de las PGPR en *Pratylenchus spp.* y *Radopholus similis* en *Musa acuminata*. Se realizó la caracterización morfológica y molecular mediante PCR, la pareja de primer D3A (5- GACCCGTCTTGAAACACGGA-3) y D3B (5- TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) a *Pratylenchus spp.* Se diseñaron plataformas de reproducción masiva para el nematodo, empleando discos de zanahoria y plántulas de *Musa paradisiaca*, obteniendo promedios de 13,212 y 11,156 nematodos respectivamente. Para la evaluación de los ensayos antagónicos *in vitro* se emplearon las cepas: *A. calcoaceticus* (BMR 2-12), *S. marcescens* (PM3-8), *P. veronii* (R4) y *K. variicola* (BO 3-4) Se evaluó la actividad antagonista *in vitro* en nematodo de estadio J2: obteniendo mayor antagonismo con las Cepas BMR 2-12, R4 con un promedio superior al 80%. En los ensayos *ex vivo* se emplearon tres combinaciones bacterianas (R4, BMR 2-12, PM3-8, BO 3-4) y se evaluó; el peso radicular con 164.73g, superior a las plantas sin inoculante con 66.13g; con la combinación bacteriana se obtuvo 29 raíces superior al control con 19 raíces; el porcentaje de raíces funcionales fue del 70% en comparación del control que se obtuvo el 54%; la longitud del pseudotallo fue de 37.87cm superior al control con promedio de 28.6cm; el mayor contenido de clorofila fue de 13.42mg/cm<sup>2</sup> superior al control que con 9.48 mg/cm<sup>2</sup>. La menor población de J2 se obtuvo con la combinación bacteriana con 2,100 mientras que el control con 5,100 nematodos. Con esto se comprueba la efectividad de las PGPR como una alternativa biológica para el control de fitonematodos brindando mayor protección a los cultivos.

**Palabras claves:** PGPR, *Pratylenchus*, *Radopholus similis* medio M3, PCR

## ABSTRACT

The constant application of nematicides in the banana crop to the control of *Pratylenchus* spp. and *R. similis*, has led to a considerable reduction of beneficial soil microorganisms, generating the proliferation of pathogens and environmental contamination. The use of biological controllers such as rhizobacteria that promote plant development (PGPR) in agriculture is an alternative that benefits the physiological aspects of plants and in turn the reduction of nematicides. This research work was carried out in the Microbiology and Molecular Biology laboratories of the State Technical University of Quevedo (UTEQ). The objective of this work was to evaluate the antagonistic activity of PGPR in *Pratylenchus* spp. and *Radopholus similis* in *Musa acuminata*. The morphological and molecular characterization by PCR was performed by the pair of first D3A (5-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3) and D3B (5-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) with *Pratylenchus* spp. Massive reproduction platforms were designed for the nematodes using carrot discs and *Musa paradisiaca* seedlings, obtaining averages of 13,212 and 11,156 nematodes, respectively. The evaluation of the in vitro antagonistic assays used the strains: *A. calcoaceticus* (PM2-12), *S. marcescens* (PM3-8), *P. veronii* (R4) and *K. variicola* (BO 3-4). in vitro antagonistic activity in stage J2 nematode: obtaining greater antagonism with strains M2-12, R4 with an average higher than 90 and 82% respectively. The *ex vivo* assays were used bacterial combinations (R4, PM2-12, PM3-8); the variables evaluated; were root weight with 164.73g, higher than the plants without inoculant with 66.13g; with the bacterial combination, 29 roots were obtained superior to the control with 19 roots; the percentage of functional roots was 70% compared to the control that was obtained 54%; the length of the pseudostem was 37.87cm higher than the control with an average of 28.6cm; the highest chlorophyll content was 13.42 mg / cm<sup>2</sup> higher than the control with 9.48 mg / cm<sup>2</sup>. The lowest population of J2 was obtained with the bacterial combination with 2,100 while the control with 5,100 nematodes. This confirms the effectiveness of PGPR as a biological alternative for the control of phytonematodes providing greater protection to crops.

**Keywords:** PGPR, *Pratylenchus*, *Radopholus similis* medio M3, PCR

## TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA .....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
TABLA DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS .....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xvii
CÓDIGO DUBLÍN .....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos .....	5
1.3. Justificación .....	6

### CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Cultivo de banano.....	8
2.2. Principales problemas fitosanitarios del banano. ....	8
2.3. Daños de los nematodos en el cultivo de banano .....	9
2.4. <i>Pratylenchus spp</i> .....	11
2.4.1. Distribución e importancia económica .....	11
2.4.2. Ciclo de vida e interacción huésped-patógeno .....	11
2.4.3. Comportamiento alimenticio de <i>Pratylenchus</i> .....	12
2.4.4. Morfología de las especies de <i>Pratylenchus</i> .....	13
2.4.5. Métodos de Identificación .....	15
2.5. Las PGPR's .....	16

2.5.1. <i>Pseudomonas spp.</i> .....	16
2.5.2. <i>Serratia marcescens</i> .....	17
2.5.3. <i>Acinetobacter spp.</i> .....	18
2.5.4. <i>Klebsiella variicola</i> .....	18
2.6. Control químico .....	18

### **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

3.1. Localización de la investigación .....	21
3.2. Tipo de investigación.....	21
3.3. Método de investigación.....	21
3.4. Fuentes de recopilación de información .....	21
3.5. Material Genético .....	21
3.6. Instrumentos de la investigación .....	22
3.7. Diseños y análisis estadísticos de la Investigación.....	24
3.7.1. Diseño para la plataforma de reproducción de nematodos .....	24
3.7.2. Diseño para ensayos antagonistas de las PGPR's en el control de <i>Pratylenchus spp in vitro</i> (J1) .....	25
3.7.3. Diseño para ensayos antagonistas de las PGPR's en el control de <i>Pratylenchus spp in vitro</i> (J2) .....	25
3.7.4. Diseño para la aplicación de las PGPR's en las plantas de banano williams inoculadas con <i>Pratylenchus spp.</i> en vivero .....	26
3.7.5. Diseño para la aplicación de las PGPR's en las plantas de banano williams inoculadas con <i>R. similis</i> en viveros.....	27
3.8. Manejo del experimento .....	28
3.8.1. Aislamiento de nematodos .....	28
3.8.2. Identificación de <i>Pratylenchus spp.</i> .....	28
3.8.3. Plataforma de reproducción masiva de nematodos <i>Pratylenchus spp in vivo</i> .....	29
3.8.4. Reproducción de nematodo <i>Pratylenchus spp</i> en discos de zanahorias.....	30
3.8.5. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de los sobrenadantes bacterianos hacia <i>Pratylenchus spp</i> (J1) y (J2) .....	31
3.8.6. Inoculación edáfica de PGPR's en plántulas de banano williams que contenían <i>R. similis</i> y <i>Pratylenchus spp</i> .....	32
3.8.7. Datos a registrar .....	33

### **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Resultados.....	37
----------------------	----

4.1.1.	Identificación y caracterización morfológica del nematodo <i>Pratylenchus spp.</i> J1 y J2 .....	37
4.1.2.	Identificación por PCR del nematodo <i>Pratylenchus spp.</i> .....	39
4.1.3.	Plataforma de reproducción de nematodos .....	39
4.1.4.	Determinación de la actividad antagonista de los sobrenadantes bacterianos de las PGPR sobre <i>Pratylenchus in vitro</i> .....	41
4.1.5.	Aplicación edáfica de PGPR en <i>M. acuminata</i> para el control de <i>Pratylenchus spp.</i> en vivero .....	44
4.1.5.1.	Peso del sistema radicular .....	44
4.1.5.2.	Longitud del sistema radicular.....	45
4.1.5.3.	Porcentaje de raíces funcionales.....	46
4.1.5.4.	Porcentaje de raíces no funcionales .....	46
4.1.5.5.	Número de raíces .....	47
4.1.5.6.	Longitud del pseudotallo .....	48
4.1.5.7.	Diámetro del pseudotallo.....	48
4.1.5.8.	Ritmo de emisión de hojas .....	49
4.1.5.9.	Densidad poblacional de nematodos en suelo y raíces.....	50
4.1.5.10.	Clorofila total.....	50
4.1.6.	Aplicación edáfica de PGPR en <i>M. acuminata</i> para el control de <i>R. similis</i> en vivero .....	50
4.1.6.1.	Peso sistema radicular.....	51
4.1.6.2.	Longitud del sistema radicular.....	52
4.1.6.3.	Porcentaje de raíces funcionales.....	53
4.1.6.4.	Porcentaje de raíces no funcionales .....	53
4.1.6.5.	Número de raíces .....	54
4.1.6.6.	Longitud pseudotallo .....	55
4.1.6.7.	Diámetro del pseudotallo.....	55
4.1.6.8.	Ritmo de emisión de hojas .....	56
4.1.6.9.	Densidad poblacional de nematodos en suelo y raíces.....	57
4.1.6.10.	Clorofila total.....	57
4.2.	Discusión .....	59
4.2.1.	Identificación morfológica y molecular .....	59
4.2.2.	Plataforma de reproducción .....	60
4.2.3.	Efecto antagonista de las PGPRs contra el nematodo <i>Pratylenchus spp.</i> .....	61

**CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. Conclusiones..... 66  
5.2. Recomendaciones ..... 67

**CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA**

6.1. Bibliografía..... 69

**CAPÍTULO VII. ANEXOS ..... 80**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Pratylenchus</i> .....	12
<b>Figura 2.</b> Desarrollo de los huevos de <i>Pratylenchus spp. A.</i> .....	37
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas de <i>Pratylenchus J2.</i> .....	38
<b>Figura 4.</b> Amplificación del gen al ADN Ribosomal 26S de <i>Pratylenchus spp.</i> .....	39
<b>Figura 5.</b> Plataformas de reproducción del nematodo <i>Pratylenchus spp</i> .....	40
<b>Figura 6.</b> Plataforma de reproducción masiva del nematodo .....	40
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de Inhibición de eclosión de huevos de <i>Pratylenchus spp.</i> .....	41
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de antagonismo de sobrenadantes bacterianos sobre <i>Pratylenchus</i> <i>J2.</i> .....	42
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de antagonismo de sobrenadantes bacterianos crecidos en el medio <i>M3.</i> .....	43
<b>Figura 10.</b> Efectos de los sobrenadantes bacterianos sobre <i>Pratylenchus</i> .....	44
<b>Figura 11.</b> Efectos de las combinaciones bacterianas sobre el peso del sistema radicular	45
<b>Figura 12.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del sistema radicular .....	45
<b>Figura 13.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces funcionales .....	46
<b>Figura 14.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces no funcionales .....	47
<b>Figura 15.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el número de raíces .....	47
<b>Figura 16.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del pseudotallo.....	48
<b>Figura 17.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el diámetro del pseudotallo ....	49
<b>Figura 18.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el ritmo de emisión de hojas ..	49
<b>Figura 19.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la población de nematodos en suelo y raíces.....	50
<b>Figura 20.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el contenido clorofila total.....	51
<b>Figura 21.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el peso del sistema radicular ..	52
<b>Figura 22.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del sistema radicular .....	52
<b>Figura 23.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces funcionales .....	53

<b>Figura 24.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces no funcionales.....	54
<b>Figura 25.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el número de raíces.....	54
<b>Figura 26.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del pseudotallo.....	55
<b>Figura 27.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el diámetro del pseudotallo....	56
<b>Figura 28.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el ritmo de emisión de hojas ..	56
<b>Figura 29.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre las poblaciones de nematodos en el suelo y raíces.....	57
<b>Figura 30.</b> Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el contenido de clorofila total	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Banco de cepas bacterianas UTEQ (Caracterización morfológica) .....	22
<b>Tabla 2.</b> Esquema del Análisis de Varianza plataforma de reproducción de <i>Pratylenchus</i> 24	
<b>Tabla 3.</b> Esquema de tratamientos para la evaluación de la plataforma más idónea de reproducción masiva del nematodo <i>Pratylenchus</i> .....	24
<b>Tabla 4.</b> Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas de las Rizobacterias con <i>Pratylenchus</i> (J1) .....	25
<b>Tabla 5.</b> Esquema de tratamientos para evaluar el efecto antagonista in-vitro de las PGPRs hacia el nematodo <i>Pratylenchus</i> .....	25
<b>Tabla 6.</b> Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas de las Rizobacterias con <i>Pratylenchus</i> (J2) .....	26
<b>Tabla 7.</b> Esquema de los Tratamientos para evaluar el efecto antagonista in-vitro de las PGPRs hacia el nematodo <i>Pratylenchus</i> J2 .....	26
<b>Tabla 8.</b> Esquema del Análisis de Varianza de la inoculación de bacterias y <i>Pratylenchus</i> en plantas de banano .....	26
<b>Tabla 9.</b> Esquema de los tratamientos de la inoculación de bacterias y <i>Pratylenchus</i> en plantas de banano .....	27
<b>Tabla 10.</b> Esquema de los tratamientos de la inoculación de bacterias y <i>Radopholus similis</i> en plantas de banano .....	27
<b>Tabla 11.</b> Esquema del Análisis de Varianza de la inoculación de bacterias y <i>Radopholus similis</i> en plantas de banano .....	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Aislamiento del nematodo <i>Pratylenchus</i> .....	81
<b>Anexo 2.</b> Identificación de <i>Pratylenchus</i> .....	81
<b>Anexo 3.</b> Plataforma de reproducción masiva de <i>Pratylenchus</i> in vivo .....	82
<b>Anexo 4.</b> Plataforma de reproducción in vivo.....	82
<b>Anexo 5.</b> Crecimiento de las bacterias en el medio M3.....	83
<b>Anexo 6.</b> Obtención de sobrenadantes y Preparación de las cajas de inhibición .....	83
<b>Anexo 7.</b> Esterilización del suelo .....	84
<b>Anexo 8.</b> Siembra de las plantas meristemáticas .....	84
<b>Anexo 9.</b> Plantas ordenadas por repetición .....	84
<b>Anexo 10.</b> Inoculación de las bacterias .....	85
<b>Anexo 11.</b> Inoculación de los nematodos.....	85
<b>Anexo 12.</b> Aplicación del nematocida .....	85
<b>Anexo 13.</b> Determinación de clorofila .....	86
<b>Anexo 14.</b> Diferencias entre las combinaciones bacterianas y el control inoculadas con <i>Radopholus similis</i> .....	86
<b>Anexo 15.</b> Diferencias entre las combinaciones bacterianas y el control inoculadas con <i>Pratylenchus</i> .....	87
<b>Anexo 16.</b> Embudos de Baerman con muestras de nematodos.....	87

## CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Actividad antagonista de PGPR en nematodos fitoparasitos <i>Pratylenchus spp.</i> y <i>Radopholus similis</i> en <i>Musa acuminata</i> (Cavendish)”.		
Autor:	Crespo Avila Jorge Abel		
Palabras clave:	Rizobacterias	<i>Radopholus similis</i> , <i>PGPRs</i> , <i>Pratylenchus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Serratia sp.</i> , <i>Klebsella</i>	Actividad antagonista
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2019		
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>La constante aplicación de nematicidas en el cultivo de banano al control de <i>Pratylenchus spp.</i>, <i>Radopholus similis</i> ha conllevado una reducción considerable de los microorganismos benéficos del suelo. El uso de controladores biológicos como Rizobacterias que promueven el desarrollo en plantas (PGPR) es una alternativa que beneficia los aspectos fisiológicos de las plantas y a su vez la reducción de nematicidas. El presente trabajo tuvo como objetivo, El presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar la actividad antagonista de las PGPR en <i>Pratylenchus spp.</i> y <i>Radopholus similis</i> en <i>Musa acuminata</i>. La evaluación a los ensayos antagónicos in vitro se emplearon las cepas: <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (BMR2-12), <i>Serratia marcescens</i> (PM3-8), <i>Pseudomonas veronii</i> (R4) y <i>Klebsiella variicola</i> (BO 3-4) Se evaluó la actividad antagonista in vitro en nematodo de estadio J2: obteniendo los mejores resultados con las Cepas BMR 2-12, R4 un promedio 90.9 y 82.9 destacándose de las cepas PM3-8 y BO 3-4 con promedios 69.6 y 62.2% respectivamente. Los ensayos ex vivo se emplearon combinaciones bacterianas (R4, BMR2-12, PM3-8); se evaluaron las variables; el peso radicular con 164.73g, el mayor número de raíces fue 29 raíces; el porcentaje de raíces funcionales fue del 70%; la longitud del pseudotallo fue de 37.87cm superior a los controles con promedios de; 66.13g 19cm 54% 28.6cm respectivamente. el mayor contenido de clorofila fue de 13.42mg/cm<sup>2</sup> superior al control que con 9.48 mg/cm<sup>2</sup>. La mayor población de J2 se obtuvo en control con un promedio de 5,100 mientras que 2,100 en la combinación bacteriana. Con esto se comprueba la efectividad de las PGPR como una alternativa biológica para el control de fitonematodos brindando mayor protección a los cultivos.</p>		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del banano es de importancia para el Ecuador por los ingresos que este genera para el estado y las empresas del sector privado. La exportación bananera representa el 2% del producto interno bruto (PIB) general y aproximadamente el 35% del PIB agrícola (Ministerio de Comercio Exterior, 2017). La reducción de la producción del banano se ve afectado por problemas de hongos, bacterias, virus y el ataque de nematodos parásitos principalmente *Radopholus similis* y *Pratylenchus spp.*

El nematodo del género *Pratylenchus spp.* (Lesionador) es causante de grandes pérdidas del cultivo y se encuentra distribuido a nivel mundial. Sus daños son básicamente mecánicos, con la formación de lesiones al sistema radicular que luego son invadidas por patógenos secundarios como bacterias u hongos, acelerando el proceso de degradación de las raíces. Penetran en las raíces jóvenes de las plantas hospedadoras, allí migran a través de ellas, a menudo destruyendo células. Las hembras depositan los huevos de uno en uno en el tejido radicular o en suelo y pueden producir hasta 100 huevos en su ciclo de vida.

*R. similis*, en la mayoría de los países donde se siembra banano, es el más abundante y constituye más del 70% de la población de nematodos en el tejido radicular (Guzmán *et al.*, 2012). Este nematodo se desarrolla y completa su ciclo de vida dentro de las raíces de las plantas afectadas.

Dado al intensivo uso de nematicidas los organofosforados y carbofurados que resultan perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente causando disminución de la micro fauna del suelo; surge el uso de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) como alternativa biológica para el control de distintos nematodos, además de favorecer el crecimiento de las plantas por la producción de fitohormonas aprovechables por las mismas.

Las rizobacterias promueven el crecimiento de la planta a través de diferentes mecanismos, tales como la solubilización de minerales, hormonas y otros compuestos; ayudan a controlar patógenos en el suelo, utilizando principalmente, especies del género *Pseudomonas spp.* que poseen altos índices de mortalidad contra nematodos.

Las rizobacterias tiene la capacidad de sintetizar diferentes compuestos con efectos nematicidas. Las composiciones bioquímicas de las diferentes estructuras de los nematodos hacen que sea susceptible a un amplio espectro de bacterias con actividades antagónicas durante varias etapas de su ciclo de vida

Mediante la presente investigación se busca establecer una alternativa biológica más amigable con el hombre y el medio ambiente hacia el control del nematodo *Pratylenchus spp*, con la aplicación de PGPR's que brindan resistencia a la planta hacia algunos patógenos.

# **CAPÍTULO I**

## **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de Investigación.**

### **1.1.1. Diagnóstico del Problema**

Los nematodos *R. similis* y *Pratylenchus spp* ocasionan pérdidas económicas por la disminución de la calidad y la productividad tanto en el banano como en los demás cultivos que estos afectan.

El desconocimiento sobre la capacidad nematicida que tienen las PGPR's en nematodos lesionadores de raíces como *Pratylenchus spp.* y *R. similis*, han provocado que los bananeros opten por el uso de agroquímicos tóxicos para la salud humana y poco amigables con el medio ambiente.

El uso excesivo de nematicidas con el fin de minimizar los daños ocasionadas por nematodos lesionadores, ha propiciado un mayor impacto ambiental, debido a que los nematicidas químicos empleados no son selectivos contribuyendo a la contaminación de los recursos naturales y proporcionando un desequilibrio microbiológico del suelo al afectar las poblaciones de microorganismos benéficos.

### **1.1.2. Planteamiento del Problema**

¿Existe en la actualidad insumos agrícolas amigables con el medio ambiente y el hombre que disminuya la incidencia del daño que ocasionan los nematodos *R. similis* y *Pratylenchus spp.* en cultivares de Banano?

### **1.1.3. Sistematización del Problema**

En base a la problemática abordada anteriormente se plantean las siguientes directrices:

¿Cuáles son los caracteres morfológicos de *Pratylenchus spp*?

¿Cuál de las PGPR's, presentaran mayor efecto antagónico sobre *Pratylenchus spp* en estadio J2 in vitro?

¿Cómo obtener poblaciones de *Pratylenchus spp.* en forma masiva?

¿Cuál de los tratamientos tendrá mayor efecto en el control de nematodos las tres combinaciones bacterianas o el Químico?

## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad antagonista de las PGPR's en *Pratylenchus spp* y *R. similis* en *Musa acuminata*

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Identificar molecular y morfológicamente a *Pratylenchus spp*.
- Desarrollar una plataforma de multiplicación masiva de *Pratylenchus spp*
- Establecer la capacidad antagonista in vitro de las PGPR's sobre *Pratylenchus spp*
- Evaluar los efectos que tienen las PGPR's en plántulas de banano inoculadas con *Pratylenchus spp*. y *R. similis*

### 1.3. Justificación

Este trabajo de investigación se proyecta en la búsqueda de nuevas alternativas más amigables al control de las poblaciones de nematodos en el cultivo de banano, donde la presencia de nematodos ha generado la disminución en producción superiores al 22%. Actualmente se utilizan un sinnúmero de nematicidas que presentan una efectividad que varía entre 50 – 90%, estos productos producen un desequilibrio en la micro-flora del suelo, los nematicidas químicos no provocan la muerte del nematodo a ciertas dosis, pero alteran su comportamiento limitando la capacidad parasítica del mismo, esto puede promover el desarrollo de tolerancia del nematodo contra los nematicidas

Esta investigación propone la utilización de PGPR's como bio-controladores para los nematodos parásitos de raíces en banano *R. similis* y *Pratylenchus spp.* estas bacterias también actúan como promotores del crecimiento de las plantas sin alterar el equilibrio microbiológico del suelo, contribuyendo así con el desarrollo del sector bananero en el Ecuador y la reducción del uso de nematicidas tóxicos para la salud humana y del suelo.

Además, se verifica el sinergismo por la combinación de los biocontroladores de origen bacteriano al control de *R. similis* y *Pratylenchus spp.* y favorecer al incremento de la masa radicular y otros aspectos morfológicos y fisiológicos de la planta, de la misma manera contribuirá al origen de nuevas investigaciones en beneficio de los agricultores.

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Cultivo de banano**

El banano además de ser una fruta tropical de gran demanda y preferencia en el mercado internacional (principalmente en los países del norte), es también, un alimento básico para millones de habitantes en el mundo, principalmente en África y Asia, por lo cual, es uno de los alimentos más importantes a nivel mundial. El banano es fuente de fibra, posee bajo contenido de sodio, y es la fuente más rica de vitamina B6 y potasio “lista para consumir”(Chandler, 1995).

La producción anual de banano y plátano a nivel mundial es de más de 76 millones de toneladas, lo cual genera más de 1,5 millones de empleos. Aproximadamente el 15% de la producción de banano y plátano es exportada (Price, 1995).

## **2.2. Principales problemas fitosanitarios del banano.**

Las plagas y enfermedades del banano son un problema significativo a nivel mundial. Las enfermedades pueden afectar todas las partes de la planta y pueden ser ocasionadas por hongos, bacterias y virus. Las plagas por su parte, a pesar de que parecieran tener una menor importancia general, pueden constituirse también como serios factores limitantes de la producción (Ploetz, 2004).

En el ámbito de las plagas, Ploetz (2004), señala a los nematodos *R. similis*, *P. coffeae*, *P. goodeyi* y *Helicotylenchus multicinctus* (más restringido al sub-trópico), como los de mayor distribución e importancia en el banano; asimismo, señala al picudo minador (*Cosmopolites sordidus*), como el insecto plaga de mayor importancia en el cultivo de banano.

Los nematodos son organismos pequeños de 300 a 1000  $\mu\text{m}$ , de longitud por 15 a 35  $\mu\text{m}$ , de ancho. Su diámetro pequeño hace que no sean observables a simple vista, pero se pueden ver con facilidad en el microscopio. Los nematodos tienen, en general, forma de anguila y en corte transversal se ven redondos, presentan cuerpos lisos no segmentados y carecen de patas u otros apéndices (Agrios, 2010).

Los nematodos que producen lesiones como *R. similis* y *P. coffeae* se consideran plagas económicamente importantes para el banano (Sundararaju, 2002).

*R. similis* es un endoparásito migratorio (Araya, 2003). En los estadios infectivos penetran las capas de la raíz con poco efecto sobre el cilindro central y vacían el contenido celular del parénquima cortical. Esto resulta en cavidades, túneles y en la necrosis de los tejidos que se

tornan rojizos y finalmente negruzcos. Estas lesiones generalmente se unen produciendo la atrofia del tejido radical. En infecciones severas, *R. similis* migra hasta el cormo provocando lesiones de color pardo-rojizo-negro, las cuales pueden verse en los hijos recién brotados (Araya, 2003).

Las perforaciones hechas por los nematodos y la necrosis que se produce, favorece la pudrición por hongos, bacterias y excesos de humedad. En estados avanzados, las plantas carecen de raíces absorbentes, lo cual afecta directamente a la absorción de agua y nutrientes y provoca el alargamiento del período de crecimiento (Araya, 2003).

La acumulación de las poblaciones de *R. similis* y *P. coffeae* varían en gran medida dependiendo de la estación y otras condiciones ecológicas como la precipitación, temperatura del suelo, humedad del suelo y la disponibilidad de raíces susceptibles que desempeñarían sus propios papeles en la acumulación de las poblaciones (Sundararaju, 2002).

Las pérdidas en producción provocadas por el daño de nematodos son muy variables las estimaciones de reducciones en plantaciones comerciales del Ecuador son diversas representando 22 % de pérdidas en rendimiento (Chávez *et al.*, 2009).

Según (Vargas *et al.*, 2015) manifiestan que todos estos nematodos son una gran amenaza en la reducción de la productividad del cultivo de banano y representa un potencial destructivo considerable para otros cultivos comerciales. Su efecto debe ser observado, evaluado y analizado con detalles en los sistemas productivos actuales, de manera que permitan el desarrollo y conservación del agro-ecosistema.

### **2.3. Daños de los nematodos en el cultivo de banano**

Los síntomas pueden variar de acuerdo con el hábitat parasítico del nematodo, la relación parásito-hospedante y otros factores tales como la edad de la planta y sus condiciones fisiológicas (Guzmán *et al.*, 2012).

*R. similis* es un nematodo que se alimenta de raíces y cormos de banano y plátano en todo el mundo, afectando el crecimiento y desarrollo de este cultivo, con pérdidas en producción entre el 20 y 100%. Debido a que estas musáceas han sido tradicionalmente propagadas por semilla asexual mediante colinos “cormos” o cepas “rizomas” y a que este nematodo se caracteriza por ingresar y movilizarse dentro de las células de raíces y los cormos, esto ha

permitido que el intercambio de material de siembra infectado sea el principal medio de su diseminación alrededor del mundo (Guzmán, 2011).

Las perforaciones hechas por los nematodos y la necrosis que se produce, favorece la pudrición por hongos, bacterias y excesos de humedad. En estados avanzados, las plantas carecen de raíces absorbentes, lo cual afecta directamente a la absorción de agua y nutrientes y provoca el alargamiento del período de crecimiento (Araya, 2003).

La acumulación de las poblaciones de *R. similis* y *P. coffeae* variaría en gran medida dependiendo de la estación y otras condiciones ecológicas como la precipitación, temperatura del suelo, humedad del suelo y la disponibilidad de raíces susceptibles que desempeñarían sus propios papeles en la acumulación de las poblaciones (Sundararaju, 2002).

Según (Gauggel *et al.*, 2003) manifiestan que el deterioro del sistema radical del banano y su efecto adverso en la producción se debe a factores climáticos, edáficos (físicos y químicos) y biológicos.; un deterioro lento y gradual debido a la degradación paulatina de las propiedades físicas y químicas del suelo, deterioro de la actividad biológica, sistemas de drenajes deficientes (diseño, implementación, manejo y mantenimiento) y prácticas pobres de manejo del cultivo (control de enfermedades, nemátodos, insectos y malezas).

Las pérdidas en producción inducidas por el daño de nematodos son muy variables las estimaciones de reducciones en plantaciones comerciales del Ecuador son diversas representando 22 % de pérdidas en rendimiento (Chávez *et al.*, 2009).

En Ecuador la presencia de este nematodo es una de las causas de la reducción de la producción en muchas plantaciones, estimadas en un 17 a 78% (Triviño & Farras, 2014).

#### ➤ **Especies cripticas**

Se entiende como especies criticas aquellas que han sufrido procesos de especializacion pero que no presentan cambios morfologicos importantes, lo que hace difícil su identificación empleando únicamente métodos morfológicos.

La separación de las especies dentro del género *Pratylenchus* es difícil por a gran variabilidad intraespecífica y el pequeño número de características diagnósticas disponibles para diferenciar a nivel de especie (Castillo & Vovlas, 2007). *Pratylenchus* posee especies cripticas como es el caso de *P. coffeae* (Palomares *et al.*, 2012).

## **2.4. *Pratylenchus spp***

Pocas especies de nematodos parásitos de plantas (PPN, por sus siglas en inglés) se reconocen actualmente como invasivas, pero esto se debe en gran parte a una investigación y reconocimiento insuficientes. La extracción, identificación y cuantificación del daño que causan pueden ser difíciles. Muchas especies de PPN ahora son reconocidas como invasivas y de interés para la bioseguridad (Singh *et al.*, 2013).

### **2.4.1. Distribución e importancia económica**

Según (Luc *et al.*, 2005) ocho especies de *Pratylenchus*, han sido reportadas atacando *Musa spp.* alrededor del mundo. Pero solo dos de estas están relativamente diseminadas y reconocidas como patógenos, estas son *P. coffeae* y *P. goodeyi*. y también reporta que en el cultivo del café los nematodos lesionadores que pueden afectar son *P. coffeae*, *P. goodeyi*, *P. brachyurus*, *P. pratensis* y *P. loosi*.

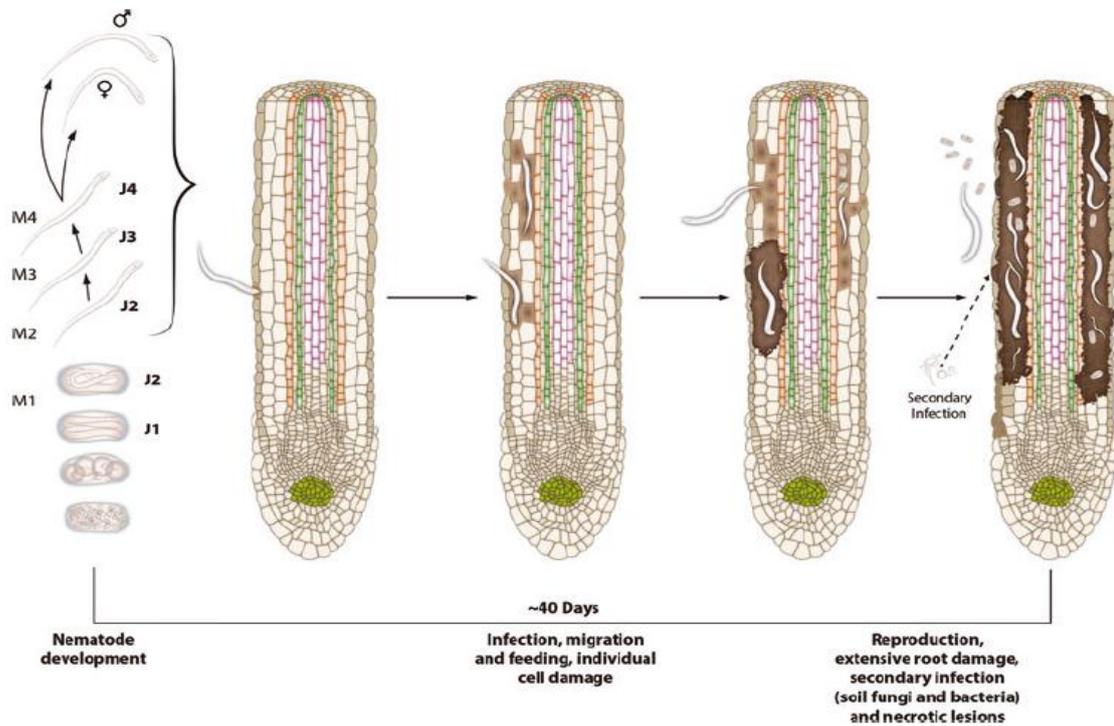
Los nematodos de la raíz del género *Pratylenchus* son reconocidos como una de las principales restricciones nematológicas en cultivos de importancia económica primaria, principalmente por sus pérdidas de cultivos, amplio rango de hospederos y la distribución mundial de algunas especies (Zamora *et al.*, 2016).

Los nematodos parásitos de plantas del género *Pratylenchus* se encuentran entre las tres principales plagas de nematodos más importantes de los cultivos y plantas hortícolas en todo el mundo. (Jones & Fosu-Nyarko, 2014)

Hay más de 70 especies descritas, la mayoría son polífagas con una amplia gama de plantas hospedadoras. Debido a que no forman patrones de alimentación obvios característicos de los endoparásitos sedentarios (por ejemplo, agallas o quistes), y todas las etapas similares a gusanos son móviles y pueden entrar y salir de las raíces del huésped, es más difícil reconocer su presencia y el daño que causan (Jones & Fosu-Nyarko, 2014).

### **2.4.2. Ciclo de vida e interacción huésped-patógeno**

*Pratylenchus spp.* son endoparásitos de raíces intracelulares polífagos, migratorios, con un ciclo de vida que dura de 3 a 9 semanas, según las especies y las condiciones. La temporización de los ciclos de vida de las especies de *Pratylenchus* se ha estudiado más a menudo cuando se mantiene *in vitro*, y varía con la especie, la temperatura, la humedad y el nivel de asociación compatibles con huéspedes de plantas (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Pratylenchus***

Se desarrollan dentro del huevo hasta la primera etapa juvenil (J1), esto se traduce en la segunda etapa juvenil (J2) que luego sale del huevo. Todas las etapas juveniles y adultas pueden infestar las raíces de las plantas hospedantes, las etapas móviles juvenil y adulta pueden entrar y salir de las raíces. Aunque *Pratylenchus spp.* son endoparásitos migratorios pasan la mayor parte de su ciclo de vida en las raíces de la planta huésped, pero también se pueden encontrar en la superficie de la raíz y en el suelo adyacente. Cuando están maduras, las hembras ponen huevos ya sea dentro de las raíces infestadas, depositadas individualmente o en grupos o filas, o en el suelo adyacente (Castillo & Vovlas, 2007).

### **2.4.3. Comportamiento alimenticio de *Pratylenchus***

Durante el crecimiento de la raíz, las células del capuchón de la raíz denominadas "células limítrofes" se desprenden y contribuyen a la rizosfera mediante la secreción de proteínas antimicrobianas, fitoalexinas, proteínas de arabinogalactano y pectinas, que pueden atraer o repeler microorganismos patógenos, incluidas las PPN. De estos, los nematodos son atraídos quimiotácticamente a las células del borde donde se agregan y su movilidad se reduce (Driouich *et al.*, 2013).

Estos nematodos pueden alimentarse de pelos radicales, células epidérmicas, corticales y estelares, y debido a que pueden salir y entrar en las raíces, un nematodo individual podría

acceder y dañar varias raíces. La pista de invasión inicial a menudo es seguida por otros nematodos, posiblemente atraídos por compuestos liberados de células dañadas. La infección de la raíz se caracteriza por lesiones marrones en los puntos de entrada, migración, alimentación y salida. Su alimentación provoca una reducción en el crecimiento de la raíz, retraso del crecimiento y distorsión de la raíz. Esto se acompaña de la formación de lesiones extensas, áreas necróticas, pardeamiento y muerte celular, que resultan tanto del daño por alimentación directa como de la infección secundaria por hongos o bacterias del suelo (Saeed *et al.*, 1998).

Las etapas J2 y J3 tienden a alimentarse de los pelos de la raíz, y las etapas posteriores se mueven hacia la raíz para alimentarse de forma endoparásita. Después de una breve alimentación (de unos pocos segundos a 2 minutos), los pelos radiculares sobreviven hasta 10 horas, pero después de una alimentación más extensa, las células generalmente mueren dentro de una hora (Zunke, 1990).

#### **2.4.4. Morfología de las especies de *Pratylenchus***

*Pratylenchus* posee características morfológicas que permiten diferenciarlo de otros géneros. La estructura cefálica se caracteriza por ser plana. El estilete es corto y oscuro. El esófago traslapa ventralmente con el intestino (Davis & Mac Guidwin, 2000).

##### **✚ Pared del cuerpo**

La pared corporal está compuesta por una cutícula, una hipodermis o epidermis y la musculatura somática. (Kisiel *et al.*, 1972) demostraron que la ultra-estructura de la cutícula en *P. penetrans* era similar al patrón general entre los nematodos y comprendía tres zonas principales: la cortical, la matriz y las capas basales. La cutícula tiene dos funciones principales:

- Protege el nematodo del ambiente externo e interactúa con él.
- Es crucial para el movimiento, ya que evita la distorsión del cuerpo durante la contracción muscular.

##### **✚ Longitud y forma del cuerpo**

La longitud del cuerpo varía desde un valor promedio de aproximadamente 0.36 mm tan grande como 0.74mm. Solo este carácter no es muy útil para la identificación, debido al gran número de especies tienen una longitud corporal bastante similar. Además, dentro de una especie, la longitud del cuerpo puede ser modificada por factores bióticos y abióticos, por

ejemplo, el hábito corporal en la relajación es bastante homogéneo dentro del género y puede describirse como ligeramente curvado ventral a casi recto. La longitud del cuerpo, así como otros valores morfométricos en especímenes fijos, generalmente se encontraron más pequeños que los de especímenes vivos de *Pratylenchus* (Inserra *et al.*, 2007).

#### **Región labial**

La región labial no está bien definida, compensada por un estrechamiento del contorno corporal. Su forma es característica de ciertas especies, por ejemplo, *P. brachyurus* y *P. thornei* (Corbett & Clark, 1983).

#### **Estilete**

El estilete es robusto con botones basales bien desarrollados. La parte cónica está fuertemente esclerotizada como lo muestran (Chen & Wen, 1972). El tamaño promedio del estilete en *Pratylenchus* es aproximadamente 16µm. El rango de longitud del estilete dentro de una especie generalmente varía entre 1 y 3µm, dependiendo de la especie y la población (Loof, 1991).

#### **Sistema nervioso**

El centro del sistema nervioso consiste en un anillo de nervio circofaríngeo con ganglios asociados a partir de los cuales los nervios longitudinales se extienden en sentido anterior y posterior. Las únicas partes del sistema nervioso fácilmente reconocibles bajo el microscopio de luz son el propio anillo nervioso y los órganos receptores somáticos (fásmidos).

#### **Intestino**

El intestino es un tubo simple con un lumen distinto. Está revestido por un epitelio celular de una capa que contiene muchos glóbulos lipídicos (Kisiel *et al.*, 1974).

#### **Sistema reproductivo**

El sistema reproductivo de la hembra adulta consiste en una única gónada dirigida anteriormente y un saco uterino post-vulvular. La posición relativa de la vulva (es decir, V%) en *Pratylenchus spp.* varía, siendo aproximadamente el 78%. El ovario es más corto en las especies monosexuales que en las bisexuales. El oviducto está representado por una constricción relativamente corta entre el ovario y la espermateca y carece de luz visible. Se compone de dos filas de cuatro células (Bert *et al.*, 2003). A la espermateca le sigue el útero, que consiste en un tubo de dos partes forrado con células planas y es muscular y extensible.

El sistema reproductor masculino es monorchic y, al no ofrecer tanta variedad de formas y estructuras como el sistema femenino, es de menor importancia taxonómica (Loof, 1978). El testículo consiste en una fila múltiple de espermatogonia. El conducto deferente generalmente está lleno de espermatozoides y se une ventralmente a la cloaca. Las espículas ligeramente arqueadas descansan sobre un sencillo gubernáculo en forma de canal, que es inamovible y no está provisto de músculos.

#### Cola

(Frederick & Tarjan, 1989) diferenciaron siete tipos de forma de cola y punta de cola, que incluyen: puntiagudas, digitalizadas, finamente puntiagudas, hemisféricas, subdigitadas, subhemisféricas y truncadas; la punta está anulada, hendida o lisa.

#### 2.4.5. Métodos de Identificación

En la década de los 90's se iniciaron los estudios moleculares para la identificación de especie del género *Pratylenchus*, para ello se han realizado estudios que involucran métodos morfológicos, morfométricos, bioquímicos y moleculares (Castillo & Vovlas, 2007).

Aunque *Pratylenchus* es un nematodo polífago, conocer el rango de especies que ataca un cultivo es útil para el establecimiento de tácticas de manejo (Goulart, 2008). Los métodos morfológicos, morfométricos, bioquímicos y moleculares permiten la identificación de especies de *Pratylenchus*.

#### Bioquímicos

Para identificar especies de *Pratylenchus* se ha hecho uso de técnicas bioquímicas de análisis de proteínas. Sin embargo, para realizar estos estudios se requiere un alto número de especímenes y el diagnóstico de especies de *Pratylenchus*, mediante el uso de patrones de proteínas y fenotipos de isoenzimas se hace difícil, ya que es probable que algunas de las proteínas analizadas no estén presentes en todos los estadios del ciclo de vida del nematodo o bien los factores ambientales pueden influenciar los resultados. (Castillo & Vovlas, 2007)

#### Moleculares

Los métodos moleculares proveen una alternativa más rápida a la identificación de especies que los basados en morfología (Donn *et al.*, 2008).

Mediante el uso de PCR se amplifica la región D-3 del fragmento del ADNr 26S utilizando los cebadores para la amplificación del fragmento: D3A 5-GAC CCG TCT TGAAAC ACG

GA-3, y D3B 5-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3. Estos cebadores fueron diseñados por W. Kelly Thomas de la Escuela de Biología Ciencias, University of Missouri, Kansas City, basado en la comparación de secuencias de nematodos rabditoideos con *C. elegans* (Albana *et al.*, 1997).

## **2.5. Las PGPR's**

Es bien sabido que un número considerable de especies bacterianas, principalmente aquellas asociadas con la rizosfera de la planta, pueden ejercer un efecto beneficioso sobre el crecimiento de la planta. Este grupo de bacterias se ha denominado "rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas" (PGPR), y entre ellas se encuentran las cepas de los géneros tales como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*. La estimulación de diferentes cultivos por PGPR se ha demostrado en ensayos de laboratorio y de campo.

Los efectos promotores del crecimiento de la planta de la PGPR se derivan principalmente de cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces de las plantas inoculadas (Okon *et al.*, 1988; Sarig *et al.*, 1988). El proceso de inoculación podría estimular el crecimiento y desarrollo de la raíz (Mia *et al.*, 1998), que se produjo casi en todas las dimensiones, a saber, la producción de raíces primarias y secundarias, raíces más largas y mayor volumen y masa (43%).

Las interacciones rizósicas de microbios y plantas tienen una gran influencia en la salud de las plantas y en la calidad del suelo, ya que estos microorganismos asociados con las raíces pueden ayudar a la planta huésped a lidiar con la sequía, las condiciones nutricionales y las condiciones de estrés de patógenos transmitidos por el suelo. Las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) pueden considerarse entre los microorganismos beneficiosos de la rizosfera. En un sistema de plantas micro-propagadas, la inoculación bacteriana al inicio de la fase de aclimatación también debe observarse desde la perspectiva del establecimiento de la rizosfera microbiota del suelo. (Jaizme *et al.*, 2004)

### **2.5.1. *Pseudomonas spp.***

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* han sido estudiadas como importantes agentes de bio-control por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, como bacterias, hongos, nematodos y virus, mismos que podrían llegar a reducir considerablemente las cosechas en los cultivos establecidos tanto en invernadero como en campo. Estos organismos

ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Loper, 1988; Hamdan *et al.*, 1991; Mazzola *et al.*, 1992; Thomashow & Weller, 1995; Haas & Défago, 2005; Berg & Hallmann, 2006). Además, se ha comprobado que en algunos casos inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo (Weller & Cooke, 1983; Kloepper & Ryu, 2006).

En cuanto al control de nematodos, cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* han demostrado actividad antagonista contra *R. similis* y *Meloidogyne spp.* en banano, maíz y tomate (Becker *et al.*, 1988; Aalten *et al.*, 1998). Un aislamiento endofítico de *P. aeruginosa* produjo compuestos tóxicos in vitro que resultó en alta mortalidad de los estadios juveniles de *M. javanica* (Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2001). Asimismo, el compuesto 2,4-diacetylphloroglucinol producido por *P. fluorescens* redujo la eclosión de huevos de *M. javanica* (Siddiqui & Shaukat, 2003). Nuñez (2006) encontró que aislamientos endofíticos de *Pseudomonas spp.* redujeron significativamente la población de *R. similis* en plantas de banano bajo condiciones de invernadero, en comparación con plantas no tratadas.

### **2.5.2. *Serratia marcescens***

Promueve el crecimiento de plantas mediante la inducción de resistencia contra patógenos de plantas (Kloepper *et al.*, 1993), producción de sustancias antagonicas (Queiroz & Melo, 2006) y solubilización de fosfatos (Tripura *et al.*, 2007). En el contexto emergente de la importancia agronómica de esta bacteria, informamos el potencial de promoción de la tolerancia al frío y al crecimiento de las plantas, el crecimiento de las plantas puede ser estimulado por las fitohormonas producidas por bacterias.

Produce varias enzimas hidrolíticas como quitinasa, proteasa, lipasa, celulasa y metabolitos que promueven el crecimiento de las plantas como IAA y sideróforos.

Las quitinasas, junto con otras enzimas hidrolíticas, degradan las paredes celulares de los hongos e inhiben su crecimiento. *Serratia* es uno de los productores más competentes de quitinasas, cuya producción, actividad y regulación génica están bien estudiadas, al evaluarla con *R. solani* se observó que el micelio fúngico en la zona de interacción en cultivos duales se distorsionó, mostrando abultamiento, lisis y estallido de las hifas. Debido a la degradación de la pared celular fueron prominentes (Purkayastha *et al.*, 2018).

### **2.5.3. *Acinetobacter* spp.**

*Acinetobacter calcoaceticus* es un Novedosa PGPR por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas causando una mejora por ABA y GAs endógenos, aminoácidos (Kang *et al.*, 2012).

Varios cepas de *Acinetobacter* promueven el crecimiento de la planta y pueden hacerlo secretando giberelinas en el ambiente de la planta y convirtiendo el fosforo insoluble en el suelo en formas solubles que están fácilmente disponibles para la planta . ademas poseen propiedades como la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, sideróforo y la producción de amoníaco (Kang *et al.*, 2009).

### **2.5.4. *Klebsiella variicola***

Las bacterias *Klebsiella variicola* se encuentran en asociación con las plantas. Poco se sabe acerca de sus patrones de colonización, roles y mecanismos durante la asociación con los hospedadores de la planta. Se a identificado una bacteria fijadora de nitrógeno, DX120E, que se aisló de raíces esterilizadas en la superficie del cultivar de caña de azúcar, DX120E colonizó preferentemente en las zonas de maduración y elongación de las raíces y entró en las raíces a través de grietas en el sitio de emergencia de las raíces laterales y en la epidermis alterada. DX120E puede penetrar las células epidérmicas de la raíz con la ayuda de sus enzimas de degradación celulósica (Wei *et al.*, 2014).

DX120E también es capaz de promover el crecimiento de cultivares GT21 (caña de azúcar) y la absorción de N, P y K en plantas en condiciones de invernadero; *K. variicola* es capaz de colonizar en sus hospedadores de la planta de caña de azúcar, fijar el N<sub>2</sub> en asociación con las plantas y promover el crecimiento de las plantas (Wei *et al.*, 2014).

## **2.6. Control químico**

Los productos químicos registrados para el control de nematodos resultan altamente tóxicos, de alto valor económico y requieren de personal capacitado para su aplicación (Pinochet 1986; Gowen & Quénéhervé 1990; Tabora *et al.*, 2002; Araya 2004; Athman *et al.*, 2006). Los nematicidas se usan en promedio dos veces al año a las dosis recomendadas por las casas comerciales. Tanto los carbamatos (Carbofuran y Oxamil) como los organofosforados (Terbufos, Etroproph, Fenamiphos, Cadusafos) son inhibidores de las acetilcolinesterasas presentes en múltiples formas moleculares en la neuroanatomía del nematodo y dependiendo

de la dosis y la concentración pueden actuar como nematotoxicos (matan los nematodos) o nematostáticos (inhiben su funcionamiento normal). El mayor efecto de estos productos es en la reproducción y no en la mortalidad de los nematodos, con una efectividad que fluctúa entre un 50 y 90%, grandemente afectada por las propiedades físico-químicas del suelo y las condiciones climáticas de la zona (Araya, 2004).

Una de las principales limitantes del uso de los nematicidas es que su aplicación frecuente modifica la microflora y micro-fauna del suelo alterando las cadenas tróficas, eliminando los microorganismos antagonistas de los nematodos (Araya, 2004). Además, el uso indiscriminado de una determinada molécula generalmente resulta en pérdida de efectividad, debido a su biodegradación a metabolitos no tóxicos por la acción de hongos y bacterias del suelo (Moens *et al.*, 2004). Otro aspecto importante es que para que el nematicida mate o inactive al nematodo debe haber contacto entre ellos, ya sea a través de la penetración de la cutícula o por ingestión durante la alimentación.

## **CAPÍTULO III**

# **MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Localización de la investigación**

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

### **3.2. Tipo de investigación**

Se utilizó el método experimental comparando información existente en la literatura y estudios anteriores realizados sobre agentes antagonistas, e identificación morfológica, molecular del nematodo *Pratylenchus spp.*

### **3.3. Método de investigación**

En la investigación se emplearon los métodos deductivos, analítico y de observación teniendo en cuenta la bibliografía mencionada en este proyecto.

### **3.4. Fuentes de recopilación de información**

Las fuentes utilizadas para la obtención de información fueron secundarias ya que se obtuvieron de: revistas, publicaciones científicas, libros y tesis.

### **3.5. Material Genético**

Para la elaboración de la plataforma de reproducción masiva de *Pratylenchus spp. in vivo* se usó plantas de banano orito que son más susceptibles al daño de este nematodo.

Para los ensayos antagonistas *in vitro* se utilizó PGPR's de los géneros *Pseudomonas Serratia*, *Klebsiella* y *Acinetobacter* que se encuentran almacenadas en el banco de cepas bacterianas del laboratorio de biología molecular. a -40°C (Tabla 1).

- *Pseudomonas veroni R4*
- *Serratia marcescens* PM3 – 8
- *Acinetobacter calcoeceticus* BMR 2-12
- *Klebsiella variicola* BO 3-4

Para los ensayos antagonistas *in-vivo* se utilizaron la combinación de PGPR's de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter* y *Klebsiella*; en plantas de banano de Subgrupo Cavendish variedad Willians debido a la susceptibilidad hacia este género de nematodo.

- *P. veroni* R4 y *K. variicola* BO 3-4, *A. calcoeceticus* BMR 2-12
- *P. veroni* R4 y *S. marcescens* PM 3 -8, *K. variicola* BO 3-4
- *P. veroni* R4 y *A. calcoeceticus* BMR-12, *S. marcescens* PM 3 -8
- Testigo químico (Rugby 10)
- Testigo absoluto (solo nematodos)

**Tabla 1** Banco de cepas bacterianas UTEQ (Caracterización morfológica)

Cepas	Fluorescente	Proteasa	HCN	Pirrolnitrina	Catalasa
<i>A. calcoeceticus</i> BMR 2-12	+			+	+
<i>S. marcescens</i> PM 3-8	++	+	+		+
<i>K. variicola</i> PM 3-4	++	+	+	+	+
<i>P. veronii</i> R4	++		+	+	+

### 3.6. Instrumentos de la investigación

#### Materiales de Laboratorio

- Puntas Blancas de micro-pipeta (0.2-10µl)
- Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20µl y 20-200 µl)
- Puntas azules de micro-pipeta (100-1000µl)
- Papel Toalla
- Botellas esterilizables de 500 ml
- Vidrio de reloj
- Juego de Micro-pipetas (0.2-10µl, 2-20µl, 20-200µl y 100-1000µl)
- Tamices (criba de 475µm, 90µm y 25µm)
- Frascos Shopp de vidrio (500 ml)
- Tubos de Eppendorf (0.6 ml y 1.5 ml)
- Tubo PCR individual 0.2 ml. Cs/1000.
- Papel Parafilm
- Vasos de precipitación (50 ml, 250 ml y 500ml)

- Cajas Petri
- Guantes Quirúrgicos talla M
- Tijeras Quirúrgicas
- Frascos de vidrio tapa amarilla de 250 ml
- Embudos simples de vidrio
- Llave de paso metálica

### **Equipos de laboratorio**

- |                           |                                       |
|---------------------------|---------------------------------------|
| • Cámara de flujo Laminar | • Incubadora                          |
| • Microscopio             | • Agua ultra pura                     |
| • Cámara de microscopio   | • Agua miliq                          |
| • Microondas              | • Etanol 95%                          |
| • Licuadora               | • King B                              |
| • Nevera                  | • Sulfato de magnesio hepta-hidratado |
| • Vortex                  | • Bacto™ Peptona                      |
| • Destilador de agua      | • Fosforo de Potación Dibásico        |
| • Autoclave               | • Glicerol                            |
| • Estufa                  |                                       |
| • Centrifuga              |                                       |
| • UV transiluminador      |                                       |

### **Materiales de Oficina**

- Cuaderno
- Computador
- Lapicero
- Lápiz
- USB – Pendrive
- Escritorio

### **Materiales de campo**

- Macetas plásticas
- Suelo solarizado
- Etiquetas
- Marcadores
- Baldes

### ➤ Factores de Estudio

Para los ensayos antagonistas se estudió un solo factor constituido por las rizobacterias, mientras que para los ensayos in vivo se estudió la combinación de las rizobacterias y la población de *R. similis* y *Pratylenchus spp.*

### 3.7. Diseños y análisis estadísticos de la Investigación

En esta investigación se aplicó el diseño completamente al azar DCA. Todas las variables estudiadas fueron sometidas al análisis de varianza (ADEVA). Se estableció las diferencias estadísticas entre las medias para los ensayos en el invernadero mediante la prueba de Tukey al 95% de probabilidad. El procesamiento de datos fue llevado al programa estadístico Infostat versión 2018.

#### 3.7.1. Diseño para la plataforma de reproducción de nematodos

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), para evaluar el medio de cultivo con mayor población de nematodos, generando 3 tratamientos de 4 repeticiones cada uno. Se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizará el Software estadístico Infostat versión 2018 para el correspondiente procesamiento. (Tabla 3).

**Tabla 2.** Esquema del Análisis de Varianza plataforma de reproducción de *Pratylenchus*

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	11
Tratamientos	2
Error	9

Elaborado por: El Autor

**Tabla 3.** Esquema de tratamientos para la evaluación de la plataforma de reproducción masiva más idónea de reproducción masiva del nematodo *Pratylenchus*

Tratamientos	
1	Discos de zanahoria
2	Plantas de banano orito
3	Control (plantación establecida)

### 3.7.2. Diseño para ensayos antagonistas de las PGPR's en el control de *Pratylenchus spp in vitro* (J1)

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), para evaluar el efecto antagonista de las PGPR hacia el nematodo *Pratylenchus spp*, generando 4 tratamientos con 3 repeticiones cada uno. Se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizó el Software estadístico Infostat versión 2018 para el correspondiente procesamiento. (Tabla 5).

**Tabla 4.** Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas de las Rizobacterias con *Pratylenchus* (J1)

Fuente de variación	Grados de libertad
<b>Total</b>	11
<b>Tratamientos</b>	3
<b>Error</b>	8

Elaborado por: Autor

**Tabla 5.** Esquema de tratamientos para evaluar el efecto antagonista in-vitro de las PGPRs hacia el nemátodo *Pratylenchus*

TRATAMIENTOS	
1	<i>P. veronii</i> cepa R4
2	<i>A. calcoaceticus</i> cepa PM2-12
3	<i>S. marcesens</i> cepa PM3-8
4	<i>K. variicola</i> BO 3-4

### 2.7.3. Diseño para ensayos antagonistas de las PGPR's en el control de *Pratylenchus spp in vitro* (J2)

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), para evaluar el efecto antagonista de las PGPR hacia el nematodo *Pratylenchus spp*, generando 4 tratamientos con 3 repeticiones cada uno. Se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia

entre las medias de los tratamientos. Se utilizó el Software estadístico Infostat versión 2018 para el correspondiente procesamiento. (Tabla 7).

**Tabla 6.** Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas de las rizobacterias con *Pratylenchus* (J2)

Fuente de variación	Grados de libertad
<b>Total</b>	11
<b>Tratamientos</b>	3
<b>Error</b>	8

Elaborado por: Autor

**Tabla 7.** Esquema de los Tratamientos para evaluar el efecto antagonista *in vitro* de las PGPR's hacia el nemátodo *Pratylenchus* J2

TRATAMIENTOS	
1	<i>P. veronii</i> R4
2	<i>A. calcoaceticus</i> cepa BMR 2-12
3	<i>S. marcesens</i> cepa PM3-8
4	<i>K. variicola</i> BO 3-4

#### 2.7.4. Diseño para la aplicación de las PGPR's en las plantas de banano willians inoculadas con *Pratylenchus spp.* en vivero

Se aplicó el diseño completamente al azar (DCA), para evaluar el efecto antagonista de las PGPR hacia los nematodos *Pratylenchus spp.*, en plantas de banano de la Variedad Cavendish a nivel de invernadero en la parte posterior del laboratorio, generando 5 tratamientos con 5 repeticiones con 3 unidades experimentales (Tabla 9).

**Tabla 8.** Esquema del Análisis de Varianza de la inoculación de las bacterias y *Pratylenchus* en plantas de banano

Fuente de variación	Grados de libertad
<b>Total</b>	24
<b>Tratamientos</b>	5
<b>Error</b>	19

Elaborado por: Autor

**Tabla 9.** Esquema de los tratamientos de la inoculación de las bacterias y *Pratylenchus* en plantas de banano

<b>TRATAMIENTOS</b>	
<b>1</b>	<i>Combinación de PGPR (P. veronii R4, K. variicola BO 3-4, A. calcoaceticus BMR 2-12).</i>
<b>2</b>	<i>Combinación de PGPR (P. veroni R4 y S. marcescens PM3 -8, K. variicola BO 3-4).</i>
<b>3</b>	<i>Combinación de PGPR (P. veroni R4 y A. calcoaceticus BMR 2-12, S. marcescens PM3 -8).</i>
<b>4</b>	Control químico: para <i>Pratylenchus spp.</i> (RUGBY 10)
<b>5</b>	Testigo absoluto

**2.7.5. Diseño para la aplicación de las PGPR's en las plantas de banano willians inoculadas con *R. similis* en viveros**

Se aplicó el diseño completamente al azar (DCA), para evaluar el efecto antagonista de las PGPR hacia los nematodos *R. similis* en plantas de banano de la Variedad Cavendish a nivel de invernadero en la parte posterior del laboratorio, generando 5 tratamientos con 5 repeticiones con 3 unidades experimentales. Se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizó el Software estadístico Infostat versión 2018 para el correspondiente procesamiento. (Tabla 10).

**Tabla 10.** Esquema de los tratramientos de la inoculación de bacterias y *R. similis* en plantas de banano

<b>TRATAMIENTOS</b>	
<b>1</b>	<i>Combinación de PGPR (P. veronii R4, K. variicola BO 3-4, A. calcoaceticus BMR2-12).</i>
<b>2</b>	<i>Combinación de PGPR (P. veronii R4 y S. marcescens PM3 -8, K. variicola BO 3-4).</i>
<b>3</b>	<i>Combinación de PGPR (P. veronii R4 y A. calcoaceticus BMR2-12 , S. marcescens PM3 -8).</i>
<b>4</b>	Control químico: para <i>R. similis</i> (RUGBY 10)

**Tabla 11.** Esquema del Análisis de Varianza de la inoculación de bacterias y *R. similis* en plantas de banano

Fuente de variación	Grados de libertad
<b>Total</b>	24
<b>Tratamientos</b>	5
<b>Error</b>	19

Elaborado por: Autor

### 3.8. Manejo del experimento

#### 3.8.1. Aislamiento de nematodos

Los nematodos del genero *Pratylenchus spp* fueron obtenidos de la finca el Paraíso ubicada en la Parroquia Guasaganda perteneciente al Cantón La Maná. Se empleó la metodología descrita por INIAP (2005), se recolectó cinco muestras de 100g de raíces en la planta madre e hijo, para ser sometidas a un proceso de tamizaje para la captura de nematodos y su respectiva identificación.

El aislamiento del nematodo *Pratylenchus spp* se realizó según la técnica de Stmerdin (1963). Las muestras de raíces se licuaron 100 g de raíces en 500 ml de agua manteniendo en reposo de 10 min, la suspensión se vertió sobre un juego superpuesto de tamices de 500  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$  y 25,  $\mu\text{m}$  respectivamente.

Los restos de raíces retenidas en la criba de 90  $\mu\text{m}$ , se transfirieron al embudo de Baermann (Hooper, 1986a) con filtro de papel toalla, con 40 cc de agua.

Después de 24 a 48 h, todas las formas activas de nematodos pasarón a través del papel toalla y se recogieron en un pequeño volumen de agua (5-10 ml).

#### 3.8.2. Identificación de *Pratylenchus spp*.

##### ➤ Identificación morfológica de *Pratylenchus spp*.

En la identificación morfológica se empleó un microscopio a 10X - 40X de magnificación, se utilizaron las claves taxonómicas del género *Pratylenchus* propuestas por Loof (1978)

y Handoo & Morgan (1989). Estas se basan en caracteres morfológicos de la hembra, como la región labial, estilete y estructuras asociadas, intestino medio y recto, sistema excretor y órganos reproductivos, presencia o ausencia de machos. Este último parámetro se debe a que la hembra posee más características diagnósticas que el macho, que en todo caso es raro o poco frecuente en un número importante de especies (Loof, 1991).

Para la identificación se tomaron 30  $\mu$ l de muestra transfiriendo a un vidrio de reloj para ser observado en magnificación 10x – 40X, para establecer las características morfométricas de *Pratylenchus spp.* descritas por Filipjev & Schuurmans-Stenkoven (1941).

#### ➤ **Caracterización molecular de *Pratylenchus spp***

Se identificó por PCR (Reacción de la cadena de la Polimerasa) mediante la extracción de ADNg, utilizando muestras de tejido de zanahoria de la plataforma de reproducción in vitro. Muestras de los discos de zanahoria que contenían el nematodo en reproducción, se pulverizaron con nitrógeno líquido para la obtención del ADNg, se empleó el kit QIAGEN-Start Protocol (USA) como lo explica Cantuña, (2013). Para la amplificación del ADN se utilizaron los partidores D3A (5- GACCCGTCTTGAAACACGGA-3) y D3B (5- TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) (Al-Banna *et al.* 1997). La mezcla para PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l que consistió de: 5  $\mu$ l de buffer Dream Taq (10X); 1  $\mu$ l de dNTP's (2mM); 1  $\mu$ l / cada primer; 0.3  $\mu$ l de Taq; 9.7  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O; 2  $\mu$ l de ADN. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador. Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización a 94 ° C durante 5 min, seguidas de 35 ciclos de 94 ° C durante 1 min, 62 ° C durante 1 min y 72 ° C durante 1 min, y 7 min adicionales a 72 ° C. Los productos de PCR se separaron por Electroforesis en un gel de agarosa de 1.5%, se ubicó 3  $\mu$ l de marcador molecular de 100bp. Se utilizó 20  $\mu$ l del producto de PCR. La electroforesis fue realizada a 90V durante 75minutos. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un transluminador

#### **3.8.3. Plataforma de reproducción masiva de nematodos *Pratylenchus spp* in vivo**

Se sembraron cepas de banano orito en un espacio de 1.5 x 3 m, que contiene suelo preparado con 4 sacos de bocashi, 5 de tierra arenosa y 1 de cascarilla de arroz, a una distancia de 0.5 m entre plantas y 0.5 m entre hileras bajo ambiente controlado. A los 60

días después de la siembra se aplicó 200g de raíces infectadas con *Pratylenchus spp.* licuadas en 500 ml de agua estéril por plantas con intervalos de 2 días durante 10 días para asegurar la colonización cuando las raíces presenten líneas necróticas color rojizo a negras.

#### **3.8.4. Reproducción de nematodo *Pratylenchus spp* en discos de zanahorias**

Para la reproducción de *Pratylenchus spp.* en discos de zanahorias, es necesario obtener zanahorias frescas y sanas, con una forma cilíndrica (un diámetro aproximado de 3 cm). Estas fueron peladas y lavadas con agua estéril, seguidamente se cortaron discos de 3 a 5 mm de espesor, para después ser sumergidos en hipoclorito de sodio al 10% por 5 min y remojadas nuevamente con agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio de los discos de zanahoria.

Los discos fueron flameados y asperjados con alcohol al 90%, acto y ubicados en placas Petri con 25 ml de agar noble al 2%, y se añadió el antibiótico penicilina a una concentración de 400mlg / 500ml.

Los nematodos obtenidos serán esterilizados con penicilina a una concentración de 400mlg / 500ml, fueron ubicados 50 nematodos en (50 µl) en tubos de eppendorf de 1.5 ml, después se añadió 200 µl de agua estéril y se centrifugó a 3,500 rpm por 60 segundos. Se retiró 200 µl de agua (sobrenadante), para después ser añadido 200 ml de ampicilina a una concentración de 450mlg/500ml y se centrifugo, proceso que se repitió 3 veces quedando en un volumen de 50µl de nematodos.

Los nematodos ya esterilizados fueron vertidos con una micropipeta en los discos de zanahoria, después se incubado por 30 días a 28 °C.

Una vez obtenidos los datos se aplicó la siguiente fórmula para la determinar la población de nematodos

$$N^{\circ} \text{ Nem } x \frac{200\text{ml}}{2\text{ml} x \frac{25\text{g}}{100\text{g}}}$$

Donde:

N° Nem = número de nematodos observados en una cantidad conocida de agua  
200ml = cantidad de agua utilizada en el embudo  
2ml = cantidad de agua utilizada para el conteo de los nematodos  
25g = muestra procesada  
100g = total de muestra

### **3.8.5. Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de los sobrenadantes bacterianos hacia *Pratylenchus spp* (J1) y (J2)**

#### **➤ Obtención de extractos celulares de las rizobacterias**

La recuperación de los extractos celulares las bacterias fueron incubadas en dos medios de cultivo, cultivo en King B ubicando 15 µl de las bacterias en 50 ml del medio King B líquido (Peptona 20g, fosfato de potasio 1.5g, sulfato de magnesio 1.5g, glicerol 15ml/ 1L), sobre un agitador magnético (Elmi DOS-20L Digital Orbital Shaker) a 150 rpm por 48 h.

Iniciando con el 1% de inóculo bacteriano se incubaron las bacterias en medio (M3) descrito por Rodríguez (2018) como medio alternativo con los siguientes componentes (50 g/L de Melaza, 20 g/L de harina de maíz, 5 g/L de sal en grano, 15 ml/L de glicerina), generado por un biorreactor para acelerar el crecimiento bacteriano.

Las bacterias crecieron por 24h, en el medio King B y M3, para la recuperación de los extractos celulares se centrifugó en tubos falcon de 15 ml a 300 x g por 3 min. Se recuperó el sobrenadante descartando el pellet, por triplicado. El sobrenadante se ubicó en tubos eppendorf de 1,5 ml para otro proceso de centrifugación a 10 x g por 3 min. Las muestras se filtraron empleando Nalgene Syringe de 0.2 µm y posteriormente se sometieron a un choque térmico de 15 min a 90°C y 15 min a -40°C.

#### **➤ Ensayos antagonistas con extractos celulares de las rizobacterias en la inhibición de eclosión de huevos J1**

Los huevos de *Pratylenchus* fueron limpiados con agua estéril y luego transferidos a pocillos (tapas de tubos eppendorf) y sometidos al 10% con extractos celulares bacterianos se los incubó por 9 días a 25 °C evaluándose cada 3 días.

#### **➤ Ensayos antagonistas con extractos celulares de las rizobacterias crecidas en medio King B y M3 en el porcentaje de mortalidad de juveniles J2**

Se recolectaron los extractos bacterianos con una micropipeta y se transfirieron 15 µm a cada pocillo que contenía 150ml de agua (aplicando a una concentración al 10%) con 20 nematodos se las incubó por 72 horas a 25 °C evaluándose cada 24 horas.

#### **Viabilidad de *Pratylenchus spp.***

Los nematodos de las placas de inhibición con sobrenadantes bacterianos fueron evaluados de la siguiente manera:

***No presenta movilidad + No recuperan movilidad bajo estímulos***  
**= *Nematodo Muerto***

Los estímulos se los realizó con una fibra de cabello de brocha, los cuales se lo hizo repetidas veces para observar si recuperaba su movilidad, caso contrario se confirmó su muerte.

#### **3.8.6. Inoculación edáfica de PGPR's en plántulas de banano williams que contenían *R. similis* y *Pratylenchus spp***

##### **➤ Preparación del suelo**

Se utilizó suelo franco arcilloso más turba a una proporción (2/1). Que fue esterilizado durante dos semanas mediante solarización con el uso de polímero negro. Se emplearon fundas plásticas de 12 x 16 pulg' que fueron llenadas con el suelo solarizado y procediendo al trasplante de plantas meristemáticas del Subgrupo Cavendish variedad Willians de 10 cm de alto, bajo invernadero.

##### **➤ Inoculación de las PGPR en plantas de banano**

Las bacterias se incubaron en un biofermentador por 24 h en el medio M3 y su aplicación a las plantas de banano se realizó por la combinación antes sugeridas. Su primera aplicación se realizó al momento del trasplante añadiendo 1ml al 10% de cultivo bacteriano al sistema radicular de la planta. Posteriormente se realizó un ciclo de aplicación bacterianas de 50ml por planta a (8, 15, 22, 35 y 45 dds).

##### **➤ Inoculación de nematodos**

Al mes después del trasplante se inocularon aproximadamente 10,000 *R. similis* y 12,000 *Pratylenchus spp.* en los tratamientos correspondientes, alrededor del sistema radical se

realizó perforaciones en el suelo para la inoculación. Los nematodos inoculados fueron extraídos de la plataforma de reproducción de discos de zanahoria (60%) y de raíces de una plantación infestada (40%) con *R. similis* y *Pratylenchus spp.* determinando la concentración por cada 10 cc de solución hubo una población de 10,000 *R. similis* y 12,000 *Pratylenchus spp.* respectivamente con la ayuda de una micro-pipeta se aplicó la solución alrededor de cada planta.

➤ **Aplicación de nematicida (*Rugby 10*)**

Se empleó el nematicida RUGBY 10 G (*Caduzafos*) a los 30 días después de la inoculación de los nematodos, se realizó la primera aplicación a una dosis de 10g/planta.

➤ **Labores de mantenimiento de las plantas.**

Todas las plantas tuvieron una fertilización base mediante la aplicación de 5g/ planta del fertilizante completo NPK (10-30-10); esta labor se realizó a los 20, 30, 40 días luego de la inoculación de las rizobacterias con la finalidad que la planta tenga un mejor aprovechamiento del fertilizante por medio de las bacterias. Se realizó dos riegos por semana dependiendo de las condiciones climáticas. Durante el periodo experimental todas las hojas senescentes se seccionaron de las plantas.

### **3.8.7. Datos a registrar**

➤ **Peso total de raíces por planta**

Las raíces de cada planta se lavaron cuidadosamente para retirar las partículas del suelo adheridas a ellas, registrando su peso total de raíces sanas y dañadas para su evaluación a los 90 días después de la siembra.

➤ **Número de raíces totales**

Se contaron todas las raíces sanas como dañadas para posteriormente proceder a clasificarlas en raíces funcionales y no funcionales; clasificando raíces no funcionales aquellas que tenían el tejido totalmente necrótico.

➤ **Porcentaje de raíces funcionales**

Se tomó en cuenta aquellas raíces que no presentaban daño significativo es decir raíces que no tenían necrosis (podridas) avanzada. Para determinar el porcentaje se utilizó la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{número de raíces sanas}}{\text{número de raíces totales}} \times 100$$

➤ **Porcentaje de raíces no funcionales**

Se tomaron en cuenta aquellas raíces que presentaban necrosis (ahogadas) avanzada hasta la parte central lo cual se aplicó la fórmula

$$\frac{\text{número de raíces dañadas}}{\text{número de raíces totales}} \times 100$$

➤ **Longitud de raíces**

Se midió la longitud de la masa radicular para verificar la mayor longitud.

➤ **Altura de planta (cm)**

Se evaluaron las plantas desde la base del cormo hasta el punto de emisión de las hojas.

➤ **Diámetro de pseudotallo (cm)**

Se procedió a medir el diámetro del pseudotallo en centímetros empleando el calibrador de Vernier, desde la base del tallo a 3 cm de altura, en cada una de las plantas.

➤ **Densidad poblacional de *R. similis* y *Pratylenchus spp.***

Los niveles poblacionales de nematodos en las raíces se determinaron por el método de "Licuado – Tamizado". Para el efecto, se cortaron las raíces (sanas + dañadas) en pedazos de 1 cm, se pesaron 50 g y se licuaron con 100 cc de agua común durante 3 secciones de 30 S cada una y sometida al proceso de tamizado como esta descrito anteriormente. la densidad poblacional se determinó mediante fórmula descrita anteriormente.

➤ **Ritmo emisión de Hojas**

El ritmo de emisión de hojas se midió pitando la última hoja desarrollada entre una fecha y otra durante un lapso de 75 días.

➤ **Clorofila**

Para la determinación de la concentración de clorofila se utilizó el método de extracción con etanol (Wintermans & De Mots, 1965), en discos foliares de 1.3 cm<sup>2</sup> tomados del sector foliar correspondiente a cada tratamiento. La extracción de los pigmentos se realizó macerando en frío cada disco foliar en un mortero con 4 ml de una solución fría de MgCO<sub>3</sub> (0.5 g/L<sup>-1</sup>) en etanol al 98%. El extracto se transfirió a un tubo y se lavó el mortero con 4 ml de la misma solución de etanol para completar un volumen final de 8 ml. La separación del extracto se hizo por centrifugación a 3.000 g durante 5 min. Al extracto etanólico obtenido se le leyó la absorbancia (A) a 645 y 663 nm en un espectrofotómetro. A partir de estos datos, se calcularon las concentraciones de clorofila a (Cla), y clorofila total (Clt), con base en las siguientes ecuaciones:

$$Cla = [(12,7 \times (A663) - 2,69 \times (A645)) \times 8] / (1000 \times PS)$$

$$Clt = [(20,2 \times (A645) + 8,02 \times (A663)) \times 8] / (1000 \times PS),$$

donde PS corresponde al peso seco del disco foliar.

## **CAPÍTULO IV**

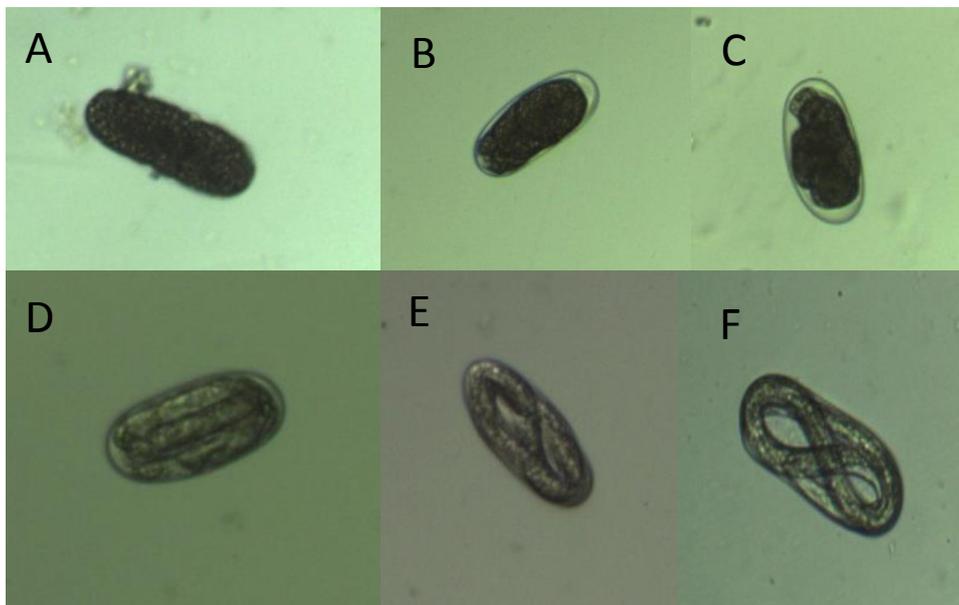
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados

### 4.1.1. Identificación y caracterización morfológica del nematodo *Pratylenchus spp.* J1 y J2

#### ➤ Ovoposición J1.

De las muestras colectadas del sistema radicular se identificó el ciclo de ovoposición de *Pratylenchus spp* (J1), de raíces infectadas del cultivar *M. paradisiaca* (orito) determinando su forma ovoide, alargados con longitudes de entre 84 - 99  $\mu\text{m}$  y diámetros de entre 35 - 44  $\mu\text{m}$ , Con el periodo de eclosión de los huevos de nematodos entre 8-10 días (Figura 1).



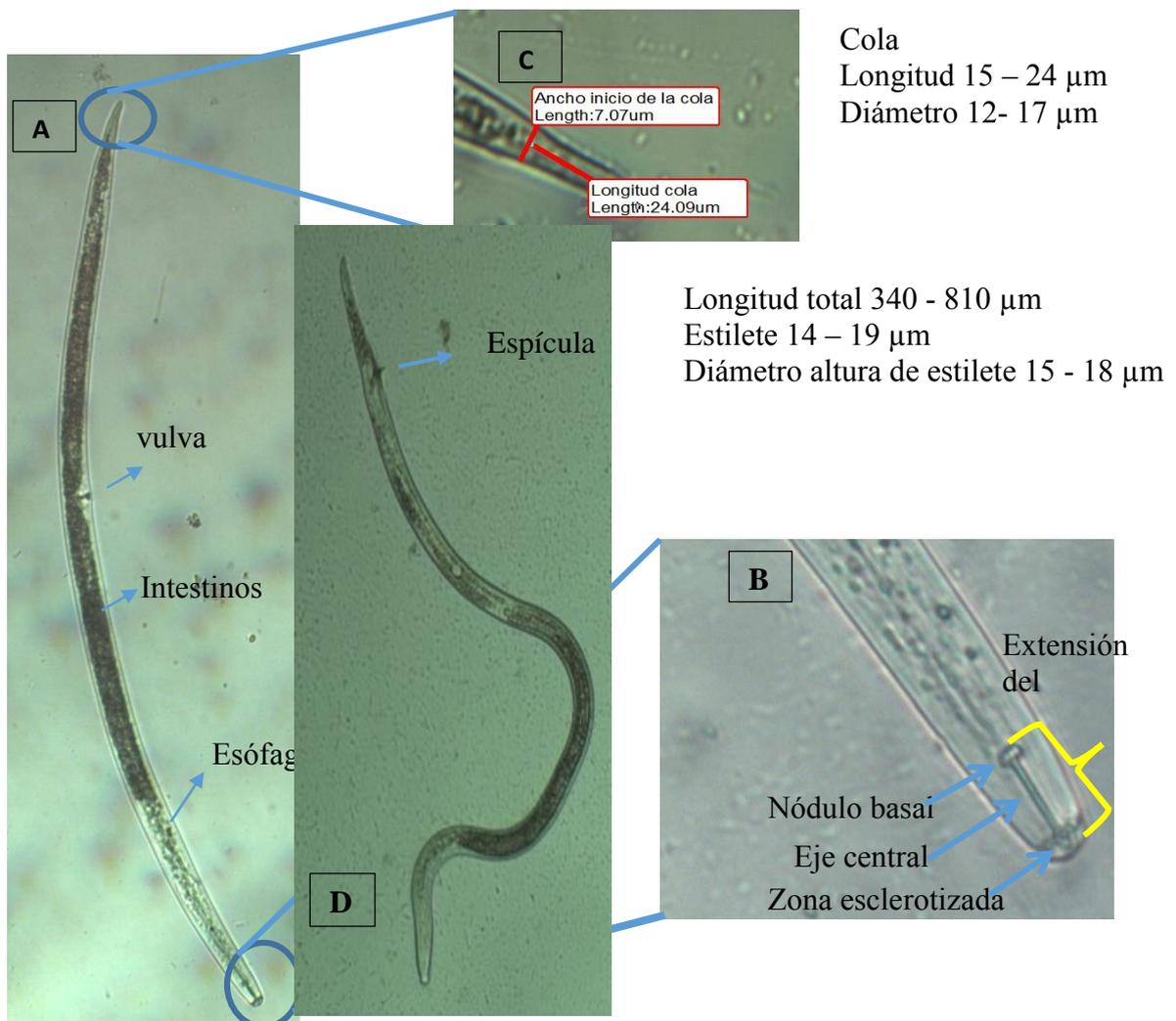
**Figura 2. Desarrollo de los huevos de *Pratylenchus spp.*** A. Huevo de *Pratylenchus spp.* primeras horas de ovopositado; B. Desarrollo del nematodo en estadio J1, Huevo ovopositado primer día de edad (Etapa de mitosis); C. Huevo con 3 días de ovopositado, D. Huevo con 5 días de ovopositado, E. Huevo con 7 días de ovopositado, el nematodo está completamente desarrollado, F. Huevo de nematodo con 8 días de ovopositado, mostrándose el nematodo, con órganos y estructuras ya desarrolladas.

#### ➤ Estados juveniles J2

Del estadio J2 se verificó por base a las características morfométricas y morfológicas al género *Pratylenchus*, a partir de seis muestra de tejido radicular de banano orito se corroboró la identificación de los nematodos juveniles 2 de *Pratylenchus spp.*, en base a las observaciones presentan su cuerpo filiforme, elongado, longitud de 340 a 810  $\mu\text{m}$ , con una cabeza aplanada (parte anterior), el estilete bien desarrollado con nódulos basales distintos,

una cola con forma cónica pero redondeada al final (parte posterior), y un dimorfismo sexual entre ambos géneros.

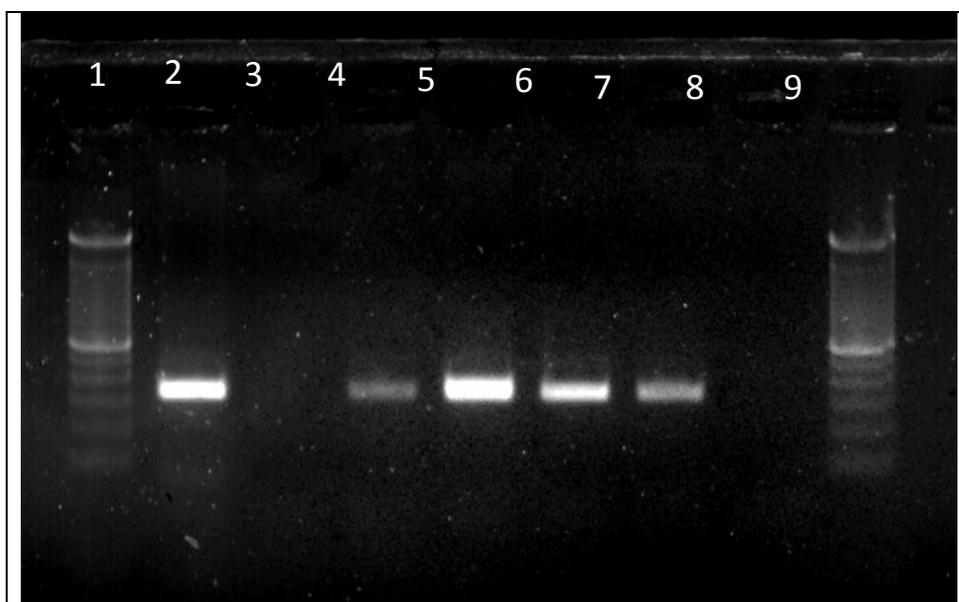
*Pratylenchus spp.* hembra posee un cuerpo más alargado en comparación con el macho (Figura 3D) con longitudes que oscilan de entre 340-810  $\mu\text{m}$ , (Figura 3A); Parte anterior: la forma de la cabeza va desde angosta y suavemente redondeada, estilete bien desarrollado y fuertemente esclerotizado con longitudes que varían de entre 14-19  $\mu\text{m}$  los nódulos basales del estilete redondeados, cóncavos ligeramente aplanados, cabeza aplanada con un diámetro de 15 – 18  $\mu\text{m}$  a la altura del estilete (Figura 3 B); Parte posterior: La hembra posee ovarios que se encuentran entre el intestino y la vulva, la vulva está ubicada a un 70 – 80% de la longitud del nematodo, y una cola cónica pero redondeada al final con longitudes de entre 15-24  $\mu\text{m}$  con diámetros que varían de entre 12-17  $\mu\text{m}$ , (Figura 3C).



**Figura 3. Características morfológicas de *Pratylenchus J2*** A. nematodo hembra, B. parte anterior del nematodo hembra, C. parte posterior del nematodo hembra. D. nematodo macho.

#### 4.1.2. Identificación por PCR del nematodo *Pratylenchus spp.*

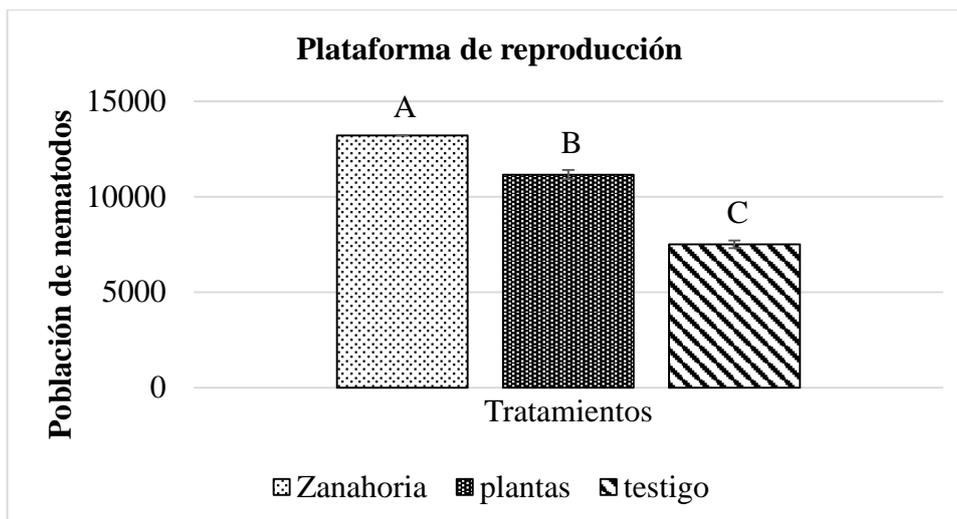
Los nematodos identificados por su morfología al género *Pratylenchus*, estos se ubicaron individualmente en disco de zanahoria para para su reproducción en condiciones *in vitro*, para realizar la extracción de ADNg, se verificó un producto de amplificación de 350 bp que amplifican al Gen del ADN ribosomal 26S para cinco muestras de que corresponden a este género. Las muestras de nematodos provienen de plantaciones de *Musa paradisiaca* se encontró una especie diferente a *Pratylenchus* muestra 3. Los análisis basados en el gen 26S no permitieron determinar la identidad de la especie, pero si establecer que no está relacionada con *Pratylenchus*. (Figura 4).



**Figura 4.** Amplificación del gen al ADN Ribosomal 26S de *Pratylenchus spp.* con los partidores D3A y D3B con 20µl de la mix de PCR. Pozo 1 y 9 marcador molecular de 100 bp; pozo 2 al 7, muestras individuales de *Pratylenchus spp.* obtenidas de *M. paradisiaca*, pozo 3 nematodo perteneciente a otro género; pozo 8 control negativo.

#### 4.1.3. Plataforma de reproducción de nematodos

Mediante la plataforma de reproducción para el nematodo del genero *Pratylenchus spp.* se verificó su mayor reproducción bajo condiciones *in vitro*, esta mediante el empleo de discos de zanahoria con agar obteniendo un promedio de 13,212 nematodos, obteniendo un aumento de 264 más veces de la población inicial. Superando al tratamiento realizado en plántulas de *M. paradisiaca* con 11,156 nematodos marcando como referencia al muestreo de plantaciones infectadas con 7,500 nematodos, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5. Plataformas de reproducción del nematodo *Pratylenchus spp*** Los tratamientos con diferentes letras representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el número de nematodos en cada tratamiento.

Los nematodos de la reproducción *in vitro* a los 2 meses se observó los síntomas del aumento de la población formando una mancha blanquecina sobre la superficie indicador de la multiplicación del nematodo posteriormente formando una masa gelatinosa en el disco de zanahoria (Figura 6 A) y en *M. paradisiaca* donde su sistema radicular presentó lesiones de color rojizo pardo de 1 milímetro hasta varios centímetros hasta tornarse necrótica (Figura 6 B).



**Figura 6. Plataforma de reproducción masiva del nematodo** **A.** Disco de zanahoria formándose la mancha blanquecina tornándose totalmente gelatinosos a los 2 meses. **B** plantas de *M. paradisiaca*. y sus primeros síntomas de infestación del nematodo.

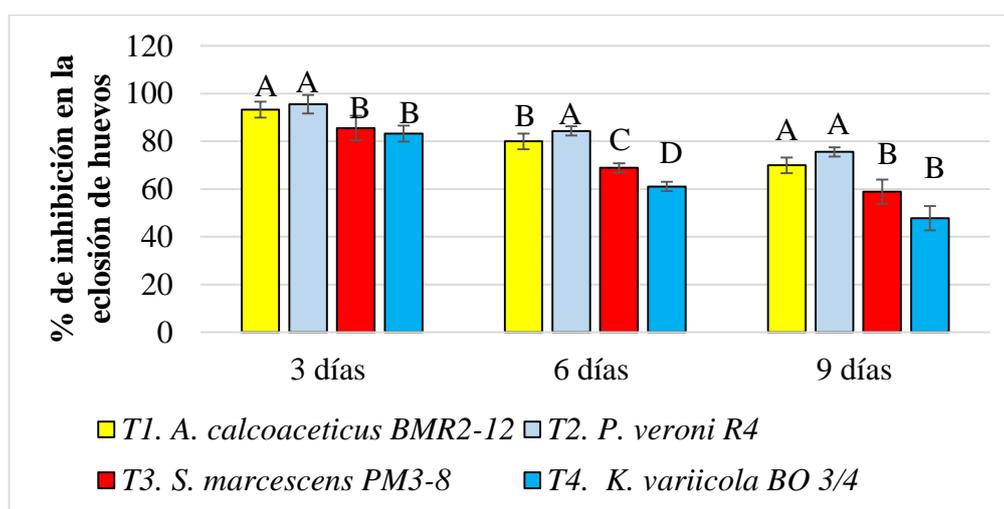
#### 4.1.4. Determinación de la actividad antagonista de los sobrenadantes bacterianos de las PGPR sobre *Pratylenchus* in vitro

##### ➤ Ensayos de inhibición de eclosión de huevos (%)

La aplicación de extractos celulares *in vitro* hacia la eclosión de huevos, se verificó diferencia estadística entre los tratamientos observado a los 3 días la mayor inhibición de eclosión de huevos con las cepas *P. veronii* (R4) y *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) con 95.6% y 93.3% las cepas *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) se visualizó la menor capacidad antagonista de 85.6 y 83.3% respectivamente.

La evaluación a los 6 días después de la aplicación de los sobrenadantes la cepa, *P. veronii* (R4) presento mayor potencial antagonista de 84.4% de inhibición estadísticamente superior a las demás cepas. El extracto celular de *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) con 80%, mientras *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) presentaron la menor capacidad antagonista de 68.9 y 61.1% respectivamente.

La evaluación a los 9 días los sobrenadantes que mantuvieron sus efectos antagonistas superiores al 70% de inhibición de la eclosión de huevos se verifico en las cepas *P. veronii* (R4) y *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) siendo estadísticamente superiores a las cepas *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) que presentaron antagonismo de 58.9 y 47.8% respectivamente.



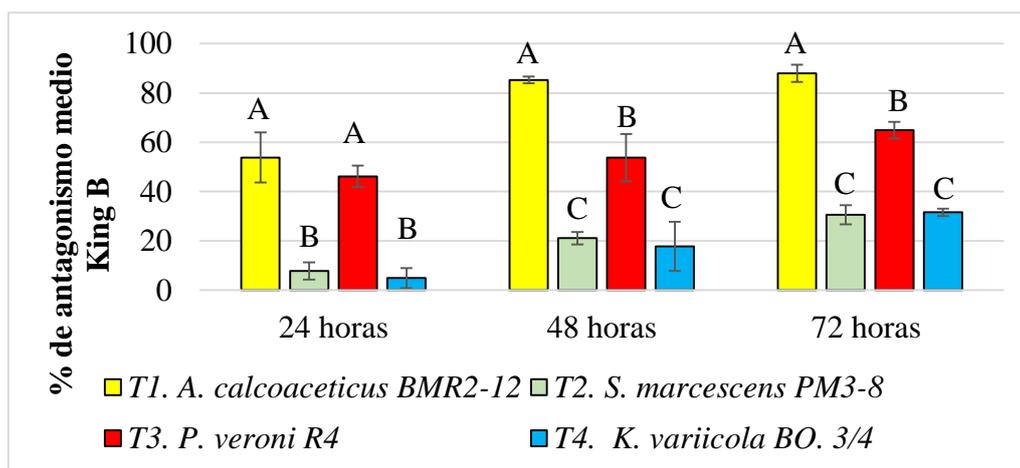
**Figura 7. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos de *Pratylenchus* spp.** los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos correspondiente de cada tratamiento.

➤ **Ensayos antagonistas de los extractos celulares obtenidos de medio King B y M3 de las PGPR a nematodos J2**

Extractos celulares de las PGPR incubados en King B La aplicación de los extractos celulares obtenidos de King B y expuestos durante 24 h los nematodos se verificó diferencia estadística entre los tratamientos destacándose el extracto obtenido de *A. calcoeticus* (BMR 2-12) con 53.8% de la muerte de los nematodos J2. Con menor efectividad se observó en *P. veronii* (R4) con el 46.3% de nematodos muertos. Los extractos de *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) no superan su actividad antagonista al 10% (Figura 8).

La eficacia de la efectividad de los extractos por a las 48 h de exposición de los nematodos, se verificó diferencia significativa entre los tratamientos destacándose el extracto de *A. calcoeticus* (BMR 2-12) con 85.3% de antagonismo estadísticamente superior a las demás cepas. Manteniendo la efectividad superior al 50% el extracto de *P. veronii* (R4) con 53.8%, con el menor efecto antagónico se observó por la aplicación de sobrenadantes de *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) con 21.1 y 17.8% respectivamente (Figura 8).

La evaluación a las 72 h se verificó diferencia significativa entre los tratamientos destacándose el extracto de *A. calcoeticus* (BMR 2-12) con el 88% de antagonismo estadísticamente superior a las demás cepas. Manteniendo la efectividad superior al 64% por *P. veronii* (R4), con el menor efecto antagónico se observó por los extractos de *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) con 30.6 y 31.6% respectivamente (Figura 8).

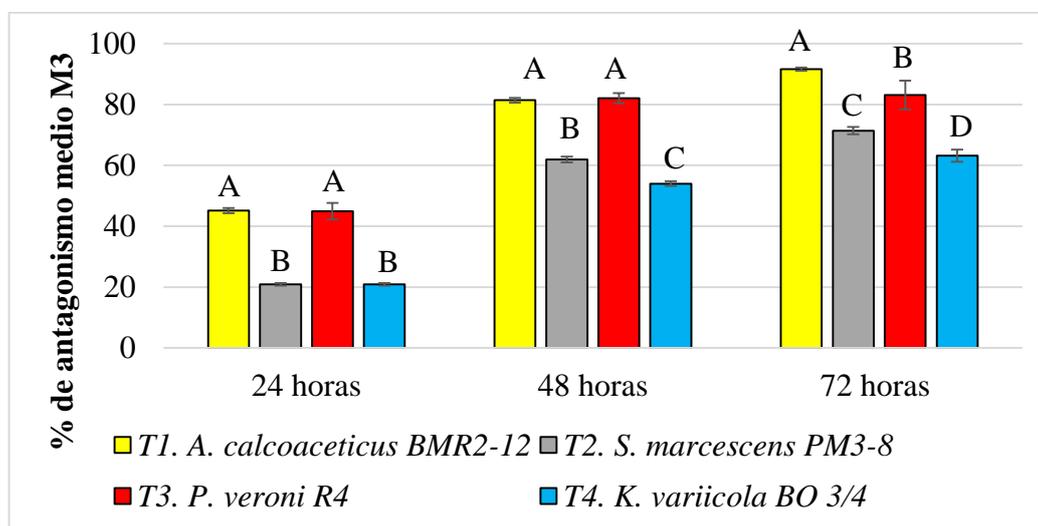


**Figura 8. Porcentaje de antagonismo de sobrenadantes bacterianos sobre *Pratylenchus J2*** Los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de antagonismo correspondiente a cada tratamiento.

Extractos celulares de las PGPR incubados en el medio M3 La aplicación de los extractos celulares bacterianos obtenidos del medio M3 y expuestos durante 24 h los nematodos, se verificó diferencia estadística entre los tratamientos destacándose *A. calcoeticus* (BMR 2-12) y *P. veronii* (R4) con 40.9 y 44.4% de muerte de los nematodos J2 respectivamente. Con menor antagonismo se observó por la aplicación de los sobrenadantes de *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) con 16.4 y 20.5% respectivamente (Figura 9).

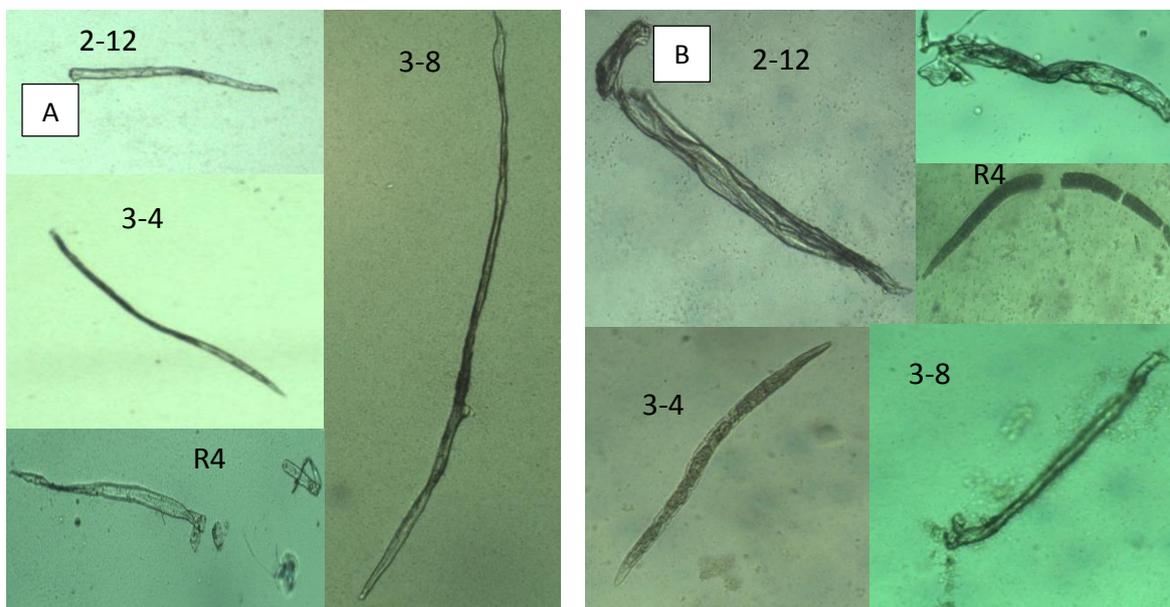
La eficiencia de la actividad antagonista de los extractos bacterianos por 48 h que mantuvieron su efecto antagonista superior al 82% de mortalidad en los nematodos J2 se verificó con las cepas *A. calcoeticus* (BMR 2-12) y *P. veronii* (R4) siendo estadísticamente superiores a las cepas, *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) con 61.5 y 56% de mortalidad respectivamente (Figura 9).

La eficiencia de la actividad antagonista de los extractos por 72 h hacia los nematodos, presentaron capacidad antagonista destacándose la cepa *A. calcoeticus* (BMR 2-12) con 90.9% de mortalidad. *P. veronii* (R4) con promedio 82.9% de antagonismo, mientras que las cepas *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) presentaron la menor capacidad antagonista hacia los nematodos obteniendo promedios de 69.6 y 62.2% respectivamente (Figura 9).



**Figura 9. Porcentaje de antagonismo de sobrenadantes bacterianos crecidos en el medio M3.** *Pratylenchus* J2 los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de antagonismo correspondiente a cada tratamiento, mostrando resultados simultáneos en las 24, 48 y 72 horas.

Los metabolitos secundarios producidos por los extractos celulares bacterianos causan la muerte de los nematodos (Figura 10 A y B) *A. calcoeticus* (BMR 2-12) y *P. veronii* (R4) a más de causar la muerte estas degradan la cutícula ocasionando partición del nematodo a diferencia de *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. variicola* (BO 3-4) que provocan desecamiento de los nematodos.

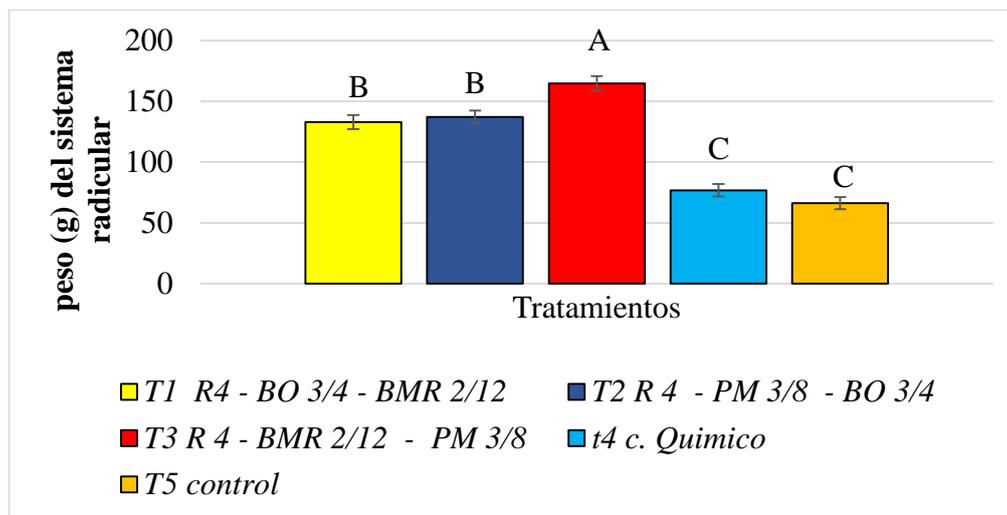


**Figura 10. Efectos de los sobrenadantes bacterianos sobre *Pratylenchus*** **A.** Actividad antagonista de las cepas *A. calcoeticus* (BMR 2- 12), *S. marcescens* (PM 3 -8) , *P. veronii* (R4) y *K. variicola* (BO 3 – 4), en el medio King **B.** Actividad antagonista de las cepas *A. calcoeticus* (BMR 2- 12), *S. marcescens* ( PM 3 -8) , *P. veronii* (R4) y *K. variicola* (BO 3 – 4), en el medio alternativo.

#### 4.1.5. Aplicación edáfica de PGPR en *M. acuminata* para el control de *Pratylenchus spp.* en vivero

##### 4.1.5.1. Peso del sistema radicular

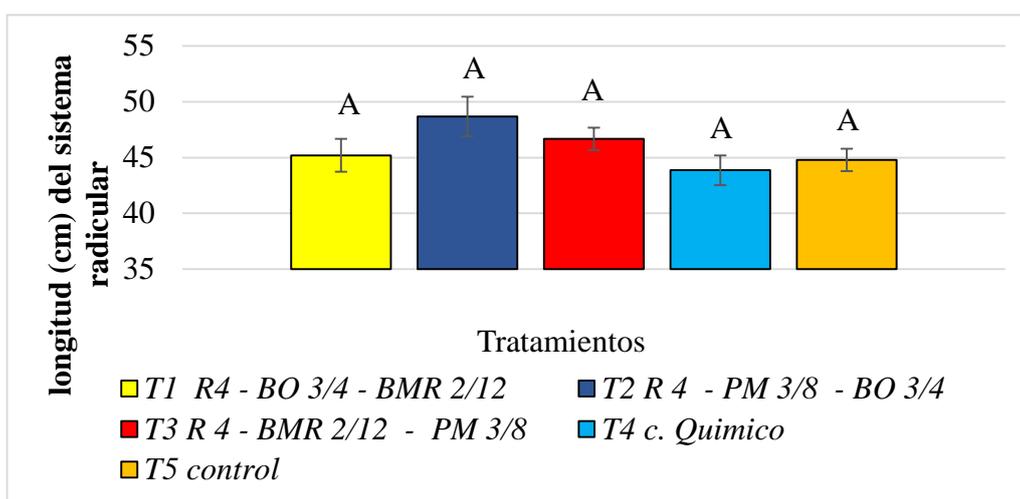
La aplicación del consorcio bacteriano crecidas en el medio M3, indujeron al incremento del peso radicular, este carácter morfológico se ve influenciado debido al aumento en tamaño y número de raíces, se verificó diferencia estadística entre los tratamientos destacándose la combinación 3 de (R4, BMR 2-12, PM 3-8) con 164.73g. Con menor efectividad por parte de las bacterias se observó en las combinaciones 2 y 1 de (R4, PM 3-8, BO 3-4) y (R4, BO 3-4 BMR 2-12) con 137.3 y 133.03g respectivamente del peso radicular. Las plantas sin inoculante bacteriano no superan los 80g del peso radicular (Figura 11).



**Figura 11. Efectos de las combinaciones bacterianas sobre el peso del sistema radicular** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el peso del sistema radicular correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.5.2. Longitud del sistema radicular

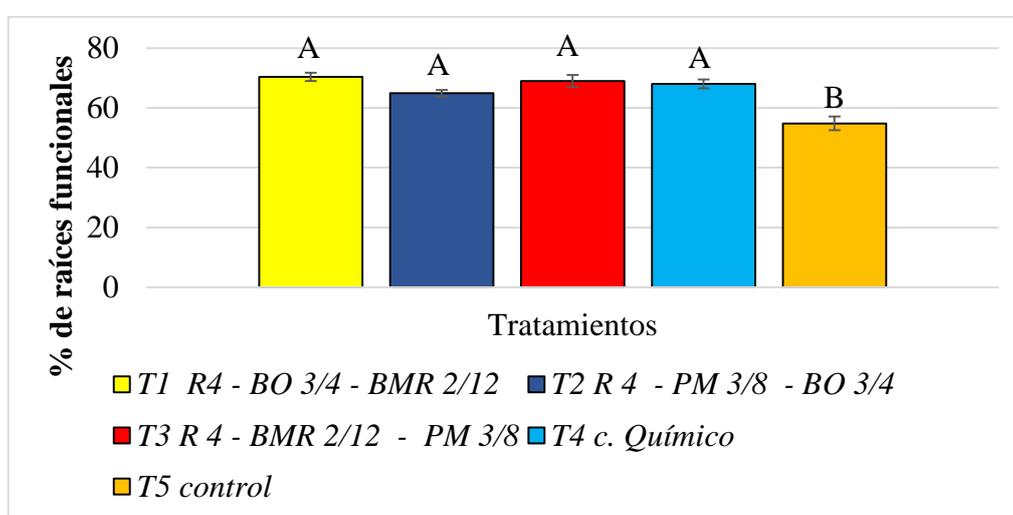
La aplicación del consorcio bacteriano crecidas en el medio M3, se verificó que no existe diferencia estadística entre los tratamientos, alcanzando una longitud que oscila entre 43.87 y 48.67 cm. Figura 12.



**Figura 12. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del sistema radicular** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican la longitud del sistema radicular correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.5.3. Porcentaje de raíces funcionales

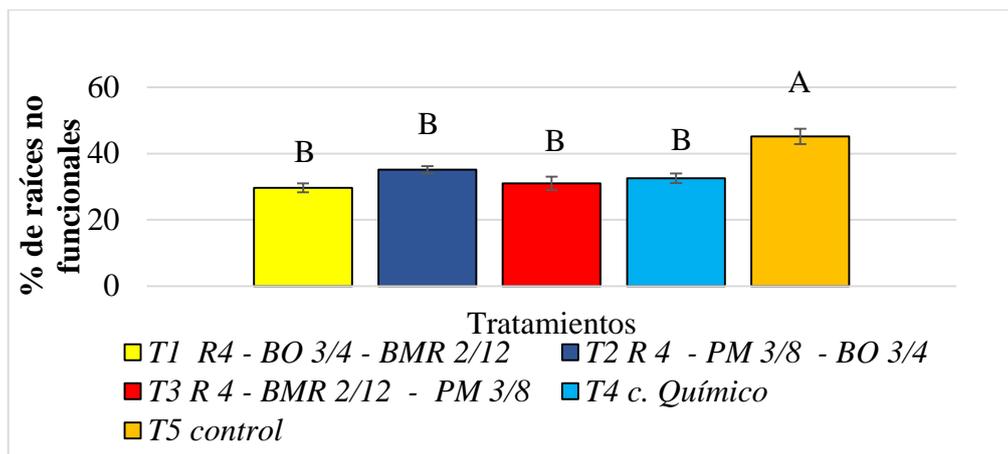
La aplicación del consorcio bacteriano crecidas en el medio M3 promovieron el incremento del porcentaje de raíces funcionales, El mayor porcentaje de raíces funcionales se obtuvo con la combinación 1 (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12) con promedio de 70.34%. Este resultado influyo positivamente de las bacterias ejerciendo un efecto biocontrolador sobre el nematodo aumentando el número de raíces funcionales. Seguido por las combinaciones (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4), y (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8) de igual manera el tratamiento 4 que alcanzaron promedios de 64.88; 69; 68.02% superiores al control con 54.78% de raíces funcionales (Figura 13).



**Figura 13. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces funcionales** T1 (*R4*, *BO* 3-4 *BMR* 2-12), T2 (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4), T3 (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de raíces funcionales de cada tratamiento.

#### 4.1.5.4. Porcentaje de raíces no funcionales

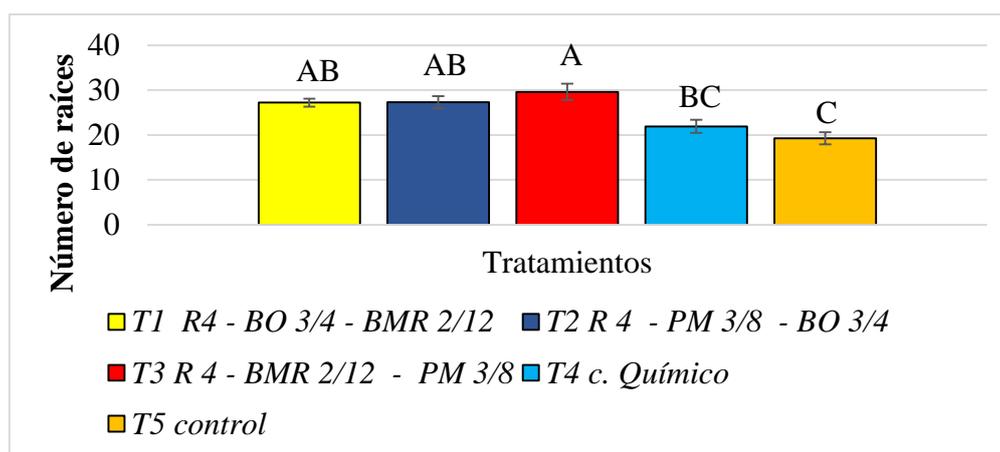
El menor porcentaje de raíces no funcionales se obtuvo con la combinación 1 (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12) con 29.66%. Esto se debe al efecto positivo ejercido por las bacterias en el control de los nematodos, seguido por los tratamientos 2 (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4), combinación 3 (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8) que alcanzaron un promedio de 35,12; 31% respectivamente; estadísticamente superiores a las plantas sin inoculante bacteriano las cuales presentaron el mayor daño en el sistema radicular ocasionado por los nematodos con 45.55% de raíces no funcionales (Figura 14).



**Figura 14. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces no funcionales** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.5.5. Número de raíces

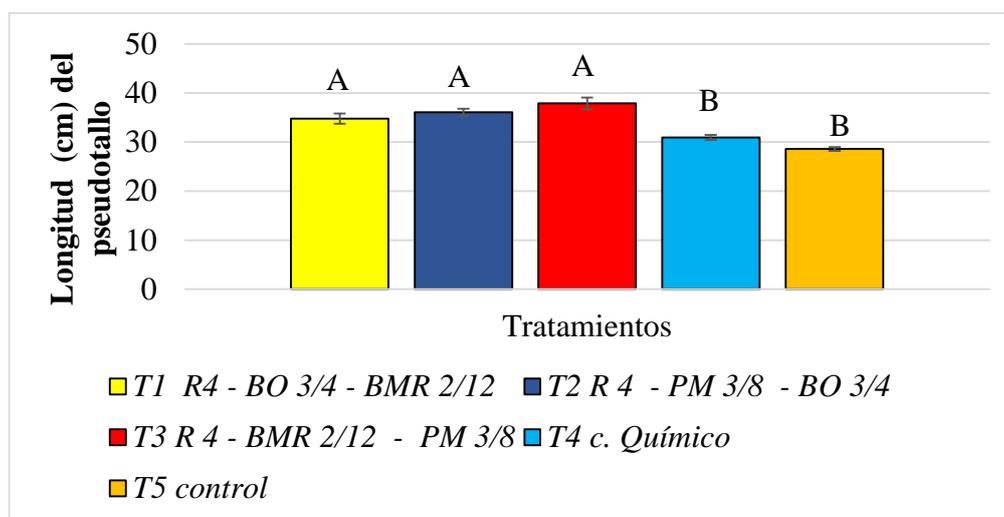
Este carácter morfológico se ve influenciado por las inoculaciones del consorcio bacteriano, promovieron que se incremente el número de raíces a diferencia de los controles. Se verificó diferencia estadística entre los tratamientos destacándose la combinación 3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8) con 29.6 raíces. Con menor efectividad se observó en las combinaciones 1 (R4, BO 3-4, BMR 2-12) y combinación 2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), con 27.2 y 27.27 respectivamente. Los tratamientos sin inoculante bacteriano no superan las 22 raíces por plantas (Figura 15).



**Figura 15. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el número de raíces** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el número de raíces correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.5.6. Longitud del pseudotallo

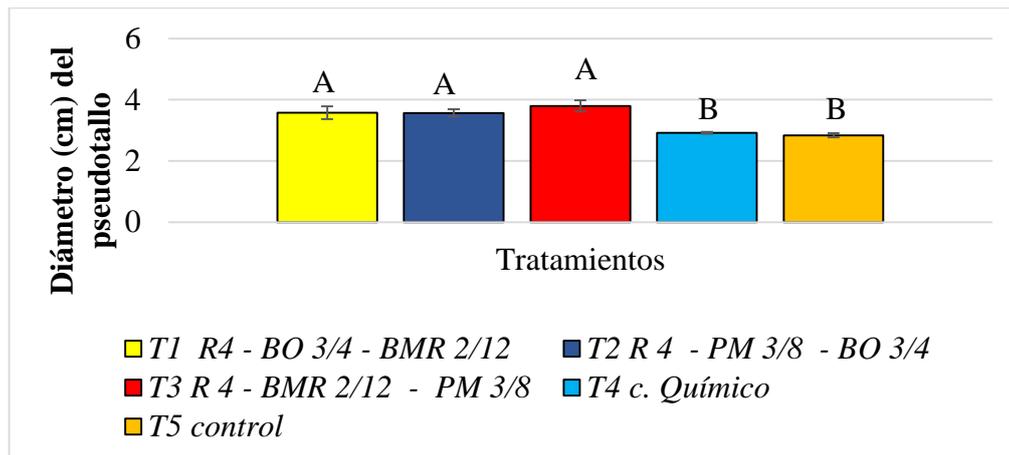
Este carácter morfológico de la longitud del pseudotallo se ve influenciado por las bacterias aplicadas en consorcio debido al efecto positivo que estas ejercen para la mejor asimilación de nutrientes. La mayor longitud del pseudotallo se obtuvo con las combinaciones bacterianas (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8) con un promedio de 37,87 cm estadísticamente igual a las demás combinaciones, (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12) y (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4) que superan los 35 cm superiores a los tratamientos sin inoculantes bacteriano que no superan los 30 cm (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del pseudotallo** T1 (*R4*, *BO* 3-4 *BMR* 2-12), T2 (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4), T3 (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican la longitud del pseudotallo correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.5.7. Diámetro del pseudotallo

Las aplicaciones de las bacterias en consorcio promovieron el incremento del diámetro del pseudotallo a diferencia de las plantas sin inoculante bacteriano. Se verificó el mayor diámetro en la combinación 3 (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8) con promedio de 3.8 cm estadísticamente igual a las demás combinaciones bacterianas (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12) y (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4), que se obtuvo promedios de 3.58 y 3.57cm respectivamente superiores a las plantas sin inoculantes bacteriano que no superaron los 3cm de diámetro (Figura 17).

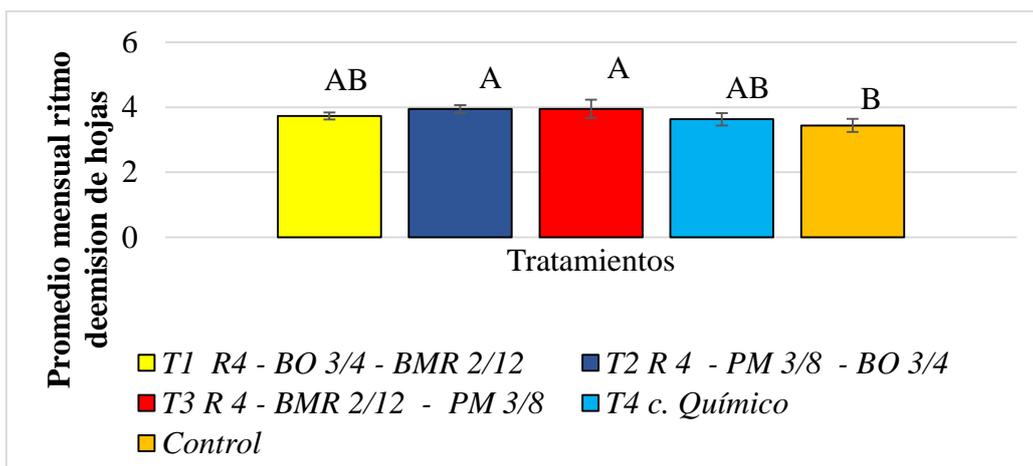


**Figura 17. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el diámetro del pseudotallo**

T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.5.8. Ritmo de emisión de hojas

Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron que se acelere el ritmo de emisión de hojas a diferencia de los controles. El mayor ritmo de emisión de hojas se obtuvo con las combinaciones (R4, BMR 2-12, PM 3-8) y (R4, PM 3-8 y BO 3-4) con 3.95 hojas mensual estadísticamente superiores a los demás tratamientos sin digerir de la combinación 1 (R4, BO 3-4, BMR 2-12) y el tratamiento 4, que se obtuvo promedios de 3.73 y 3.63 hojas mensual, superiores al control que alcanzó promedio de 3.44 hojas mensuales (Figura 18).

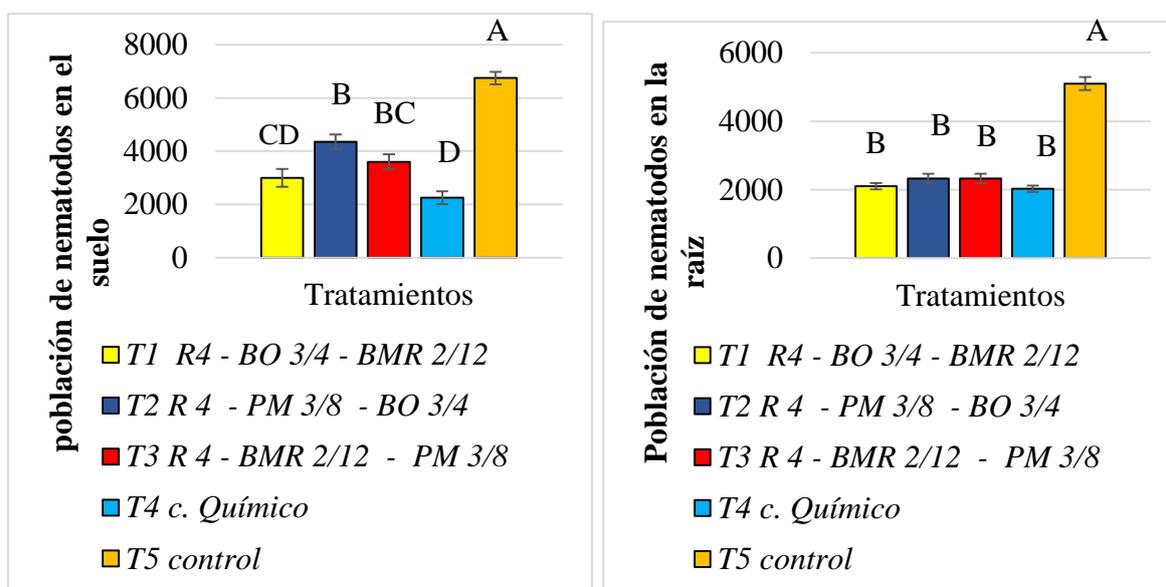


**Figura 18. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el ritmo de emisión de hojas**

T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.5.9. Densidad poblacional de nematodos en suelo y raíces

Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron la reducción de la población de nematodos en el sistema radicular y en el suelo. La menor población de nematodos se obtuvo con la aplicación del nematicida con 2,250 de igual manera con la combinación bacteriana (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12) se obtuvo 3,000 nematodos mientras con, (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4) y (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8) obteniendo poblaciones de 4,350 y 3,600 nematodos en 100 gramos de suelo, la mayor población se verificó en el control con 6,650 (Figura 19). La menor población de *Pratylenchus* se obtuvo con las combinaciones bacterianas (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12), (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4) y (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8) y el control químico obteniendo poblaciones de 2,100; 2,325; 2,325 y 2,025 nematodos en 50 gramos de raíces respectivamente, estadísticamente iguales. La mayor población de *Pratylenchus* en las raíces se obtuvo en el control con una población de 5,100 nematodos (Figura 19).

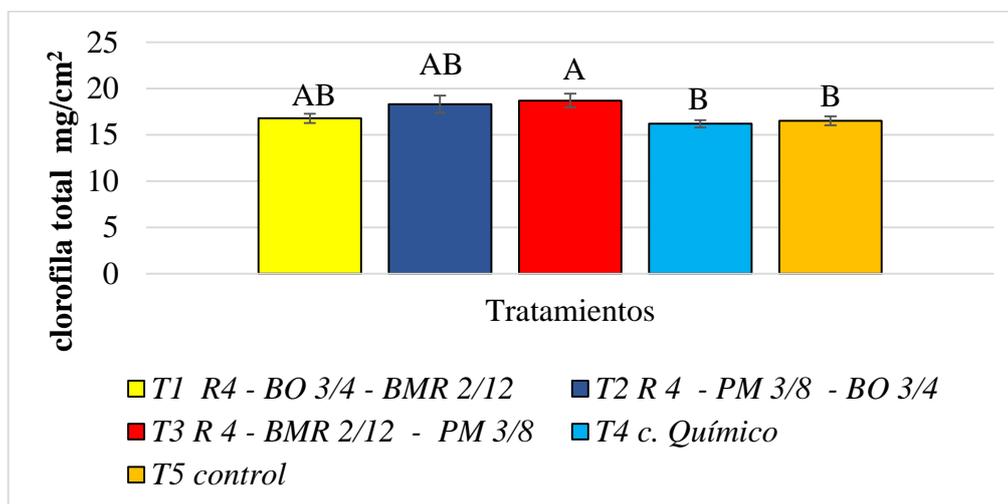


**Figura 19. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la población de nematodos en suelo y raíces** T1 (*R4*, *BO* 3-4, *BMR* 2-12), T2 (*R4*, *PM* 3-8, *BO* 3-4), T3 (*R4*, *BMR* 2-12, *PM* 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de antagonismo correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.5.10. Clorofila total

Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron que se incremente la clorofila a diferencia de los controles. La mayor concentración de clorofila total se obtuvo con las combinaciones

(R 4, BMR 2-12 y PM 3-8) con 18.7mg/cm<sup>2</sup> estadísticamente superior a las demás combinaciones sin digerir de la combinación (R 4, PM 3-8, BO 3-4) y (R 4, BO 3-4, BMR 2-12) con 18.31 y 16.78 mg/cm<sup>2</sup> respectivamente, estadísticamente superiores a los demás tratamientos. La menor concentración de clorofila total se obtuvo en las plantas sin inoculantes con 16.19 y 16.51 mg-cm<sup>2</sup> (Figura 20).

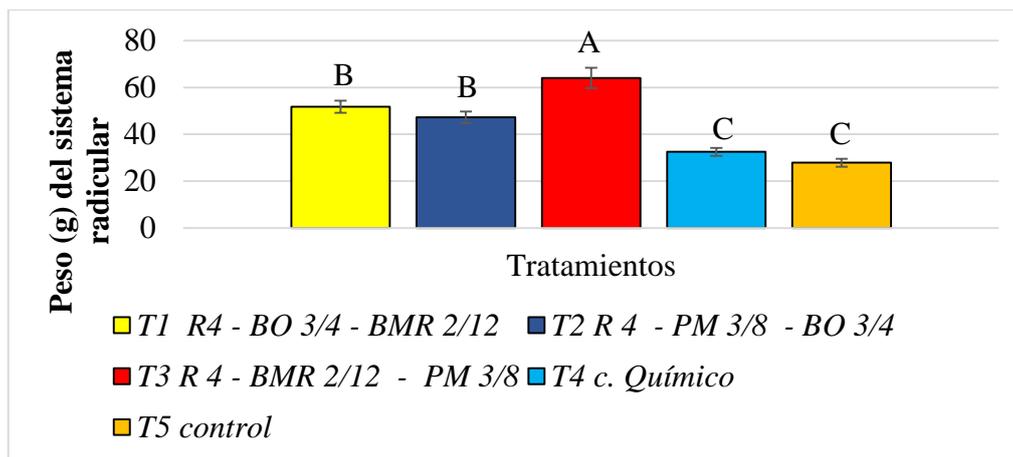


**Figura 20. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el contenido de clorofila total** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.6. Aplicación edáfica de PGPR en *M. acuminata* para el control de *R. similis* en vivero

##### 4.1.6.1. Peso sistema radicular

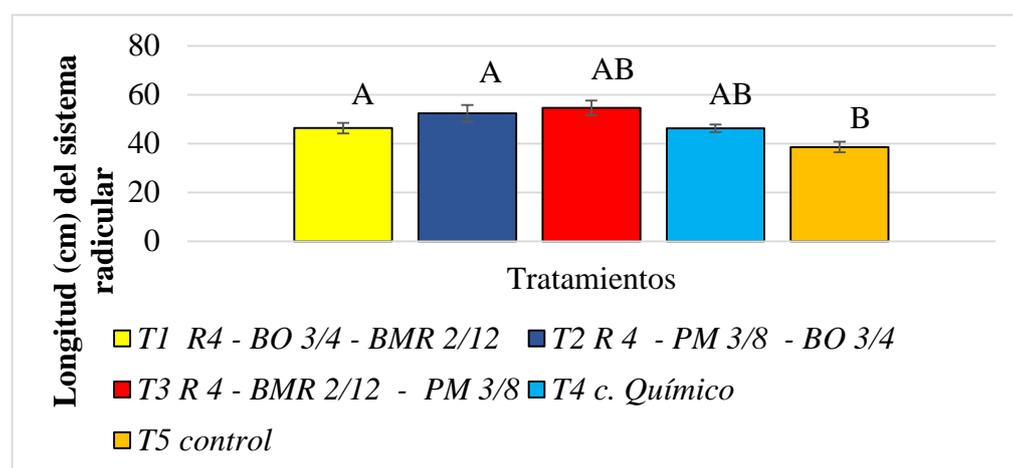
La aplicación del consorcio bacteriano crecidas en el medio M3, indujeron al incremento del peso radicular, esto se ve influenciado por el efecto antagonista de las bacterias hacia los nematodos de igual a la producción de fitohormonas por parte de las bacterias las cuales promueven mayor número de raíces y que desarrollen con mayor vigorosidad. Se verificó diferencia estadística entre los tratamientos destacándose la combinación 3 de (R4, BMR 2-12, PM 3-8) con 64.03 g. Con menor efectividad se observó en las combinaciones 2 y 1 de (R4, PM 3-8, BO 3-4) y (R4, BO 3-4, BMR 2-12) con 51.83 y 47.27 g del peso radicular. Las plantas sin inoculante bacteriano no superan los 35 g del peso radicular debido al daño causado por los nematodos en el sistema radicular provocando las pudriciones de las mismas (Figura 21).



**Figura 21. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el peso del sistema radicular** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el peso del sistema radicular correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.6.2. Longitud del sistema radicular

La aplicación del consorcio bacteriano crecidas en el medio M3, se verificó incremento en la longitud del sistema radicular. La mayor longitud se obtuvo en las combinaciones bacterianas superando los 50 cm. Con menor efectividad se verificó en las plantas sin inoculante no superan los 40 cm (Figura 22).

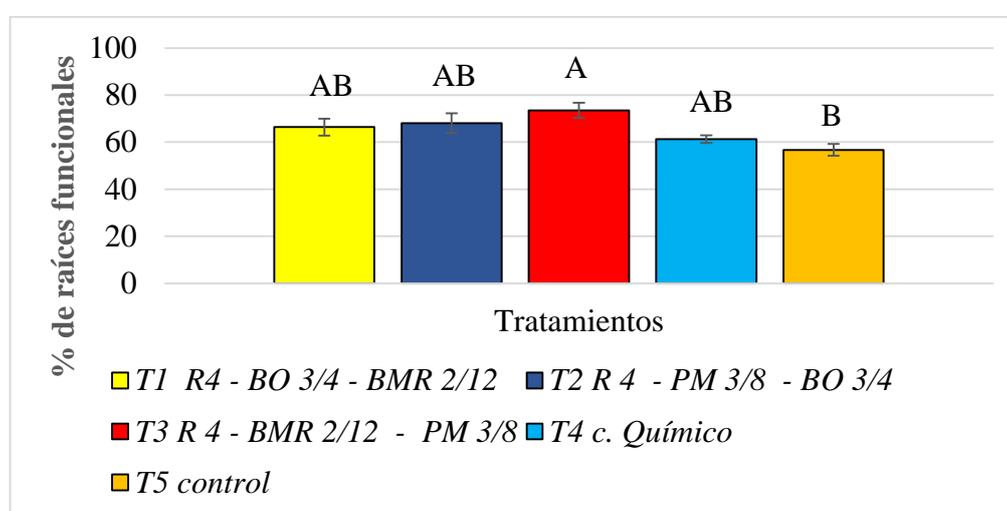


**Figura 22. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del sistema radicular**

T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.6.3. Porcentaje de raíces funcionales

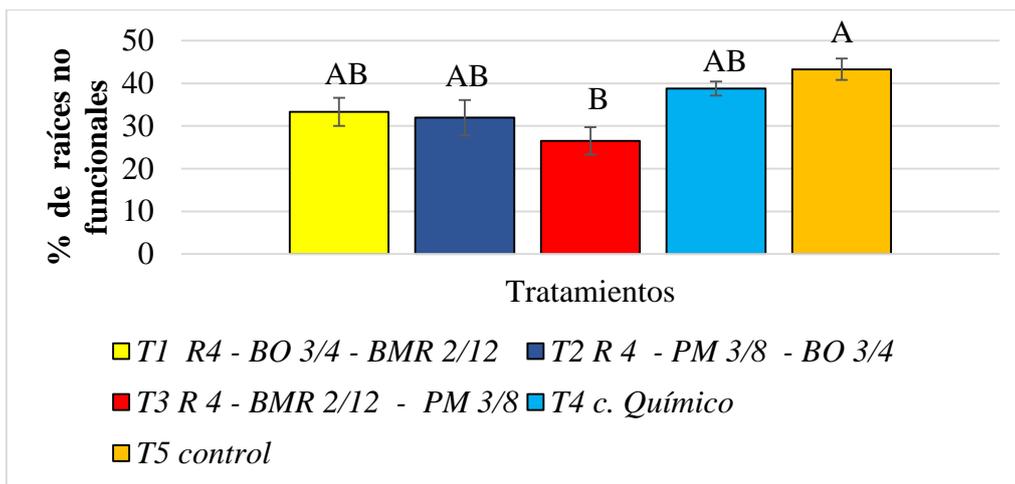
La aplicación del consorcio bacteriano crecidas en el medio M3 promovieron el incremento del porcentaje de raíces funcionales, el mayor porcentaje de raíces funcionales se obtuvo con las combinaciones (*R 4, BMR 2-12, PM 3-8*) y (*R 4, BO 3-4, BMR 2-12*) que superan el 70%. Este resultado influyo positivamente ejerciendo un efecto biocontrolador sobre el nematodo aumentando el número de raíces funcionales. Con menor efectividad se verificó en la combinación (*R4, PM 3-8, BO 3-4*), y el tratamiento 4 las que alcanzaron un promedio de 68.06, 61.21% respectivamente; mientras que las plantas sin inoculante no superaron el 57% de raíces funcionales (Figura 23).



**Figura 23. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces funcionales** T1 (*R4, BO 3-4 BMR 2-12*), T2 (*R4, PM 3-8, BO 3-4*), T3 (*R4, BMR 2-12, PM 3-8*). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de raíces funcionales correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.6.4. Porcentaje de raíces no funcionales

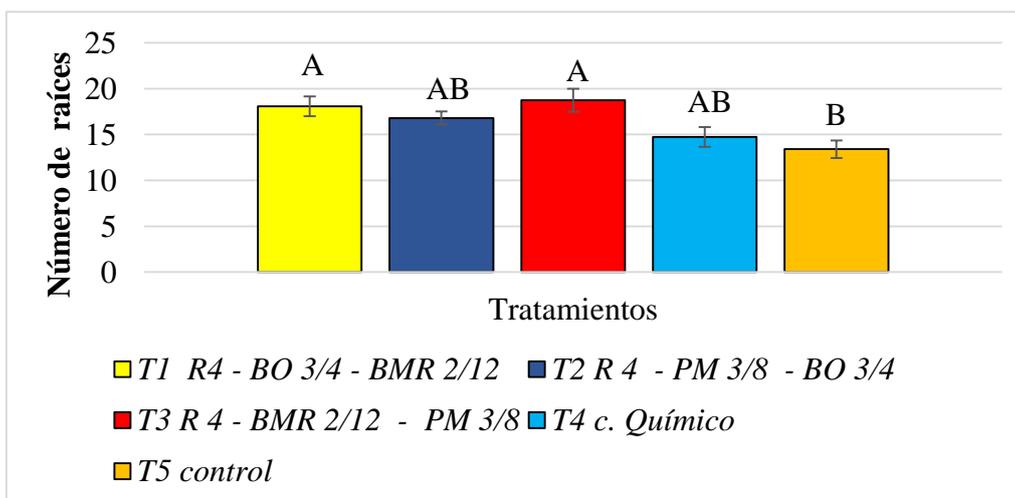
Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron que se disminuya el porcentaje de raíces no funcionales. El menor porcentaje de raíces no funcionales se obtuvo con la combinación (*R 4, BMR 2-12, PM 3-8*) con 26.5% seguido por las combinaciones (*R 4, PM 3-8, BO 3-4*) y (*R 4, BO 3-4, BMR 2-12*) y el tratamiento 4 las que alcanzaron promedios de 31.94, 33.32 y 38.79% respectivamente estadísticamente iguales y superiores a las plantas sin inoculante bacteriano que presento mayor daño por los nematodos obteniendo un 43.29% de raíces no funcionales (Figura 24).



**Figura 24. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el porcentaje de raíces no funcionales** T1 (R 4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R 4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R 4, BMR 2-12, PM 3-8). Los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de raíces no funcionales correspondiente a cada tratamiento.

#### 4.1.6.5. Número de raíces

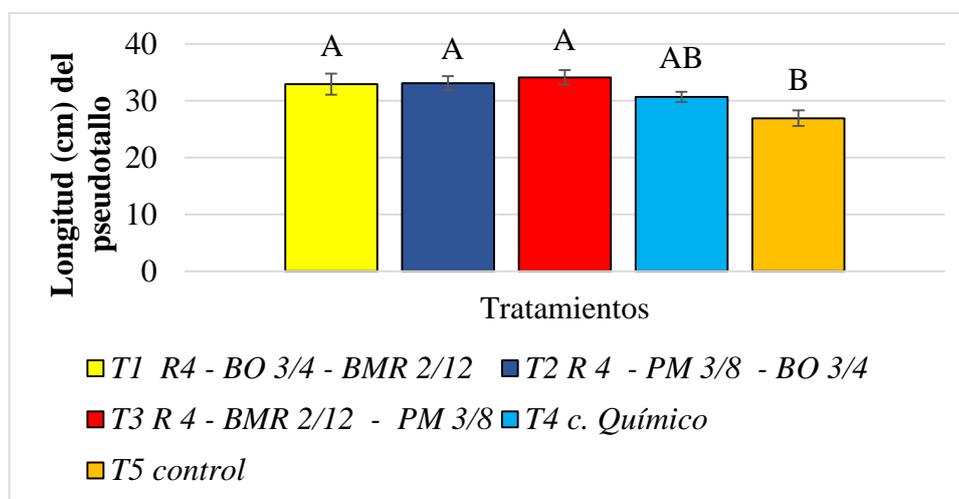
Este carácter morfológico se ve influenciado por las inoculaciones del consorcio bacteriano, promovieron que se incremente el número de raíces. El mayor número de raíces se obtuvo en las combinaciones (R 4, BO 3-4 y BMR 2-12) y (R 4, BMR 2-12 y PM 3-8) superiores a 18 raíces. Con menor efectividad se verificó en la combinación (R 4, PM 3-8 y BO 3-4) con 16 raíces. las plantas sin inoculante no superan las 14 raíces (Figura 25).



**Figura 25. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el número de raíces** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.6.6. Longitud pseudotallo

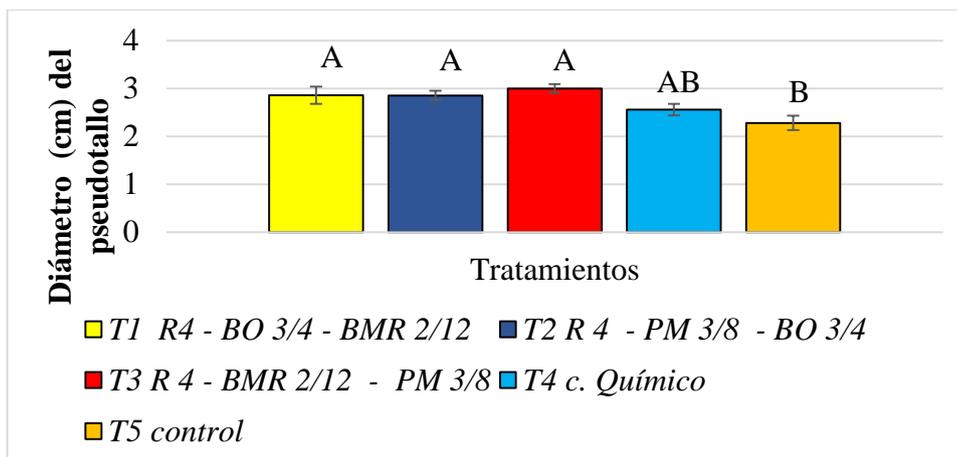
Este carácter morfológico de la longitud del pseudotallo se ve influenciado por el efecto positivo que ejercen en las plantas las bacterias aplicadas en consorcio a diferencia de las plantas sin inoculante bacteriano. Las mayores longitudes se obtuvieron con las combinaciones bacterianas (*R 4*, *BMR 2-12*, *PM 3-8*) con 34,13 cm estadísticamente igual a las demás combinaciones bacterianas (*R 4*, *BO 3-4*, *BMR 2-12*), (*R 4*, *PM 3-8*, *BO 3-4*) que superan los 33 cm superiores a las plantas sin inoculante que no superaron longitudes de 30 (Figura 26).



**Figura 26. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre la longitud del pseudotallo** T1 (*R4*, *BO 3-4*, *BMR 2-12*), T2 (*R4*, *PM 3-8*, *BO 3-4*), T3 (*R4*, *BMR 2-12*, *PM 3-8*). Los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.6.7. Diámetro del pseudotallo

Las bacterias crecidas en el medio M3 aplicadas en consorcio promovieron que se incremente el diámetro del pseudotallo, esto debido al efecto positivo ejercido por las bacterias dentro de la fisiología y morfología de las plantas a diferencia de las plantas sin inoculante bacteriano que presentaron el menor diámetro. El mayor diámetro del pseudotallo se obtuvo con la combinación bacteriana (*R 4*, *BMR 2-12*, *PM 3-8*) con promedio de 3 cm estadísticamente igual a las demás combinaciones bacterianas (*R 4*, *BO 3-4*, *BMR 2-12*) y (*R 4*, *PM 3-8*, *BO 3-4*), que se obtuvo promedios de 2.86 y 2.87cm respectivamente superiores a las plantas sin inoculante bacteriano que no superan los 2.5cm respectivamente (Figura 27).

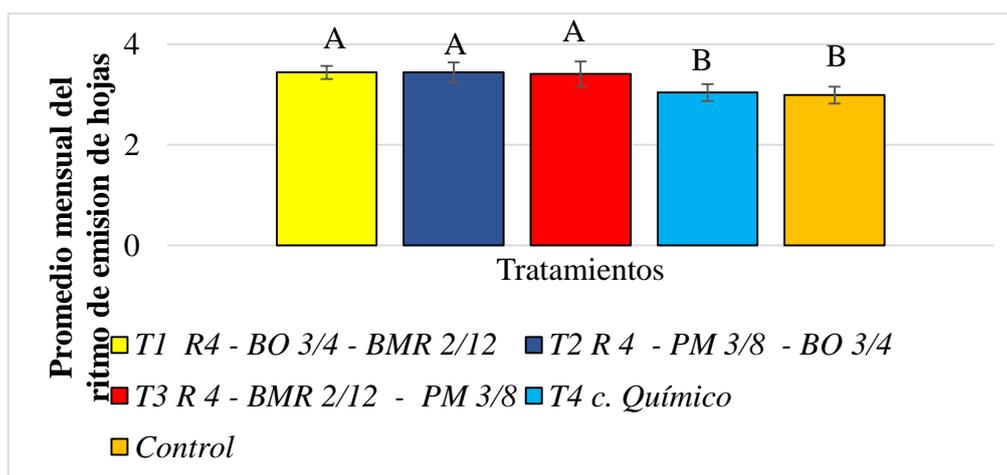


**Figura 27. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el diámetro del pseudotallo**

T1 (R4, BO 3-4, BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.6.8. Ritmo de emisión de hojas

Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron que se acelere el ritmo de emisión de hojas a diferencia de los controles. El mayor ritmo de emisión de hojas se obtuvo de las combinaciones (R 4, PM 3-8, BO 3-4) y (R 4, BO 3-4, BMR 2-12) obteniendo 3.44 hojas mensual y la combinación (R 4, BMR 2-12, PM 3-8) obteniendo 3.41 hojas mensual estadísticamente iguales y superiores a los demás tratamientos. El menor ritmo de emisión de hojas se obtuvo en las plantas sin inoculante que superan las 3 hojas mensual (Figura 28).

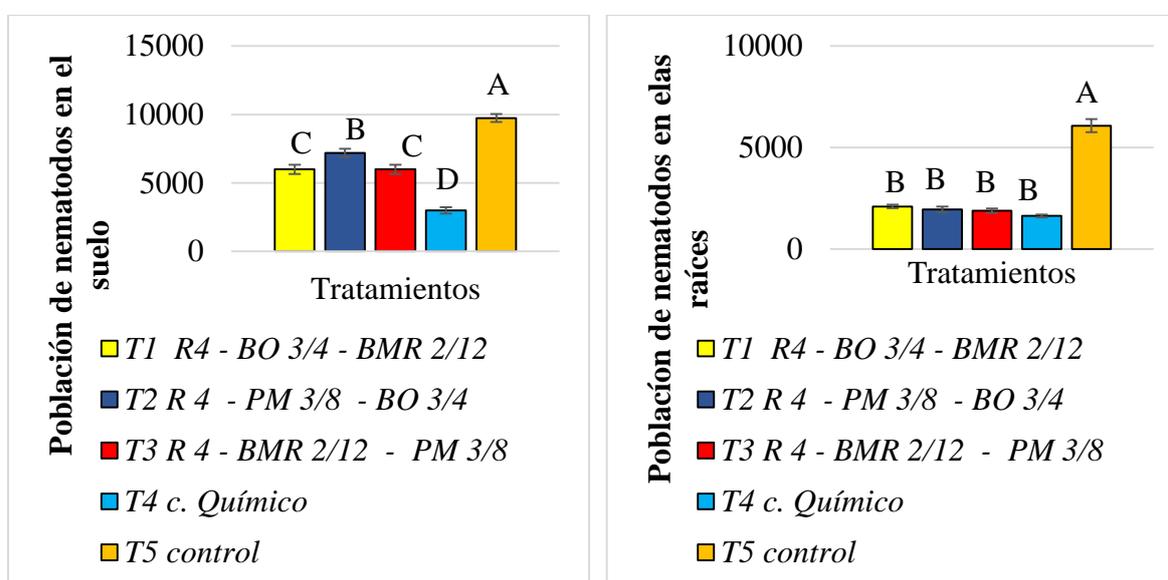


**Figura 28. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el ritmo de emisión de hojas**

T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). Los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.6.9. Densidad poblacional de nematodos en suelo y raíces

Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron la reducción de la población de nematodos en el sistema radicular y en el suelo. La menor población de *R. similis* se verificó con las combinaciones (R 4, BO 3-4, BMR 2-12), (R 4, PM 3-8, BO 3-4) y (R 4, BMR 2-12, PM 3-8) obteniendo poblaciones de 6,000; 7,200 y 6,000, la mayor población de *R. similis* en el suelo se obtuvo con el control con una población de 9,750 nematodos (Figura 29). La menor población *R. similis* se verificó con las combinaciones (R 4, BO 3-4, BMR 2-12), (R 4, PM 3-8, BO 3-4) y (R 4, BMR 2-12, PM 3-8) 2,100; 1,950; 1,885 respectivamente, la mayor población de *R. similis* en las raíces se obtuvo en el control con una población de 6,075 nematodos mientras que nematodos en 50 gramos de raíces. Estadísticamente iguales (Figura 29).

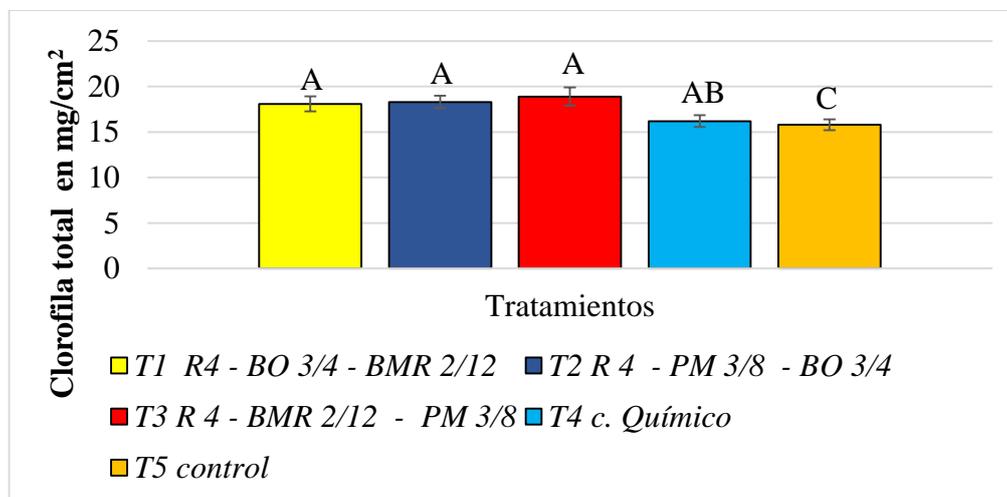


**Figura 29. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre las poblaciones de nematodos en el suelo y raíces** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el porcentaje de antagonismo correspondiente a cada tratamiento

#### 4.1.6.10. Clorofila total

Las bacterias aplicadas en consorcio promovieron el incremento del contenido de la clorofila a diferencia de las plantas sin inoculante bacteriano. La mayor concentración de clorofila total se obtuvo con las combinaciones (R4, BMR 2-12 y PM 3-8) con 13.42mg/cm<sup>2</sup> mientras que la combinación (R4, PM 3-8, BO 3-4) y (R4, BO 3-4, BMR 2-12) con 13.34 y 12.78 mg-

cm<sup>2</sup> respectivamente, estadísticamente superiores a las plantas sin inoculante. La menor concentración del contenido de clorofila se obtuvo en las plantas sin inoculante que no superaron los 9.5 mg/cm<sup>2</sup> (Figura 30).



**Figura 30. Efecto de las combinaciones bacterianas sobre el contenido clorofila total** T1 (R4, BO 3-4 BMR 2-12), T2 (R4, PM 3-8, BO 3-4), T3 (R4, BMR 2-12, PM 3-8). los tratamientos con letras similares no presentan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las columnas indican el contenido de clorofila correspondiente a cada tratamiento.

## 4.2. Discusión

### 4.2.1. Identificación morfológica y molecular

Los caracteres morfológicos descritos coinciden con los de Filipjev & Schuurman-Stenhoven (1941) en *P. brachyurus*, *P. neglectus*, y *P. penetrans*.

Las cabezas en ciertos individuos se observan suavemente ancha y en otros más angostas (Roman & Hirschman, 1969; Tarté & Mai, 1976; Corbett & Clart, 1983; Castillo & Volvas, 2007), explican que la región labial se encuentra ligeramente desplazada del cuerpo, siendo la parte anterior baja y aplanada. La forma de los nódulos del estilete, presentan una forma cóncava y redondeada según Roman & Hirschmann (1969) también observaron en *P. penetrans* que la forma y longitud del estilete puede tener una variación más o menos redondeada en la parte anterior marcadamente en forma de copa. Así mismo Bert *et al.*, (2003) demostraron que la espermateca del género *Pratylenchus* se forma a partir de un total de 12 células, disposición específica para cada especie.

Las hembras de *Pratylenchus* observadas poseen la vulva aproximadamente a 70% de la longitud del cuerpo concordando con Davis & Mac Guidwin (2000) que manifiestan que las hembras de *Pratylenchus* se caracterizan por poseer la vulva a una altura del 70, 80% de la longitud del cuerpo.

La forma de la cola se observó más o menos cónica pero redondeada y lisa al final, concordando con las descripciones de Roman & Hirschmann (1969), quienes observaron el extremo de la cola redondeado y liso. Tarté & Mai (1976) demostraron que la forma final de la cola de la hembra de *P. penetrans* puede variar en función de los factores ambientales, en particular de la planta hospedero, por lo que los individuos tienen que ser interpretados cuidadosamente.

Castillo & Volvas (2007), Corbett & Clark, (1983) mencionan que a longitud del cuerpo, la forma de los nódulos y longitud del estilete pueden no ser buenos caracteres para la identificación de especies de *Pratylenchus spp.*, ya que, dentro de una misma especie, estos aspectos se pueden ver modificados por factores bióticos y abióticos.

La identificación del nematodo *Pratylenchus* mediante la técnica de PCR obtuvo un producto de 350 bp en concordancia con Albanna *et al.*, (1997) cuando fue realizada la prueba de ADNr de *Pratylenchus* con los partidores D3A y D3B, obtuvo una amplificación de 350 bp respectivamente. Así mismo Sandoval, (2015) indica que con las muestras de

ADNr obtenidas de las hembras adultas produjeron amplicones de 350 bp.

No existen estudios recientes del género de *Pratylenchus* presente en banano y las investigaciones previas no se basan en métodos moleculares. Se debe tener en cuenta que la separación de *P. coffeae* mediante métodos morfológicos y morfométricos es poco fiable debido a la similitud de caracteres (De Luca, 2012) lo que hubiera podido llevar a errores en las identificaciones previamente realizadas y podría considerarse la posibilidad de lo que originalmente se identificó como *P. coffeae* se tratara en realidad de otra especie.

#### **4.2.2. Plataforma de reproducción**

Los hábitos alimenticios de los nematodos determinan el tipo de tejido vegetal necesario para su cultivo (Coyne *et al.*, 2014). El nematodo lesionador *Pratylenchus spp.*, al ser un nematodo endoparásito migratorio, no requiere elementos vasculares y puede reproducirse fácilmente en tejido de callo indiferenciado o en materiales como la zanahoria (Coyne *et al.*, 2014). En el 2010 Gonzaga V. & Santos J.M., demostraron que los discos de zanahoria son un medio adecuado para la multiplicación de la mayoría de especies del género *Pratylenchus*. La técnica de disco de zanahoria estéril ha sido empleada con éxito para el cultivo monoxenico de varias especies del nematodo lesionador, como *P. vulnus* (Moody *et al.*, 1973), *P. brachyurus* (O'Bannon y Taylor 1968), *P. sudanensis* (Mudiope *et al.*, 2004), *P. scribneri* (Lawn & Noel, 1986) y *P. zaeae* (Kagoda *et al.*, 2010).

Los discos de zanahoria ofrecen una alternativa rentable y menos laboriosa para reproducir nematodos, lo que resulta en una mayor cantidad obtenida de nematodos en comparación con otros métodos (Boisseau, 2008).

La población de nematodos obtenidas aumentó en 264 veces de la población inicial lo cual es mayor a las obtenidas por Gonzaga *et al.*, (2012) en la investigación de dos métodos in vitro para la reproducción de *Pratylenchus brachyurus* y *R. similis* en zanahoria, quien obtuvo un aumento de 226 veces para *Pratylenchus brachyurus* y 280 para *R. similis*. Costa (2014) trabajo con 12 poblaciones de *R. similis* quien encontró que las poblaciones más agresivas se reproducen más rápido que las demás que las poblaciones menos agresivas.

Castillo *et al.*, (1995) y Boisseau M & Sarah JL, (2008) también obtuvieron los mejores resultados en la reproducción vitro de los géneros *Pratylenchus* y *Radopholus* en zanahoria en este tiempo de incubación. Costa en el 2004 en una investigación para evaluar la dinámica

poblacional de 3 poblaciones de *R. similis* el cual obtuvo su pico de población más alto los 60 días.

El mayor número de nematodos sugiere que periodos iguales o mayores de 60 días son ideales para obtener poblaciones altas de *P. coffeae*. Castro & Ferraz, (1989) obtuvieron los mejores resultados 60 días después de la inoculación. Como los cilindros de la zanahoria se encontraron en buenas condiciones todavía sería sostenida por un periodo de tiempo más largo. Fallas & Sarah (1994) manejaron la población de *R. similis* para mantenerla creciendo en discos de zanahoria por 75 días a 25°C. Gonzaga & Santos, (2010) también obtuvieron poblaciones altas de *Pratylenchus spp.* 100 días después de la inoculación.

#### **4.2.3. Efecto antagonista de las PGPRs contra el nematodo *Pratylenchus spp.***

##### **➤ Inhibición de eclosión de huevos**

Las cepas de *P. veronii* (R4) y *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) presentó la mayor inhibición de eclosión de huevos contra *Pratylenchus* con 75.6% y 70% respectivamente obteniendo resultados similares a los de Verdesoto (2018) que obtuvo en *R. similis* un 70% en las cepas (BMR 2-12) (R4). Valarezo (2017) en *Meloidogyne* incógnita obtuvo con la R4 un promedio de 96% esto puede deberse al hábito del nematodo mientras que con la cepa (BMR 2-12) obtuvo promedio de 70%. Montes *et al.*, (2016), menciona que *P. veroni* produce proteasa que tiene actividad nematicida a huevos de *Xiphinema index*. La proteasa es una enzima que degrada la pared celular al patógeno. Estas enzimas hidrolíticas actúan como factores biocontroladores Elad *et al.*, (1982).

Las cepas *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. varicola* (BO 3-4) presentaron una menor inhibición con 58 % y 47% concordando con Verdesoto, (2018) que obtuvo menor inhibición de eclosión de huevos con las cepas (PM 3-14) y (PM 3-8) en *R. similis* con 43% y 25% respectivamente. No concordando con lo obtenido por Valarezo (2017) quien obtuvo en *M. incógnita* un promedio de 94% con la cepa (PM 3-8) pero resultado similar en la cepa (BO 3-4).

##### **➤ Antagonismo de las PGPR's en J2**

La cepa de *A. calcoaceticus* (BMR 2-12) presentó un alto potencial antagonista contra *Pratylenchus*, obteniendo un porcentaje de mortalidad en nematodos J2 a las 72h de la exposición superior al 88%, similares a los obtenidos por Verdesoto, (2018) en *R. similis* que obtuvo promedio de 90% pero diferente a los resultados obtenidos por Valarezo, (2017),

este menciona que *A. calcoaceticus* (BMR 2-12) generó una mortalidad de  $\leq 25$  % en nematodos J2 de *M. incógnita* a las 24h de la exposición. La diferencia en resultados se dio a causa de las pocas horas que fue evaluado *A. calcoaceticus* (BMR 2-12) contra *M. incógnita*.

La cepa *P. veronii* (R4) presentó una mortalidad en *Pratylenchus* superior al 64% difiriendo a los resultados obtenidos por Verdesoto, (2018) y Valarezo, (2017) quienes manifiestan que obtuvieron promedios de 86% y 87% en *R. similis* y *M. incógnita* respectivamente. Las variaciones se deben a la biología de cada nematodo.

Las cepas *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. varicola* (BO 3-4) presentaron menor capacidad antagonista con 30,6 y 31,6% respectivamente, difiriendo a los resultados obtenidos por Verdesoto, (2018) y Valarezo, (2017) quienes manifiestan que obtuvieron promedios de 76 y 65% en *R. similis* y *M. incógnita* respectivamente con la cepa (PM 3-8) a diferencia de la cepa (BO 3-4) que presentó promedio  $\leq 25$  % en *M. incógnita*

#### ➤ **Antagonismo de las PGPR's en J2 medio M3**

El porcentaje de antagonismo en este medio a las 72 horas fue 91,6% para *A. calcoaceticus* (BMR 2-12) 83.1% para *P. veronii* (R4) 71.4% para *S. marcescens* (PM 3-8) y 63.2% para *K. varicola* (BO 3-4) estos porcentajes de mortalidad de *Pratylenchus spp.* se debe a la producción de metabolitos producidos por las distintas cepas bacterianas que se utilizó, estas producen Proteasas, Quitinasas, Cianuro de Hidrogeno, sideroforos y Pirrolnitrina. Se ha descrito comúnmente que las quitinasas están involucradas en el control de nematodos, debido a que estas enzimas pueden degradar la cutícula del patógeno principalmente constituida por la quitina (Qiu *et al.*, 1997). De igual manera el cianuro es un agente fitotóxico capaz de inhibir las enzimas involucradas en los principales procesos metabólicos, y su utilización en áreas de métodos de biocontrol está aumentando (Devi & Cols; 2007) además los sideróforos son secretados por las bacterias de manera que afecte a la competitividad, ya que inhiben el crecimiento de otros microorganismos debido a que poseen acción antibiótica, e impiden el crecimiento de patógenos limitando el hierro disponible para ellos (Shen & Cols; 2013).

#### ➤ **Inoculación combinaciones bacterianas en plantas de banano en vivero**

Las rizobacterias benéficas asociadas a las raíces de las plantas pueden estimular el crecimiento y la productividad de diferentes cultivos por medio de diversos mecanismos

(Bhattacharyya & Jha, 2012; Saharan & Nehra, 2011; Vessey, 2003). En la literatura se encuentran un gran número de reportes que demuestran los efectos benéficos de la inoculación de diferentes PGPR a nivel in-vitro, como en invernadero y campo (Posada, 2012a; Posada, 2012b; Gholami *et al.*, 2009; Ramírez, 2008; Oswald *et al.*, 2007; Mia *et al.*, 2005; Cakmakc *et al.*, 2001; Turner & Backman, 1991)

Bajo estas condiciones experimentales la inoculación de las combinaciones bacterianas indujo significativamente en el desarrollo de la planta y contenido de clorofila, estos resultados deben ser comparados con los obtenidos con otros géneros de bacterias debido a que no se han encontrado referencias de estos géneros en el control de nematodos.

Los tratamientos inoculados con las rizobacterias tuvieron mayor longitud, diámetro del pseudotallo, mayor número de raíces, peso de raíces, porcentaje de raíces funcionales con un aumento del 32%, 33%, 53%, 149%, 28%, respectivamente lo cual corrobora con (Rodríguez *et al.*, 2008) quienes mencionan que mediante la inoculación de dos cepas de *P. fluorescens* cepas EPS291 y EPS817, con ambas cepas bacterianas indujeron un efecto positivo sobre el crecimiento del banano micropropagado. El mayor efecto se observó en plantas tratadas con *P. fluorescens* EPS817. Discrepando con Maziah *et al.*, (2010) mencionan que mediante la inoculación de rizobacterias UPMB10 en medios que contienen 1 ml de boro mostro un aumento significativo en el peso fresco y seco, la longitud máxima y total de las raíces 2.1 g, 0.182 g, 20 cm y 76 cm, respectivamente, en comparación con el control o el tratamiento no inoculado, lo cual indican que la inoculación de UPMB10 combinada con boro aumentó el crecimiento de la planta y la biomasa de la raíz de las plántulas; estudios fisiológicos en plántulas de banano expresados como crecimiento de las plántulas, número, peso fresco o seco o raíces, longitud total y máxima de las raíces se vieron aumentando significativamente el crecimiento de la planta a 323.4 y 294.7%, respectivamente, en comparación con el control o el tratamiento no inoculado. (Jaizme *et al.*, 2004) mencionan que con la inoculación de *Bacillus spp.* en plantas de banano "Grande Naine" se detectaron incrementos significativos en el peso fresco aéreo, de raíz y total. La bacteriología aumentó la biomasa fresca y la materia seca aérea en aproximadamente (40 y 43) %, respectivamente. El diámetro y la superficie foliar también fueron significativamente mayores (alrededor del 20%) en las plantas tratadas con *Bacillus spp.* consorcio que en las plantas de control. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en pseudotallo y longitudes de raíz adventicias. Estas diferencias se deben al género de las bacterias, la

variedad utilizada la forma de la inoculación ya que ellos lo hacen añadiendo 1ml de boro a la solución bacteriana y estas plantas no fueron inoculadas con nematodos.

Las combinaciones bacterianas mostraron un aumento en el contenido de clorofila total en comparación con las del control el mayor contenido de clorofila se obtuvo 13.42 y 18.7mg/cm<sup>2</sup> para *Pratylenchus spp.* y *R. similis* respectivamente en comparación con los controles que se obtuvo 9.48 y 16.51 mg/cm<sup>2</sup> respectivamente discrepando con (Maziah *et al.*, 2010) quienes obtuvieron resultados de 9.8 mg/cm<sup>2</sup> para la combinación bacteriana y 4.1 mg/cm<sup>2</sup> para el control.

La población de nematodos obtenidos en las combinaciones bacterianas fue menor al del control tanto en el suelo como en el sistema radicular. Corroborando con (Aalten *et al.*, 1998; Jonathan *et al.*, 2000). quienes manifiestan que el uso de PGPR para controlar el nematodo en las raíces del banano ya se ha descrito, informando reducciones significativas del daño del nematodo y la invasión de los tejidos de la raíz. De igual manera por medio de la producción de metabolitos producidos por las distintas cepas bacterianas que se utilizó, estas producen Proteasas, Quitinasas, Cianuro de Hidrogeno, sideroforos y Pirrolnitrina. De igual manera el cianuro es un agente fitotóxico capaz de inhibir las enzimas involucradas en los principales procesos metabólicos, y su utilización en áreas de métodos de biocontrol está aumentando (Devi & Cols, 2007) además los sideróforos son secretados por las bacterias de manera que afecte a la competitividad, ya que inhiben el crecimiento de otros microorganismos debido a que poseen acción antibiótica, e impiden el crecimiento de patógenos limitando el hierro disponible para ellos (Shen & Cols, 2013).

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones

- La hembra de *Pratylenchus spp.* posee el cuerpo más alargado en comparación con el macho oscilando la longitud total entre 340 y 810µm, poseen estilete bien desarrollado, la cola tiene forma cónica, pero redondeada al final.
- La plataforma de reproducción masiva más idónea fue la de discos de zanahoria la cual se obtuvo una población de 13,212 nematodos en cada disco.
- La mayor inhibición de eclosión de huevos en *Pratylenchus* se obtuvo con las cepas *P. veronii* (R4) y *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) que presentaron promedios de 75.6 y 70% respectivamente.
- El mayor antagonismo de *Pratylenchus J2* se obtuvo con el medio M3 destacándose las cepas *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) y *P. veronii* (R4) con promedios de 90.9% y 82.9% respectivamente, de igual manera las cepas *S. marcescens* (PM 3-8) y *K. varicola* (BO 3-4) tuvieron un promedio de antagonismo de 69.6 y 62.2% respectivamente.
- La mejor combinación bacteriana en los ensayos in vivo con *Pratylenchus* fueron las cepas *P. veronii* (R4), *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) y *S. marcescens* (PM 3-8) en la cual se obtuvo el mayor longitud y diámetro del pseudotallo con promedios de 37.87 y 3.8cm respectivamente de igual manera mayor peso radicular con 164,73g, esto debido al mayor número de raíces con 29,6 el porcentaje de raíces funcionales 69% en comparación con el control que obtuvieron promedios de 2.82 8.6 66.13 19.27 y 54.78 respectivamente.
- La mejor combinación bacteriana en los ensayos in vivo con *R. similis* fueron las cepas *P. veronii* (R4), *A. calcoeceticus* (BMR 2-12) y *S. marcescens* (PM 3-8) en la cual se obtuvo el mayor longitud y diámetro del pseudotallo con promedios de 3 y 34.13 respectivamente de igual manera mayor peso radicular con 64.03g esto debido al mayor número de raíces con 18.73 el porcentaje de raíces funcionales con el 73.5% y longitud del sistema radicular con 54.6cm en comparación con el control que se obtuvieron promedios de 2.28 28.93 13.14 56.71 27.9 y 38.57 respectivamente.

## 5.2. Recomendaciones

- Realizar la caracterización molecular de las especies del género *Pratylenchus* que predominan en las plantaciones bananeras de la zona.
- Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* con los sobrenadantes bacterianos y las células bacterianas crecidos en el medio M3 en otros géneros de nematodos y en diferentes cultivos de la zona para comprobar su efectividad.
- Producir masivamente el medio M3. para aplicarlo en plantaciones comerciales de banano con el fin de realizar nuevos estudios de efectividad en el campo.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Bibliografía

Aalten, P. M., Vitour, D., Blanvillain, D., Gowen, S. R., & Sutra, L. (1998). Effect of rhizosphere *Pseudomonas fluorescent* strains on plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne spp.* *Letters in Applied Microbiology*, 27(6), 357-361.

Al-Banna, L., Williamson, V., & Gardner, S. L. (1997). Phylogenetic Analysis of Nematodes of the Genus *Pratylenchus* Using Nuclear 26S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 94-102.

Al-Banna, L., Ploeg, A. T., Williamson, V. M., & Kaloshian, I. (2004). Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology*, 36(2), 142.

Atkinson, H. J., Urwin, P. E., & McPherson, M. J. (2003). Engineering plants for nematode resistance. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 615-639.

Agrios, G. N. (2010). *Fitopatología*. Mexico : Limusa.

Araya, M. (2003). Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el trópico americano. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos, 79-102.

Araya, T. Z., Padilla, W. P., Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liébanas, G., Palomares-Rius, J. E., & Castillo, P. (2016). Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezii* and *P. panamaensis* topotypes. *European journal of plant pathology*, 145(4), 973-998.

Arevalo Pinto, M. A. (2017). Evaluación de la reproducción in vitro de *Pratylenchus coffeae* en zanahoria (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Bach, T., Díaz, M., Ferreira, A., Laurent, A. (2007). Estudio de las características de promoción del desarrollo vegetal de *Pseudomonas fluorescens* utilizada en el biofertilizante Rizofos. VI Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelo. VI Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, ISBN 978-950-665437-5. Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Becker, J. O., Zavaleta-Mejia, E., Colbert, S. F., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., Hancock, J. G., & Van Gundy, S. D. (1988). Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology (USA)*.
- Bert, W., Van Gansbeke, R., Claeys, M., Geraert, E., & Borgonie, G. (2003). Comparative morpho-anatomical studies of the female gonoduct within the Pratylenchidae (Nematoda: Tylenchina). *Nematology*, 5(2), 293-306.
- Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 53-69). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Boisseau, M., & Sarah, J. L. (2008). In vitro rearing of Pratylenchidae nematodes on carrot discs. *Fruits*, 63(5), 307-310.
- Çakmakçı, R., Kantar, F., & Sahin, F. (2001). Effect of N<sub>2</sub>-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(5), 527-531.
- Castaneda-Alvarez, C., & Aballay, E. (2016). Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 203.
- Castro, M. D. A. (1986). *Multiplicacao'in vitro'de Pratylenchus brachyurus, Pratylenchus zae, Radopholus similis e Tylenchorhynchus sp* (No. Thesis C355mu). Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais (Brasil).
- Castillo, P., Trapero-Casas, J. L., & Jiménez-Díaz, R. M. (1995). Effect of time, temperature, and inoculum density on reproduction of *Pratylenchus thornei* in carrot disk cultures. *Journal of Nematology*, 27(1), 120.
- Castillo, P., & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management*. Brill.
- Chandler, S. (1995). The nutritional value of bananas. In *Bananas and plantains* (pp. 468-480). Springer, Dordrecht.
- Chávez-Velazco, C., Solórzano-Figueroa, F., & Araya-Vargas, M. (2009). Relación entre

- nematodos y la productividad del banano (Musa AAA) en Ecuador. *agronomía mesoamericana*, 351-360.
- Chen, T. A., & Wen, G. Y. (1972). Ultrastructure of the feeding apparatus of *Pratylenchus penetrans*. *Journal of nematology*, 4(3), 155.
- Corbett, D. C. M. (1973). *Pratylenchus penetrans*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set, 2.
- Coyne, D. L., Adewuyi, O., & Mbiru, E. (2014). Protocol for in vitro culturing of lesion nematodes: *Radopholus similis* and *Pratylenchus spp.* on carrot discs.
- De Luca, F., Troccoli, A., Duncan, L. W., Subbotin, S. A., Waeyenberge, L., Coyne, D. L., ... & Inserra, R. N. (2012). *Pratylenchus speijeri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae), a new root-lesion nematode pest of plantain in West Africa. *Nematology*, 14(8), 987-1004.
- Del Carmen Jaizme-Vega, M., Rodríguez-Romero, A. S., & Guerra, M. S. P. (2004). Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated bananas. *Fruits*, 59(2), 83-90.
- Devi, K. K., Seth, N., Kothamasi, S., & Kothamasi, D. (2007). Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions. *Current Microbiology*, 54(1), 74-78.
- Donald, C., & CLARK, A. (1983). Surface features in the taxonomy of *Pratylenchus* species. *Revue Néinatol*, 6(1), 85-98.
- Donn, S., Griffiths, B. S., Neilson, R., & Daniell, T. J. (2008). DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies. *Applied Soil Ecology*, 38(1), 20-26.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M. L., Vicré-Gibouin, M., & Hawes, M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 489-495.
- Duncan, L. W., Inserra, R. N., & Dunn, D. (1998). Seasonal changes in citrus fibrous root starch concentration and body length of female *Pratylenchus coffeae*. *Nematropica*.
- Fallas, G. A., & Sarah, J. L. (1994). Effect of storage temperature on in vitro reproduction of *Radopholus similis*. *Nematropica*, 24(2), 175-177.

- Filipév, I. N., & Stekhoven, J. H. S. (1941). *A manual of agricultural helminthology*. Brill Archive.
- Fosu-nyarko, J. O. H. N., Jones, M. G., & Wang, Z. (2009). Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. *Molecular Plant Pathology*, *10*(2), 237-248.
- Frederick, J. J., & Tarjan, A. C. (1989). A compendium of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nemata: Pratylenchidae). *Revue de Nématologie*, *12*(3), 243-256.
- Gauggel, C. A., Sierra, F., Arévalo, G., Turner, D. W., & Rosales, F. E. (2003). La problemática del deterioro radical del banano y su impacto en la producción: Experiencia en América Latina. *Sistema radical del banano: Hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo*.
- Gholami, A., Shahsavani, S., & Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *Int J Biol Life Sci*, *5*(1), 35-40.
- Gonzaga, V., & Santos, J. M. (2010). Estudo comparativo de multiplicação in vitro de seis espécies de *Pratylenchus* em cilindros de cenoura. *Nematologia brasileira*, *34*, 226-230.
- Goto, D. B., Miyazawa, H., Mar, J. C., & Sato, M. (2013). Not to be suppressed? Rethinking the host response at a root-parasite interface. *Plant Science*, *213*, 9-17.
- Goulart, A. M. C. (2008). Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (*gênero Pratylenchus*). Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Guzmán Piedrahita, Ó. A. (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Revista Luna Azul*, (33).
- Guzmán, Ó. A., Castaño, J., & Villegas, B. (2012). Efecto de la limpieza sanitaria de cormos de plátano (*Musa AAB Simmonds*) sobre nematodos fitoparásitos. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, *15*(1), 87-95.
- Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., & Waeyenberge, L. (2007). Comparative d2/d3 LSU-rDNA sequence study of some Iranian *Pratylenchus loosi* populations. *African Journal of Biotechnology*, *6*(21).
- Hamdan, H., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1991). Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3270-3277.

Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307.

Handoo, Z. A., & Golden, A. M. (1989). A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematodes). *Journal of Nematology*, 21(2), 202.

Inserra, R. N., Troccoli, A., Gozel, U., Bernard, E. C., Dunn, D., & Duncan, L. W. (2007). *Pratylenchus hippeastri* n. sp.(Nematoda: Pratylenchidae) from amaryllis in Florida with notes on *P. scribneri* and *P. hexincisus*. *Nematology*, 9(1), 25-42.

Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Hearne, L., Maier, T., Baum, T. J., & Mitchum, M. G. (2007). Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(3), 293-305.

Jonathan, E. I., Barker, K. R., Abdel-Alim, F. F., Vrain, T. C., & Dickson, D. W. (2000). Biological Control Of *Meloidogyne incognita* on Tomato and Banana with Rhizobacteria, *Actinomycetes*, and *Pasteuria Penetrans*. *Nematropica*, 30(2), 231-240.

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323.

Jones, M. G. K., & Fosu-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus spp.*) and their interaction with host plants. *Annals of applied biology*, 164(2), 163-181.

Kagoda, F., Coyne, D. L., Mbiru, E., Derera, J., & Tongoona, P. (2010). Monoxenic culture of *Pratylenchus zaeae* on carrot discs. *Nematologia Mediterranea*, 38(1).

Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shinwari, Z. K., Kim, Y. H., Joo, G. J., & Lee, I. J. (2012). *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pak. J. Bot*, 44(1), 365-372.

Kisiel, M., Himmelhoch, S., & Zuckerman, B. M. (1972). Fine structure of the body wall and vulva area of *Pratylenchus penetrans*. *Nematologica*, 18(2), 234-238.

Kisiel, M. J., Himmelhoch, S., Castillo, J. M., & Zuckerman, B. M. (1974). Fine structure of the intestine of *Pratylenchus penetrans*. *Nematologica*, 20(2), 262-264.

- Kloepper, J. W., Tuzun, S., Liu, L., & Wei, G. (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. *Pest management: biologically based technologies. American Chemical Society Books, Washington, DC*, 156-165.
- Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2006). Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In *Microbial root endophytes* (pp. 33-52). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kumar, A. R., Kumar, N., Poornima, K., & Soorianathasundaram, K. (2008). Screening of in-vitro derived mutants of banana against nematodes using bio-chemical parameters. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 271-279.
- Lawn, D. A., & Noel, G. R. (1986). Gnotobiotic culture of *Pratylenchus scribneri* on carrot discs. *Nematropica*, 16(1), 45-51.
- Lilley, C. J., Wang, D., Atkinson, H. J., & Urwin, P. E. (2011). Effective delivery of a nematode-repellent peptide using a root-cap-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 151-161.
- Lira, V. L., Rosa, M. O., de Oliveira, S. A., de Oliveira, C. M. G., & de Moura, R. M. (2014). Análises morfológica e molecular de isolados de *Pratylenchus coffeae* ocorrentes no estado de pernambuco, Brasil, em Inhame. *Nematropica*, 44(2), 152-165.
- Loof, P. A. (1978). *The genus Pratylenchus Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae): a review of its anatomy, morphology, distribution, systematics and identification*. Swedish University of Agricultural Sciences, Research Information Centre..
- Loof, P. A. A. (1991). The family Pratylenchidae Thorne, 1949. Manual of agricultural nematology. New York, NY, USA, Marcel Dekker, 363-421.
- Loper, J. E. (1988). Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology*, 78(2), 166-172.
- Luc, M., Sikora, R., & Bridge, J. (2005). En Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. (pág. 917). CABI: Wallingford.
- Martínez, H. F. C., Rosero, N. C., Álvarez, A. E. B., Carriel, J. M., Malagón, G. C., & Jaramillo, M. P. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas spp* como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(1), 25-30.

- Maziah, M., Zuraida, A. R., Halimi, M. S., Zulkifli, H. S., & Sreeramanan, S. (2010). Influence of boron on the growth and biochemical changes in plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated banana plantlets. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 933-944.
- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., & Pierson, L. S. (1992). Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2616-2624.
- Mia, M. A. B., Shamsuddin, Z. H., Wahab, Z., & Marziah, M. (2005). High-yielding and quality banana production through plant growth-promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation. *Fruits*, 60(3), 179-185.
- Michel, L. U. C., Baldwin, J. G., & Arnold, H. (1986). *Pratylenchus moretto* n. sp. (Nemata: Pratylenchidae). *Revue Nématol*, 9(2), 119-123.
- Ministerio de Comercio Exterior. (Junio de 2017). Recuperado el Junio de 2018, de Boletín de Banano : [http://panama.embajada.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/informe\\_sobre\\_el\\_sector\\_bananero\\_ecuatoriano\\_29.05.2017\\_def.pdf](http://panama.embajada.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/informe_sobre_el_sector_bananero_ecuatoriano_29.05.2017_def.pdf)
- Moody, E. H., Lownsbery, B. F., & Ahmed, J. M. (1973). Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology*, 5(3), 225.
- Mudiope, J., Coyne, D. L., Adipala, E., & Sikora, R. A. (2004). Monoxenic culture of *Pratylenchus sudanensis* on carrot disks, with evidence of differences in reproductive rates between geographical isolates. *Nematology*, 6(4), 617-619.
- Nickle, W. R. (1991). Manual of agricultural nematology. M. Dekker.
- Nithyadevi, A., Ponnuswami, V., Sundararaju, P., Soorianathasundaram, K., & Sathiamoorthy, S. (2007). Phenylalanine ammonia lyase and total phenol content in resistant banana to *Pratylenchus coffeae*.
- Nguyen, T. D., Le, T. M. L., Nguyen, H. T., Nguyen, T. A. D., Liebanas, G., & Trinh, Q. P. (2017). Morphological and Molecular Characteristics of *Pratylenchus haiduongensis* sp. n., a New Species of Root-Lesion Nematodes Associated with Carrot in Vietnam. *Journal of nematology*, 49(3), 276.

- Núñez Pérez, C. (2006). Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nemátodo barrenador *Radopholus* of banana rhizosphere endophytic bacteria polulations to biocontrol *Radopholus similis* borer nematode (No. Thesis N972est). CATIE, Turrialba (Costa Rica).
- OBannon, J. H., & Taylor, A. L. (1968). Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. *Phytopathology*, 58(3), 385.
- Oldroyd, G. E., & Robatzek, S. (2011). The broad spectrum of plant associations with other organisms. *Current opinion in plant biology*, 4(14), 347-350.
- Oswald, A., Calvo, P., Sanchez, J., & Zúñiga, D. (2007). Using plant growth promoting rhizobacteria to improve potato production and plant health. In Proceedings of the 16th International Symposium of the International Scientific Centre for Fertilizers (CIEC)-Mineral Versus Organic Fertilization Conflict or Synergism (pp. 401-409).
- Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., & Castillo, P. (2014). Cryptic species in plant-parasitic nematodes. *Nematology*, 16(10), 1105-1118.
- Ploetz, R. (2004). *Enfermedades y plagasy: Un análisis de su importancia y manejo*. INIBAP, Montpellier (Francia)..
- Price, N. S. (1995). The origin and development of banana and plantain cultivation. In *Bananas and plantains* (pp. 1-13). Springer, Dordrecht.
- Posada, L. F., Alvarez, J. C., Hu, C. H., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2016). Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence in situ hybridization. *Journal of microbiological methods*, 128, 125-129.
- Purkayastha, G. D., Mangar, P., Saha, A., & Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PloS one*, 13(2), e0191761.
- Qtu, J., Hallmann, J., Kokalis-Burelle, N., Weaver, D. B., Rodriguez-Kabana, R., & Tuzun, S. (1997). Activity and differential induction of chitinase isozymes in soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. *Journal of nematology*, 29(4), 523.
- Queiroz, B. P. V. D., & Melo, I. S. D. (2006). Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 448-450.

- Ramírez, C. A. (2005). Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas en banano (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 169p).
- Rodríguez-Romero, A. S., Badosa, E., Montesinos, E., & Jaizme-Vega, M. C. (2008). Growth promotion and biological control of root-knot nematodes in micropropagated banana during the nursery stage by treatment with specific bacterial strains. *Annals of Applied Biology*, *152*(1), 41-48.
- Roman, J., & Hirschmann, H. (1969). Morphology and morphometrics of six species of *Pratylenchus*. *Journal of Nematology*, *1*(4), 363.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, *21*(1), 30.
- Sandoval Ruiz, R. (2015). Determinación molecular de especies de *Pratylenchus* asociadas a cultivos agrícolas de Costa Rica.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC genomics*, *14*(1), 271.
- Smant, G., & Jones, J. (2011). Suppression of plant defences by nematodes. In *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 273-286). Springer, Dordrecht.
- Saeed, I., Macguidwin, A., & Rouse, D. (1998). Effect of Initial Nematode Population Density on the Interaction of *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* on 'Russet Burbank' Potato 1. *Journal of Nematology*, 100 - 107.
- Santos, J. R., Andrade, E. P., Costa, D. C., Gonzaga, V., & Cares, J. E. (2012). Comparison of two methods for in vitro multiplication of *Radopholus similis* and *Pratylenchus brachyurus* in carrot cylinders. *Tropical Plant Pathology*, *37*(4), 266-270.
- Siddiqui, I. A., & Ehteshamul-Haque, S. (2001). Suppression of the root rot–root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: The influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria. *Plant and Soil*, *237*(1), 81-89.

- Siddiqui, I. A., & Shaukat, S. S. (2003). Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(12), 1615-1623.
- Singh, S. K., Hodda, M., Ash, G. J., & Banks, N. C. (2013). Plant-parasitic nematodes as invasive species: characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology*, 163(3), 323-350.
- Starr, J. L., Bridge, J., & Cook, R. (2002). Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential. *Plant resistance to parasitic nematodes*, 1-22.
- Sundararaju, P. (2002). Fluctuaciones estacionales de *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae* en ciertos cultivares de banano. *INFOMUSA INFOMUSA*, 16.
- Talavera, M. (2003). Manual de nematología agrícola. Introducción al análisis y control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal. México: Edit. Limusa, 1-9.
- Tarte, R., & Mai, W. F. (1976). Morphological variation in *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology*, 8(3), 185.
- Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In *Plant-microbe interactions* (pp. 187-235). Springer, Boston, MA.
- Tripura, C., Sashidhar, B., & Podile, A. R. (2007). Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis–Enhanced Mineral Phosphate Solubilization by Groundnut-Associated *Serratia marcescens* GPS-5. *Current microbiology*, 54(2), 79-84.
- Triviño, C., & Farias, E. (2004). Antagonistas nativos para manejo de *Radopholus similis* en banano. INIAP Archivo Historico.
- Turner, J. T., & Backman, P. A. (1991). Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant disease*, 75(4), 347-353.
- Vargas, R., Wang, A., Obregón, M., & Araya, M. (2015). Efecto de *Trichoderma spp.*, *Paecilomyces lilacinus* y la inyección de nematicida en el pseudotallo en el combate de *Radopholus similis* y la producción de banano. *Agronomía Costarricense*, 61 - 76.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

- Wei, C. Y., Lin, L., Luo, L. J., Xing, Y. X., Hu, C. J., Yang, L. T., ... & An, Q. (2014). Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biology and fertility of soils*, 50(4), 657-666.
- Weller, D. M., & Cook, R. J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatments with *Pseudomonads. fluorescent* *Phytopathology*, 73(3), 463-469.
- Wintermans, J. F. G. M., & De Mots, A. S. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*, 109(2), 448-453.
- Zamora, T., Peraza, W., Archidona, A., Cantalapedra, C., Liebanas, G., Palomares, J., & Castillo, P. (2016). Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *p. gutierrezi* and *P. panamaensis* topotypes. *Koninklijke Nederlandse*, 27.
- Zúñiga, C., & Giannina, K. (2012). Determinación de nemátodos del género *Pratylenchus* en un huerto de manzanos de bajo vigor y evaluación del control químico.

## **CAPÍTULO VII**

### **ANEXOS**

**Anexo 1** aislamiento del nematodo *Pratylenchus*



Recolección de raíces



Limpieza



Licudo



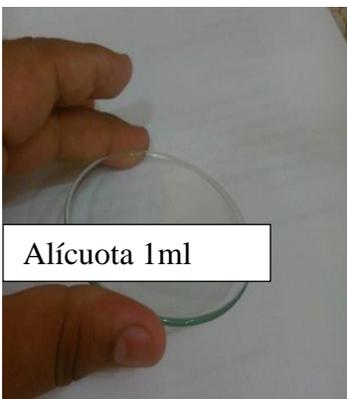
Embudo de Baermann



Tamizado



**Anexo 2** Identificación de *Pratylenchus*



Observación de *Pratylenchus*



**Anexo 3.** Plataforma de reproducción masiva de *Pratylenchus* in vivo



Plataforma de reproducción in vitro **A.** preparación de los discos de zanahoria. **B.** discos de zanahoria listos para ser inoculados con los nematodos. **C.** incubadora calibrada a 28°C para almacenar los discos con la zanahoria. **D.** discos de zanahoria a cuando ya e nematodo se reprodujo.

**Anexo 4.** Plataforma de reproducción in vivo



Plantas de orito sembradas en un espacio de 3x 1m

Aislamiento de *Pratylenchus* de raíces infectadas

Daños ocasionados por *Pratylenchus* en la plataforma

**Anexo 5.** Crecimiento de las bacterias en el medio M3.



**Anexo 6** Obtención de sobrenadantes y Preparación de las cajas de inhibición



Bacterias a las 24 h



Centrifugación para extracción de sobrenadantes



Transferencia a tubos eppendorf



Sobrenadantes bacterianos



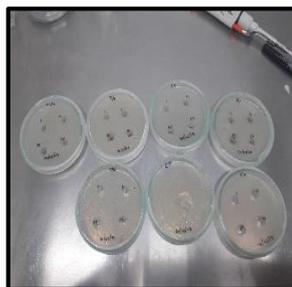
Choque térmico a 95° C y -400 °C



Sobrenadantes filtrados empleando Nalgene Syringe de 0,2µm



Preparación de las placas con 12 pocillos



Inoculación de sobrenadantes a nematodos



**Anexo 7.** Esterilización del suelo



**Anexo 8.** Siembra de las plantas meristemáticas



**Anexo 9.** Plantas ordenadas por repetición



**Anexo 10.** Inoculación de las bacterias



**Anexo 11.** Inoculación de los nematodos



**Anexo 12.** Aplicación del nematicida



**Anexo 13.** Determinación de clorofila



**Anexo 14.** Diferencias entre las combinaciones bacterianas y el control inoculadas con *R. similis*



**Anexo 15** Diferencias entre las combinaciones bacterianas y el control inoculadas con *Pratylenchus*



**Anexo 16** Embudos de Baerman con muestras de nematodos



## **Financiamiento**

El trabajo se financió por el Proyecto de FONDO COMPETITIVO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA FOCICYT (UTEQ-AGRICOLA-2-FCA-IAGR-2017-18), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, de la investigación: “ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE PGPR EN NEMATODOS FITOPARASITOS *Pratylenchus spp.* Y *Radopholus similis* EN *Musa acuminata* (CAVENDISH)”