



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:

“Evaluación del efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (pgprs) con actividad antagonista hacia el nematodo *Radopholus similis* en el cultivo de banano *in vitro*”

Autor:

Angel Vinicio Verdesoto Valencia

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2018

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **ANGEL VINICIO VERDESOTO VALENCIA** 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.

ANGEL VERDESOTO VERDESOTO VALENCIA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado Angel Vinicio Verdesoto Valencia, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado “**Evaluación del efecto de Rizobacterias Promotoras de crecimiento de plantas (PGPRs) con actividad antagonista hacia el nematodo *Radopholus similis* en el cultivo de Banano *in vitro***”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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



Dokument [Marco Teorico.docx](#) (D36794224)

Inskickat 2018-03-21 09:26 (-05:00)

Inskickad av hcanchignia@uteq.edu.ec

Mottagare hcanchignia.uteq@analysis.orkund.com

Meddelande Verdesoto [Visa hela meddelandet](#)

5% av det här c:a 9 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 7 st källor.

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Marco Teorico.docx (D36794224)
Submitted: 3/21/2018 3:26:00 PM
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 5 %

Sources included in the report:

<https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/5797/Bioprospecci%C3%B3n%20de%20hongos%20endof%C3%A1cticos%20para%20el%20control%20biol%C3%B3gico%20del%20nematodo%20barrenador%20Radopholus%20similis%20en%20el%20cultivo%20de%20banano.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
<http://www.sidalc.net/repdoc/A1654E/A1654E.PDF>
http://www.bioquirama.com/pdf/CONTROL_BIOLOGICO_DE_NEMATODOS_EN_BANANO.PDF
<http://www.promusa.org/Radopholus+similis>
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400008>
<https://doi.org/10.1163/156854106779799259>
https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4_70

Instances where selected sources appear:

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:

“Evaluación del efecto de Rizobacterias Promotoras de crecimiento de plantas (PGPRs) con actividad antagonista hacia el nematodo *Radopholus similis* en el cultivo de Banano *in vitro*”.

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

Aprobado por:

Ing. Ignacio Sotomayor Herrera, MSc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ph.D. Fernando Abasolo Pacheco
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ph.D. Marisol Rivero Herrera
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Quevedo – Los Ríos- Ecuador
2018

AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento:

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

Mi agradecimiento al Director de tesis, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, por su amistad, enseñanza, apoyo y estimulación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A los docentes Ing. Cesar Varas, Ing. Ignacio Sotomayor, Ing. Ludvik Amores, Ec. Flavio Ramos, Ing. Pedro Rosero, Dr. Jefferson Aragundi, Ing. Ramiro Gaibor, Ing César Bermeo, Ing. Leonardo Matute, Ing. Alfonso Vasco, PhD. Fernando Abasolo, Ing. Freddy Amores, Ing. Yanila Granados, Ing. Jefferson Bravo, PhD. Silvia Saucedo, Ing. Karina Sotomayor y a la PhD Carmen Suárez, por brindarme su amistad y grandes enseñanzas en el trayecto de toda mi preparación académica.

Al Ing. Antonio Mendoza por brindarme su amistad y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

A mi mejor amigo Ricardo Fernando Romero Meza por su amistad, confianza y apoyo durante el proyecto de investigación y toda mi carrera Universitaria.

A mi mejor amiga Daniela Bucheli por su amistad, confianza y apoyo durante toda mi formación académica.

A mi gran amigo y compañero Jorge Luis Rodríguez Acosta, que siempre me ha apoyado en todo momento y que hemos compartido un sinnúmero de experiencias profesionales.

Al Ing. Luigy Barragán Rosado por brindarme su amistad y estar hay en los mejores y peores momentos a lo largo de mi formación profesional.

A mi gran amigo Oswald Chavez por brindarme su amistad estando en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología: Angel Cedeño, Gabriel Esmeraldas, Jorge Crespo, Byron Muñoz, Isa Girón, Al Ing. Alex Blanco, Deivy Guevara, Javier Auhing, gracias por brindarme su amistad y apoyo a lo largo de la investigación y formación académica.

También a mis amigos Harón Engracia, Joselyn Vélez, Ivo Sabando, Antonio Solórzano, Jaime Briones, Roxana López, Raul Armendáriz, José Nieto, Amy Murillo, Ivan Cano, Jonathan Cervantes, Wagner Velásquez, que han formado parte de mi vida profesional a los que me encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

GRACIAS A TODOS POR SU AMISTAD

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme lograr esta meta en mi vida, también por darme a unos padres maravillosos, ya que, con sus esfuerzos, confianza, amor y apoyo incondicional, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional. Este logro se los dedico a mis padres Carlos Vinicio Verdesoto Vargas y Genny Yolanda Valencia Sigcha.

A mis hermanos Carlos Alberto Verdesoto Valencia y Karla Yolanda Verdesoto Valencia, que siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí sacándome una sonrisa en todo momento.

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación es brindar una alternativa biológica para el control del nematodo *R. similis*, ya que este es uno de los principales problemas en pérdida de producción en el cultivo de banano. El nematodo *R. similis* es un patógeno que ataca el sistema de anclaje de la gran mayoría de musáceas. En esta investigación se empleó PGPRs aisladas de la rizosfera de cultivares de Musáceas spp. del banco de germoplasma del laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Quevedo. Se realizó la caracterización morfológica de *R. similis* siguiendo lo establecido por Ryss & Woust en 1997. También se elaboró distintas plataformas de reproducción masiva para el nematodo, empleados para los ensayos antagonistas. Realizado los ensayos antagonistas con las PGPRs se obtuvo los siguiente resultados: La cepa de *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* presentó un alto potencial antagonista contra *R. similis*, en inhibición de eclosión de huevos superiores al 70%, similares a las cepas controles *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas protegens CHA0* y *Pseudomonas veroni R4* y así mismo la cepa de *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12*, presentó el mayor porcentaje de mortalidad contra nematodos juveniles 2 de *R. similis* superiores al 90%, superando a las cepas controles *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas protegens CHA0* y *Pseudomonas veroni R4*.

ABSTRACT

The main objective of this research is to provide a biological alternative for the control of the nematode *R. similis*, since this is one of the main problems in the loss of the production units in the banana crop. The nematode *R. similis* is a pathogen that attacks the anchoring system of the vast majority of musaceas. In this research, PGPRs isolated from endemic muses belonging to the Microbiology laboratory of the Technical University of Quevedo were used. The morphological characterization of the nematode *R. similis* was carried out, following what was established by Ryss & Woust in 1997. Different platforms of massive reproduction were also elaborated for the aforementioned nematode, later said nematodes were used for the antagonistic tests. Once the antagonistic tests were performed with the PGPRs, the following results were obtained: the strain of *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* presented a high potential antagonist against *R. similis*, obtaining results in the inhibition of egg hatching greater than 70%, similar to control the *Bacillus subtilis* strains, *Pseudomonas protegens CHA0* and *Pseudomonas veroni R4* and also the strain of *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* showed the highest percentage of mortality against juvenile nematodes of *R. similis* greater than 90%, surpassing the control strains *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas protegens CHA0* and *Pseudomonas veroni R4*.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	i
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	viii
RESUMEN.....	ix
TABLA DE CONTENIDO	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
CÓDIGO DUBLÍN	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. Problema de Investigación.....	3
1.1.1. Planteamiento del problema	3
1.1.1.1. Diagnóstico	3
1.1.1.2. Pronóstico.....	3
1.1.2. Formulación del Problema.....	4
1.1.3. Sistematización del Problema	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	3
2.1. Marco conceptual	8
2.1.1. Cultivo de Banano.....	8
2.1.1.1. Variedades.....	8
2.1.1.2. Tolerancia a nematodos.....	9
2.1.2. Nematodo <i>R. similis</i>	9
2.1.2.1. Taxonomía	9

2.1.2.2.	Morfología	10
2.1.2.3.	Hábito	11
2.1.2.4.	Forma de alimentarse y daño	11
2.1.2.5.	Reproducción.....	11
2.1.2.6.	Ciclo de vida.....	12
2.1.2.7.	Hospederos.....	12
2.1.3.	Control Biológico.....	12
2.1.3.1.	Ruta de resistencias ISR y SAR	13
2.1.3.2.	Bacterias endofíticas (BE)	14
2.1.3.3.	<i>Bacillus spp.</i>	15
2.1.3.4.	<i>Pseudomonas spp.</i>	15
2.1.3.5.	<i>Enterobacter spp.</i>	16
2.1.3.6.	<i>Acinetobacter spp.</i>	16
2.1.3.7.	<i>Serratia spp.</i>	17
2.1.3.8.	Metabolitos Secundarios	17
CAPÍTULO III. MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		19
3.1.	Localización.....	20
3.2.	Tipo de investigación	20
3.3.	Métodos de Investigación	20
3.4.	Fuente de recopilación de información	20
3.5.	Diseño de la investigación	20
3.5.1.	Diseño para determinar la plataforma de reproducción masiva más idónea de nematodos <i>R. similis</i>	20
3.5.2.	Diseño para la evaluación de ensayos antagonistas con rizobacterias y sobrenadantes contra nematodos juveniles (J1) <i>R. similis</i>	21
3.5.3.	Diseño para la evaluación de ensayos antagonistas con rizobacterias y sobrenadantes contra nematodos juveniles (J2) <i>R. similis</i>	22
3.6.	Instrumentos de investigación	23
3.6.1.	Materiales de laboratorio	23
3.6.2.	Equipos de laboratorio.....	24
3.6.3.	Reactivos	24
3.6.4.	Material genético.....	25
3.7.	Manejo del Experimento	26
3.7.1.	Identificación nematodo <i>R. similis</i> por características morfológicas.	26
3.7.2.	Establecimiento de la plataforma de reproducción masiva de nematodos.	27

3.7.3.	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las Rizobacterias hacia <i>R. similis</i>	28
3.7.4.	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de los sobrenadantes bacterianos hacia <i>R. similis</i>	29
3.7.5.	Viabilidad de <i>R. similis</i>	30
3.7.6.	Datos registrados y formas de evaluación	30
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		32
4.1.	Resultados	33
4.1.1.	Identificación y caracterización morfológica del nematodo <i>R. similis</i>	33
4.1.2.	Establecimiento de la plataforma de reproducción masiva de nematodos más idónea	35
4.1.3.	Determinar el efecto antagonista de los sobrenadantes bacterianos de las PGPRs contra <i>R. similis in vitro</i>	36
4.1.4.	Determinación el efecto antagonista de las PGPRs contra <i>R. similis in vitro</i>	40
4.2.	DISCUSIÓN	44
4.2.1.	Identificación morfológica.....	44
4.2.2.	Plataforma de reproducción más idónea del nematodo <i>R. similis</i>	44
4.2.3.	Efecto antagonista de las PGPRs contra el nematodo <i>R. similis</i>	45
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		33
5.1.	Conclusiones.....	48
5.2.	Recomendaciones.....	49
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA		51
CAPÍTULO VII. ANEXOS		55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo del nematodo <i>R. similis</i> J1.....	33
Figura 2. Características morfológicas del nematodo <i>R. similis</i> J2.....	34
Figura 3. Plataformas de reproducción del nematodo <i>R. similis</i>	35
Figura 4. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con sobrenadantes contra <i>R. similis</i>	37
Figura 5. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con sobrenadantes contra <i>R. similis</i>	37
Figura 6. Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes contra <i>R. similis</i> J2.....	39
Figura 7. Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes contra <i>R. similis</i> J2.....	39
Figura 8. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con Rizobacterias contra <i>R. similis</i>	41
Figura 9. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con rizobacterias contra <i>R. similis</i> . 41	
Figura 10. Porcentaje de mortalidad con rizobacterias contra <i>R. similis</i> J2.....	42
Figura 11. Porcentaje de mortalidad con rizobacterias contra <i>R. similis</i> J2.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza Plataforma de reproducción.....	21
Tabla 2. Esquema de tratamientos para la evaluación de la plataforma más idónea de reproducción masiva del nematodo <i>R. similis</i>	21
Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J1) <i>R. similis</i>	21
Tabla 4. Esquema de tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J1) <i>R. similis</i>	22
Tabla 5. Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J2) <i>R. similis</i>	22
Tabla 6. Esquema de tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J2) <i>R. similis</i>	23
Tabla 7. Características morfológicas <i>R. similis</i> en micras	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de nematodos <i>R. similis</i>	55
Anexo 2. Observación del Nematodo <i>R. similis</i>	55
Anexo 3. Elaboración plataforma in vitro de discos de zanahoria de <i>R. similis</i>	56
Anexo 4. Elaboración de Plataforma in vivo de <i>R. similis</i>	56
Anexo 5. Elaboración de placas de inhibición para ensayos antagonistas.	56
Anexo 6. Siembra de bacterias y extracción de metabolitos extracelulares.	57

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Evaluación del efecto de Rizobacterias Promotoras de crecimiento de plantas (PGPRs) con actividad antagonista hacia el nematodo <i>Radopholus similis</i> en el cultivo de Banano <i>in vitro</i> ”.		
Autor:	Verdesoto Valencia Angel Vinicio		
Palabras clave:	Rizobacterias	<i>Radopholus similis</i> , PGPRs, <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Eterobacter sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Serratia sp.</i>	Actividad antagonista
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2018		
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>El objetivo principal de esta investigación es brindar una alternativa biológica para el control del nematodo <i>R. similis</i>, ya que este es uno de los principales problemas en la pérdida de las unidades de producción en el cultivo de banano. El nematodo <i>R. similis</i> es un patógeno que ataca el sistema de anclaje de la gran mayoría de musáceas. En esta investigación fueron utilizadas PGPRs aisladas de musas endémicas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Quevedo. Fue realizada la caracterización morfológica del nematodo <i>R. similis</i> siguiendo lo establecido por Ryss & Woust en 1997. También se elaboró distintas plataformas de reproducción masiva para el nematodo ya mencionado, posteriormente dicho nematodos fueron usados para los ensayos antagonistas. Realizado los ensayos antagonistas con las PGPRs se obtuvo los siguiente resultados: la cepa de <i>Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12</i> presento un alto potencial antagonista contra <i>R. similis</i>, obteniendo resultados en la inhibición de eclosión de huevos superiores al 70%, similares a las cepas controles <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Pseudomonas protegens CHA0</i> y <i>Pseudomonas veroni R4</i> y así mismo la cepa de <i>Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12</i>, presentó el mayor porcentaje de mortalidad contra nematodos juveniles 2 de <i>R. similis</i> superiores al 90%, superando a las cepas controles <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Pseudomonas protegens CHA0</i> y <i>Pseudomonas veroni R4</i>.</p>		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, el banano tiene una superficie sembrada de 162039 hectáreas distribuidas en las provincias de Manabí, Los Ríos, Guayas, El Oro y Esmeraldas con una producción promedio de 1938 cajas por hectárea ocupando el primer puesto en el mercado de exportación nacional. Según el MAGAP (2016), el banano genera alrededor de 2 a 2,5 millones de empleos directos e indirectos.

INIAP (2014), menciona que en los cultivares de banano y plátano, después de las lesiones foliares ocasionadas por la Sigatoka negra como amarilla (*Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola*), También hay que considerar la existencia de una gran variedad de nematodos fitoparásitos que son los causantes de grandes pérdidas económicas, donde se destaca en la zona de Quevedo el nematodo barrenador de raíces *R. similis*.

R. similis es un nematodo fitoparásito que se alimenta de raíces de una gran variedad de cultivos, afectando a la mayoría de los cultivares de musáceas, afectando el sistema radicular y cormos; disminuyendo el desarrollo, con pérdidas en producción entre el 20 y 100% dependiendo de la severidad del ataque, Blake, (1961). Las musáceas han sido tradicionalmente propagadas por semilla asexual mediante colinos, cormos o cepas, ha permitido que el intercambio de material de siembra infectado sea el principal medio de su diseminación alrededor del mundo encontrándose en todos los países productores de banano, Sutton & Barker, (2002).

En la presente investigación se pretende determinar una alternativa de control hacia el nematodo *R. similis* más amigable con el medio ambiente, con la aplicación de PGPRs rizobacterias promotoras de crecimiento que brindan resistencia a la planta hacia algunos patógenos.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema

1.1.1.1. Diagnóstico

En los años 50 la principal variedad cultivada a nivel nacional para la exportación bananera fue la “Gros Michel”, conocida también como “Guineo de seda” por su agradable sabor y color. A partir de los años 50-60 esta variedad se vio afectada por una enfermedad conocida como Mal de Panamá raza 1, por lo que el gobierno ecuatoriano reemplazo esta variedad susceptible por una resistente del subgrupo Cavendish (Sotomayor, 2012). Esta fue la solución contra esta enfermedad, pero a su vez provoco un nuevo problema, ya que la variedad mencionada resultó ser poco tolerante al ataque de nematodo fitopatógenos, provocando el volcamiento de las unidades de producción y bajos rendimientos, como consecuencia perdidas económicas a nivel nacional.

En la actualidad el nematodo que más ha causado disminución de la producción en el Ecuador, es el nematodo barrenador de raíces *R. similis*, ya que dicho patógeno se encuentra en casi todos los suelos agrícolas del mundo atacando diversos cultivares.

Las empresas productoras de banano con el propósito de reducir las pérdidas ocasionadas por este nematodo, han optado por la aplicación de nematicidas en un promedio de dos veces al año a las dosis recomendadas por el fabricante, Es importante mencionar que, estos nematicidas tienen efecto sobre la microbiota y microfauna del suelo, alterando así las cadenas tróficas.

1.1.1.2. Pronóstico

La aplicación de las *PGPRs* (Rizobacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas) mejorarían la micro-flora del suelo y a su vez promoverán la activación de las vías de resistencia de la planta ISR (Resistencia Sistémica Inducida), trayendo como consecuencia la disminución de los daños causado por *R. similis* en los cultivares de Banano.

1.1.2. Formulación del Problema

¿Existe en la actualidad insumos agrícolas amigables con el medio ambiente que disminuya la incidencia que tiene el nematodo *R. similis* en cultivares de Banano del subgrupo Cavendish y sub-grupos derivados?

1.1.3. Sistematización del Problema

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

- ¿Cuáles son las características morfológicas del nematodo *R. similis*?
- ¿Cómo obtener de forma masiva grandes cantidades nematodos *R. similis* para ensayos antagonistas?
- ¿De todas las rizobacterias aisladas de musas endémicas, cuál de ellas posee una mayor capacidad antagónica hacia *R. similis* a nivel de laboratorio?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antagonista que tienen las Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (*PGPRs*) hacia el nematodo *R. similis* en el cultivo de banano *in vitro*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar por características morfológicas a *R. similis*.
- Establecer la plataforma más idónea de reproducción masiva del nematodo *R. similis*.
- Determinar el efecto antagonista de los sobrenadantes bacterianos de las *PGPRs* contra *R. similis in vitro*.
- Determinar el efecto antagonista de las *PGPRs* contra *R. similis in vitro*.

1.3. Justificación

En la actualidad, el nematodo *R. similis* ha causado disminución del rendimiento ya que atacan el sistema radicular de las plantas de banano, debido a esto, los bananeros han optado por la aplicación de nematicidas químicos, tres veces al año. Estos poseen una efectividad que varía de entre el 50% - 90%.

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. De ahí la importancia de buscar nuevas alternativas para el control de nematodos, como es el uso de PGPRs. Se ha reportado que estas pueden elaborar metabolitos extracelulares como 2,4-DAPG, Plt, proteasa y HCN que son compuestos químicos muy efectivos contra el control de nematodos fitopatogenos.

Por lo tanto, las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR), son una alternativa viable para el biocontrol del nematodo *R. similis*, como también de otro tipo de patógenos en planta, ya que promueven la resistencia sistémica inducida (ISR). Este proyecto de investigación pretende promover el uso de PGPRs para el biocontrol de nematodos parasíticos de raíces de banano, contribuyendo así con el desarrollo bananero en el Ecuador.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Cultivo de Banano

El banano (*Musa AAA*) es un componente importante de la dieta humana en casi todos los países del mundo, ya sea como alimento cocido o como fruta fresca. Es una excelente fuente de alimento, y en algunas regiones del mundo, como Africa, constituyen el componente principal de la dieta humana. 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, 2008).

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).

2.1.1.1. Variedades

Las variedades cultivadas son híbridos mejorados de las especies silvestres *Musa acuminata* y *M. balbisiana*, de la familia Musaceae, nativas del Sureste de Asia. En general, los híbridos varían grandemente en tamaño de la planta y de los frutos, morfología, calidad del fruto y resistencia a plagas y enfermedades (Florida & Crane, 1998).

Los que poseen una alta proporción de *M. acuminata* producen frutos dulces, en tanto los que poseen una alta proporción de *M. balbisiana* producen frutos con alto contenido de almidón (Florida & Crane, 1998).

La producción de una determinada variedad dependerá del fruto y rendimiento deseado, la adaptación a las condiciones agroclimáticas de la zona y la incidencia de patógenos. La mayoría de los cultivares comerciales de banano (*Musa AAA*) pertenecen al subgrupo Cavendish desde los años 1960, cuando fue introducido el cultivar “Valery”, seleccionado por su resistencia al Mal de Panamá (Florida & Crane, 1998).

Valery reemplazó al cultivar Gros Michel y fue luego reemplazado por el cultivar Gran Enano en la década de 1980, el cual es uno de los materiales más utilizados actualmente (Florida & Crane, 1998).

2.1.1.2. Tolerancia a nematodos

La tolerancia que tienen las musáceas hacia los nematodos se debe a la facilidad que tienen estas para penetrar las raíces y cormos de las plantas, y por el número de raíces que cada material genético pueda generar (Speijer, 1997).

A continuación, se muestra el grado de tolerancia que tienen las diferentes variedades productivas y no productivas de musáceas hacia el nematodo *R. similis* (Speijer, 1997).

- Gran Naine: Altamente susceptible a *R. similis*
- Gros Michel: Moderadamente resistente a *R. similis*
- Yangambi km5: Alta resistencia a *R. similis*
- Pisang Jari Bauya: Resistente a *R. similis*

2.1.2. Nematodo *R. similis*

R. similis es un nematodo fitoparásito que se alimenta de raíces y cormos de banano y plátano en todo el mundo, afectando su crecimiento y desarrollo, con pérdidas en producción entre el 20 y 100% (Guzmán, 2011).

Debido a que estas musáceas han sido tradicionalmente propagadas por semilla asexual mediante colinos, cormos, cepas o rizomas y a que este fitonematodo se caracteriza por ingresar y movilizarse dentro de las células de raíces y los cormos, ha permitido que el intercambio de material de siembra infectado sea el principal medio de su diseminación alrededor del mundo (Guzmán, 2011).

2.1.2.1. Taxonomía

R. similis fue descrito por primera vez por Cobb en 1891, quien lo encontró en raíces de banano procedentes de Fiji (Gowen, Quénehervé, & Fogain, 2005; Nickle, 1991; Sutton &

Barker, 2002). El describió la nueva especie en 1893 como *Tylenchus similis* e indicó que no se habían observado hembras (Nickle, 1991).

En 1907, Cobb encontró ambos sexos infectando raíces de caña de azúcar provenientes de las islas de Hawaii. Años más tarde, Cobb recibió de Jamaica cormos de Gros Michel infectados, y utilizó los especímenes adicionales para realizar una descripción más completa de la especie en 1915 (Gowen et al., 2005).

- Reino: Animalia
- Phylum: Nematoda
- Clase: Secernentea
- Orden: Tylenchida
- Familia: Pratylenchidae
- Género: Radopholus
- Especie: *R. similis*; (Cobb, 1893) Thorne, 1949

2.1.2.2. Morfología

R. similis es un pequeño nematodo (menos de 1 mm de largo) con cola alargada y marcado dimorfismo sexual en la región anterior. La clave para diferenciar a la familia *Pratylenchidae* es el apéndice que presenta a modo de adaptación (Ryss, 2014).

R. similis Macho. - La cabeza en forma de perilla se acciona mediante una constricción definitiva. En comparación con las hembras los labios laterales son claramente más pequeños, no se observan anillos en la cabeza. La esclerotización cefálica, el estilete, el bulbo mediano y el lóbulo de la glándula faríngea se desarrollan débilmente, posee cuatro labios internos pronunciados débilmente, un gubernáculo con titila pequeña y una espículas dorsalmente arqueadas (Ryss, 2014).

R. similis Hembra. - Dado al dimorfismo sexual, el nematodo *R. similis* hembra posee una cabeza ligeramente hemisférica, de tres a seis anillos en los labios bucales, un estilete bien definido con perillas redondeadas, cuatro labios internos laterales, labios externos protuberantes, dos ovarios funcionales e igualmente desarrollados, cada uno con una espermateca esferoide a menudo con pequeños espermatozoides en forma de varilla.

Metacarpo bien desarrollado, elipsoidal alargado con válvulas distintas, Tres células glandulares en el lado dorsal del cuerpo y una cola conoide alargada con una angosta terminación (Ryss, 2014).

2.1.2.3. Hábito

R. similis es un nematodo endoparásito migratorio, capaz de completar su ciclo de vida dentro de la raíz. La penetración ocurre principalmente cerca de la punta de la raíz, pero el nematodo puede migrar a través de ella (Sutton & Barker, 2002).

Las hembras y todos los estados juveniles son infectivos. Los machos por otra parte poseen un estilete poco desarrollado, y probablemente no son parasíticos (Sutton & Barker, 2002).

La migración y la oviposición depende de factores nutricionales, a medida que las hembras se mueven desde el área necrótica (Sutton & Barker, 2002).

2.1.2.4. Forma de alimentarse y daño

En las células del cilindro cortical, *R. similis* produce lesiones de longitud variable (5 o más cm) con forma de estrías. Estas inicialmente tienen colores que varían desde amarillo claro hasta oscuro, luego rosado rojizas y finalmente marrón o negras (Blake, 1961).

En algunos casos produce depresiones en el tejido que modifican la anatomía cilíndrica original de las raíces (Blake, 1961). En infestaciones altas, las lesiones rodean completamente las raíces, hasta destruirlas totalmente (Gowen et al., 2005).

Dicha coloración se caracteriza por estar infestada con todos los estados de desarrollo del nematodo (Gowen et al., 2005). *R. similis* no solo causa daño físico, sino que también causa daño fisiológico al producir hipertrofia del núcleo y nucléolo de las células (Blake, 1966).

2.1.2.5. Reproducción

El nematodo *R. similis* tiende a reproducirse de dos formas según la alimentación que estos tengan. Asexual por partenogénesis y consiste en que un nematodo hembra alcanza la

madurez y llega a convertirse en dos individuos iguales. Sexual en el tejido infectado. Las hembras ponen de 4 a 5 huevos por día durante dos semanas (Loos & Loos, 1960).

2.1.2.6. Ciclo de vida

Como la mayoría de nematodos, los estados de desarrollo de *R. similis* son vermiformes o con forma de lombriz y tienen cuatro estados juveniles (J1, J2, J3 y J4) y el adulto (Loos & Loos, 1960).

El estado J1 se desarrolla dentro del huevo, luego muda la cutícula y luego de 8 a 10 días emerge el J2. Los estados J2, J3 y J4 también mudan la cutícula hasta llegar al estado adulto entre 10 y 13 días (Loos & Loos, 1960).

El estado J2 y la hembra adulta son infectivos y tienen formas móviles que pueden abandonar las raíces en condiciones adversas, llegando al suelo para parasitar nuevamente raíces sanas. El movimiento de los juveniles y las hembras es estimulado por factores nutricionales, ya que necesitan tejido sano para alimentarse (Blake, 1961).

Después de iniciar su alimentación, *R. similis* completa su ciclo de vida entre 20 y 25 días en los tejidos de las raíces y cormos a una temperatura entre 24 y 32°C; siendo óptima su reproducción entre 25 y 28°C (Blake, 1961).

2.1.2.7. Hospederos

Se ha reportado más de 350 especies de plantas que son susceptibles a *Radopholus spp.*, en las que se incluyen banano, cítricos, pimienta negra, antúrios, aráceas (antúrios, taro), jengibre, té, coco y otras palmas (Brooks et al., 1996).

2.1.3. Control Biológico

Los fitonematodos coexisten en la rizosfera con gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales han sido aislados e identificados como antagonistas de los nematodos, ya que ejercen algún tipo de control biológico (Sikora, 1992).

Estos enemigos naturales de los nematodos pueden ser depredadores, que los matan y se los comen, como hongos y otros nematodos, o parásitos que viven a expensas suyas causando su muerte paulatina, entre los que se pueden mencionar virus, protozoos, bacterias y hongos (Khan et al., 2006).

Se han identificado suelos supresivos a los fitonematodos, es decir, sistemas de producción en los cuales se mantiene un equilibrio entre las poblaciones de nematodos y sus enemigos naturales permitiendo la permanencia de cultivos susceptibles durante varios años sin presentar una reducción en su rendimiento (Sikora, 1992).

Está completamente documentado que ciertas bacterias de la rizósfera, conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento (*PGPR*), producen compuestos que pueden afectar positivamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, desde su germinación hasta la senescencia (Kloepper et al., 1999).

Un gran número de rizobacterias han sido utilizadas como agentes de biocontrol en diversos cultivos y tienen gran potencial para el control de nematodos, especialmente las *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* (Pieterse & Loon, 1999).

Las rizobacterias generalmente colonizan las raíces promoviendo el crecimiento de las plantas y previenen el establecimiento de patógenos. Además, desencadenan una serie de reacciones de defensa en la planta hospedera (Pieterse & Loon, 1999).

2.1.3.1. Ruta de resistencias ISR y SAR

La resistencia sistémica inducida (ISR) es una respuesta de defensa de la planta ante la presencia y actividad de un agente biológico no patogénico, específico, que reduce la severidad o la incidencia de la enfermedad o daño causado por un patógeno que se encuentra espacialmente separado del agente inductor (Kloepper & Ryu, 2006).

La resistencia sistémica también puede ser inducida por sustancias químicas o por la presencia de patógenos, denominándose entonces resistencia sistémica adquirida (SAR). Las diferencias entre ISR y SAR son el agente inductor y los signos que presenta la planta (Pieterse et al., 1998).

ISR es un fenómeno independiente del ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico, y no produce la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Pieterse et al., 1998).

Se ha demostrado ISR contra diversas plagas y enfermedades a partir de la colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias (*PGPR*) y microorganismos endofíticos (Kloepper & Ryu, 2006).

Recientemente se demostró la inducción de resistencia contra *R. similis* en plantas de banano con la inoculación de aislamientos endofíticos de cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* en pruebas de split-root system, con reducciones en la penetración de *R. similis* de hasta 45% en la parte no tratada de la planta (Vu et al., 2006).

2.1.3.2. Bacterias endofíticas (BE)

Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la rizosfera, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Weller, 1988).

Ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente, aunque no necesariamente, con beneficio recíproco para el hospedero y para el simbionte (Lugtenberg & Dekkers, 1999).

La promoción de crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores; uno de ellos es la síntesis de ciertas sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas.

Esto favorece la capacidad de absorción de agua y nutrientes, permitiendo que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Lugtenberg & Dekkers, 1999).

Los mecanismos involucrados en este proceso incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo y la producción de fitohormonas (Zablotowicz et al., 1991).

2.1.3.3. *Bacillus spp.*

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Bunterngsook et al., 2012).

Los mecanismos de acción de *Bacillus spp.* incluyen competencia por espacio y nutrientes (Handelsman, 1996), antibiosis (Loeffler et al., 1986) e inducción de resistencia (J. W. Kloepper & Ryu, 2006). Además, tienen comprobado efecto en la promoción de crecimiento de las plantas (Kloepper et al., 2004).

La capacidad de *Bacillus spp.* de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers, 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico (Turner, 2003).

B. subtilis es uno de los más eficientes agentes de biocontrol, el cual exhibe actividad antagonista contra varios hongos, bacterias patogénicas y ha constituido una importante alternativa de control biológico contra *R. similis* y *M. incognita* (Turner, 2003).

2.1.3.4. *Pseudomonas spp.*

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* han sido estudiadas como importantes agentes de biocontrol 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 (Bunterngsook et al., 2012).

Estos organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Bunterngsook et al., 2012).

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 (Kloepper & Ryu, 2006).

En cuanto al control de nematodos, cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* han demostrado actividad antagonista contra *Radopholus similis* y *Meloidogyne spp.* en banano, maíz y tomate (Becker et al., 1988).

Un aislamiento endofítico de *P. aeruginosa* produjo compuestos tóxicos in vitro que resultó en alta mortalidad de los estadios juveniles de *M. javanica* (Ali Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2001).

Asimismo, el compuesto 2,4- diacetylpholoroglucinol producido por *P. fluorescens* redujo la eclosión de huevos de *M. javanica* (Siddiqui & Shaukat, 2003).

2.1.3.5. *Enterobacter spp.*

Varias especies del género *Enterobacter* se sabe que interactúan y ejercer efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas. El fomento del crecimiento de las plantas los efectos de las bacterias beneficiosas pueden ocurrir a través de mecanismos directos o indirectos que incluyen la producción de fitohormonas o enzimas que promueven el crecimiento de las plantas, aumento de la absorción de nutrientes y prevención de daños fitopatógenos (Glick et al., 1999).

2.1.3.6. *Acinetobacter spp.*

Acinetobacter es un género bacteriano omnipresente ampliamente distribuido en ambientes de suelo y agua y actualmente incluye 17 especies válidamente descritas y 14 especies genómicas sin nombre (Gerischer, 2008).

Acinetobacter es un microbio del suelo; sin embargo, estudios detallados sobre su papel en la promoción del crecimiento de las plantas no han sido reportados (Peix et al., 2009).

2.1.3.7. *Serratia spp.*

La *Serratia spp.* es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Existen estudios donde *Serratia marcescens* actúan como *PGPRs* para activar el crecimiento en plantas para el control de *P. parasitica* en cítricos, donde redujo el 50% de la incidencia al activar la ISR de la planta (Queiroz & Melo, 2006).

La evidencia hasta la fecha ha demostrado que *S. marcescens* es capaz de inducir el crecimiento de las plantas y suprime *P. parasitica*, y también de establecerse en la rizosfera. Por lo tanto, todos estos criterios lo convierten en un potencial agente de control biológico (Queiroz & Melo, 2006).

2.1.3.8. Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son productos de bacterias que tienden a ser biosintetizados después de la tasa de crecimiento o después de la fase exponencial de las bacterias, es decir en la fase estacionaria. Aunque se desconoce en la mayoría de los casos, la función del metabolito secundario, la bioactividad de estos compuestos ha sido explotada como medicamentos, veneno, agentes saborizantes en alimentos, fitohormonas y otros de aplicación industrial (Chaparro, 2010).

Numerosas bacterias producen antibióticos para asegurar su propia supervivencia. Algunos de estos antibióticos son inhibidores efectivos de fitopatógenos y desempeñan un papel importante en la biología control de enfermedades de plantas (Someya et al., 2004).

Los metabolitos secundarios poseen las siguientes características:

- Son productos naturales elaborados por grupos microbianos pertenecientes a ciertas especies.
- Generalmente sintetizados como compuestos químicos con diversidad estructural, por ejemplo: Alcaloides, flavonoides, Benzoquinonas, glucósidos, tetraciclas, aminoazúcares, etc.
- Parece que no se encuentran relacionados con los procesos de las vías biosintéticas de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polímeros.

- En su mayoría son excretados al exterior, lo que puede estar relacionado con la eliminación de material tóxico.
- Producción de compuestos estructurales de cubiertas fúngicas.
- Captación de minerales indispensables para otros microorganismos, lo que los hace competitivos.
- La formación de señales de diferenciación (esporulación y acumulación de productos de reserva).
- La producción de elementos que contribuyan a la colonización de espacio y nutrientes (antibióticos y toxinas) (Chaparro, 2010).

CAPÍTULO III

MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología 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 Coordenadas Latitud: 01°06′, Sur; Latitud: 79°27′, Oeste.

3.2. Tipo de investigación

Esta investigación es de tipo experimental, ya que evaluó las variables de forma objetiva, sistemática y en ambiente controlado con la finalidad de estudiar los efectos que tienen las *PGPRs* sobre el nematodo *R. similis*.

3.3. Métodos de Investigación

Se utilizó el método comparativo, donde se comparó información existente en la literatura y ensayos sobre agentes antagonistas, dicho método fue utilizado para la identificación de las *PGPRs* más eficaces contra el nematodo *R. similis*.

3.4. Fuente de recopilación de información

La información recopilada se la obtuvo a partir de revistas científicas, libros, boletines, etc., así mismo la información recopilada en la investigación se la realizó por registro de datos.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Diseño para determinar la plataforma de reproducción masiva más idónea de nematodos *R. similis*

Se aplicó el diseño completamente al azar con 3 tratamientos y 5 repeticiones. Las variables en estudio fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Duncan al 95%

de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. El esquema del análisis de varianza se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza Plataforma de reproducción

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	10
Tratamientos	2
Error	8

- **Tratamientos para evaluación de la plataforma más idónea de reproducción masiva del nematodo *R. similis***

Tabla 2. Esquema de tratamientos para la evaluación de la plataforma más idónea de reproducción masiva del nematodo *R. similis*

Tratamientos	
1	Discos de zanahoria
2	Plántulas de banano
3	Control

3.5.2. Diseño para la evaluación de ensayos antagonistas con rizobacterias y sobrenadantes contra nematodos juveniles (J1) *R. similis*.

Se aplicó el diseño completamente al azar con 7 tratamientos en 5 repeticiones. Las variables en estudio fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. El esquema del análisis de varianza se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J1) *R. similis*.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	30
Tratamientos	6
Error	24

- **Tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J1) *R. similis*.**

Tabla 4. Esquema de tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J1) *R. similis*.

Tratamientos	
1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0
2	<i>Pseudomonas veroni</i> R4
3	<i>Bacillus subtilis</i>
4	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14
5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12
6	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8
7	Control

3.5.3. Diseño para la evaluación de ensayos antagonistas con rizobacterias y sobrenadantes contra nematodos juveniles (J2) *R. similis*.

Se aplicó el diseño completamente al azar con 7 tratamientos en 4 repeticiones. Las variables en estudio fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. El esquema del análisis de varianza se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Esquema del Análisis de Varianza ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J2) *R. similis*.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	24
Tratamientos	6
Error	18

- **Tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J2) *R. similis*.**

Tabla 6. Esquema de tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con Rizobacterias contra nematodos juveniles (J2) *R. similis*.

Tratamientos	
1	<i>Pseudomonas protegens CHA0</i>
2	<i>Pseudomonas veroni R4</i>
3	<i>Bacillus subtilis</i>
4	<i>Enterobacter asburiae PM3-14</i>
5	<i>Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12</i>
6	<i>Serratia marcescens PM3-8</i>
7	Control

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Materiales de laboratorio

- Puntas Blancas de micro-pipeta (0.2-10 μ l)
- Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20 μ l y 20-200 μ l)
- Puntas azules de micro-pipeta (100-1000 μ l)
- Papel Toalla
- Papel Klennex
- Botellas esterilizables de 500 ml
- Vidrio de reloj
- Juego de Micro-pipetas (0.2-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l)
- Tamices (criba de 475 μ m, 90 μ m y 25 μ m)
- Frascos Chopp 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
- Sacabocado
- Piceta de 500 ml
- Tijeras Quirúrgicas
- Frascos de vidrio tapa amarilla de 250 ml
- Embudos simples de vidrio
- Llave de paso metálica

3.6.2. Equipos de laboratorio

- Balanza de 0,001 g.
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio
- Cámara de microscopio
- Microondas
- Licuadora
- Nevera
- Vortex
- Destilador de agua
- Autoclave
- Estufa
- Centrifuga
- Incubadora

3.6.3. Reactivos

- Agar noble
- Agua ultra pura
- Agua miliq
- Cloro
- Etanol 95%

- King B
- Sulfato de magnesio hepta-hidratado
- Bacto™ Peptona
- Fósforo de Potación Dibásico
- Glicerol

3.6.4. Material genético

Se recolectaron muestras de la Finca Experimental “La María”, de raíces que presentarán daños necróticos y rayados rojizos, fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de la UTEQ, donde se aisló al nematodo *R. similis*.

Para el estudio *in vitro*, se utilizó las *PGPRs* del laboratorio de Microbiología y Biotecnología vegetal de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, mencionadas a continuación:

- *Pseudomonas protegens CHA0*
- *Pseudomonas veroni R4*
- *Bacillus subtilis*
- *Enterobacter asburiae PM3-14*
- *Acinetobacter calcoaceticus BMR 2-12*
- *Serratia marcescens PM3-8*

Para la elaboración de la plataforma de reproducción masiva in vivo se emplearon plantas de banano variedad “Valery” proporcionadas por la Hcda. La Montaña ubicada vía El Empalme con las siguientes características:

- Ciclo vegetativo: 6-15 años
- Altura de planta: 3,5 m
- Potencial de rendimiento: 10-14 manos por plantas

3.7. Manejo del Experimento

3.7.1. Identificación nematodo *R. similis* por características morfológicas.

a) Recolección e identificación morfológica

La recolección de muestras de raíces se realizó en la Finca Experimenta “La María”. Con la ayuda de un barreno se tomaron muestras en un hoyo de 30 cm de largo por 15 cm de ancho a una profundidad de 20-40 cm. Se tomaron raíces que presentaron daños provocados por nematodos.

El aislamiento del nematodo *R. similis* se empleó la técnica de Stmerdin (1963). Las muestras de raíces de banano (100 g de raíces) se trituraron 20 a 30 segundos en 500 ml de agua, después de un período de reposo de 20 min., la suspensión fue vertida sobre un juego superpuesto de tamices de 500 μm , 475 μm y 90 μm , respectivamente.

Los restos de raíces retenidas en la criba de 90 μm , se transfirieron a una criba de extracción de 20 centímetros de diámetro con filtro de papel toalla, colocada dentro de un recipiente con 100 cc de agua.

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

La identificación se realizó bajo un micrómetro a 4X – 10X - 40X de magnificación, para establecer las características morfométricas de *R. similis* descrita por Ryss y Woust (1997).

El aislamiento de nematodos juveniles (J1), se eliminaron los contaminantes de las muestras de raíces con agua limpia, fueron segmentadas en partes de 3mm de longitud con una tijera quirúrgica, suspendido con hipoclorito de sodio al 10% y se la mantuvo en agitación durante 10 min, y ser vertidas en un juego superpuesto de tamices de 500 μm , 90 μm y 25 μm , respectivamente.

Los restos de raíces retenidas en la criba de 25 μm , se transfirieron a un vaso de precipitación de 50 ml.

Para la identificación se tomaron 300 µl de muestra y se transfirieron a un vidrio de reloj para ser observados en magnificación 10x, para establecer las características morfométricas de *R. similis* descrita por Ryss y Woust (1997).

3.7.2. Establecimiento de la plataforma de reproducción masiva de nematodos.

a) Plataforma de reproducción masiva de nematodos *R. similis* in vivo

Se trasplantaron cepas de banano del subgrupo Cavendish variedad “Valery” en un espacio de 3x5 m ubicado en el invernadero del laboratorio de microbiología en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, con suelo preparado con 7 sacos de bocashi, 3 de tierra y 1 de cascarilla de arroz, a una distancia de 0.5 m entre plantas y 0.5 m entre hileras. A los 50 días después de la siembra fueron vertidos 200g de raíces infectadas con *R. similis* trituradas en 500 ml de agua estéril por planta. Las aplicaciones se hicieron cada dos días durante 10 días para asegurar la colonización del nematodo.

b) Reproducción de nematodo *R. similis* en discos de zanahorias

Siguiendo lo establecido por Moody (1986), se obtuvieron zanahorias frescas y sanas, fueron peladas y lavadas con agua estéril, para luego cortarlas en discos con 3-5 mm de espesor y ser sumergidos en hipoclorito de sodio al 10% durante 5 min y ser remojadas nuevamente con agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio de los discos de zanahoria.

Los discos fueron flameados y después asperjados con alcohol al 85-90%, acto seguido se llenó cajas Petri con 25 ml de agar noble al 2%, donde los discos se colocaron una vez que el agar se gelificó.

Después de preparar los discos de zanahoria, se capturaron nematodos *R. similis* de raíces de banano usando la técnica ya descrita. Los nematodos obtenidos fueron esterilizados con ampicilina al 2% de la siguiente forma: se capturaron 50-75 nematodos (50 µl) y colocados en tubos de eppendorf de 1.5 ml, después se añadió 200 µl de agua estéril y se centrifugó a 3500 rpm por 60 segundos. Se retiró 200 µl de sobrenadante, para después añadir 200 µl de ampicilina 2% y se centrifugaron nuevamente, proceso que se repitió por tres ocasiones hasta solo quedar 50 µl de nematodos.

Los nematodos ya esterilizados fueron vertidos con una pipeta en los discos de zanahoria y incubados por 30 días a 28°C.

c) Recolección de muestras de raíces (control)

Para el muestreo de raíces se usó la metodología usada por INIAP (2005), que consiste en la obtención de 5 muestras de 100g entre la planta madre y planta hijo al azar en una hectárea, las muestras fueron tomadas en la finca experimental “La María”.

Estas muestras fueron llevadas al laboratorio para ser procesadas, y posteriormente se le realizar un análisis usando la metodología descrita por Araya (2002).

3.7.3. Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las Rizobacterias hacia

R. similis

a) Preparación de placas de inhibición con rizobacterias

Los aislados bacterianos se incubaron en King B líquido hasta alcanzar una concentración de $1,5 \times 10^9$ células/ml, para después recuperar 500 µl del cultivo y homogenizar en 12,5 ml de King B + 0,3 g de agar/100 ml.

Se transfirió 300 µl del inóculo bacteriano a placas de cultivo Greiner Bio Cellstar (Serie: 662-160) incubado por 16 h a 25 °C, hasta alcanzar la concentración de $1,5 \times 10^9$ células/ml. Para la preparación de placas de inhibición, se vertió agar noble al 10% en las placas, poco tiempo después de gelificarse se le realizaron 3 pocillos que contenían 120 µl King B sólido, cada placa se la consideró como una unidad experimental con 3 sub unidades experimentales (pocillos).

Una vez preparadas las placas de inhibición, se recolectaron las colonias bacterianas con una punta amarilla de micro-pipeta y se las transfirieron a los pocillos de las placas de inhibición y se las incubó por 16h a 25 °C.

b) Enfrentamiento de huevos de *R. similis* (J1) en placas de inhibición con rizobacterias.

Se vertieron 10 µl de nematodos (10 huevos) previamente esterilizados en cada pocillo de las placas de inhibición. La evaluación fue registrada por fotografías cada 24 horas después del cuarto día hasta el Séptimo día de la inoculación con una cámara digital Nikon.

c) Enfrentamiento de juveniles (J2) de *R. similis* en placas de inhibición con rizobacterias.

Se vertieron 20 µl de nematodos (20 nematodos) previamente esterilizados en cada pocillo de las placas de inhibición. La evaluación se registró por fotografías cada 24 horas durante 3 días con una cámara digital Nikon.

3.7.4. Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de los sobrenadantes bacterianos hacia *R. similis*

a) Preparación de placas de inhibición con sobrenadantes bacterianos.

Para la obtención de los cultivos filtrados libres de células, las bacterias se incubaron en el medio de cultivo King B, con agitación de 150 rpm a 28 °C. Los cultivos fueron colectados durante las 48 horas. Las células se removieron por centrifugación a 8000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante libre de células se filtró asépticamente al pasar por la membrana estéril con un tamaño de poro de 0,45 µm y guardado a 4 °C.

Para la preparación de placas de inhibición se vertió 50 ml de agar noble al 10%, poco tiempo después de que gelificara se le realizó 3 pocillos que contenían 120 µl de agar noble al 2%, cada placa se la consideró como una unidad experimental con 3 subunidades experimentales (pocillos).

b) Enfrentamiento de huevos de *R. similis* (J1) en placas de inhibición con sobrenadantes bacterianos.

Se vertió 10 µl de nematodos (10 huevos) previamente esterilizados en cada pocillo de las placas de inhibición. La evaluación fue registrada por fotografías cada 24 horas después del cuarto día hasta el Séptimo día de la inoculación con una cámara digital Nikon.

c) Enfrentamiento de juveniles (J2) de *R. similis* en placas de inhibición con sobrenadantes bacterianos.

Se vertió 20 ml de nematodos (20 nematodos) previamente esterilizados en cada pocillo de las placas de inhibición. La evaluación fue registrada por fotografías cada 24 horas durante 3 días con una cámara digital Nikon.

3.7.5. Viabilidad de *R. similis*

Los nematodos de las placas de inhibición bacterianas y 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.

3.7.6. Datos registrados y formas de evaluación

Morfológicos

- Forma (posterior y anterior)
- Longitud de estilete
- Longitud de parte anterior
- Longitud de parte posterior
- Longitud total del nematodo en todos sus estadios.
- Longitud de spícula
- Diámetro de cuerpo (cabeza)

- Diámetro de cuerpo (ano)

Análisis Nematológico

- Numero de Nematodos en 20 μ l

Evaluaciones *in vitro*

- Efectos de rizobacterias contra juveniles (J2) de *R. similis* (%)
- Efectos de rizobacterias contra juveniles (J1) de *R. similis* (%)
- Efectos de sobrenadantes bacterianos contra juveniles (J2) de *R. similis* (%)
- Efectos de sobrenadantes bacterianos contra juveniles (J1) de *R. similis* (%)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Identificación y caracterización morfológica del nematodo *R. similis*

Los huevos del nematodo *R. similis* (J1), tienen forma ovoide, son alargados con longitudes de entre 106-129 μm y diámetros de entre 40-51 μm , (Figura 1A); El periodo de eclosión de los huevos de nematodos es de 8-10 días, (Figura 1B).

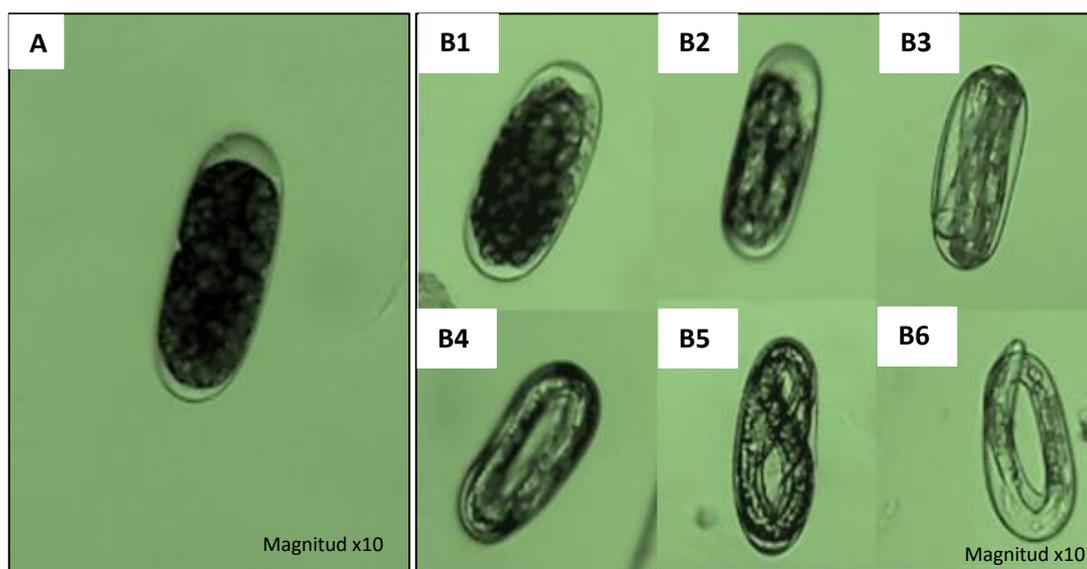


Figura 1. Desarrollo del nematodo *R. similis* J1. A.- Nematodo *R. similis* en estadio juvenil 1, estadio de huevo; B.- Desarrollo del nematodo en estadio J1, B1. Huevo ovipositado con 5 horas de edad (Etapa de mitosis), B2. Huevo con 2 días de edad, B3. Huevo con 4 días de edad, B4. Huevo con 6 días de edad, la forma del nematodo está completamente desarrollada, B5. Huevo de nematodo con 8 días de edad, mostrando un nematodo, con órganos y estructuras ya desarrolladas, B6 Nematodo estadio J2 de 10 días de edad, mostrando un nematodo completamente desarrollado.

En la identificación de los nematodos juveniles 2 de *R. similis*, en base a las observaciones realizadas se constató que posee un cuerpo filiforme con una cabeza corta (parte anterior), una cola con forma helicoidal alargada (parte posterior), y un dimorfismo sexual entre ambos géneros.

R. similis macho posee un cuerpo más alargado que la hembra con una longitud que oscila entre 640 μm – 870 μm (Figura 2A); Parte anterior: Estilete poco desarrollado con longitudes que varían entre de 12-14 μm , cabeza en forma de cono que mide de entre 81-95 μm con un

diámetro en la parte más pronunciada de la cabeza de entre 12-16 μm (Figura 2B); Parte Posterior: El macho posee Spicila (órgano reproductor) con longitudes que varían entre 13-23 μm , y una cola helicoidal con longitudes de entre 75-86 μm con un diámetro en la parte más pronunciada de entre 11-14 μm (Figura 2C).

R. similis hembra posee un cuerpo más corto en comparación con el macho con longitudes que oscilan de entre 605-780 μm , (Figura 2D); Parte anterior: Estilete bien desarrollado más largo y marcado a diferencia del macho con longitudes que varían de entre 16-21 μm , cabeza en forma de cono que mide de entre 75-97 μm con un diámetro en la parte más pronunciada de la cabeza de entre 15-25 μm , en comparación con el macho la hembra es más robusta, (Figura 2E); Parte posterior: La hembra posee ovarios que se encuentra cerca del ano, y una cola helicoidal con longitudes de entre 77-89 μm con diámetros en la parte más pronunciada que varían de entre 16-24 μm , (Figura 2F).

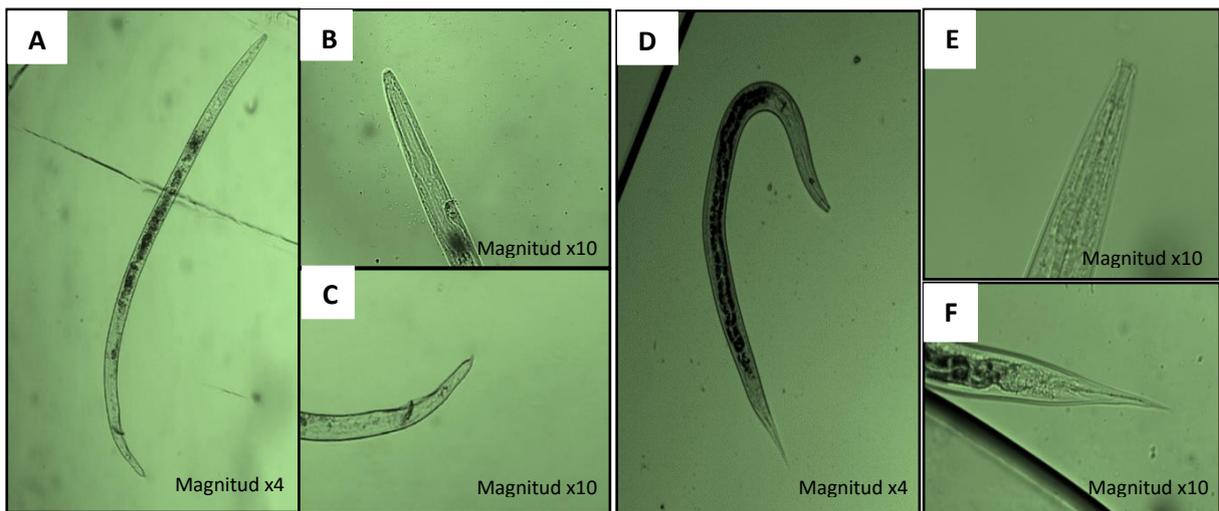


Figura 2. Características morfológicas del nematodo *R. similis* J2. A.- *R. similis* macho, B.- Parte anterior del nematodo macho, C.- Parte posterior del nematodo macho, D.- *R. similis* hembra, E.- Parte anterior del nematodo hembra, F.- Parte posterior del nematodo hembra.

Tabla 7. Características morfológicas *R. similis* en micras

Característica	Macho (µm)	Hembra (µm)	Huevos (µm)
Longitud cuerpo	640-870	605-780	
Longitud estilete	12-14	16-21	
Parte anterior	81-95	75-97	
Parte Posterior	75-86	77-89	
Diámetro cuerpo ano	11-14	16-24	
Diámetro cuerpo cabeza	12-16	15-25	
Longitud espícula	13-23		
Diámetro			40-51
Longitud			106-129

4.1.2. Establecimiento de la plataforma de reproducción masiva de nematodos más idónea

El tratamiento que presento mayor número de nematodos fue en discos de zanahoria con un promedio de 5708 nematodos, superando al tratamiento realizado en plántulas de banano que presentó 3251 nematodos y al tratamiento control con 1710 nematodos, respectivamente.

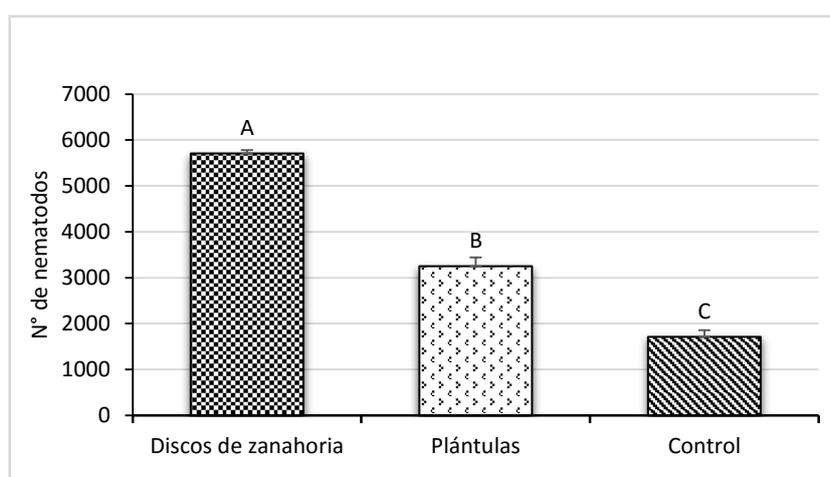


Figura 3. Plataformas de reproducción del nematodo *R. similis*. Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las barras indican el número de nematodos correspondiente de cada tratamiento.

4.1.3. Determinar el efecto antagonista de los sobrenadantes bacterianos de las PGPRs contra *R. similis in vitro*

Ensayos antagonistas con Nematodos J1 (juveniles 1)

Las aplicaciones de los extractos celulares a poblaciones de nematodos in vitro a los 6 días de la exposición, dieron como resultado que *Bacillus subtilis* alcanzó el mayor porcentaje de control con 89,8%, siendo estadísticamente igual al extracto de *Pseudomonas veroni R4* que obtuvo 81,7%, *Pseudomonas protegens CHA0* con 72,7% y *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* con 72,5%. La menor incidencia de actividad antagonista se verificó por el extracto celular de *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14*, que presentaron porcentajes de 49,0% y 41,5 %, respectivamente.

Los sobrenadantes de las PGPRs a 8 días de la exposición, dieron como resultado que *Bacillus subtilis* alcanzó el mayor porcentaje de control con el 66,9%, estadísticamente igual a los tratamientos con *Pseudomonas veroni R4* con 65,7%, *Pseudomonas protegens CHA0* con 65,7% y *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* con 61,7%, siendo estadísticamente superiores a los demás tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14*, que obtuvieron porcentajes de 23,5% y 30,2%, respectivamente.

Los sobrenadantes de las PGPRs a 10 días de exposición, dieron como resultado que *Bacillus subtilis* alcanzó el mayor porcentaje de control con el 72,5%, estadísticamente igual a los tratamientos con *Pseudomonas veroni R4* con 70,8%, *Pseudomonas protegens CHA0* (CHA0) con 70,8% y *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* con 71,7%, siendo estadísticamente superiores a los demás tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14*, que obtuvieron porcentajes de 34,2% y 40,0%, respectivamente.

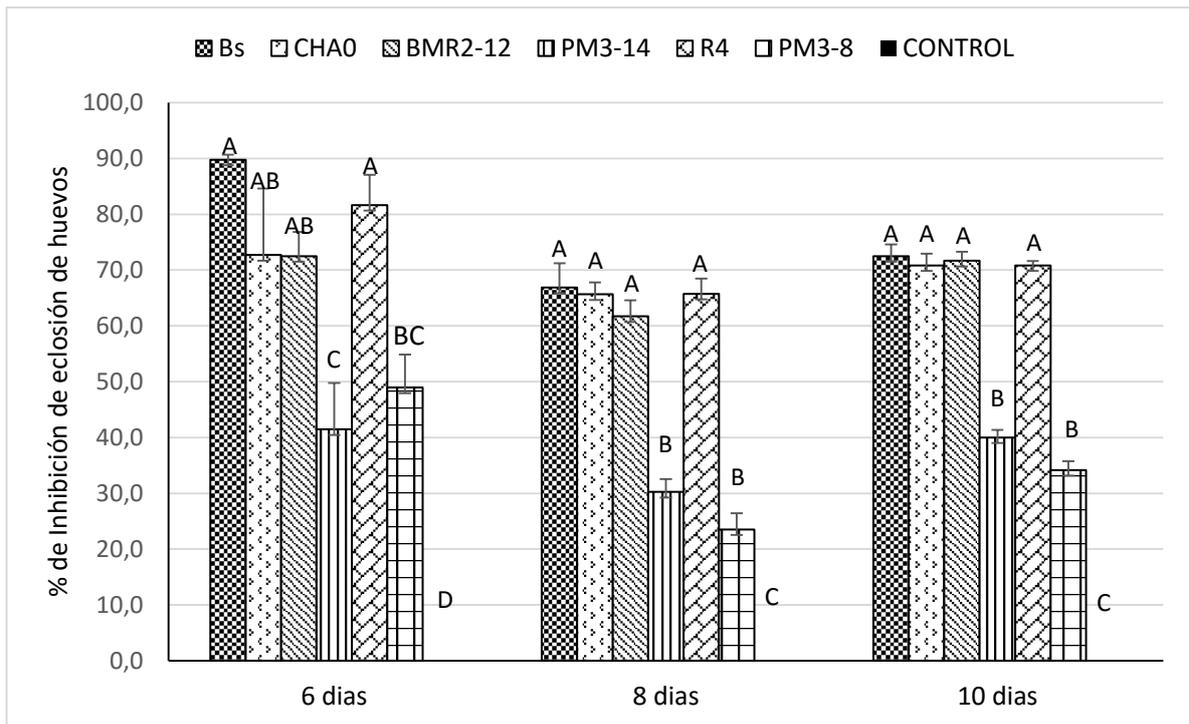


Figura 4. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con sobrenadantes contra *R. similis*. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las barras indican el porcentaje de eclosión de huevos correspondiente de cada tratamiento, mostrando resultados simultáneos a los 6,8 y 10 días después de la inoculación.

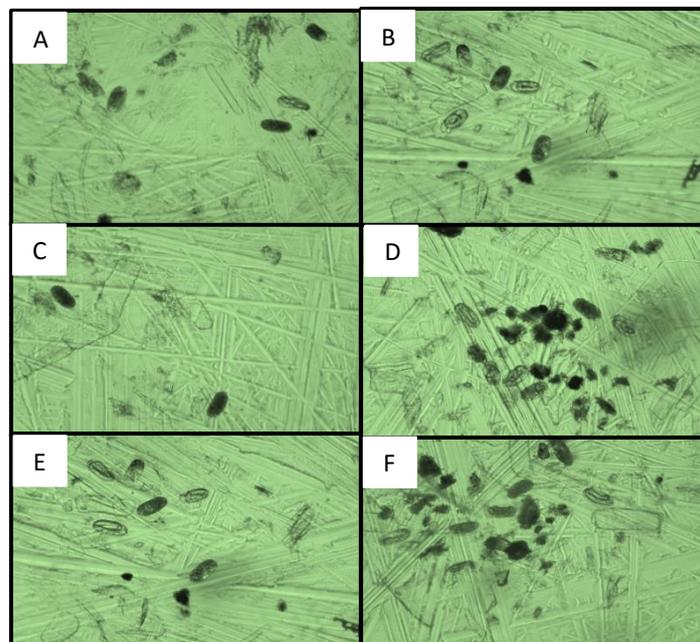


Figura 5. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con sobrenadantes contra *R. similis*. **A.** *Bacillus subtilis*, **B.** *Pseudomonas protegens* CHA0, **C.** *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, **D.** *Serratia marcescens* PM3-8, **E.** *Pseudomonas veroni* R4, **F.** *Enterobacter asburiae* PM3-14

Ensayos antagonistas con Nematodos J2 (juveniles 2)

Las aplicaciones de los extractos celulares a poblaciones de nematodos in vitro a 24 horas de la exposición, dieron como resultado que *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad hacia el nematodo *R. similis* con el 43,4%, siendo este estadísticamente igual a los tratamientos con *Bacillus subtilis* con 39,3%, *Pseudomonas veroni R4* con 37,5%, a *Pseudomonas protegens CHA0* con 35,0% y *Serratia marcescens PM3-8* con 33,0% respectivamente. La menor incidencia de actividad antagonista se verificó por la Rizobacteria de *Enterobacter asburiae PM3-14* con 24,0%.

Tratamientos inoculados con sobrenadantes bacterianos a las 48 horas, dieron como resultado que *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12*, alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad hacia el nematodo *R. similis* con el 81,5%, siendo este estadísticamente igual a los tratamientos con *Bacillus subtilis* con 75,9%, *Pseudomonas veroni R4* con 76,3% y *Pseudomonas protegens CHA0* con 66,4%, todos estos tratamientos son estadísticamente superiores a los tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14* con promedios de 54,8% y 51,2% respectivamente.

Tratamientos inoculados con sobrenadantes bacterianos a las 72 horas, dieron como resultado que *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12*, alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad hacia el nematodo *R. similis* con el 93,3%, siendo este estadísticamente igual a los tratamientos con *Bacillus subtilis* con 93,3%, *Pseudomonas veroni R4* con 91,4% y *Pseudomonas protegens cepa CHA0* con 89,6%, todos estos tratamientos son estadísticamente superiores a los tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14* con promedios de 77,9% y 72,6% respectivamente.

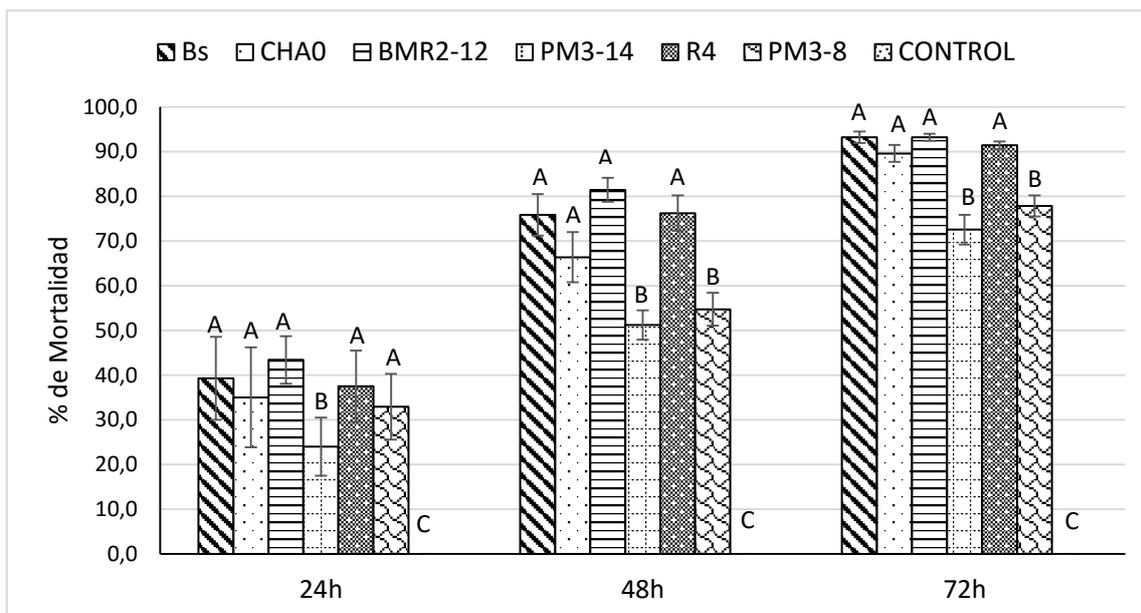


Figura 6. Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes contra *R. similis* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, mostrando resultados simultáneos a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación.

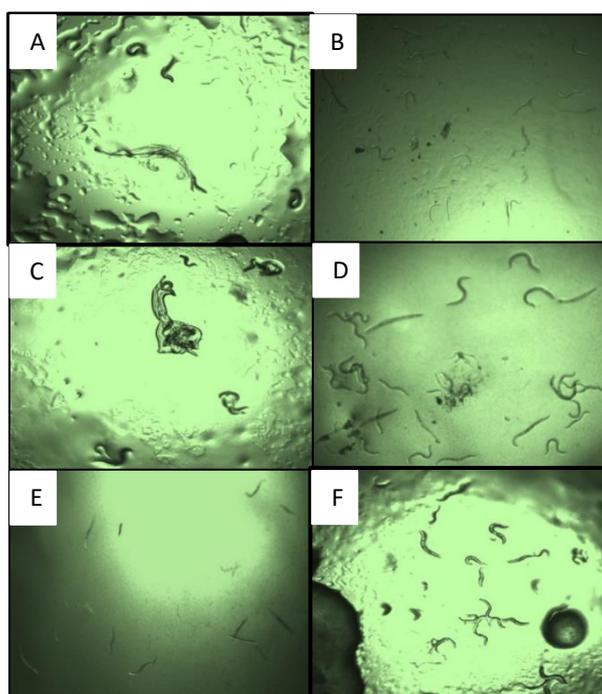


Figura 7. Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes contra *R. similis* J2. **A.** *Bacillus subtilis*, **B.** *Pseudomonas protegens* CHA0, **C.** *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, **D.** *Serratia marcescens* PM3-8, **E.** *Pseudomonas veroni* R4, **F.** *Enterobacter asburiae* PM3-14

4.1.4. Determinación el efecto antagonista de las PGPRs contra *R. similis* *in vitro*

Ensayos antagonistas con Nematodos J1 (juveniles 1)

Las aplicaciones de las rizobacterias a poblaciones de nematodos *in vitro* a 6 días de la exposición, dieron como resultado que *Pseudomonas veroni R4* con 91,4% fue el que mayor porcentaje de control alcanzó, estadísticamente igual a los tratamientos con *Bacillus subtilis* 80,5%, *Pseudomonas protegens CHA0* 74,7% y *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* 60,8%, estadísticamente superior a los demás tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14*, con porcentajes de 50,4% y 37,2% respectivamente.

Tratamientos inoculados con rizobacterias a los 8 días, dieron como resultado que *Bacillus subtilis* con 68,9%, alcanzó el mayor porcentaje de control sin diferir estadísticamente con los tratamientos *Pseudomonas protegens CHA0* con 63,2%, *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* con 59,2% y *Pseudomonas veroni R4* con 54,9%. Todos estos tratamientos fueron estadísticamente igual a los tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14*, que obtuvieron porcentajes de 43,5% y 25,4%, respectivamente.

Tratamientos inoculados con rizobacterias a los 10 días, dieron como resultados que *Bacillus subtilis* con 75,5%, alcanzó el mayor porcentaje de control sin diferir estadísticamente con los tratamientos *Pseudomonas protegens CHA0* con 74,2%, *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* con 71,7% y *Pseudomonas veroni R4* con 68,3%. Todos estos tratamientos fueron estadísticamente igual a los tratamientos con *Serratia marcescens PM3-8* y *Enterobacter asburiae PM3-14*, que obtuvieron porcentajes de 51,7% y 40,8%, respectivamente.

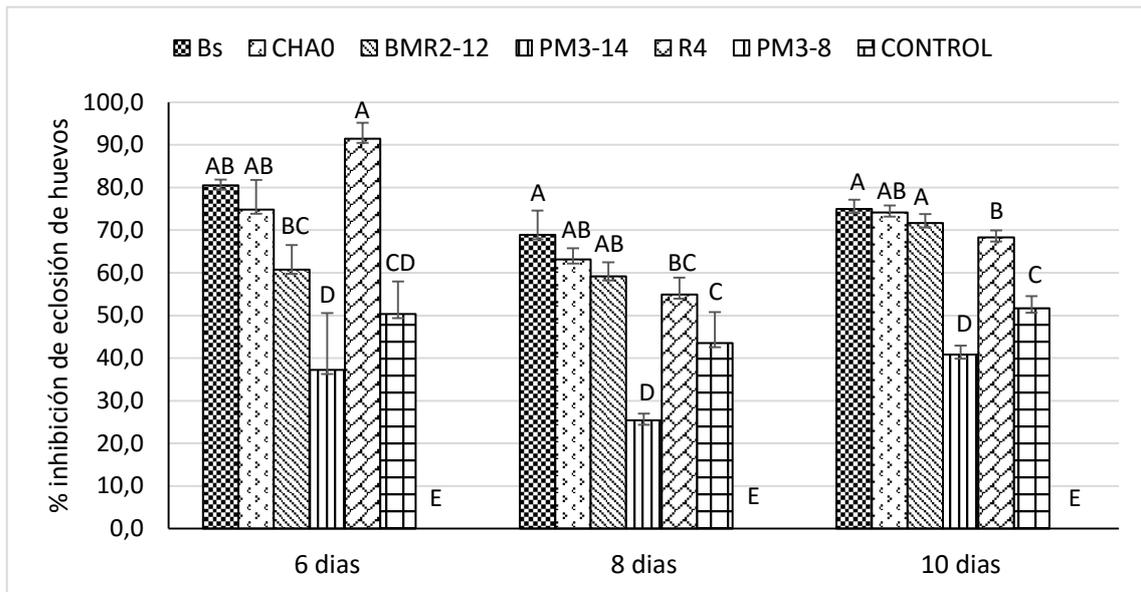


Figura 8. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con Rizobacterias contra *R. similis*. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las barras indican el porcentaje de eclosión de huevos correspondiente de cada tratamiento, mostrando resultados simultáneos a los 6, 8 y 10 días después de la inoculación.

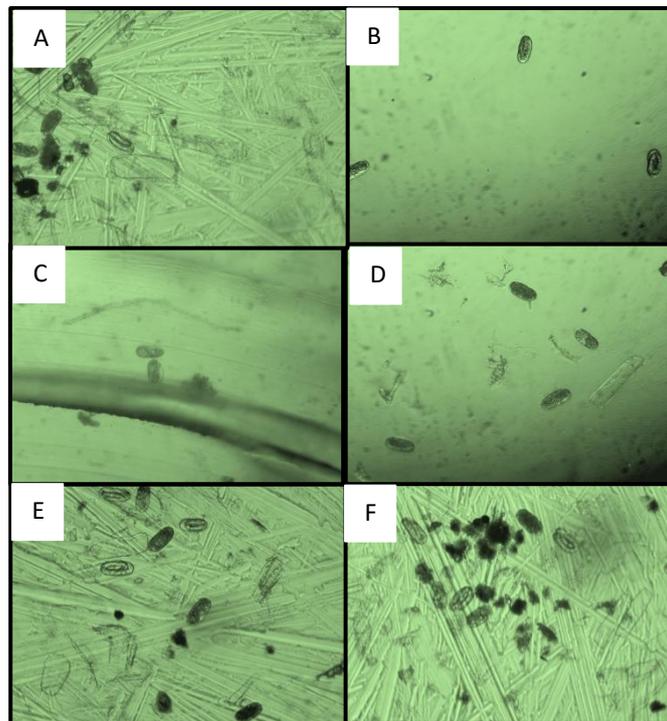


Figura 9. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos con rizobacterias contra *R. similis*. **A.** *Bacillus subtilis*, **B.** *Pseudomonas protegens* CHA0, **C.** *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, **D.** *Serratia marcescens* PM3-8, **E.** *Pseudomonas veroni* R4, **F.** *Enterobacter asburiae* PM3-14

Ensayos antagonistas con Nematodos J2 (juveniles 2)

Las aplicaciones de las rizobacterias a poblaciones de nematodos in vitro a 24 horas de la exposición, dieron como resultado que *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad hacia el nematodo *R. similis* con el 32,1%, siendo este estadísticamente igual a los tratamientos con *Bacillus subtilis* con 31,6%, superando a los tratamientos con *Pseudomonas veroni* R4 con 29,5%, *Pseudomonas protegens* CHA0 con 26,6%, *Serratia marcescens* PM3-8 con 24,1% y *Enterobacter asburiae* PM3-14 con 21,5%.

Tratamientos inoculados con rizobacterias a las 48 horas, dieron como resultado que *Pseudomonas veroni* R4, alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad hacia el nematodo *R. similis* con el 72,7%, superando a los demás tratamientos *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12 con 68,8%, *Pseudomonas protegens* CHA0 con 65,5%, *Bacillus subtilis* con 63,7%, *Serratia marcescens* PM3-8 con 48,3% y *Enterobacter asburiae* PM3-14 con 41,9%.

Tratamientos inoculados con rizobacterias a las 72 horas, dieron como resultado que *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad hacia el nematodo *R. similis* con el 90,1%, siendo este estadísticamente igual a los tratamientos con 90,1%, superando a los tratamientos con *Pseudomonas protegens* CHA0 con 87,5%, *Pseudomonas veroni* R4 con 86,5%, *Bacillus subtilis* con 86,6, *Serratia marcescens* PM3-8 con 76,2% y *Enterobacter asburiae* PM3-14 con 71,4% respectivamente.

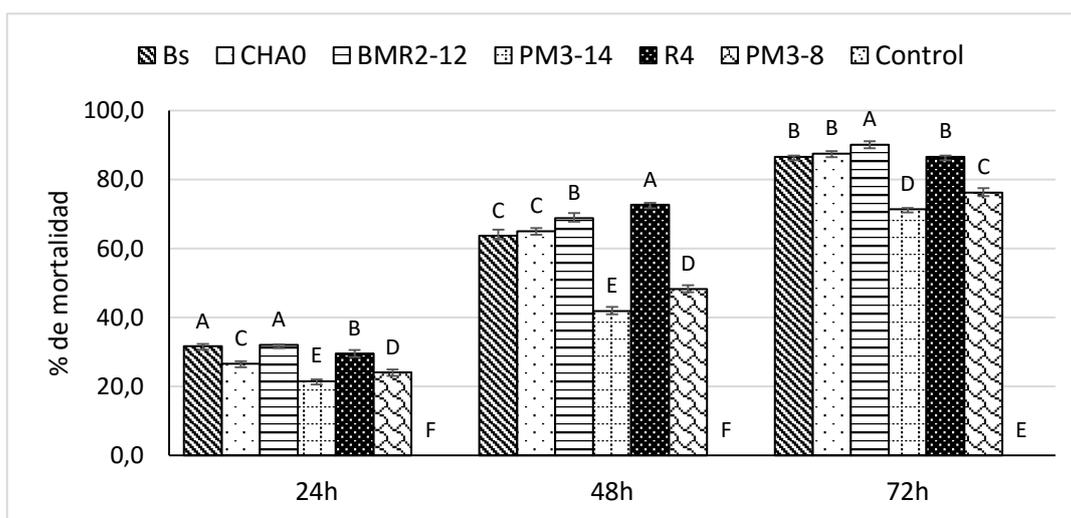


Figura 10. Porcentaje de mortalidad con rizobacterias contra *R. similis* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, mostrando resultados simultáneos a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación.

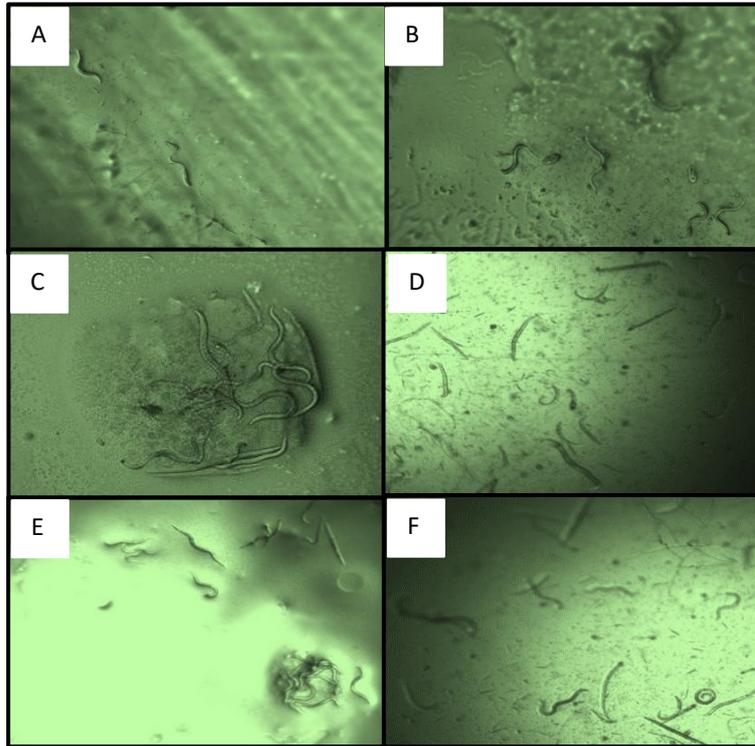


Figura 11. Porcentaje de mortalidad con rizobacterias contra *R. similis* J2. **A.** *Bacillus subtilis*, **B.** *Pseudomonas protegens* CHA0, **C.** *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, **D.** *Serratia marcescens* PM3-8, **E.** *Pseudomonas veroni* R4, **F.** *Enterobacter asburiae* PM3-14

4.2. DISCUSIÓN

4.2.1. Identificación morfológica

El nematodo *R. similis* tiene un cuerpo filiforme con una cabeza corta (parte anterior) y una cola con forma helicoidal alargada (parte posterior). Posee dimorfismo sexual entre ambos géneros coincidiendo con los estudios realizados por Ryss & Woust (1997), quien menciona que el referido nematodo está adaptado para moverse con rapidez y facilidad en el suelo, porque tiene forma filiforme con una cabeza corta y una cola helicoidal.

El *R. similis* macho posee un cuerpo más alargado que la hembra con una longitud que oscila entre 640µm – 870µm, En su parte anterior presenta un estilete poco desarrollado con longitudes que varían entre de 12-14µm, la cabeza tiene forma de conica que mide de entre 81-95 µm con un diámetro en la parte más pronunciada de la cabeza de entre 12-16µm. En la parte posterior el macho tiene espícula (órgano reproductor) con longitudes que varían entre 13-23µm, y una cola helicoidal con longitudes de entre 75-86µm con un diámetro en la parte más pronunciada de entre 11-14µm. El *R. similis* hembra posee un cuerpo más corto en comparación con el macho con longitudes que oscilan de entre 605-780µm. En la parte anterior presenta un estilete bien desarrollado más largo y marcado a diferencia del macho con longitudes que varían de entre 16-21µm. Su cabeza tiene forma conica que mide de entre 75-97µm con un diámetro en la parte más pronunciada de la cabeza de entre 15-25µm, en comparación con el macho la hembra es más robusta. En su parte posterior la hembra posee ovarios que se encuentran cerca del ano, y una cola helicoidal con longitudes de entre 77-89µm con diámetros en la parte más pronunciada que varían de entre 16-24, coincidiendo con las características generales morfométricas descritas por Ryss & Woust (1997), quien menciona que la longitud total del nematodo *R. similis* es de 601-841 µm o más. La longitud de la cabeza parte anterior es de 75-96 µm o más, su estilete tiene una longitud de 13-27 µm, una cola o parte posterior de 65-92 µm, una espícula de 15-25 µm, diámetro de la cola de 4-25 µm.

4.2.2. Plataforma de reproducción más idónea del nematodo *R. similis*

La plataforma de reproducción masiva de *R. similis* con mayor número de nematodos fue la elaborada a partir de discos de zanahoria con un promedio 5708 nematodos por discos de

25g, coincidiendo con lo postulado por Moody (1986), donde indica que los nematodos en zanahorias tienden a reproducirse asexualmente por partenogénesis, debido a la facilidad que tienen para penetrar y alimentarse de la misma. Todo esto conlleva a que los nematodos tengan condiciones favorables alterando así su comportamiento y favoreciendo a la reproducción partenogénica, aumentando su número rápidamente en un promedio de 5000 a 6000 nematodos por disco. Los nematodos aislados de discos de zanahoria sufrieron alteraciones en el desarrollo del estilete disminuyendo su tamaño o a su vez atrofiándose, la hipótesis que se plantea es que debido a las condiciones de laboratorio y cambio de alimentación provocó la alteración, ya que la zanahoria es un tubérculo muy succulento y susceptible al ataque de nematodos.

4.2.3. Efecto antagonista de las PGPRs contra el nematodo *R. similis*

Eclosión de huevos (J1)

La cepa de *A. calcoaceticus* BMR2-12 presentó un alto potencial antagonista contra *R. similis*, obteniendo resultados en la inhibición de eclosión de huevos superior al 70%, concediendo con Valarezo, (2017), que indica que las cepas *A. calcoaceticus* BMR2-12 generó una eclosión de huevos $\leq 75\%$ en *M. incognita*. La cepa de *B. subtilis* alcanzó un porcentaje de inhibición de eclosión de huevos $\leq 75\%$, similar a los resultados obtenidos por Gutiérrez, (2003), menciona que las cepas de *Bacillus spp.* alcanzaron una reducción de la eclosión de huevos de entre 75% y 88%. La cepa *P. protegens* CHA0 obtuvo resultados en la disminución de eclosión de huevo $\leq 75\%$, similar a lo mencionado por Siddiqui & Shahid, (2003) menciona que en las pruebas de eclosión, encontró el mayor efecto antagónico por *P. protegens* CHA0 con 60 % de inhibición para *M. javanica* después de 48 h, por la producción del antibiótico 2,4-DAPG, que degrada la pared celular del huevo. Sherif et al., (1999) La producción de metabolitos secundarios por las bacterias de la rizósfera causa una ruptura en la membrana de los huevos de nematodos y afecta la vitalidad del agallador J2. La cepa *P. veroni* R4 alcanzo resultados de disminución en la eclosión de huevos $\leq 70\%$, coincidiendo con 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)

Mortalidad en nematodo J2

La cepa de *A. calcoaceticus* BMR2-12 presentó un alto potencial antagonista contra *R. similis*, obteniendo resultados de mortalidad en nematodos J2 a las 72h de la exposición superior al 90%, diferente a los resultados obtenidos Valarezo, (2017), este menciona que *A. calcoaceticus* BMR2-12 generó una mortalidad de $\leq 25\%$ en nematodos J2 de *M. incognita* a las 24h de la exposición. La diferencia en resultados se dio a causa de las pocas horas que fue evaluado *A. calcoaceticus* BMR2-12 contra *M. incognita*. La cepa de *B. subtilis*, alcanzó un porcentaje de mortalidad contra *R. similis* J2 $\leq 95\%$, coincidiendo con Lian et al., (2007), el menciona que *Bacillus spp.* posee una mortalidad de nematodos de entre 80%, 99% y 100%. La cepa de *P. protegens* CHA0 obtuvo resultados de mortalidad $\leq 89\%$, parecido a lo mencionado por Valarezo, (2017), La cepa *P. protegens* CHA0 obtuvo un porcentaje de mortalidad del J2 de *M. incognita* con 87.5%. La cepa de *P. veroni* R4 obtuvo resultados de inhibición de eclosión de huevos $\leq 89\%$, mayor a los resultados obtenidos por Valarezo Castro, (2017) donde menciona que la cepa *P. veronii* R4 obtuvo un porcentaje de mortalidad del J2 de *M. incognita* con 71,6%, la diferencia de resultados pudo ser causada por la diferencia de concentraciones a la hora de realizar los ensayos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El estadio J1 del nematodo *R. similis* tiene una duración de 10 días, y presento longitudes de entre 106 μm y 129 μm con un diámetro de entre 40 μm y 51 μm .
- El nematodo *R. similis* presento dimorfismo sexual, los machos poseen espícula, un estilete poco desarrollado y una longitud del cuerpo de 840 μm , las hembras tienen ovarios, un estilete completamente desarrollado y una longitud del cuerpo de 780 μm .
- La plataforma más idónea para la reproducción masiva de nematodos fue la que es elaborada a partir de discos de zanahoria, obteniendo un promedio de 5708 nematodos por discos de 25 gramos.
- La cepa de *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* presento un alto potencial antagonista contra *R. similis*, obteniendo resultados en la inhibición de eclosión de huevos superiores al 70%, similares a las cepas controles *Bacillus subtilis* con $\leq 75\%$, *Pseudomonas protegens CHA0* con $\leq 75\%$ y *Pseudomonas veroni R4* con $\leq 70\%$.
- La cepa de *Acinetobacter calcoaceticus BMR2-12* presento el mayor porcentaje de mortalidad contra nematodos juveniles 2 de *R. similis* superiores al 90%, similar a las cepas controles *Bacillus subtilis* con $\leq 95\%$, *Pseudomonas protegens CHA0* con $\leq 89\%$ y *Pseudomonas veroni R4* con $\leq 89\%$.

5.2. Recomendaciones

- Realizar la caracterización molecular del nematodo *R. similis* para obtener un mejor estudio a nivel de género y especie con mayor grado de confiabilidad.
- Evaluar el efecto antagonista de la PGPRs con mayores resultados a nivel in vivo en plántulas de banano.
- Elaborar un biorreactor de producción en masa de las PGPRs para los estudios en campo.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Al., B. et. (1996). Plant-parasitic nematodes of banana in american samoa, 65–72.
- Ali Siddiqui, I., & 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. <https://doi.org/10.1023/A:1013313103032>
- 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 [1988]. *Phytopathology (USA)*. [American Phytopathological Society]. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8909121>
- Blake, C. D. (1961). Root rot bananas caused by *Radopholus similis* (Cobb) and its control in new south wales.
- Blake, C. D. (1966). The Histological Changes in Banana Roots Caused By *Radopholus similis* and *Helicotylenchus Multicinctus*, (1961).
- Bunternngsook, B., Mhuantong, W., Champreda, V., Thamchaipenet, A., Eurwilaichitr, L., Bacon, C. W., ... Cassells, A. C. (2012). Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1575-2>
- Chandler, S. (2008). The nutritional value of bananas. *Bananas and Plantains*, 6(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0296-0>
- Chaparro, A. (2010). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana, 116.
- Florida, L. P., & Crane, J. H. (1998). Los Platanos en Florida 1. Boards, 1–8.
- Gerischer, U. (2008). *Acinetobacter molecular microbiology*. Caister Academic Press.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., & Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Published by imperial college press and distributed by world scientific publishing co. <https://doi.org/10.1142/p130>
- Gowen, S. R., Quénéhervé, P., & Fogain, R. (2005). *Nematode Parasites of Bananas and Plantains. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.*, Wallingford: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9780851997278.0611>
- Handelsman, J. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell Online*, 8(10), 1855–1869. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1855>
- Khan, A., Williams, K. L., & Nevalainen, H. K. M. (2006). Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *BioControl*, 51(5), 659–678. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-4242-x>
- Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2006). Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Soil Biology, Volume 9. Microbial Root Endophytes*, 9, 33–52. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_3

- Kloepper, J. W., Ryu, C., & Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp., 94(11), 1259–1266.
- Kloepper, J. W., Zehnder, G. W., Murphya, J. F., & Fernandez, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases, 21–26.
- Lian, L. H., Tian, B. Y., Xiong, R., Zhu, M. Z., Xu, J., & Zhang, K. Q. (2007). Proteases from *Bacillus*: A new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 262–269. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02184.x>
- Loeffler, W., Tschen, J. S. - ., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T. - F, ... Wu, T. - G. (1986). Antifungal Effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F- 29- 3 A Comparison with Activities of Other *Bacillus* Antibiotics. *Journal of Phytopathology*, 115(3), 204–213. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1986.tb00878.x>
- Loos, C. A., & Loos, S. B. (1960). The Black-head Disease of Bananas (*Musa acuminata*). *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 27(2), 189–193. Retrieved from <http://bionames.org/archive/issn/0018-0130/27/189.pdf>
- Lugtenberg, B. J. J., & Dekkers, L. C. (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*, 1(1), 9–13. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00005.x>
- Nickle, W. R. (1991). *Manual of agricultural nematology*. M. Dekker.
- Peix, A., Lang, E., Verbarq, S., Spr, C., Santa-regina, I., Mateos, P. F., ... Rodr, C. (2009). *Acinetobacter* strains IH9 and OCII, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*, 32, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.03.004>
- Piedrahita Guzmán, Ó. A. (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Luna Azul*, (33), 17. <https://doi.org/10.17151/luaz.2015.41.19>
- Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 4(2), 52–58. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01364-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01364-8)
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S., van Pett, J., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., ... Van Loon, L. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10(September), 1571–1580.
- Price, N. S. (1995). The origin and development of banana and plantain cultivation. *Bananas and Plantains*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0737-2_1
- Queiroz, B. P. V. de, & Melo, I. S. de. (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. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400008>
- Rodgers, P. B. (1989). Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development, (February), 155–164.

- Ryss, A. (2014). Taxonomy , identification , evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didephic species) studied on morphological data (N, (January 2003).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.006>
- Sikora, R. a. (1992). Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 245–270.
- Someya, N., Nakajima, M., Hamamoto, H., Yamaguchi, I., & Akutsu, K. (2004). Effects of light conditions on prodigiosin stability in the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2. *Journal of General Plant Pathology*, 70(6), 367–370. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0134-7>
- Sotomayor, I. (2012). La Raza Tropical 4 de Mal de Panamá: Amenaza Potencial para la Industria Bananera y Platanera del Ecuador. Retrieved from <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/bananera1.pdf>
- Speijer, P. R. (1997). Screening of Musa germplasm for resistance and tolerance to nematodes. IPGRI.
- Sutton, T. B., & Barker, K. R. (2002). Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Plant Disease*, (66), 964–974.
- Turner, D. W. (2003). Banana root system towards a better understanding for its productive management: procedings. Inibap.
- Vu, T., Hauschild, R., & Sikora, R. a. (2006). *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Nematology*, 8(6), 847–852. <https://doi.org/10.1163/156854106779799259>
- Weller, D. (1988). Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26(172), 379–407.
- Zablotowicz, R. M., Tipping, E. M., Lifshitz, R., & Kloepper, J. W. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The Rhizosphere and Plant Growth*, 1978, 315–326. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4_70

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento del nematodo *R. similis*



Anexo 2. Observación del Nematodo *R. similis*



Anexo 3. Elaboración plataforma in vitro para la multiplicación de *R. similis* en discos de zanahorias



Discos de zanahoria de 3mm de espesor



Esterilización hipoclorito al 10%



Flameado de discos de zanahoria



Preparación de placas



Disco colonizado por *R. similis*



Incubar por 30 días a 28°C

Anexo 4. Elaboración de Plataforma in vivo de *R. similis*



Plántulas de banano sembradas en un espacio de 3x5 m



Aislamiento de *R. similis* de raíces infectadas



Inoculación de *R. similis*.



Raíces infectadas 60 días después de la inoculación

Anexo 5. Elaboración de placas de inhibición para ensayos antagonistas.



Placas con agar al 10%



Placas con pocillos que contenían agar al 2%



Inoculación de sobrenadantes



Inoculación de nematodos

Anexo 6. Siembra de bacterias y extracción de sobrenadantes bacteriano.



Bacterias a las 24 h



Centrifugación para extracción de sobrenadantes



Transferencia a tubos eppendorf



Sobrenadantes bacterianos



Choque térmico a 95°
C y -400 °C



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 nematicida a *Radopholus similis* por rizobacterias nativas y comerciales del género *Pseudomonas* spp. *CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA # 4*