



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:

**“Efecto de *Pseudomonas* spp fluorescentes con actividad antagonista hacia
Meloidogyne spp en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*)”**

Autor:

Ronald Hernán Valarezo Castro

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

DIRECTOR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2016 – 2017

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **RONALD HERNÁN VALAREZO CASTRO** 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.


RONALD HERNÁN VALAREZO CASTRO

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 Valarezo Castro Ronald Hernán, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado “**Efecto de *Pseudomonas* spp fluorescentes con actividad antagonista hacia *Meloidogyne* spp en el cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum*)**”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

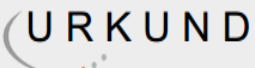
Dr. Hayron Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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



Dokument [tesisurkum.docx](#) (D24626157)
Inskickat 2016-12-28 11:15 (-05:00)
Inskickad av hcanchignia@uteq.edu.ec
Mottagare hcanchignia.uteq@analysis.urkund.com
Meddelande Tesis Valarezo [Visa hela meddelandet](#)

9% av det här c.a 29 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 5 st källor.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: tesisurkum.docx (D24626157)
Submitted: 2016-12-28 17:15:00
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 9 %

Sources included in the report:

tesiskarenchavezurkum-1.docx (D23233916)
tesiskarenchavezurkum.docx (D22352339)
GUERRA PROYECTO DE INVESTIGACION 25-02-2016.docx (D18180626)
http://www.uteq.edu.ec/revistacy/publico/archivos/C2_Canchignia.pdf
<http://www.monografias.com/trabajos75/nematodos-fitoparasitos-manejo-formadores-agallas/nematodos-fitoparasitos-manejo-formadores-agallas2.shtml>

Instances where selected sources appear:

20

Dr. Hayron 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:

“Efecto de *Pseudomonas* spp fluorescentes con actividad antagonista hacia *Meloidogyne* spp en el cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum*)”.

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

Aprobado por:

Ing. Ignacio Sotomayor H MSc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dra. Marisol Rivero H
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Jefferson Aragundi V MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

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

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

Le agradezco a mi Director de tesis, Dr. Hayron Canchignia Martínez, por su enseñanza y estimulación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A la Dra. Carmen Triviño, por su enseñanza y apoyo para poder realizar esta investigación.

A la Dra. Carmen Suárez, por su enseñanza y ayudarme con algunos materiales necesarios para la culminación de esta investigación.

También a mis amigos que han formado parte de mi vida profesional a las que les encantaría agradecerles su amistad, apoyo y compañía.

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme lograr esta meta, también por darme a unos padres que me han apoyado e todo momento, ya que con sus esfuerzos, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional, este logro se los dedico a Katty Castro y Darwin Valarezo.

A Karen Chávez por ser una persona muy especial en mi vida y me apoyo en todo este proceso.

RESUMEN EJECUTIVO

La constante aplicación de nematicidas para el control de *M. incognita*, ha ocasionado pérdida de microorganismos benéficos y contaminación ambiental. El uso de control biológicos en la agricultura es una alternativa que beneficia los aspectos fisiológicos de las plantas y a su vez la reducción del uso de nematicidas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las rizobacterias *Pseudomonas* spp fluorescentes con actividad antagonista hacia *Meloidogyne* spp en el cultivo de tomate. Se reprodujo el *M. incognita* en plantas de tomates por dos meses en condiciones de invernadero. Para su identificación morfológica se recuperaron nematodos en diferentes estadios a través del tamizado. En la identificación molecular se extrajo ADN a partir de raíces con síntomas de agallamiento con la ayuda del kit QIAGEN y se utilizó dos parejas de primer Finc/Rinc y Inc-K14F/ Inc-K14R con una amplificación de 1200 y 399 pb. Para la evaluación de los ensayos se utilizó siete cepas de *Pseudomonas* que producen Cianuro de hidrogeno (HCN), Proteasa, Pirrolnitrina y Catalasa. Se estudió un solo factor, las rizobacterias, se realizaron ensayos *in vitro*: 1) Inhibición de eclosión de huevos de *M. incognita*, el porcentaje se determinó contando 50 huevos por 0.5 cm²; 2) Mortalidad del *M. incognita* J2 evaluándose las cepas al 4 %. Ensayos *in vivo*: Altura de planta, Peso radicular, Número de agallas, Peso de agallas y Población del *M. incognita* J2. Se empleó el diseño completamente alzar (D.C.A) para evaluar el efecto antagonista de las rizobacterias, se utilizó la prueba de Tukey al 95 %. Las cepas *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-8 mostraron mayor actividad antagónica hacia *M. incognita* en los ensayos *in vivo*. Las cepas *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4, *P. fluorescens* BMR2-12 y PM3-14 presentaron mayor actividad antagonista en las evaluaciones *in vivo*.

Palabras claves: *Meloidogyne incognita*, rizobacterias, actividad antagonista.

ABSTRAC

The constant application of nematicides for the control of *M. incognita*, has caused loss of beneficial microorganisms and environmental pollution. It is of biological control in agriculture is an alternative that benefits the physiological aspects of the plants and at the same time reducing the use of nematicides. This work aimed to evaluate rhizobacteria *Pseudomonas fluorescent* spp with antagonistic activity to *Meloidogyne* spp. in the tomato crop. The *M. incognita* in tomato plants reproduced by two months in greenhouse conditions. For morphological identification nematodes in different stadiums were recovered through the sieving. In molecular identification, DNA was extracted from roots with symptoms of damping with the help of QIAGEN kit and used two pairs of first Finc/Rinc and Inc-K14F / Inc-K14R with an amplification of 1200 and 399 pb. Seven strains of *Pseudomonas* that produce cyanide was used for the evaluation of the trials of hydrogen (HCN), protease, Pirrolnitrina, and catalase. We studied a single factor, rhizobacteria, were performed in vitro assays: 1) inhibition of *M. incognita* eggs hatch, the percentage was determined by counting 50 eggs per 0.5 cm²; (2) mortality of the *M. incognita* J2 evaluating strains to 4%. In vivo tests: plant height, root weight, number of galls, galls weight and population of the *M. incognita* J2. The design was used completely lift (D.C.A) to evaluate the antagonistic effect of rhizobacteria, Tukey's test was used to 95%. Strains *p. protegens* CHA0 and *p. fluorescens* PM3-8 showed more antagonistic activity towards *M. incognita* in the in vivo tests. Strains *p. protegens* CHA0, *p. veronii* R4, *p. fluorescens* BMR2-12 and PM3-14 showed greater antagonist activity in vivo assessments.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, rhizobacteria, antagonistic activity.

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.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO	viii
TABLA DE CONTENIDO	x
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
Código Dublín	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1 Problema de investigación.....	4
1.1.1 Planteamiento del problema.....	4
1.1.2 Formulación del problema	5
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 Objetivo general	6
1.2.2 Objetivos específicos	6
1.3 Justificación.....	7
CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1 Marco referencial.....	9
2.1.1 Cultivo de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	9
2.1.1.1 Origen.....	9

2.1.1.2 Taxonomía y morfología	9
2.1.1.3 Requerimientos de clima y suelo	11
2.1.1.4 Efecto en el desarrollo y rendimiento en el cultivo de tomate por el <i>Meloidogyn</i> sp.....	11
2.1.2 El género <i>Meloidogyne</i>	12
2.1.2.1 Especies de <i>Meloidogyne</i>	14
2.1.2.2 Morfología y desarrollo del <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
2.1.2.3 Efecto de <i>Meloidogyne</i> spp, sobre el desarrollo de las plantas	20
2.1.2.4 Estrategia de manejos de nematodos	20
2.1.3 Rizobacterias con actividad antagonista	22
2.1.4 La presencia de rizobacterias en plantas	25
CAPÍTULO III MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.1 Localización.....	28
3.2 Tipo de investigación	28
3.3 Material genético	28
3.3.1 Características fenológicas y fenométricas.....	28
3.4 Método de investigación.....	28
3.5 Fuentes de recopilación de información.....	29
3.6 Diseño de la investigación.....	29
3.6.1 Manejo del experimento.....	29
3.6.1.1 Aislamiento e identificación por morfología y molecular de <i>M. incognita</i>	29
3.6.1.2 Reproducción de <i>M. incognita</i> en condiciones de invernadero.....	30
3.6.1.3 Selección y crecimiento de las <i>Pseudomonas</i> spp	31
3.7 Instrumento de investigación.....	31
3.8 Tratamientos evaluados	31
3.8.1 Evaluación antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp para eclosión de huevos y nematodos J2 de <i>M. incognita in vitro</i>	32

3.8.1.1 Inhibición para eclosión de huevos <i>M. incognita</i> (%).....	32
3.8.1.2 Evaluación de la mortalidad nematodos J2 (%)	33
3.8.2 Evaluación antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp hacia <i>M. incognita</i> en plantas de tomate.....	34
3.8.2.1 Altura de planta (cm)	35
3.8.2.2 Peso de raíces (g).....	35
3.8.2.3 Número y peso de agallas (g).....	35
3.8.2.4 Población de <i>M. incognita</i> J2.....	35
3.9 Recursos humanos y materiales.....	35
3.9.1 Material de laboratorio	35
3.9.2 Reactivos de laboratorio.....	36
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Resultados.....	38
4.1.1 Aislamiento e Identificación por Morfología y Molecular de <i>M. incognita</i>	38
4.1.2 Evaluación antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp para eclosión de huevos y nematodos J2 de <i>M. incognita in vitro</i>	40
4.1.2.1 Inhibición en eclosión de huevos (%).....	40
4.1.2.2 Mortalidad de nematodos J2 (%).....	41
4.1.3 Evaluación antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp hacia <i>M. incognita</i> en plantas de tomate.....	43
4.1.3.1 Altura de planta (cm)	43
4.1.3.2 Peso radicular (gr)	44
4.1.3.3 Numero de agallas	45
4.1.3.4 Peso de agallas (gr)	46
4.1.3.5 Población de J2	49
4.2 Discusión	50
4.2.1 Aislamiento e identificación por morfología y molecular de <i>M. incognita</i>	50

4.2.2 Evaluación antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp para eclosión de huevos y nematodos J2 de <i>M. incognita in vitro</i>	51
4.2.2.1 Eclosión de huevos.....	51
4.2.2.2 Mortalidad de nematodos.....	51
4.2.3 Evaluación antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp hacia <i>M. incognita</i> en plantas de tomate.....	52
4.2.3.1 Altura de plantas (cm).....	52
4.2.3.2 Peso radicular.....	53
4.2.3.3 Número y peso de agallas.....	53
4.2.3.4 Población del J2.....	54
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1 Conclusiones.....	57
5.2 Recomendaciones.....	58
CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA.....	59
6.1 Bibliografía.....	60
CAPÍTULO VII ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Esquema del analisis de varianza.....	29
Cuadro 2 Tratamientos.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida parasitaria de <i>Meloidogyne incognita</i>	18
Figura 2	Anatomía de <i>Meloidogyne</i> spp	19
Figura 3	Esquema general para la evaluación de eclosión de huevos.....	32
Figura 4	Esquema general para la evaluación de mortalidad de nematodo J2.....	33
Figura 5	Esquema general de inoculación de <i>Pseudomonas</i> en plantas de tomate e inoculación de nematodos en macetas.....	34
Figura 6	Reproducción en invernadero de <i>M. incognita</i>	38
Figura 7	Etapas del desarrollo del <i>M. incognita</i>	39
Figura 8	Amplificación del ARNr 5.8S mediante PCR de <i>M. incognita</i>	39
Figura 9	Actividad antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp hacia <i>M. incognita</i> en raíces de plantas de tomate.....	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1	Evaluación de eclosión de huevos del <i>M. incognita</i>	41
Grafico 2	Evaluación de mortalidad del <i>M. incognita</i>	42
Grafico 3	Evaluación de altura de planta.....	44
Grafico 4	Evaluación peso de raíz.....	45
Grafico 5	Evaluación del número de agallas.....	46
Grafico 6	Evaluación del peso de agallas.....	47
Grafico 7	Evaluación de la población de <i>M. incognita</i> J2.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit.....	70
Anexo 2	Evaluación de los ensayos antagonista hacia <i>M. incognita</i> <i>in vitro</i>	71
Anexo 3	Proceso para el tamizaje y recuperación de huevos y nematodos del <i>M. incognita</i>	72
Anexo 4	Lavado de las <i>Pseudomonas</i> spp.....	73

Código Dublín

Título:	“Efecto de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes con actividad antagonista hacia <i>Meloidogyne</i> spp en el cultivo de tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)”		
Autor:	Valarezo Castro Ronald Hernán		
Palabras clave:	Rizobacterias	<i>M. incognita</i>	Actividad antagonista
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2016		
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>Resumen.- La constante aplicación de nematicidas para el control de <i>M. incognita</i>, ha ocasionado pérdida de microorganismos benéficos y contaminación ambiental. Es uso de control biológicos en la agricultura es una alternativa que beneficia los aspectos fisiológicos de las plantas y a su vez la reducción del uso de nematicidas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las rizobacterias <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes con actividad antagonista hacia <i>Meloidogyne</i> spp en el cultivo de tomate. Se reprodujo el <i>M. incognita</i> en plantas de tomates por dos meses en condiciones de invernadero. Para su identificación morfológica se recuperaron nematodos en diferentes estadios a través del tamizado. En la identificación molecular se extrajo ADN a partir de raíces con síntomas de agallamiento con la ayuda del kit QIAGEN y se utilizó dos parejas de primer Finc/Rinc y Inc-K14F/Inc-K14R con una amplificación de 1200 y 399 pb. Para la evaluación de los ensayos se utilizó siete cepas de <i>Pseudomonas</i> que producen Cianuro de hidrogeno (HCN), Proteasa, Pirrolnitrina y Catalasa. Se estudió un solo factor, las rizobacterias, se realizaron ensayos <i>in vitro</i>: 1) Inhibición de eclosión de huevos de <i>M. incognita</i>, el porcentaje se determinó contando 50 huevos por 0.5 cm²; 2) Mortalidad del <i>M. incognita</i> J2 evaluándose las cepas al 4 %. Ensayos <i>in vivo</i>: Altura de planta, Peso radicular, Número de agallas, Peso de agallas y Población del <i>M. incognita</i> J2. Se empleó el diseño completamente alzar (D.C.A) para evaluar el efecto antagonista de las rizobacterias, se utilizó la prueba de Tukey al 95 %. Las cepas <i>P. protegens</i> CHA0 y <i>P. fluorescens</i> PM3-8 mostraron mayor actividad antagónica hacia <i>M. incognita</i> en los ensayos <i>in vivo</i>. Las cepas <i>P. protegens</i> CHA0, <i>P. veronii</i> R4, <i>P. fluorescens</i> BMR2-12 y PM3-14 presentaron mayor actividad antagonista en las evaluaciones <i>in vivo</i>.</p>		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

Introducción

En Ecuador, la producción de tomate (*Lycopersicum esculentum*), ocupa el cuarto lugar en importancia por área sembrada dentro del cultivo de hortalizas con 3333 hectáreas, una producción total de 61426 toneladas métricas y un promedio de 18,4 t/ha (INEC, 2015).

Según el INEC (2015), la superficie cosechada se incrementa en 21,8% de 2003 al 2005, pero los rendimientos por hectárea se reducen de 25 t/hectárea en 2006 a 9,7 t/hectárea en 2008 y luego se recuperan a 22 t/hectárea en el 2014. Entre las causas de la disminución del rendimiento se aduce al incremento de la incidencia y severidad de enfermedades, insectos plagas y de los nematodos agalladores *Meloidogyne sp.* y *Nacobbus sp.* (MAGAP, 2014). En cambio, la recuperación del rendimiento registrada en el 2002, se aduce a que esta hortaliza se empezó a cultivar bajo cubierta (invernadero) en la sierra a partir del año 2000, cuya superficie se estimó en 400 ha, presentando un constante crecimiento y desarrollo tecnológico (AGRIPAC, 2015).

En el caso particular de las principales zonas tomateras se determinó que las especies de nematodos agalladores que prevalecen en estas son *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* con una incidencia de 27,8% (12 campos y 5 invernaderos) y 86,9% (31 campos y 22 invernaderos), respectivamente, y severidad (infestación del suelo expresada por poblaciones de 1 a más de 80 nematodos/100gramos de suelo y de 1 a más de 150 nematodos/100g de suelo.) (Revelo, Cazco, & Sandoval, 2006).

Los nematodos patógenos motivo de estudio en presente trabajo, tienen la habilidad de infectar los cultivos con huevos que pueden enterrarse profundamente en el suelo, eclosionar e infectar con sus larvas (los llamados juveniles o J2) las plantas recién emergidas y particularmente sensibles. Además, la concentración del inóculo, si no se desinfecta profundamente el suelo, se incrementa año tras año hasta hacer inviable el cultivo de sus plantas hospedadoras (Eisenback, Hirschmann, & Sasser, 1983).

En el tomate, uno de los nematodos que pueden infectar con virulencia su cultivo es el responsable de la enfermedad conocida como agalla de la raíz provocada por las

especies del género *Meloidogyne*, entre ellas *Meloidogyne incognita*. Aunque para la lucha contra este nematodo se han probado nuevos nematicidas, su alto costo y sobre todo los efectos tóxicos antes mencionados, han propiciado la búsqueda de alternativas menos dañinas (Eisenback, Hirschmann, & Sasser, 1983). Actualmente hay múltiples investigaciones realizadas sobre esas posibles alternativas que pasan desde el uso de extractos vegetales a agentes de biocontrol o la adición de enmiendas orgánicas al suelo, conocida como biofumigación, que se puede aplicar junto a la solarización del suelo en zonas de intensa incidencia solar (Eisenback, Hirschmann, & Sasser, 1983).

El control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas como las rizobacterias, es una de las alternativas que más atención ha recibido en los últimos años por efecto de producción de metabolitos secundarios con actividad proteolítica o antibióticos. Así, el control biológico surge como respuesta a la búsqueda de formas de control de patógenos, en la que prima la calidad de las cosechas y el respeto a los recursos naturales y humanos (Triviño, 2004).

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Problema de investigación

1.1.1 Planteamiento del problema

Existe una gran incidencia de nematodos como *Meloidogyne* spp. en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum*). La enfermedad causada por este nematodo ha ocasionado pérdidas en la producción hasta de un 21%, debido a una considerable baja de la calidad del producto, disminución de la productividad del cultivo, llegando incluso a la pérdida total de las plantas (Eisenback, Hirschmann, & Sasser, 1983).

El uso excesivo de nematicidas para el control de *Meloidogyne* spp. ha ocasionado un incremento en el impacto ambiental que contribuyen a la contaminación de los principales recursos como es el suelo, agua y aire. También a la pérdida de la biodiversidad de los microorganismos que habitan en el suelo entre ellos las rizobacterias ya que estas benefician al desarrollo de las plantas.

Diagnóstico

El nematodo *Meloidogyne* spp, causa agallamiento en el sistema radicular de las plantas de tomate comerciales, donde para combatir las afectaciones del nematodo se requiere de una diversidad de productos agroquímicos. Para esto, se realizó una selección de *P. fluorescens* que ejerza una actividad antagónica. La aplicación de *P. fluorescens*, fue necesaria para confirmar la actividad antagónica hacia *Meloidogyne* spp, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Pronóstico

En este trabajo de investigación fue necesario comprobar que *P. fluorescens* lidere un efecto antagónico hacia *Meloidogyne* spp en condiciones *in vitro* e *in vivo*. El problema estaría basado al no verificar actividad antagónica por las *P. fluorescens* hacia el nematodo agallador.

1.1.2 Formulación del problema

¿Cuál de las rizobacterias de *P. fluorescens* mantienen actividad antagónica hacia *Meloidogyne* spp?

1.1.3 Sistematización del problema

¿Cuál es el efecto de las *P. fluorescens* sobre la eclosión de la masa de huevos del *Meloidogyne* spp?

¿Qué tratamiento tendrá mayor efecto antagónico hacia la mortalidad del nematodo en estadio J2?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar las rizobacterias *Pseudomonas* spp fluorescentes con actividad antagonista hacia *Meloidogyne* spp. en el cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum*)

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar caracteres morfológicos del nematodo *Meloidogyne* spp.
- Evaluar la actividad antagonista de *Pseudomonas* spp. hacia el *Meloidogyne* spp. *in vitro*.
- Evaluar el efecto de *Pseudomonas* spp. inoculadas en plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* spp.

1.3 Justificación

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada.

Los rendimientos por hectárea han sido muy variables entre 2003 y 2014, debido principalmente a la presencia de problemas fitosanitarios. Los nematodos Fitoparásitos más importantes que afectan al cultivo de tomate son el nematodo del nudo radical que se encuentra distribuido en diferentes zonas del país. Los nematodos al alimentarse del sistema de raíces afectan directamente la nutrición de la planta haciéndola más susceptible al ataque de hongos y bacterias (Chagueza, 2011). La continua utilización de diferentes clases de productos de nematicidas para controlar estos parásitos y las enfermedades de plantas, ha generado serios problemas con relación a la salud pública y calidad.

Por ende, tomando en cuenta la incidencia de *Meloidogyne* spp, se hace necesario el estudio de nuevas alternativas de producción que sean sustentables. La utilización de biocontroladores como las rizobacterias que ofrecen en la agricultura beneficios fisiológicos en las plantas y además producen antibióticos controladores hacia diferentes patógenos, llevaría a la reducción del uso de agroquímicos y asegurar la biodiversidad y salud humana.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Marco referencial

2.1.1 Cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum*)

Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento, y en menor proporción al aumento de la superficie. Es cultivado en muchas zonas, con amplia variabilidad de condiciones de clima y suelo, aunque se cultiva principalmente en climas secos, tanto para producción en estado fresco como para uso agroindustrial. La producción global de tomates para consumo en fresco y proceso se estimaba en 108 millones de toneladas métricas, con un rendimiento promedio de 36 ton/ha. Asia produce más de la mitad del tomate que se produce en el mundo (FAO, 2014).

2.1.1.1 Origen

El origen del género *Lycopersicum* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile. Probablemente desde allí fue llevado a Centroamérica y México donde se domesticó y ha sido por siglos parte básica de la dieta. Luego, fue llevado por los conquistadores a Europa (Giacconi & Escaff, 2004).

2.1.1.2 Taxonomía y morfología

Familia Solanaceae.

Especie: *Lycopersicum esculentum*

El tomate cultivado corresponde, básicamente, a *L. esculentum*, aunque también se cultiva una fracción de la variedad botánica *cerasiforme* y de *Lycopersicon pimpinellifolium* ("cherry", "cereza", o "de coctel"). El mejoramiento ha generado muchas variedades distintas para fines muy específicos (Esquinas & Nuez, 1995).

Planta: El tomate puede presentar básicamente dos hábitos de crecimiento: determinado e indeterminado. La planta indeterminada es la normal y se caracteriza por tener un crecimiento extensivo, postrado, desordenado y sin límite. En ella, los tallos presentan

segmentos uniformes con tres hojas (con yemas) y una inflorescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo (Esquinas & Nuez, 1995).

Sistema radical: Alcanza una profundidad de hasta 2 m, con una raíz pivotante y muchas raíces secundarias. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de cultivo, se daña la raíz pivotante y la planta desarrolla resulta en un sistema radical fasciculado, en que dominan raíces adventicias y que se concentran en los primeros 30 cm del perfil (Esquinas & Nuez, 1995).

Tallo principal: Los tallos son ligeramente angulosos, semileñosos, de grosor mediano y con tricomas (pilosidades), simples y glandulares. Eje con un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando las hojas, tallos secundarios e inflorescencias. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales (Esquinas & Nuez, 1995).

Hojas: Las hojas son compuestas e imparipinnadas, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternada sobre el tallo (Esquinas & Nuez, 1995).

Flor: La flor del tomate es perfecta. Consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color amarillo dispuestos de forma helicoidal y de igual número de estambres que se alternan con los pétalos. Los estambres están soldados por las anteras y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo y evitan la polinización cruzada. El ovario es bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias denominadas comúnmente como “racimos”. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal. Las inflorescencias se desarrollan cada 2-3 hojas en las axilas (Esquinas & Nuez, 1995).

Fruto: Tiene peso que oscila entre unos pocos miligramos y 600 gramos. Está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Esquinas & Nuez, 1995).

2.1.1.3 Requerimientos de clima y suelo

- **Clima**

El tomate es una especie de clima cálido razonablemente tolerante al calor y a la sequía y sensible a las heladas. La planta de tomate necesita un período entre 3 y 4 meses entre su establecimiento y la cosecha del primer fruto. La temperatura media mensual óptima para su desarrollo varía entre 21 y 24°C, aunque se puede producir entre los 18 y 25°C (Calleja, 2016).

- **Suelo**

Aunque el tomate puede producirse en una amplia gama de condiciones de suelos, los mejores resultados se obtienen en suelos profundos (1 m o más), de texturas medias, permeables y sin impedimentos físicos en el perfil. Suelos con temperaturas entre los 15 y 25°C favorecen un óptimo establecimiento del cultivo después del trasplante. El pH debe estar entre 5,5 y 6,8 (Calleja, 2016).

2.1.1.4 Efecto en el desarrollo y rendimiento en el cultivo de tomate por el *Meloidogyne* sp.

El nematodo *Meloidogyne* spp. es uno de los patógenos más nocivos del tomate a nivel mundial, debido a que afecta severamente las raíces de este cultivo (Bhattari *et al.*, 2008). Se caracteriza por tener un hábito alimenticio polífago con un amplio rango de hospederos especialmente en países tropicales y subtropicales (Sikora y Fernández 2005, Moens et al. 2009). Esto ha hecho que sea considerado el nematodo fitoparásito de mayor importancia económica en el mundo. Los síntomas característicos de este nematodo provocan en la planta diferentes grados de achaparramiento, falta de vigor, deficiencias nutricionales y marchitamiento bajo condiciones de estrés (Shurtleff & Averre, 2000).

Estas afectaciones generan pérdidas a nivel mundial que se estima superan los \$US 100 billones (Bird & Kaloshian, 2003), siendo más de la mitad de estas pérdidas atribuidas a *Meloidogyne* spp (Bent et al. 2008). En el cultivo del tomate, *Meloidogyne* spp. es muy

importante por su rápida expansión, alta frecuencia de infestación y su capacidad para reducir su rendimiento hasta en un 68 % (Esparrago & Navas, 1995). Los daños causados no solo reducen el número de frutos del cultivo, sino que también afecta la calidad de los mismos impactando de esta forma en sus precios (Moens et al. 2009). Se ha documentado que la población inicial de *Meloidogyne* sp. influye en la severidad del daño, afectando el desarrollo del tomate (Salazar & Guzmán, 2013) y su rendimiento (Ehwaeti, Phillip, & Trudgill, 1998).

2.1.2 El género *Meloidogyne*

Los nematodos pertenecen al reino Animal y aunque parecen gusanos son distintos taxonómicamente de los verdaderos. La mayoría de los miles de especies de nematodos conocidas viven libremente en el agua o en el suelo y se alimentan de microorganismos, plantas o animales, pero algunos atacan y parasitan organismos vivos (Trudgill & Blok, 2001).

Los nematodos parásitos de plantas viven y se mueven en la película acuosa existente en el laberinto de microtúneles del suelo y dentro de los tejidos vegetales. Todos tienen alguna forma de estilete o arpón oral, que les permite perforar la pared de las células de la planta hospedadora para alimentarse. De acuerdo a sus hábitos alimenticios y movilidad se agrupan en:

- Ectoparásitos. Durante todo el ciclo de vida se mantienen fuera de la raíz y se alimentan de células de la epidermis o células un poco más profundas en la raíz. Tienen la capacidad de moverse hacia nuevos sitios de alimentación (*e.g. Criconemoides, Longidorus, Trichodorus, Tylenchorhynchus, Xiphinema*).
- Endoparásitos migratorios. Penetran al sistema radical y se alimentan de las células de la raíz a medida que migran (*e.g. Pratylenchus*).
- Endoparásitos sedentarios. Penetran al sistema radical, pierden la capacidad de moverse y mantienen un sitio activo de alimentación a través de células de la raíz altamente modificadas (*e.g. Meloidogyne, Globodera, Heterodera, Tylenchulus*)

(Trudgill & Blok, 2001).

Entre los nematodos que atacan las raíces de las plantas, los de la especie *Meloidogyne* spp, son los responsables de la enfermedad de la agalla de la raíz. Estos nematodos se encuentran en todo el mundo especialmente en zonas cálidas y desde luego en invernaderos.

Las pérdidas por *Meloidogyne* spp. varían entre el 15% y el 60% de la cosecha (Verdejo, 1999). Dentro del género *Meloidogyne* han sido descritas más de ochenta especies (Subbotin & Moens, 2006), de las cuales diez son importantes organismos fitopatógenos y cuatro de ellas se encuentran distribuidas en áreas agrícolas de todo el mundo, por lo que se consideran las principales especies de este género. *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, *Meloidogyne hapla* Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood y *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, suponen el 95% de todas las citas de enfermedades causadas por nemátodos formadores de agallas en las raíces, siendo *M. incognita* la especie que causa pérdidas más importantes económicamente (Hussey & Janssen, 2002) ya que, es capaz de reproducirse en más de 2000 especies de plantas (Jung & Wyss, 1999).

La infestación de la planta por *Meloidogyne* es llevada a cabo por nematodos en el segundo estadio juvenil (J2), los cuales eclosionan de los huevos en suelo y migran libremente hacia las raíces en respuesta a un estímulo químico procedente de éstas (Gaur, Beane , & Perry, 2000). Penetran en las raíces a nivel de la caliptra y migran entre las células corticales hasta alcanzar el cilindro vascular, donde inducen sitios de alimentación en los que varias células dispuestas alrededor de la cabeza del nematodo incrementan su tamaño para formar las llamadas “células gigantes”. Las células del parénquima y del periciclo circundantes se hipertrofian dando lugar a las características agallas o nódulos radiculares.

El número y el tamaño de estas agallas dependen de la susceptibilidad del hospedador y de la densidad de población inicial de nematodos en suelo. Los juveniles establecidos en las raíces se desarrollan hasta adultos. Las hembras permanecen unidas a su sitio de alimentación, donde producen huevos que serán liberados al suelo dentro

de una matriz gelatinosa. El número de huevos producido por cada hembra varía según la especie, oscilando entre 50 y 2000 huevos (Gaur, Beane , & Perry, 2000).

2.1.2.1 Especies de *Meloidogyne*

- ***Meloidogyne incognita***

Es una especie de nematodos que constituyen una importante y abundante plaga en la mayoría de los cultivos. Estos atacan las raíces de las plantas, produciendo características agallas o nódulos; por lo que son considerados como parásitos internos de las raíces de cientos de especies vegetales, incluyendo muchas plantas de importancia agrícola (Martínez et al., 2006).

Síntomas y daños

Los estados juveniles son los que causan el mayor daño. El sistema radicular infestado muestra nódulos o agallas características, cuya severidad varía dependiendo del grado de infestación por el nematodo y de la variedad y especie de la planta parasitada (Martínez et al., 2006).

Estos nódulos se forman a consecuencia de la emisión de secreciones salivares de los nematodos alimentándose de los tejidos radiculares. Los síntomas en los cultivos son típicamente producidos por la falta de crecimiento, un pobre desarrollo de las plantas con las hojas amarillentas. También se aprecia senescencia temprana, las hojas muestran colores anormales, reducción del sistema radicular, raíces infladas y producción reducida de frutos (Martínez et al., 2006).

- ***Meloidogyne javanica***

Gusanos microscópicos de unos 0,2 milímetros. Es una plaga bastante desconocida, viven bajo tierra y además no se ven a simple vista. *Meloidogyne* es un género de nematodos inductores de agallas que habitan en casi todas las regiones templadas y cálidas del mundo; son parásitos internos de las raíces de cientos de especies vegetales, incluyendo muchas plantas de importancia agrícola (Barrios, 2008).

Daños

Los daños son producidos en la raíz donde forma agallas, debido a una hipertrofia e hiperplasia de los tejidos provocados por la presencia de las hembras, y una posterior necrosis, lo cual impide una normal absorción del agua y nutrientes por parte de la planta. Las heridas son vía de entrada de otros microorganismos (virus, bacterias, hongos). Todo esto conduce a una gran disminución del vigor de la planta y rendimiento del cultivo. Los síntomas más comunes que pueden verse en la parte aérea de los huéspedes son: clorosis, debilitamiento, enanismo, raquitismo, marchitamiento. Comienzan generalmente en plantas jóvenes y raíces tiernas (Barrios, 2008).

Condiciones predisponentes

Las temperaturas de 25 a 30°C son ideales para el crecimiento y desarrollo de este nematodo. Temperaturas inferiores a 15°C o superiores a 33°C interrumpen el desarrollo de las hembras que no llegan a completar la madurez (Barrios, 2008).

- ***Meloidogyne arenaria***

M. arenaria es una especie termófila, no sobrevive en suelos con temperaturas menores a 10° C y los juveniles emergen del huevo a temperaturas mayores de 15°. La temperatura media óptima para su desarrollo es de 24 °C y es una especie rara en áreas con temperaturas medias de 3 °C. *M. arenaria* se reproduce mediante partenogénesis mitótica. Las hembras adultas ponen huevos en una envoltura gelatinosa, dentro o fuera de la raíz (Alcoba, Bejarano, & Catacata, 2005). Esta masa gelatinosa tiene propiedades celulíticas y forma una cavidad en el interior de la raíz, donde se dispone la masa de huevos, o un canal hacia el exterior, por donde sale la parte posterior de la hembra cuando la postura es externa; además, tiene propiedades antimicrobianas que protege a los huevos de la microflora del suelo (Alcoba *et al.*, 2005). En condiciones de humedad y temperatura del suelo apropiada, los juveniles del segundo estadio escapan del huevo y se desplazan hasta encontrar un hospedero. Se introducen en la planta a través de los órganos subterráneos de la misma y se fijan en la raíz, cerca del periciclo, donde

inducen la formación de un sitio de alimentación (células gigantes), que se comportan como células transfers y a través de las cuales el nematodo se alimenta a expensas de la planta; mudan tres veces hasta llegar a adultos (Caampanelli, 2004)

En condiciones de sobrepoblación se incrementa la producción de machos respecto del número de hembras; en este caso, los machos son pequeños. *M. arenaria* pasa el invierno en forma de huevo, en el suelo o dentro de restos vegetales (Caampanelli, 2004). Las poblaciones que se reproducen en maní, se refieren a la raza 1, o raza maní; mientras que las poblaciones de la raza 2 no se reproducen en maní. Frecuentemente las poblaciones de la raza 2 no se reproducen en pimiento, y ninguna raza se reproduce en algodón o frutilla. De acuerdo con los hospederos diferenciales de *M. arenaria*, la raza 1 se reproduce en tabaco, pimiento, sandía, maní y tomate; mientras que la raza 2 se reproduce en tabaco, sandía y tomate (Caampanelli, 2004).

Signos y síntomas / Daños:

El daño está representado por las células gigantes y por las agallas que se forman por hiperplasia e hipertrofia de las células de la raíz, provocando una posterior necrosis, lo cual impide una normal absorción del agua y nutrientes por parte de la planta. Los síntomas más comunes que pueden verse en la parte aérea de los huéspedes son: clorosis, debilitamiento, enanismo, marchitamiento. Comienzan generalmente en plantas jóvenes (Barrios, 2008).

2.1.2.2 Morfología y desarrollo del *Meloidogyne* spp

- **Ciclo de vida- preparasítico**

El ciclo de vida comienza con un huevo que son depositados en una matriz gelatinosa que los mantiene juntos en masas o sacos de huevos. El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2,4, 8 o más células, hasta que se ve una larva completamente formada con un estilete, enrollada de la membrana del huevo. Este es el primer estadio larval; la primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil ver separada la cutícula del primer estadio, sobresaliendo más allá de la cabeza

del segundo estadio larval. Poco después, la larva emerge a través de un agujero hecho en un extremo del cascarón flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete (Taylor & Sasser, 1983).

- **Ciclo de vida parasítico**

- **Penetración de las raíces**

Las larvas en el segundo estadio larval infectivo generalmente penetran en la raíz justamente sobre la punta de la raíz. Se mueven principalmente entre las células no diferenciadas de la raíz y, finalmente, se colocan con sus cabezas en el cilindro central en desarrollo. Con sus estiletes perforan las paredes de las células e inyectan secreciones de sus glándulas esofágicas (Taylor & Sasser, 1983).

- **Desarrollo de estadios parasíticos**

Mientras se están formando las células gigantes y las agallas, aumenta el ancho de la larva. Las células del primordio genital se dividen y este se agranda haciéndose notoria dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho. Cerca de la parte posterior del cuerpo de la hembra, las seis glándulas rectales comienzan a agrandarse. A medida que el segundo estadio larval continúa alimentándose, el cuerpo adquiere forma de frasco y las gónadas se alargan (Taylor & Sasser, 1983).

Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. Justamente antes de la segunda muda, la gónada masculina se encuentra cerca del final posterior del cuerpo y el recto es visible. Después de la segunda y tercera muda, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y solo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se desarrolla dentro de la cutícula larval, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos (Taylor & Sasser, 1983).

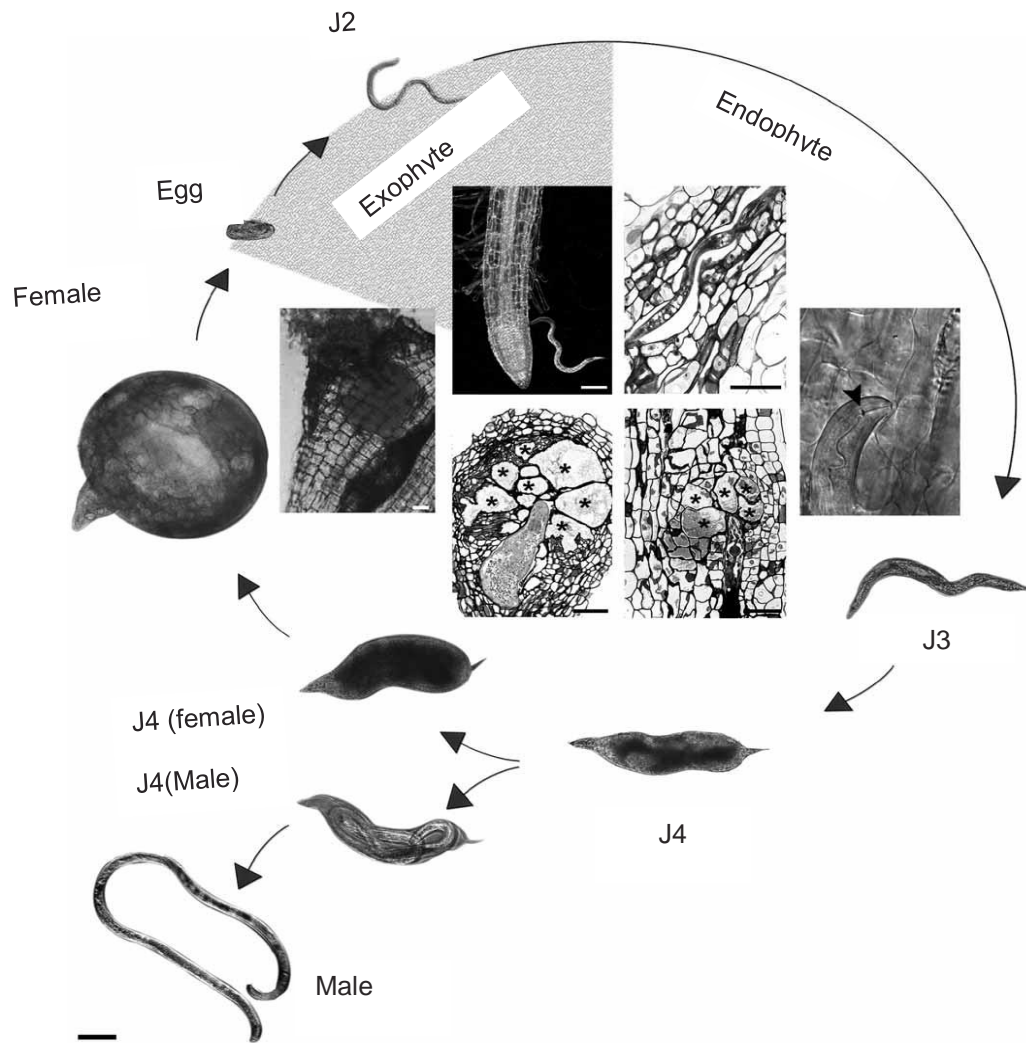


Figura 1 El ciclo de vida parasitaria de *Meloidogyne incognita*. Segundo estadio infeccioso juveniles (J2) penetran la raíz y migran entre las células para llegar al cilindro vascular de la planta. El estilete (flecha) conectado a la esófago se utiliza para perforar las paredes celulares, para liberar el esófago las secreciones y para tomar nutrientes. Cada J2 induce la diferenciación de células de raíz de cinco a siete en multinucleadas y alimentar las células hipertrofiadas (*). Estas células gigantes fuente de nutrientes para el nematodo (N). El nematodo se convierte en sedentario y con tres mudas (J3, J4, adultos). Ocasionalmente, los hombres desarrollaran y migran fuera de las raíces. Sin embargo, es se cree que no jueguen ningún papel en la reproducción. La hembra en forma de pera produce huevos que se liberan en la superficie de la raíz. Embriogénesis es el huevo es seguido por la primera muda, generación de juveniles de segundo estadio (J2). Barras de escala, 50 mm.

Una vez adultos, las hembras y los machos del nematodo *Meloidogyne* spp son fácilmente distinguibles. Los machos tienen forma de gusano y miden de 1,2 a 1,5 mm de largo y de 30 a 36 mm de diámetro. Las hembras tienen forma de pera midiendo de 0,4 a 1,3 mm de largo y de 0,27 a 0,75 mm de ancho. Cada hembra pone alrededor de 500 huevos en una sustancia gelatinosa. El ciclo de vida es completado en 4-6 semanas, dependiendo de la temperatura del suelo (Hussey, 1985).

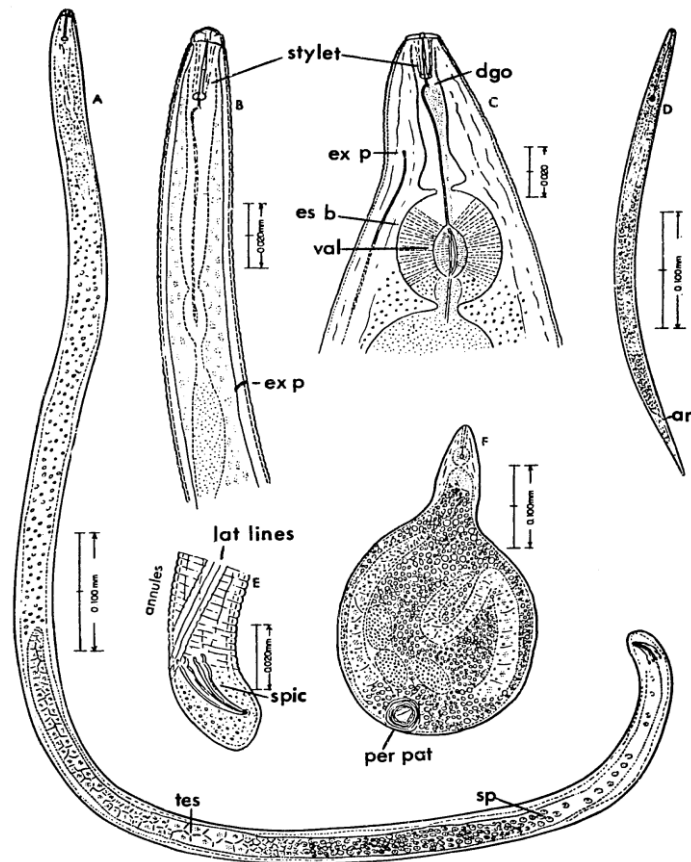


Figura 2 Anatomía de *Meloidogyne* spp. A: Macho longitud total, mostrando el estilete, testículo (les) esperma (sp) y espículas. B: Parte anterior del macho, mostrando el estilete, esófago y poro excretor (ex p). C: Parte anterior de la hembra, mostrando el estilete, el orificio de la glándula dorsal (dgo), poro excretor (ex p), bulbo esofágico (es b) y válvula (val). D: Larva mostrando el estilete, bulbo esofágico y ano (an). La cola es la porción del cuerpo posterior al ano. E: Parte posterior del macho, mostrando las líneas laterales (lat lines), anillos y espículas (spic). F: Hembra, mostrando el esófago, ovarios, y patrón perineal. Taylor, 1967.

2.1.2.3 Efecto de *Meloidogyne* spp, sobre el desarrollo de las plantas

Los nematodos de la agalla de la raíz dañan a las plantas porque desvitalizan las puntas de las raíces causando la formación de hinchamientos a lo largo de las raíces. Esos efectos no solo privan a la planta de nutrientes, sino que también desfiguran y reducen el valor de mercado de innumerables productos hortícolas. Cuando la infección de las plantas susceptibles tiene lugar en el estado de plántula, las pérdidas son especialmente importantes, llegando incluso a causar la completa destrucción de la cosecha. La infección de plantas maduras tiene efectos más suaves, aunque también puede llegar a reducir la producción considerablemente. Los síntomas de la planta son una reducción del crecimiento y del número de hojas, siendo estas más pequeñas y de color verde pálido o amarillas, y marchitamiento de la planta siendo éste más pronunciado en tiempo cálido (Hussey & Janssen, 2002).

2.1.2.4 Estrategia de manejos de nematodos

La rotación de cultivo es el método de control tradicionalmente más utilizado en la agricultura, reposo del suelo de 4-6 años. Los métodos físicos más usuales son la aplicación de calor húmedo o seco y la desecación. La termoterapia, inmersión en agua caliente (40-50°C) durante un tiempo corto (Chitwood, 2002).

- **Control químico:** Se incluyen dos grupos de nematicidas fumigantes y no fumigantes. Los fumigantes son productos químicos volátiles en los que se incluyen el bromuro de metilo el cual está prohibido su uso por ser dañino para los microorganismos beneficiosos del suelo y sobre la capa de ozono que provoca un efecto carcinógeno sobre los humanos. También se usan cloropicrina y metil-isocianato que son en realidad biocidas de amplio espectro que controlan nematodos, hongos y malas hierbas. Los productos no fumigantes son compuestos no volátiles que incluyen los carbomatos como el carbofuran y oxamilo, son más o menos solubles en aguas y están disponibles en formulación granulada (Céspedes, García, & Pérez, 2009).

- **Control biológico:** Se define en un sentido amplio como, la utilización de organismos vivos para la reducción del daño producido por una plaga o para la reducción en la severidad y/o incidencia de una enfermedad (Meyer, 2003) y abarca el fortalecimiento del control natural, la introducción de especies no nativas y el uso de plaguicidas derivados de animales, plantas, hongos, bacterias, virus y minerales (Cooping, 2001).

El suelo es un recurso natural dinámico en el que conviven millones de organismos vivos como artrópodos, anélidos, nematodos, algas, hongos y bacterias. Todos estos organismos realizan diversas funciones y participan en interacciones que permiten el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos en el suelo (Coleman , Crossely, & Hendrix , 2004). Entre estas funciones, algunos organismos compiten, inhiben, depredan o parasitan a los nematodos fitoparásitos y, por tanto, reducen sus densidades (Kerry, 2000).

Entre ellos, algunas bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, o *Pasteuria* (Walia , Sharma, & Vats, 2000) y especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Dactylella*, *Hirsutella*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pochonia* y *Verticillium* (Walia , Sharma, & Vats, 2000); Butt *et al.*, 2001; Eapen *et al.*, 2005; Singh y Mathur, 2010a), ejercen un efecto depresor directo sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos por lo que pueden ser considerados como agentes de “control biológico”.

Por otra parte, ciertos microorganismos rizosféricos pueden establecer una relación beneficiosa con la planta hospedadora del nematodo, que permite reducir los síntomas de la enfermedad causada por éstos, por lo que pueden ser considerados como agentes de "protección biológica", principalmente algunas rizobacterias (PGPR) (Wenke, Kai, & Piechulla, 2010), hongos endófitos (Sikora, Niere, & Dababat, 2008) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF) (Facelly & Smith, 2009).

2.1.3 Rizobacterias con actividad antagonista

Los productos metabólicos de aquellas bacterias que colonizan la rizósfera influyen tanto en el crecimiento vegetal como en los microorganismos que la habitan, entre ellos los nematodos (Siddiqui & Shaukat, 2003). Del total de rizobacterias que han sido identificadas, aproximadamente un 7-10% muestran potencial antagonista frente a nematodos mediante diversos mecanismos (Burkett- Cadena, Kokalis- Burelle, Lawrence, Van Santen, & Kloepper, 2008). No obstante, el potencial antagonista dentro de este grupo es probablemente mayor, ya que un 90% de ellas aún no han sido estudiadas o cultivadas. La planta, debido a las exudaciones vegetales, cambia la composición física y química del suelo en la rizósfera (Xu, 2000) pudiendo afectar la habilidad de las rizobacterias para colonizar esta zona (Ma, Zalec , & Glick, 2001).

Los mecanismos para inhibición de patógenos incluyen competición por ion férrico, difusión de productos volátiles (Siddiqui, 2006) y competición por el nicho ecológico (Duffy, 2001). Por otra parte, también debe ser tomado en cuenta como mecanismo implicado en la tolerancia al nematodo, los efectos estimulantes de la nutrición y de inducción de resistencia adquirida en planta, producidos por la inoculación de algunas rizobacterias (PGPR). Estos incluyen, fijación de nitrógeno, incremento en la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, liberación de fitohormonas o estimulación de los efectos beneficiosos de otros simbioses y producción de sideróforos y antibióticos (Siddiqui, 2006).

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, con propiedades antagonistas sobre varios patógenos. Son buenas secretoras de metabolitos, como el antibiótico oligomicina (Kim, Liem, Stewart, & Miller, 1999), fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg & Hallman, 2006).

Diversas rizobacterias del género *Pseudomonas* también muestran antagonismo frente a las poblaciones de nematodos fitoparásitos, a través de la producción de compuestos bacterianos con actividad nematocida como, sideróforos, ácido cianhídrico y

antibióticos (Berg & Hallman, 2006). Además, se ha comprobado que, en algunos casos, inducen resistencia en las plantas (Kloepper & Ryu, 2006). Esta actividad dual de los inóculos de *Pseudomonas* la presentan como una rizobacteria con gran potencial para la bioprotección y el biocontrol de nematodos fitopatógenos (Siddiqui & Shaukat, 2006).

Concretamente, *Pseudomonas putida* Trevisan es una bacteria de colonización rizosférica, que puede colonizar la rizósfera, la superficie de la raíz o incluso los espacios intercelulares superficiales (Andrews & Harris, 2000), y ha sido citada en la literatura como supresora de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp. (Akhtar & Siddiqui, 2009).

Desde hace varias décadas, se vienen desarrollando estudios sobre cómo y por qué estas PGPR son beneficiosas a las plantas. Se conoce que la estimulación se desarrolla a través de dos mecanismos fundamentales, uno directo y otro indirecto (Bashan & Holguín, 1998).

Estimulación directa: El metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento del vegetal. A través de este mecanismo se desarrollan procesos tales como:

Fijación de nitrógeno. Las leguminosas tienen la capacidad de establecer una asociación simbiótica con las bacterias de la familia Rhizobiaceae comúnmente conocidas como Rhizobius. Estas bacterias inducen en la planta la formación de estructuras especializadas, denominadas nódulos, en donde se alojan como simbioses intracelulares y fijan nitrógeno atmosférico que es utilizado por la planta (Bach & Díaz, 2009).

Por medio del manejo de los sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno (Rhizobium-leguminosa, Frankiacasuarina, Anabaena-Azolla) es posible contribuir al enriquecimiento de la fertilidad del suelo. Existen otras PGPR de vida libre capaces de reducir el nitrógeno atmosférico. Tal es el caso de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia*, entre otras. Todas ellas además, poseen otros

mecanismos tan o más importantes con los cuales aumentan la productividad de los cultivos (Bach & Díaz, 2009).

Producción de sustancias reguladoras del crecimiento. El desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o inhiben determinados procesos fisiológicos. Estas sustancias se denominan fitohormonas, que se definen como reguladores producidos por las plantas y que a bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de éstas. Dentro de las fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas se destacan las auxinas, las giberelinas y las citoquininas (Bach *et al.*, 2007). La respuesta a cada una de ellas está condicionada por factores externos e internos como la edad de la planta, el estadio fisiológico y las condiciones ambientales, entre otras. Los mecanismos aún no están muy definidos ya que no hay un modo único de acción para cada sustancia (Bach & Díaz, 2009).

Estimulación indirecta: La estimulación es indirecta cuando la bacteria es capaz de liberar una o varias sustancias o metabolitos que intervienen en procesos que mejoran el crecimiento vegetal (Bashan & Holguín, 1998). Los mecanismos fundamentales de estimulación indirecta se pueden resumir en los siguientes:

Producción de sustancias que movilizan nutrientes (ácidos orgánicos, enzimas, aminoácidos, entre otras). Estas sustancias son liberadas al medio y son capaces de movilizar elementos nutricionales como el hierro, el fósforo y el aluminio. Ejemplo de ello, lo constituyen las bacterias solubilizadoras de fósforo, las cuales a través de la secreción de ácidos orgánicos, solubilizan el fósforo mineral y mediante la acción hidrolítica de las enzimas fosfatasas, mineralizan el fósforo orgánico (Bashan & Holguín, 1998).

Producción de antibióticos. La capacidad de las PGPR de generar sustancias antibióticas pueden producir dos efectos antagónicos entre sí: Los procesos inhibitorios que retardan el desarrollo y elongación de las raíces y los que aumentan el crecimiento por inhibición de patógenos (Bashan & Holguín, 1998).

Producción de sideróforos. Los sideróforos son sustancias de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por el hierro. En condiciones de escasez de hierro, las bacterias productoras de estas sustancias, secuestran al elemento, convirtiéndolo en factor limitante para grupos de microorganismos patógenos hierro-dependiente (Bashan & Holguín, 1998).

Producción de sustancias que inducen la resistencia sistémica en algunas plantas. Las bacterias PGPR amplifican el mecanismo de la planta para la defensa frente a diferentes enfermedades, fundamentalmente en aquellas que la tienen latente o de expresión lenta (Bashan & Holguín, 1998).

Síntesis de sustancias con actividad para el control de patógenos. Síntesis de enzimas que hidrolizan la pared de algunos hongos que son patógenos y otras sustancias que controlan el desarrollo de plagas (Bashan & Holguín, 1998).

2.1.4 La presencia de rizobacterias en plantas

Los mecanismos sugeridos para lograr tal inhibición incluyen la producción de antibiótico (Hammer & Van Pee, 1997), la producción de compuestos quelantes del hierro (Coyler & Mount, 1984), producción de enzimas (Hammer & Van Pee, 1997) y competencia por sitios nutricionalmente favorables (o ricos en nutrientes) (Suslow & Schroth, 1982).

La aplicación de *Bacillus megaterium* se ha demostrado que produce varios metabolitos volátiles con actividad nematocida frente a *M. incognita* (Huang *et al.*, 2010) y, en experimentos en maceta, se han mostrado efectos reductores de la reproducción de *M. incognita* y del agallamiento sobre plantas de tomate (Siddiqui, 2006). La aplicación al suelo de *P. fluorescens* cepa CHAO produce pioverdines y SA e induce resistencia en tabaco contra el virus de la necrosis del tabaco (TNV) (Maurthofer, Hase, & Defago, 1994). La aplicación de PGPR provee resistencia sistémica hacia el virus del mosaico del pepino (CMV) en el cultivo de tomate (Zenhder, Klooper, & Yao, 2001).

Los antibióticos como *pioluteorina* (Plt), *pirrolnitrina* (Prn), *ácido fenazina-1-carboxílico* (PCA) y *2,4-diacetilfloroglucinol* (2,4-DAPG), son los principales controladores biológicos de hongos y bacterias. Por aislamientos directos y técnicas moleculares se ha demostrado que estos antibióticos son producidos en la rizósfera y desempeñan un rol en la supresión de patógenos de plantas en el suelo (Raaijmakers, Weller, & Thomashow, 1997).

CAPÍTULO III
MÉTODOLÓGICA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el campo universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo.

3.2 Tipo de investigación

Se utilizará el método experimental comparando información existente en la literatura y ensayos anteriores sobre agentes antagonistas, con los resultados que se esperan alcanzar en la identificación concreta de las bacterias eficaces hacia el nematodo *Meloidogyne* spp.

3.3 Material genético

Para realizar este experimento se utilizará la variedad FLORADADE de tomate caracterizada por ser plantas vigorosas con un ciclo vegetativo de 100 -110 días.

3.3.1 Características fenológicas y fenométricas

Tomate (Floradade)

- Ciclo vegetativo: 100-110 días
- Altura de planta: 70-90 cm
- Potencial de rendimiento: 4,5 kg/planta

3.4 Método de investigación

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

3.5 Fuentes de recopilación de información

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

3.6 Diseño de la investigación

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de las *P. fluorescens* hacia el nematodo *Meloidogyne spp*, generando 8 tratamientos de tres repeticiones cada uno con dos unidades experimentales. Poner el cuadro encerrar

Cuadro 1. Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	23
Tratamientos	7
Error	16

Las variables en estudio a evaluarse fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizó Stat Graphics para el correspondiente procesamiento estadístico.

3.6.1 Manejo del experimento

3.6.1.1 Aislamiento e identificación por morfología y molecular de *M. incognita*

Se recolectaron raíces de plantas de tomate infestadas con *Meloidogyne spp*. Las raíces fueron lavadas con agua estéril, se retiró el exceso de tierra y se recuperó 100 g de tejido radicular. Estas fueron licuadas con hipoclorito al 1 % por 1 min y reposo de 15 seg, proceso que se realizó en duplicado. El licuado se tamizó (en el orden 500, 90 y 25 μm), lavadas rápidamente con agua destilada, nematodos en estado (J4) se recuperó en el tamiz de 90 μm y fueron ubicados en un recipiente. Los huevos y nematodos J2 se

recuperaron en el tamiz de 25 μm . Se procedió a la evaluación de los caracteres morfológicos de *Meloidogyne* spp, bajo un microscopio óptico BX40. Para la descripción de los caracteres morfológicos se basó en lo indicado por Taylor & Sasser, (1983).

Se identificó por PCR mediante la extracción de ADNg, muestras de tejido radicular de tomate con síntomas de agallamiento. Se pulverizaron con nitrógeno líquido para la obtención del ADNg empleando el kit QIAGEN-Start Protocol (USA) (Anexo 1) como lo explica Cantuña, (2013). Se utilizó los primers Finc (5'CTCTGCCCAATGAGCTGTCC 3') y Rinc (5'CTCTGCCCTCACATTAAG 3') (Zijlstra *et al.*, 2000), con una amplificación de 1200 pb; el Inc-K14F (5'CCCGCTACACCCTCAACTTC 3') y Inc-K14R (5'GGGATGTGTAATGCTCCTG 3') (Randing & Carneiro, 2002), este partidor genera un producto de amplificación de 399 pb, correspondiente a *M. incognita*. Para el control se utilizó el ADNg de *R. similis* que se extrajo a partir de la maceración con un pistón estéril de tres nematodos en 50 μl de tampón TNE 2X. Se centrifugó a 10000 rpm durante 2 min y se recuperó el sobrenadante que fue utilizado directamente en la reacción de PCR (Bulman & Marshall, 1997).

El volumen final de cada reacción de PCR fue de 20 μl y contiene 4 μl Buffer (1X), 1.2 μl de MgCl_2 , 1 μl de DNTP's, 1 μl / cada primer, 0.2 μl de Taq pol, 1 μl de ADN, 10.6 μl de H_2O . La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 95 °C por 5 min, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de: 95 °C por 1 min a 58 °C por 1 min y 1 min a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y teñido con Bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) (Johanson, 1994).

3.6.1.2 Reproducción de *M. incognita* en condiciones de invernadero

En muestras de raíces con síntomas de agallamiento se seleccionaron huevos y J2 de *M. incognita* para su inoculación en plantas de tomate. Se generó un semillero con sustrato en proporción (2/1) de suelo franco arcilloso más turba (Novarbo seedling, black C1B).

A los 15 días se realizó el trasplante a macetas que contenían 3.3 kg del mismo sustrato. Se identificó morfológicamente a *M. incognita* y las plantas de tomate fueron inoculadas con 4000 nematodos J2 y huevos, para su reproducción en condiciones de invernadero a una temperatura de 28 °C durante dos meses para su reproducción.

3.6.1.3 Selección y crecimiento de las *Pseudomonas* spp

Las *Pseudomonas* fueron seleccionadas para los ensayos antagónicos por su producción de metabolitos secundarios. Las cepas *P. fluorescens* BO3-4, PM3-14 y *P. protegens* CHA0 producen proteasa, catalasa, HCN y Pirrolnitrina. La cepa *P. fluorescens* BMR2-12 produce catalasa y Pirrolnitrina. La cepa *P. fluorescens* BA4-19 produce proteasa y catalasa. La cepa *P. fluorescens* PM3-8 produce proteasa, HCN y catalasa. La cepa *P. veronii* R4 produce proteasa, catalasa y Pirrolnitrina (Chávez, 2016 y Guato, 2016).

Los aislados bacterianos se incubaron en el medio de cultivo King B líquido, (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agar, 15; agua destilada (pH 7.2)], a 28⁰C a 150 rpm/16 h. Se recuperó 96 µl del cultivo y se homogenizará en 2.3 ml de King B semi-sólido (agar 0.3 gr/ 100 ml) incubado por 16 h.

3.7 Instrumento de investigación

Estos fueron procedimientos experimentales, análisis de documentos y registro de datos.

3.8 Tratamientos evaluados

Para este tipo de investigación se establecieron 8 tratamientos y 3 repeticiones.

Cuadro 2 Tratamientos para la evaluación antagonista

Tratamientos

- T₁: *P. fluorescens* PM3-8.
- T₂: *P. fluorescens* PM3-14
- T₃: *P. fluorescens* BA4-19

- T₄: *P. fluorescens* BO3-4
- T₅: *P. fluorescens* BMR2-12
- T₆: *P. protegens* CHA0
- T₇: *P. fluorescens* R4
- T₈: Sin bacteria

3.8.1 Evaluación antagonista de *Pseudomonas* spp para eclosión de huevos y nematodos J2 de *M. incognita* *in vitro*

3.8.1.1 Inhibición para eclosión de huevos *M. incognita* (%)

Muestras de tejido radicular de tomates infectados con nematodos de la etapa de reproducción del enunciado (3.6.1.2). Las plantas con síntomas de agallamiento en sus raíces fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada en triplicado, para eliminar rastros de suelo. Con ayuda de palillos de madera (65 x 2 mm) estériles fueron seleccionadas masas de huevos de *M. incognita* del tejido radicular y ubicadas en un vidrio reloj que contenía H₂O estéril con 50 µl de cloranfenicol, verificando por caracteres morfológicos las masas de huevos con ayuda de un estereoscopio (10X).



Figura 3 Esquema general para la evaluación de eclosión de huevos

En la caja Petri con los inoculantes bacterianos antagonista (*P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* BM2-12 y las cepas controles *P. protegens* CHA0, y *P. veronii* R4) a partir del enunciado (3.6.1.3) fue inoculado una masa de huevo que engloba alrededor de 100 huevos e incubado a 27 °C (Figura 3), procediendo a la evaluación de una área 0.5 cm², teniendo un promedio de 50 huevos. La evaluación al número de huevos eclosionados se registró a los 4 y 6 días, empleando un microscopio óptico Olympus a (10x).

3.8.1.2 Evaluación de la mortalidad nematodos J2 (%)

Una masa de huevo de *M. incognita* se ubicó dentro de tubos eppendorf de PCR con 50 µl de agua estéril. A los 4 días se recuperó 5 µl de H₂O que contenía un promedio de 20 nematodos en estado J2 y ubicados en las *Pseudomonas* spp antes mencionados para la evaluación de mortalidad a las 8, 18 y 24 h. Posterior a los ensayos antagónicos estos nematodos fueron recuperados y re-suspendidos en agua estéril para verificar la movilidad, y confirmar su muerte (Figura 4).

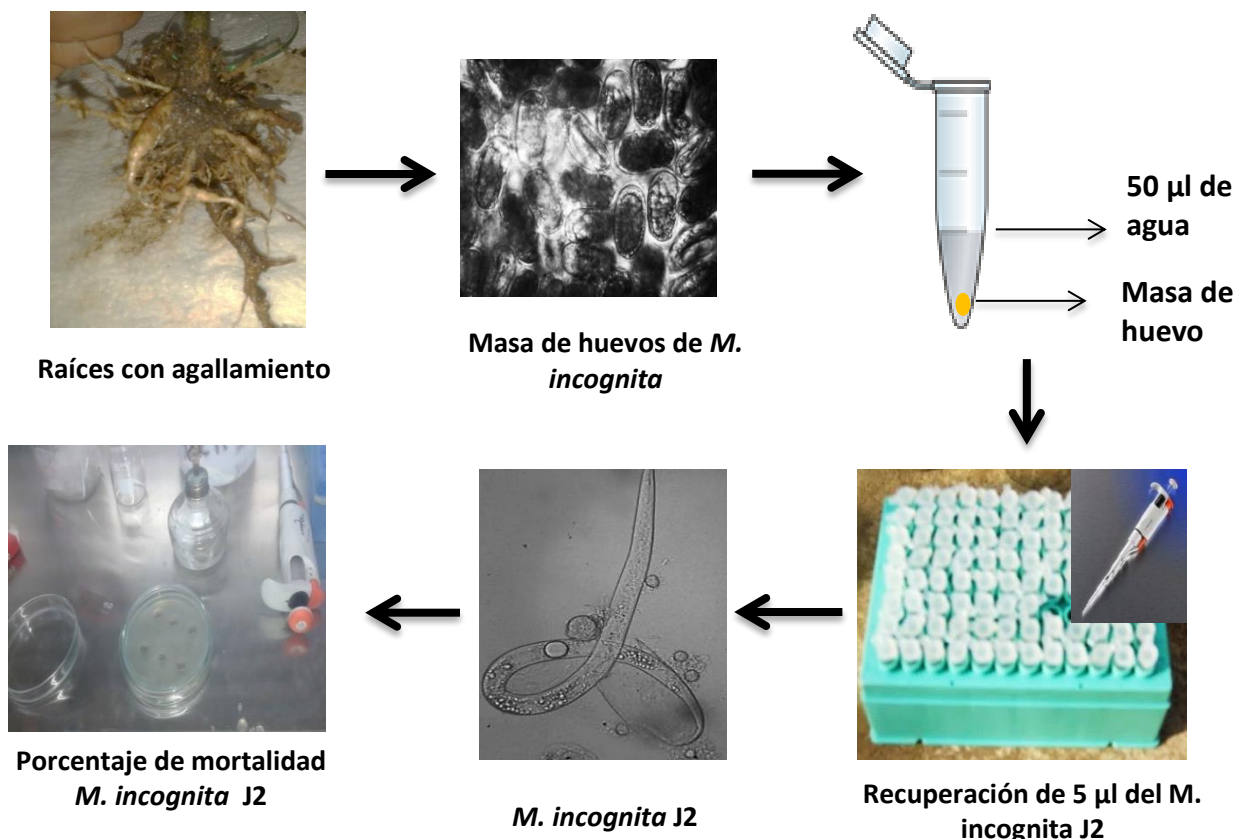


Figura 4 Esquema general para la evaluación de mortalidad de nematodos J2

3.8.2 Evaluación antagonista de *Pseudomonas* spp hacia *M. incognita* en plantas de tomate

Las bacterias fueron incubadas por 48 h, en el medio King B líquido. Se recuperó 100 ml del cultivo bacteriano, para ser centrifugado a 3000 g/15 min y lavadas dos veces con un mismo volumen de tampón fosfato salino (PBS) estéril (pH 6.5) y re-suspendidas en la misma solución, para su inoculación.

Se realizó el semillero con el sustrato en proporción (2/1) de suelo franco arcilloso más turba (Novarbo seedling, black C1B) y fue esterilizado. Las plantas de semilleros de 19 días, fueron recuperadas y sometidas a un proceso de lavado con hipoclorito al 1 % las raíces, se sumergió el tejido radicular en el tampón PBS con la bacteria por 10 min.

Las plantas fueron trasladadas a macetas con 3.3 kg de sustrato en proporción (2/1) de suelo franco arcilloso más turba (Novarbo seedling, black C1B), suelo que fue inoculado con una proporción de 1000 nematodos por maceta con 8 días de anticipación al trasplante de la planta (Figura 5).



Figura 5 Esquema general de inoculación de *Pseudomonas* en plantas de tomate e inoculación de nematodos en macetas.

Realizado el trasplante en el sustrato infectado con los nematodos también se inoculó 3 ml de la bacteria, lo que empezó con la evaluación de las siguientes variables:

3.8.2.1 Altura de planta (cm)

Se registró la altura de planta a los 20 y 30 días después del trasplante de tomate, utilizando un calibrador Vernier desde el tallo hasta la yema terminal.

3.8.2.2 Peso de raíces (g)

Se recuperó las raíces a los 32 días para su evaluación. Las raíces fueron pesadas en una balanza.

3.8.2.3 Número y peso de agallas (g)

Se contó el número de agallas desarrolladas en el sistema radicular. Las agallas fueron cortadas de la raíces y pesadas en la balanza. Las plantas de tomate sin inóculo de *Pseudomonas* sirvieron de control.

3.8.2.4 Población de *M. incognita* J2

Las agallas fueron licuadas y pasadas por los tamices de 500, 90 25 μm . Se recolectó las muestras del tamiz de 25 μm y se observaron los nematodos con la ayuda del microscopio Olympus BX10.

3.9 Recursos humanos y materiales

3.9.1 Material de laboratorio

- Tubos eppendorf 1,5 ml (1 paquetes)
- Tubos falcon 15 ml
- Tubos de PCR
- Guantes quirúrgicos
- Juego de micro-pipetas (4 unidades: 1000 ul, 200 ul, 20 ul, 5 ul)

- Puntas amarillas (200 ul) (1 paquetes)
- Puntas azules (1000 ul) (2 paquetes)
- Placas Petri desechables (100 unidades)
- Electroforesis
- Termociclador
- Tamiz (500,90,25 ul)
- Licuadora
- Tijera

3.9.2 Reactivos de laboratorio

- Agar (200 g)
- K₂P₀4 (500 g)
- KH₂PO₄ (500 g)
- MgSO₄ x 7H₂O (500 g)
- Peptona (1000 g)
- Papa Dextrosa Agar (PDA 400 g)
- Agarosa (50g)
- TRIS (20g)
- EDTA (20g)
- Alcohol 99 (20 L)

4

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Aislamiento e identificación por morfología y molecular de *M. incognita*

Se recuperó un promedio de 2000 especímenes de *M. incognita* en estados Juvenil 2 desde suelo cultivado con tomate, cuyas características morfológicas cumplieron con lo indicado por la Figura 1. Estos nematodos fueron empleados para la inoculación en las macetas de reproducción (Figura 6A). Después de 2 meses de cultivo se observó la presencia de una gran cantidad de agallamiento en las raíces con el nematodo en estado J2 (Figura 6B).

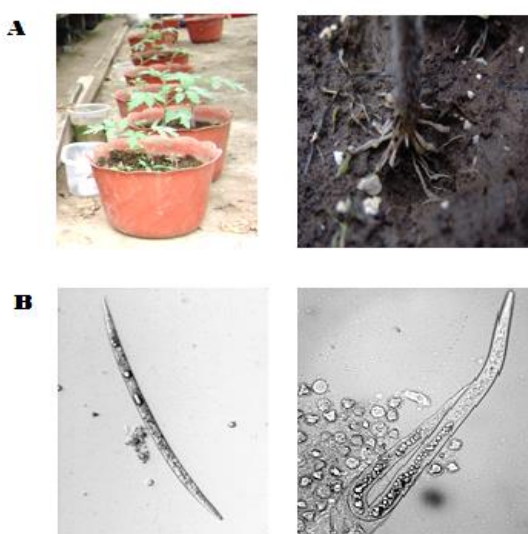


Figura 6 Reproducción en invernadero de *M. incognita*. A, Macetas de reproducción del nematodo. B, Nematodos en J2 recolectados de raíces de tomates con agallamiento de las macetas de reproducción.

De las macetas de reproducción fueron seleccionados huevos y 25 nematodos en diferentes estadios respectivamente. Los huevos y nematodos fueron identificados en base de sus características morfológicas: Los huevos se encuentran en una matriz gelatinosa que los mantiene juntos en masas (Figura 7A). El desarrollo del huevo comienza de 2 hasta 8 células, hasta que se vio una larva completamente formada y enrollada a la membrana y se observó movimiento (Figura 7B). Larva en estadio J2 que emergió del huevo dañando la membrana con su estilete (Figura 7C). Se observó el estilete del nematodo y en la parte inferior el ano que presenta una forma puntiaguda (Figura 7D y 7E). El segundo estadio larval parasítico (Figura 7F y 7G). La hembra

presento una forma de pera con una línea recta desde el ano hasta el estilete (Figura 7H).

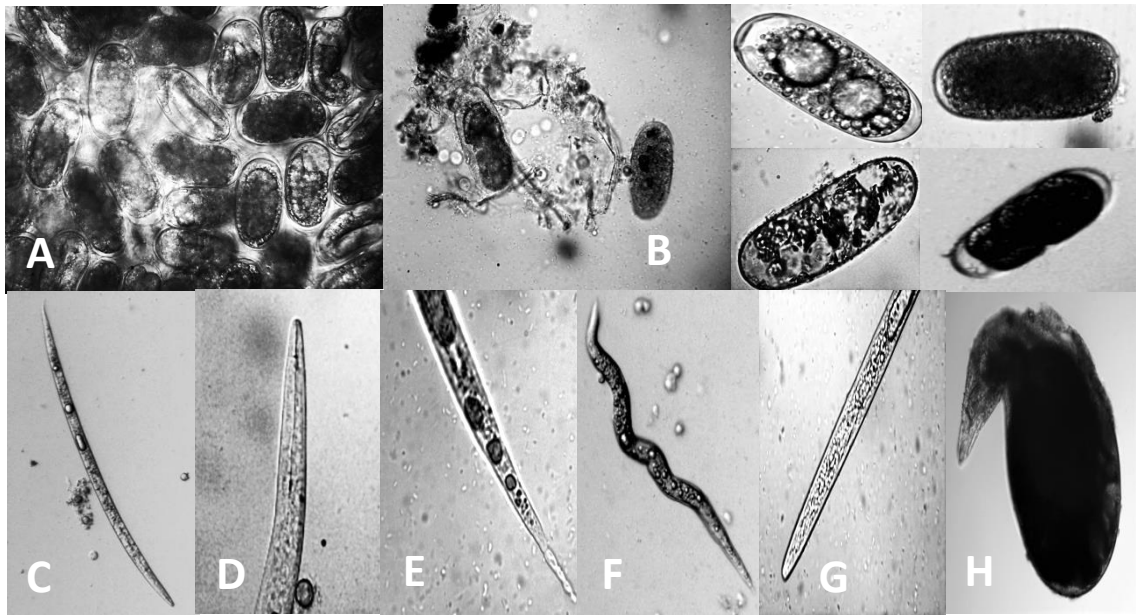


Figura 7 Etapas del desarrollo del *Meloidogyne incognita*

Se seleccionó una muestra de raíces con abundante agallamiento de las macetas de reproducción de *M. incognita* y se identificó por PCR por la amplificación del gen ARN ribosomal 5,8S. Se confirmó 3 muestras positivas para *M. incognita*, empleando las dos parejas de primer: Finc /Rinc y Inc-K14F/Inc-K14R obteniendo la amplificación esperada de 1200 pb y 399 pb, respectivamente. La especificidad de la reacción fue determinada al no observar productos de amplificación en el control *R. similis* (Figura 8).

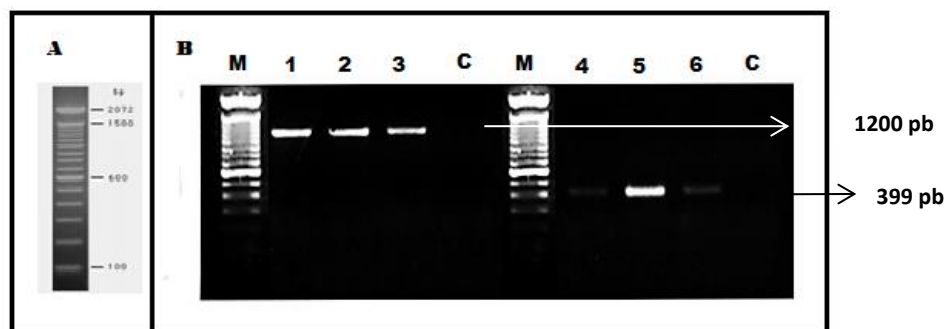


Figura 8 Amplificación del ARNr 5.8S mediante PCR de *M. incognita*. A, Lader 100 pb. B Carriles: M, marcador de peso molecular; 1,2 y 3, identificación de *M. incognita* con Finc/Rinc; 4,5 y 6, identificación de *M. incognita* con INC-K14F/INC-K14R; C control *R. similis*.

4.1.2 Evaluación antagonista de *Pseudomonas* spp para eclosión de huevos y nematodos J2 de *M. incognita in vitro*

4.1.2.1 Inhibición en eclosión de huevos (%)

En condiciones *in vitro* una observación para analizar el efecto de los aislados bacterianos de *Pseudomonas* que presentaron actividad antagonista: (*P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* BMR2-12 y las cepas control *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4) sobre la eclosión de huevos. Los ensayos antagónicos se realizaron al 4 % y evaluados a los 4 y 6 días (Grafico 1).

El mayor porcentaje de inhibición eclosión de huevos se verifico en la cepa *P. fluorescens* PM3-8 y las cepas control *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 con 100, 99.34 y 98 % mostrando mayor efecto antagónico. Las cepas *P. fluorescens* PM3-14 y BA4-19 con 93.67 y 83.67 % presentando un efecto antagonista hacia la eclosión de huevos de *M. incognita*. . Las cepas *P. fluorescens* BMR2-12 y BO3-4 generaron una eclosión de huevos ≤ 81 %. Sin la aplicación de *Pseudomonas* spp se verificó 8.67 % de inhibición de eclosión de huevos, para su evaluación a los 4 días.

La evaluación a los 6 días de inhibición eclosión de huevos se verificó las cepas control *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 y la cepa *P. fluorescens* PM3-8 con, 99.34, 96 y 94.34 % mostrando mayor efecto antagónico. Las cepas *P. fluorescens* PM3-14 y BA4-19 con 92.67 y 83.34 % mostrando un efecto antagonista a la eclosión de huevos de *M. incognita*. . Las cepas *P. fluorescens* BMR2-12 y BO3-4 generaron una eclosión de huevos ≤ 75 %. Sin la aplicación de *Pseudomonas* spp se verificó 1.67 % de inhibición de eclosión de huevos.

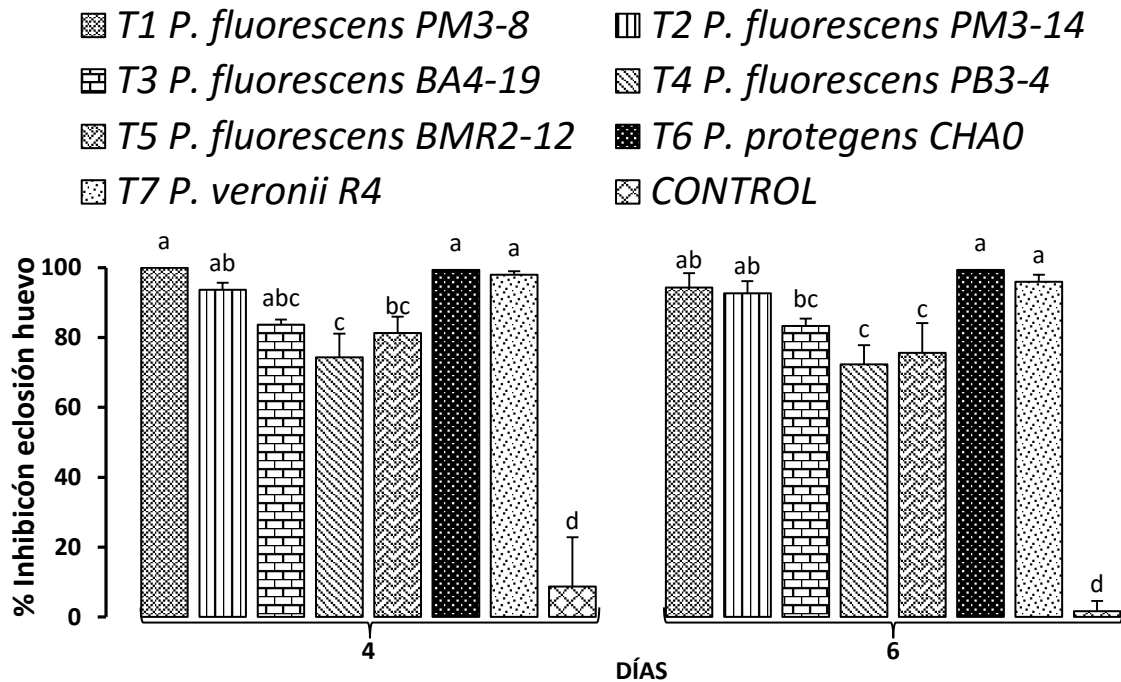


Grafico 1 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control durante 4 y 6 días. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.2.2 Mortalidad de nematodos J2 (%)

La mayor mortalidad de nematodos J2 se confirmó con las cepas controles *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 con 58.3 y 47.5 % de mortalidad J2 respectivamente. Las cepas *P. fluorescens* BA4-19, 3-14 y PM3-8 mostraron mortalidad de *M. incognita* con 25.8, 23.3, 21.6 %. A diferencia de las cepas *P. fluorescens* BO3-4 y BMR2-12 que generó mortalidad ≤ 13 %, sin aplicación de *Pseudomonas* spp no se observó mortalidad de *M. incognita*, para su evaluación a 8 h (Grafico 2).

La evaluación a 18 h, comprueba el efecto antagónico contra el nematodo J2 por *P. protegens* CHA0 con 75.8 %, mientras que la cepa *P. veronii* R4 presento un índice de 63.3 % de mortalidad. Las cepas nativas de *P. fluorescens* PM3-8, PM3-14 y BA4-19 con 58.3, 44.1 y 40.8 % en mortalidad del J2. A diferencia de las cepas *P. fluorescens* BO3-4 y BMR2-12 que generaron una mortalidad ≤ 20 %, sin la aplicación del aislado bacteriano presento un valor de 7.5 % de mortalidad de J2.

Los ensayos antagónicos a 24 h, por aplicación de *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 se verifica con 87.5 y 71.6 % de mortalidad del nematodo J2, respectivamente. Las cepas *P. fluorescens* PM3-8, PM3-14 y BA4-19 presentaron 65.8, 54.1 y 49.1 % de muerte del J2. A diferencia de las cepas BO3-4 y BMR2-12 que generaron mortalidad \leq 25 %. Sin la aplicación del aislado bacteriano se obtuvo un valor de 10 % mortalidad del *Meloidogyne* J2

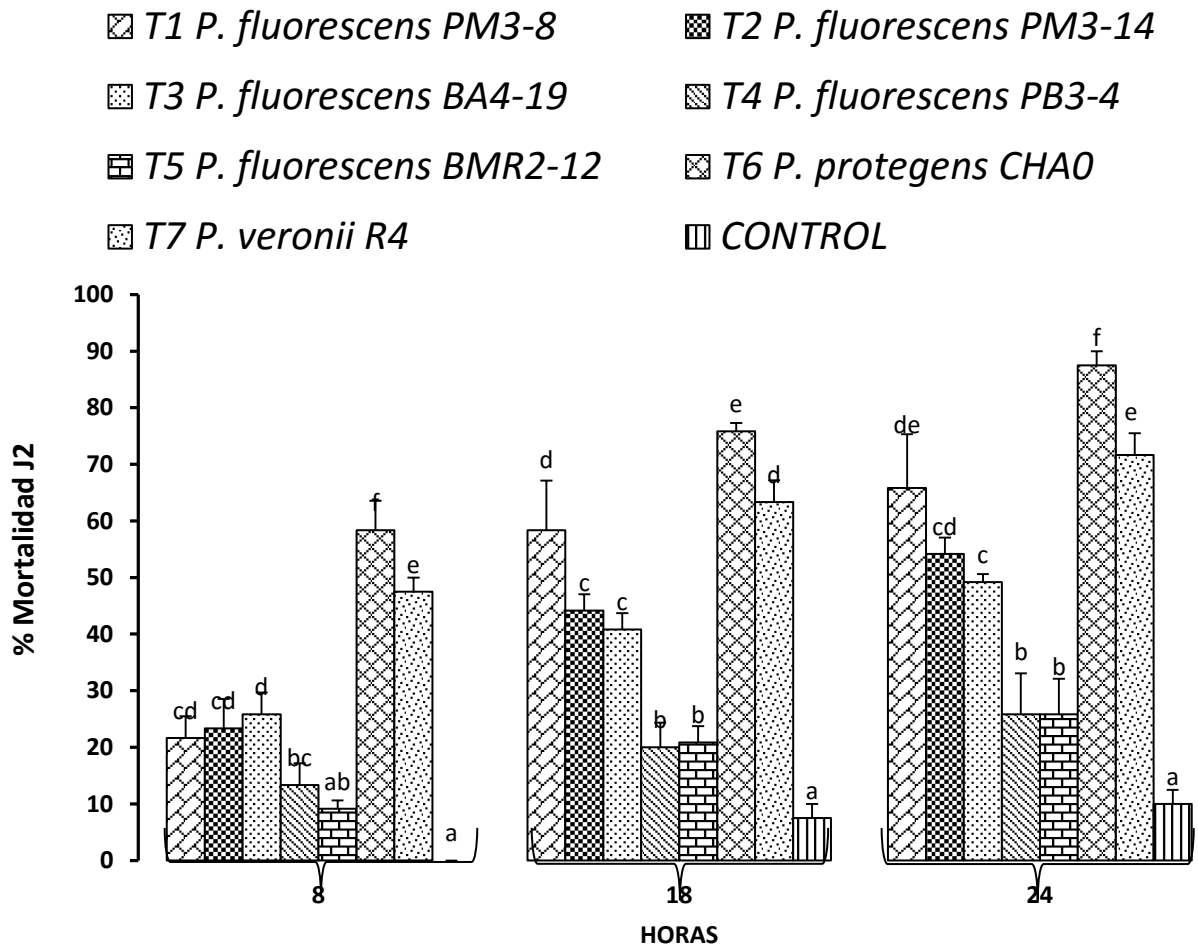


Grafico 2 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control durante 8, 18 y 24 h. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.3 Evaluación antagonista de *Pseudomonas* spp hacia *M. incognita* en plantas de tomate

4.1.3.1 Altura de planta (cm)

Se desarrolló un escrutinio para examinar el efecto de los aislados bacterianos que presentaron actividad antagonistas (*P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* BMR2-12 y las cepas control *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4) en el crecimiento de plantas de tomate inoculadas con *M. incognita* J2.

Las plantas de tomate que presentaron mayor crecimiento fueron con la cepa control *P. veronii* R4 con una altura de 32.4 cm. Las cepas *P. fluorescens* BMR2-12, BO3-4, y *P. protegens* CHA0 obtuvieron un crecimiento similar en las plantas con 31.5, 25,3 y 22.4 cm respectivamente. Las cepas *P. fluorescens* PM3-14, PM3-8 y BA4-19 mostraron un crecimiento de plantas ≤ 21 cm, sin la aplicación de los aislados bacterianos con un crecimiento de 26.5 cm, para su evaluación a los 20 días.

La evaluación a los 30 días, permitió comprobar que las plantas de tomate inoculadas con la cepa control *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* BMR2-12, mostraron mayor crecimiento con 57.1 y 52.6 cm indicando que estas tuvieron un mayor efecto antagónico contra el *M. incognita*. La cepa control *P. protegens* CHA0, *P. fluorescens* PM3-8 y PM3-14 presentaron actividad antagonista con una altura de planta ≥ 33.6 . A diferencia de las cepas *P. fluorescens* BO3-4 y BA4-19 que obtuvieron una altura de 33.1 y 23.2 mostrando menor efecto antagónico hacia los nematodos, sin la aplicación de los aislados bacterianos las plantas mostraron enanismo siendo la altura 29.3 cm por efecto de los nematodos (Grafico 3).

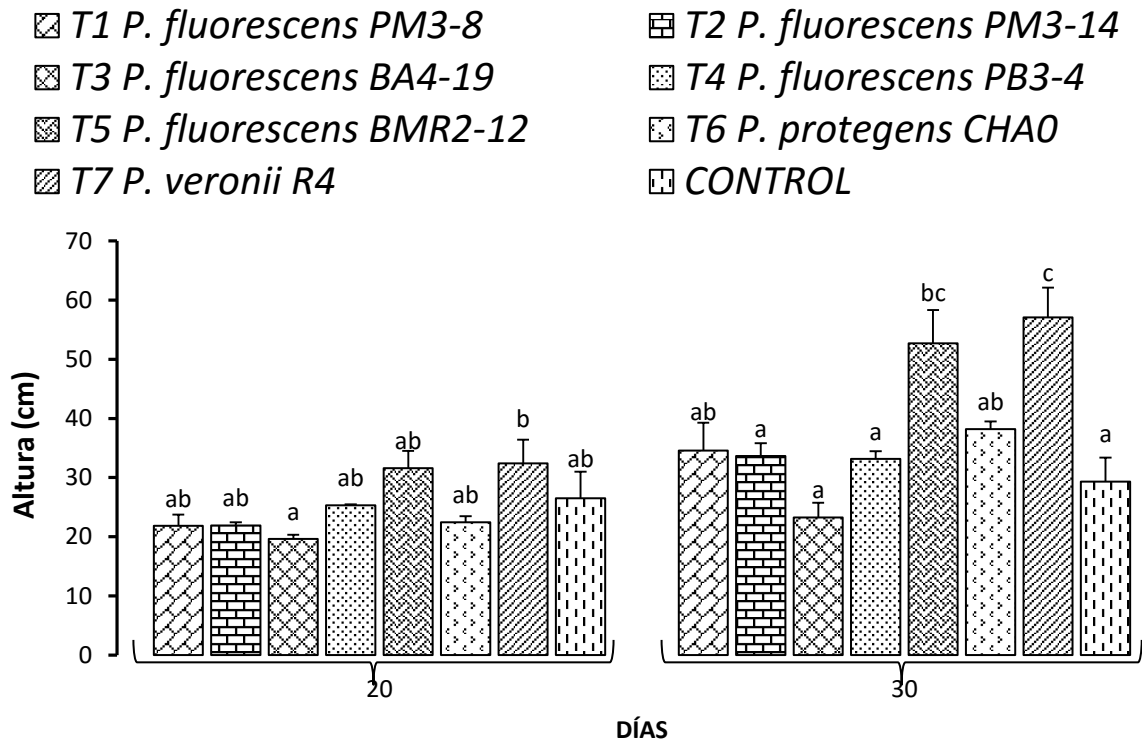


Grafico 3 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control durante 20 y 30 días. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.3.2 Peso radicular (g)

Se desarrolló un escrutinio para examinar el efecto de los aislados bacterianos que presentaron actividad antagonista sobre el peso radicular. Este ensayo se evaluó a los 32 días después del trasplante. El menor peso radicular se confirmó con las cepas *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* 3-14 con 1.83, 2.41 y 2.9 g de raíz. Las cepas *P. fluorescens* BA4-19, BO3-4, BMR2-12 y PM3-8 generaron un peso de raíz \geq 3 g, las que no recibieron aplicación de aislados bacterianos presentó 3.96 gr de peso radicular (Grafico 4).

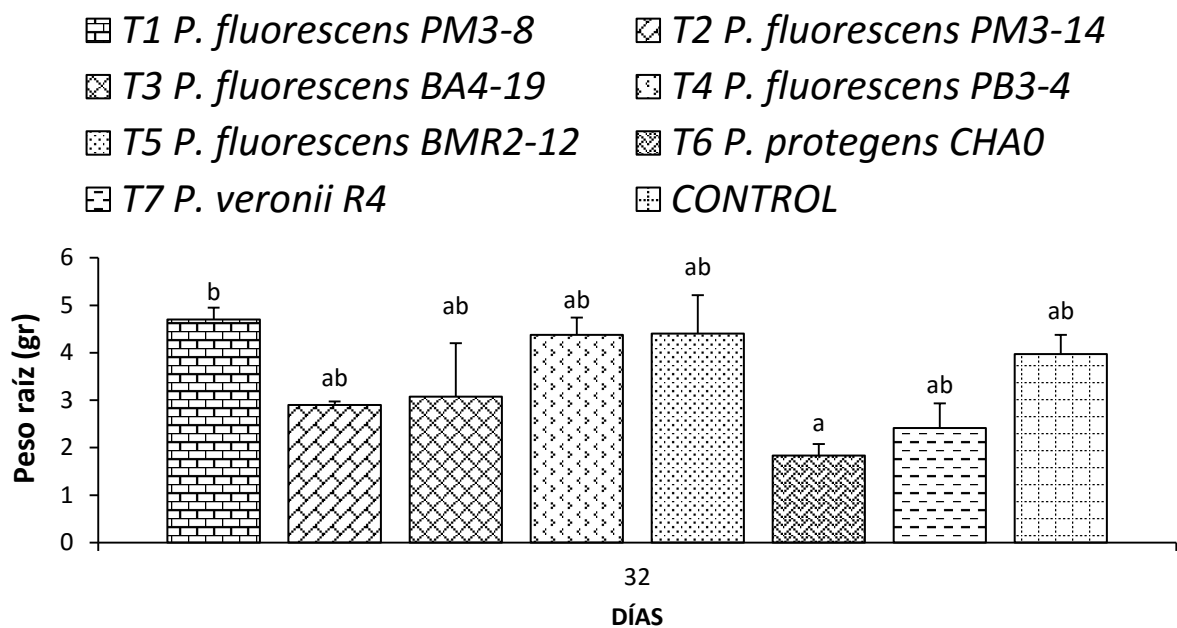


Grafico 4 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control a los 32 días. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.3.3 Numero de agallas

El menor número de agallas se observó con la cepa control *P. protegens* CHA0 con 59 agallas, mostrando un mayor efecto antagónico hacia el nematodo reduciendo la formación de agallas. Las cepas *P. veronii* R4, *P. fluorescens* BMR2-12 y PM3-14 con 299.6, 318.6 y 643, respectivamente mostraron un efecto antagónico similar hacia la formación de agallas. Las cepas *P. fluorescens* PM3-8, BO3-4, y BA4-19 generaron un agallamiento ≥ 1146 ejerciendo un menor efecto antagonista hacia el agallamiento de raíz. Sin aplicación de los aislados bacterianos se observó mayor número de agallamiento con 3098.6.

- ▨ T1 *P. fluorescens* PM3-8
- ▨ T2 *P. fluorescens* PM3-14
- ▨ T3 *P. fluorescens* BA4-19
- ▨ T4 *P. fluorescens* PB3-4
- ▨ T5 *P. fluorescens* BMR2-12
- ▨ T6 *P. protegens* CHA0
- ▨ T7 *P. veronii* R4
- ▨ CONTROL

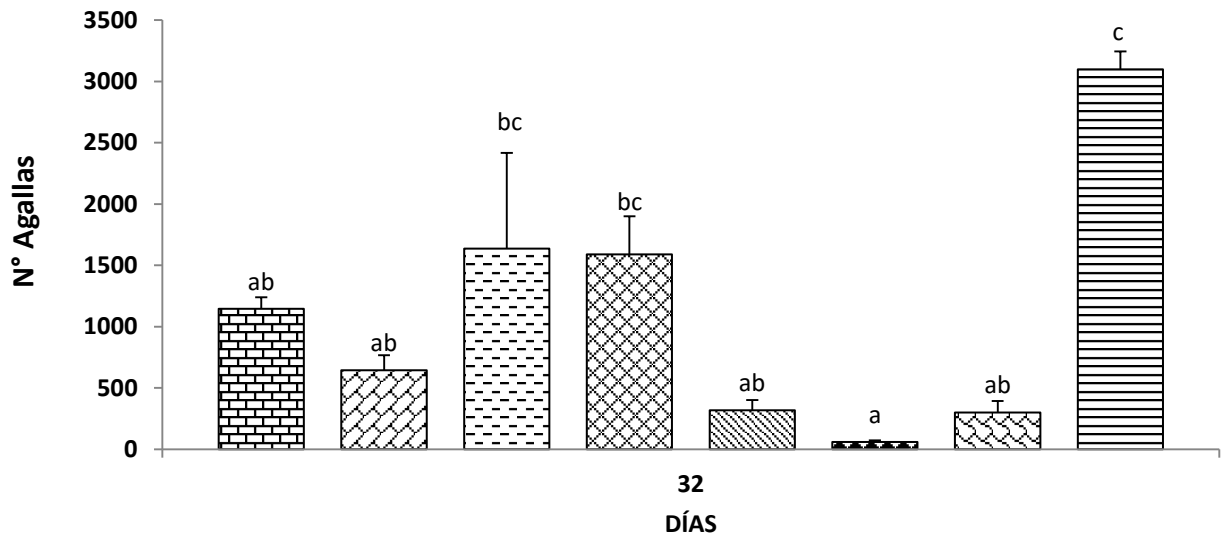


Grafico 5 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control a los 32 días. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.1.3.4 Peso de agallas (g)

Se verificó que la cepa control *P. protegens* CHA0 obtuvo un menor peso de agallas con 1.01 g, indicando un mayor efecto antagónico hacia el agallamiento causado por *M. incognita*. Las cepas *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* PM3-14 y BMR2-12 con 1.61, 2.23 y 2.32 gr de peso de agallas mostraron un efecto antagónico similar a la cepa *P. protegens* CHA0. A diferencia las cepas *P. fluorescens* BO3-4 y PM3-8 presentaron 2.66 y 3.17 g de agallamiento en las raíces. La cepa *P. fluorescens* BA4-19 obtuvo 1.61 g de agallas porque su crecimiento radicular fue poco no porque ejerció mayor efecto

antagónico que las demás cepas, sin la aplicación de los aislados bacterianos este mostro un peso de agallamiento de 2.23 gramos (Grafico 6 y Figura 9)

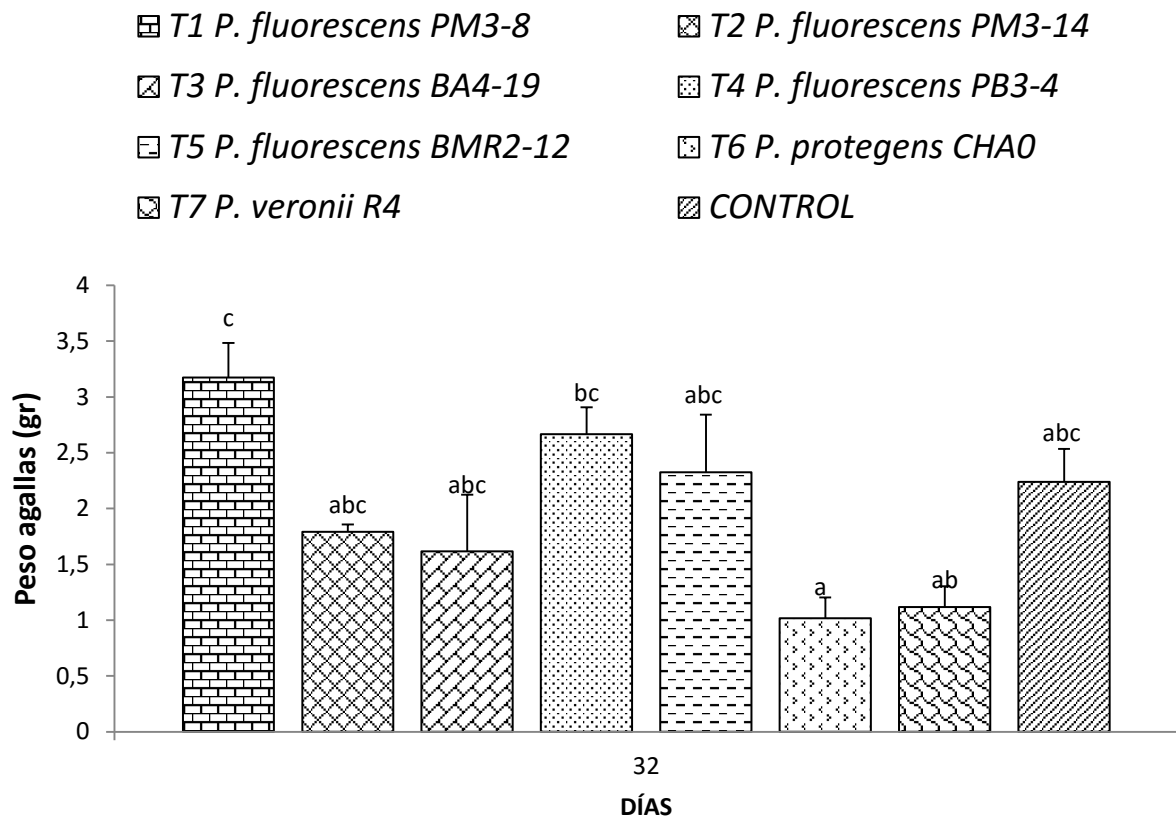


Grafico 6 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control a los 32 días. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

***P. fluorescens* PM3-8**



***P. fluorescens* PM3-14**



***P. fluorescens* BA4-19**



***P. fluorescens* BO3-4**



***P. fluorescens* BMR2-12**



***P. protegens* CHA0**



***P. veronii* R4**



CONTROL



Figura 9 Actividad antagonista de *Pseudomonas* spp hacia *M. incognita* en raíces de plantas de tomate

4.1.3.5 Población de J2

La población de *M. incognita* disminuye por aplicación de *P. protegens* CHA0 con 173.3 nematodos J2 con mayor efecto antagónico en el sistema radicular de las plantas de tomate. Las cepas *P. fluorescens* BMR2-12, PM3-14 y *P. veronii* R4 con poblaciones de 233.3, 453.3 y 500 nematodos en estado J2, respectivamente indicaron que tienen un efecto antagónico hacia los nematodos. Las cepas *P. fluorescens* PM3-8, BA4-19 y BO3-4 con ≥ 766 nematodos de *M. incognita* en estado J2 indicaron un menor efecto antagónico en el sistema radicular de las plantas. Sin la aplicación de los aislados bacterianos se observó una población de 1466.67 *M. incognita* J2.

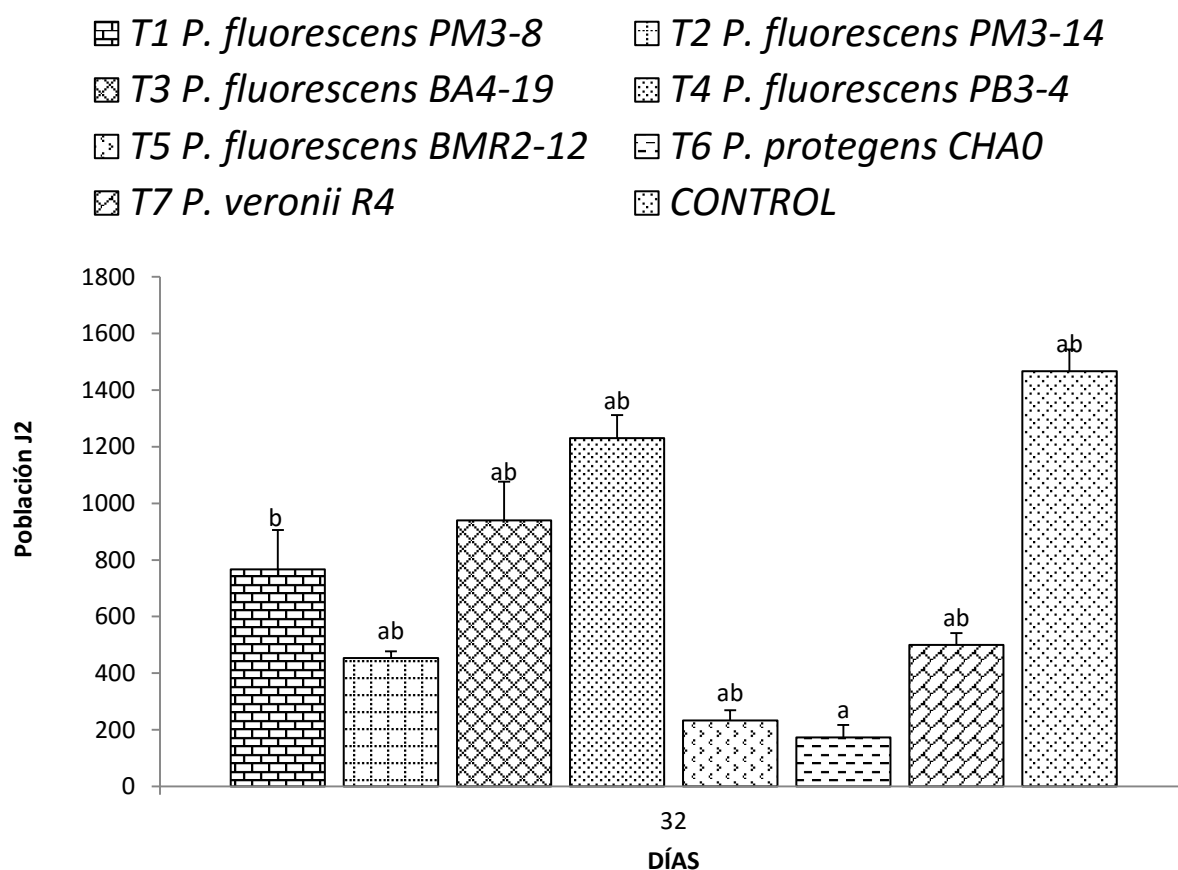


Grafico 7 Efecto de los aislados bacterianos PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, BMR2-12, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control a los 32 días. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.2 Discusión

4.2.1 Aislamiento e identificación por morfología y molecular de *M. incognita*

El interés a nivel mundial en la búsqueda de alternativas “sostenibles” para la protección vegetal se ha incrementado con las restricciones en el uso de los agroquímicos convencionales. Se han prohibido, además del bromuro de metilo, 1,3-dicloropropeno y cadusafos. El control de nematodos fitoparásitos plantea una problemática ambiental, por la escasez de opciones eficaces (Sikora *et al.*, 2007). Entre las alternativas propuestas, el control biológico presenta ventajas sobre los agroquímicos, las rizobacterias generan protección a especies vegetales hacia los nematodos fitoparásitos (Pandey y Maheshwari, 2006; Sikora *et al.*, 2007).

La plataforma de reproducción de *M. incognita* que se estableció en este proyecto de investigación, resultó ser eficiente logrando obtener una alta tasa de multiplicación de 400 nematodos en 100 g de suelo, a los dos meses. La temperatura del suelo se mantuvo entre 27 ± 2 °C. De acuerdo a Verdejo *et al.*, (2013) la reproducción de *M. incognita* bajo condiciones invernadero es funcional a temperaturas superiores a los 28 °C. Los nematodos en diferentes estadios fueron identificados para *M. incognita* por sus caracteres morfológicos: estilete, parte posterior del nematodo y la hembra en estado adulto mostró forma de pera (Figura 7), coincidiendo con Taylor & Sasser, (1983). Estos investigadores describen los caracteres morfológicos de nematodos en estadio J2 poseen en su parte posterior el ano en forma de punta y la hembra presenta una forma de pera con una línea recta desde el ano hasta el estilete. Así mismo Yongsan *et al.*, (2014) describen a las hembras *Meloidogyne* en forma de pera con un cuello largo saliente encajados en las agallas, el poro excretor se encuentra posterior a las perillas del estilete.

La identificación del nematodo *M. incognita* mediante la técnica de PCR obtuvo un producto de 1200 y 399 pb en concordancia con Yongsan *et al.*, (2014) cuando fue realizada la prueba de ADN de *M. incognita* con los partidores Finc /Rinc y Inc-K14F/Inc-K14R, obtuvo una amplificación de 1200 pb y 399 pb respectivamente.

Así mismo Zijlstra *et al.*, (2000) y Randing *et al.*, (2002) indican que con las muestras de ADN obtenidas de las hembras adultas produjeron amplicones de 1200 y 399 pb.

4.2.2 Evaluación antagonista de *Pseudomonas* spp para eclosión de huevos y nematodos J2 de *M. incognita* in vitro

4.2.2.1 Eclosión de huevos

En este ensayo se probaron siete cepas de *Pseudomonas* para determinar su efecto antagonico hacia la eclosión de huevos *M. incognita* in vitro. Entre los siete aislados bacterianos examinados, *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* PM3-8 obtuvieron el mayor porcentaje de inhibición de eclosión de huevos. La rizobacteria endémica de cultivos de Musáceas *P. fluorescens* PM3-8, produce proteasa y HCN, metabolitos secundarios responsables a la inhibición de eclosión de huevos. La cepa control *P. veronii* R4 produce proteasa que tiene actividad nematocida a *Xiphinema index* (Montes et al., 2016). La proteasa es una enzima que degrada la pared celular al patógeno. Estas enzimas hidrolíticas actúan como factores biocontroladores (Elad, Chet, & Katan, 1982)

Con la aplicación de *P. protegens* CHA0 la inhibición de eclosión de huevos fue de 99.34 % a los seis días por efecto de la producción de metabolitos secundarios. Siddiqui & Shahid, (2003) menciona que en las pruebas de eclosión, encontró el mayor efecto antagonico 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. 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 (Sherif, Ali, & Barakat, 1999).

4.2.2.2 Mortalidad de nematodos

En este ensayo se encontró mortalidad de *M. incognita* con las diferentes cepas estudiados en condiciones in vitro. La cepa *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P.*

fluorescens PM3-8 obtuvieron mayor porcentaje de mortalidad del J2 con 87.5, 71.6 y 65.8 % a las 48 h. Siddiqui & Shahid, (2003) en las evaluaciones de mortalidad *M. javanica* J2 obtuvieron mayor efecto antagónico con la cepa *P. protegens* CHA0 con 55 % a las 48 h por la producción del antibiótico 2,4-DAPG, coincidiendo con Hamid et al., (2003) que reportaron mayor mortalidad de J2 de *M. javanica* con la *P. protegens* CHA0 verificando 63 %, siendo más eficaz en la supresión de nematodos por la producción de los antibióticos 2,4-DAPG, HCN y pioluteorina.

La producción de HCN por *P. protegens* CHA0 en *M. incognita* provoca la desintegración del nematodo ejerciendo mayor inhibición y efecto nematocida. La cianogenesis es mayor durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria del microorganismo (Knowles & Bunch, 1986). Gallagher y Manoil (2001) evidenciaron que HCN es tóxico y es producido por *P. aeruginosa* cepa PAO1 que es responsable de matar al nematodo del suelo *Caenorhabditis elegans*. Inhibe el citocromo oxidasa de la célula, aunque otras metaloenzimas también son sensibles al veneno (Solomonson, 1981). El cianuro inhibe la respiración mitocondrial del nematodo causando parálisis y muerte rápidamente (Cunningham, Pitt, & Williams, 1997).

4.2.3 Evaluación antagonista de *Pseudomonas* spp hacia *M. incognita* en plantas de tomate

Las plantas de tomate en invernadero evidenciaron presencia de clorosis y nodulaciones en las raíces, está provocada por infestación del nematodo *M. incognita*, el cual es responsable de la formación de nódulos en la raíz e interfiere en la absorción de agua y nutrientes.

4.2.3.1 Altura de plantas (cm)

De los siete aislados bacterianos examinados, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* BMR2-12 presentaron plantas de tomate con mayor altura con valores de 57.1, 52.6 cm respectivamente. Siddiqui et al., (2009) en los ensayos con la aplicación de *Pseudomonas fluorescens* Pf5 obtuvo mayor crecimiento de plantas con 63.7 cm a los 40 días por la producción de fitohormonas que ayudan al crecimiento de la planta.

Siddiqui & Shaukat, (2004) reportaron que por aplicación de *P. protegens* CHA0 obtuvieron plantas con 14.3 cm de altura en tomate a los 42 días.

La aplicación de las rizobacterias endémicas de Musa, *P. fluorescens* BMR2-12 incrementa en el desarrollo morfológico de la planta. Las PGPR forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la rizósfera, que favorecen al crecimiento y desarrollo de las plantas (Weller & Cooke, 1983). Por aplicación de CHA0 se estimula el desarrollo de planta a diferencia del control, lo que atribuye también a la producción de 2,4-DAPG en la rizósfera de plantas de tomate con un impacto en el crecimiento de la planta. La aplicación de este tipo de *Pseudomonas* en diversos cultivos ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento de las plantas, observándose un incremento en la emergencia y vigor (Kloepper *et al.*, 1999).

4.2.3.2 Peso radicular

Las cepas *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* 3-14 provocaron el menor daño de tejido radicular con peso de raíz de 1.83, 2.41 y 2.9 g, respectivamente observando un mayor efecto antagónico al control de *M. incognita*. Siddiqui & Shaukat, (2004) obtuvieron 1.4 g de peso radicular con la cepa *P. protegens* CHA0 a los 42 días de su evaluación (Duffy & Défago, 1997). Abo-Elyousr *et al.*, (2010) obtuvo 1.5 g de raíz por aplicación de *Pseudomonas fluorescens* mostrando un mayor crecimiento radicular con poca presencia de agallamiento. Siddiqui *et al.*, (2009) por aplicación *P. fluorescens* Pf5 obtuvo un peso del sistema radicular de 2.1 g rizobacteria capaz de sintetizar ácido indol-acético (IAA). La capacidad de promoción de crecimiento radicular a la planta por las *Pseudomonas fluorescens* es por la buena colonización y producción de fitohormonas (Weller, 1988).

4.2.3.3 Número y peso de agallas

En las condiciones de los presentes experimentos es evidente que las cepas *P. protegens* CHA0 *P. veronii* R4, *P. fluorescens* BMR2-12 y *P. fluorescens* PM3-14, presentaron menor número con 59, 299.6, 318.6 y 643 agallas en su orden. Estas cepas producen proteasa, catalasa, HCN y PLT. Corroborando con los resultados obtenidos por Abo-

Elyousr *et al.*, (2010) con aplicación de *P. fluorescens* que fueron efectivas y redujeron en un 49 % el agallamiento en la raíz causado por *M. incognita*. Siddiqui *et al.*, (2009) obtuvieron un promedio de 42 agallas con *P. fluorescens* Pf5 de mayor efecto antagónico hacia *M. incognita* por la producción del HCN y ácido indol-acético (IAA). El HCN producido por *Pseudomonas fluorescens* juega un papel central para disuadir al nematodo, de hecho el HCN es un potente inhibidor de vías respiratorias y causa muerte paralítica de nematodos (Gallagher & Manoil, 2001).

La respuesta antagónica de *Pseudomonas protegens* CHA0 hacia *M. incognita* también se le atribuye a la producción de PLT. Se verificó que PLT causó la mayor toxicidad para *C. elegans* (Neidig *et al.*, 2011). La pirrolnitrina es un antibiótico con una acción inhibidora contra un amplio espectro de organismos patogénicos, útiles para suprimir el desarrollo de tales organismos y es capaz de interrumpir la fosforilación oxidativa y de inhibir la cadena transportadora de electrones (Baehler *et al.*, 2005).

4.2.3.4 Población del J2

Las cepas *P. protegens* CHA0, *P. fluorescens* BMR2-12, PM3-14 y *P. veronii* R4 con poblaciones de 173.3, 233.3, 453.3 y 500, en su orden presentaron menor cantidad de *M. incognita* teniendo un mayor efecto antagónico. Siddiqui *et al.*, (2009) obtuvo 134 nematodos J2 en su evaluación a los 42 días con la aplicación de *Pseudomonas fluorescens* Pf5 causando un efecto nematocida por la producción de HCN. Timper *et al.*, (2009) en la evaluación a las tres semanas presentó una población de 76.8 *M. incognita* en estadio J2 con la cepa *P. fluorescens* Wood 1R mostrando una supresión al nematodo por la producción del 2,4- DAPG. (Siddiqui, 2006).

Las *P. fluorescens* que habita en las raíces producen exudados que afectan al nematodo *X. index*, que es determinado por muchos factores, incluyendo el tipo de exudado, el efecto directo letal de una cierta concentración (Aballay, Martensson, & Persson, 2011). La producción de metabolitos por bacterias de la rizósfera causa lysis en huevos de nematodos y afecta la vitalidad de nematodos J2 en el sistema radicular Becker *et al.*, (1988) reportaron que las proteasas extracelulares son otra clase de compuestos que funcionan como nematocida hacia los nematodos agalladores (Siddiqui *et al.*, 2005).

Neidig *et al.*, (2011) mostraron que en la desactivación de la producción de la proteasa alcalina AprA resulta con una reducida toxicidad ocasionada por *P. protegens* CHA0 contra *C. elegans*.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El nematodo *M. incognita* tiene los huevos en una matriz gelatinosa. En estadio larval posee en su parte posterior el ano en forma de punta y la hembra una forma de pera con una línea recta desde el ano hasta el estilete.
- La amplificación del gen ARN ribosomal 5.8 s de *M. incognita* obtuvo un producto de amplificación de 1200 y 399 pb.
- La actividad antagónica de las cepas *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 y la cepa *P. fluorescens* PM3-8 ejercieron mayor inhibición en eclosión de huevos con valores de 99.34, 96 y 94.34 %, respectivamente.
- Los aislados bacterianos de las cepas *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4, *P. fluorescens* PM3-8 ejercieron mayor actividad antagónica hacia mortalidad del *M. incognita* J2 con 87.5, 71.6 y 65.8 %, en su orden.
- Los aislados bacterianos de las cepas *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* BMR2-12 presentaron un mayor crecimiento en plantas de tomate con 57.1 y 52.6 cm, respectivamente.
- El menor peso radicular se confirmó con las cepas *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* 3-14 con 1.83, 2.41 y 2.9 g de raíz en su orden.
- La actividad antagónica de las cepas *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4, *P. fluorescens* BMR2-12 y PM3-14, mostraron un mayor efecto antagónico hacia el nematodo reduciendo la formación de agallamiento con 59, 299.6, 318.6 y 643 agallas, respectivamente.
- Los aislados bacterianos de las cepas *P. protegens* CHA0, *P. fluorescens* BMR2-12, PM3-14 y *P. veronii* R4, presentaron mayor efecto antagónico en el sistema radicular de las plantas de tomate verificando menor población de nematodos con 173.3, 233.3, 453.3 y 500 de *M. incognita* estadio J2, respectivamente.

5.2 Recomendaciones

- Verificar el efecto antagónico de la aplicación en conjunto de más de una rizobacterias sobre la eclosión de huevos e inhibición de población de *M. incognita* en in vivo
- Verificar la aplicación de combinación de *Pseudomonas* spp micorrizas, para determinar si hay mayor efecto antagónico hacia microorganismos patogénicos.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1 Bibliografía

- Aballay, E., Martensson, A., & Persson, P. (2011). Screening of rizhosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants. *Springer*, 347, 313-325.
- Abo-Elyousr, K., Khan, Z., Morsi, M., & Abedel, M. (2010). Evaluation of plant extracts and *Pseudomonas* spp for control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on Tomato. *Nematropica*, 40, 289-299.
- AGRIPAC. (2015). Producción de tomate bajo invernadero. Boletín N° 67. 23 p.
- Akhtar, M., & Siddiqui, Z. (2009). Use of plant growth-promoting rhizobacteria for the biocontrol of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L). *Journal of General Plant Pathology* , 74(1), 53-60.
- Alcoba, N., Bejarano, M., & Catacata, J. (2005). Enfermedades de los cultivos. San Salvador: Universidad Nacional Jujuy. 74p.
- Andrews, J., & Harris , R. (2000). The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 145-180.
- Baehler, E., Bottiglieri, M., Pechy, T., & Kell, C. (2005). Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 . *Journal Appl Microbiology*, 99, 24-38.
- Barrios, G. (2008). *ECURED*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de https://www.ecured.cu/Meloidogyne_javanica
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications biocontrol-PGPB . *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1225-1228.
- Becker , J., Zavaleta, S., Colbert , M., Schroth, A., & Weinhold, J. (1988). Effect of Rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology*, 78, 1466-1469.

- Bent, E., Loffredo, A., McKenry, M., Becker, J. O., & Borneman, J. (2008). Detection and investigation of soil biological activity against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 40, 109-118.
- Berg, G., & Hallman, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. *Soil biology*, 53-69.
- Bhattarai, K., Mantelin, S., Xie, Q., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. (2008). Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires intact jasmonic acid signaling pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 21, 1205-1214.
- Bird, D. & Kaloshian, I. (2003). Are roots special nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 115-123.
- Bulman, S., & Marshall, J. (1997). Differentiation of Australian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Crop and Horticultural Science*, 25, 123-129.
- Burkett-Cadena, M., Kokalis-Burelle, N., Lawrence, K., van Santen, E., & Kloepper, J. (2008). Suppressive of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control*, 47, 55-59.
- Caampanelli, R. (2004). Guía práctica hortícola . Mosaico. 54 p.
- Calleja, R. (2016). *El tomate Terapéutico*. Obtenido de www.infoagro.com/noticias/2009/3/5562.
- Cantuña, N. (2013). Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR. *Microbiology*, 4, 9.
- Céspedes, J., García, M., & Pérez, J. (2009). Caracterización de la explotación hortícola protegida almeriense. España: FIAPA. 174 p.
- Chagueza, Y. (2011). Alternativas biológicas para el control de nematodos fitoparásitos en cultivo del plátano. Colombia: Universidad Nacional de Colombia .121 p.
- Chitwood, D. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 221-249.

- Coleman , D., Crossely, D., & Hendrix , P. (2004). *Fundamentals of Soil Ecology* (Segunda ed.). USA: Academic Press. Segunda Edición. 408 p.
- Cooping, L. (2001). *The Biopesticide Manual*. USA: British Crop Protection Council Alton . 510 p.
- Coyler, R., & Mount, M. (1984). Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvested soft root diseases. *Plant Disease*. 26, 356-359.
- Cruz, G., Hernández, C., Gallegos, G., Rodríguez , R., Aguilar , C., Padrón, E., y otros. (2006). *Bacillus* spp como biocontrol en suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum*). *Revistas Cientificas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 11.
- Cunningham, L., Pitt, M., & Williams, H. (1997). The cioAB genes from *Pseudomonas aereginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome bd quinol oxidases. *Molecular Microbiology*, 24, 579-591.
- Davies, P. (1987). *The plant hormones: Their Nature, occurrence, and functions*. Martinus-Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1-11.
- Duffy, B. (2001). Competition. *Journal Wiley and Sons*, 43, 243-244.
- Duffy, B., & Défago, G. (1997). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87, 1250-1257.
- Ehwaeti, M., Phillip, S., & Trudgill, D. (1998). Dynamics of damage to tomato by *Meloidogyne incognita*. *Appl. Nematology*, 21, 627-635.
- Eisenback, J., Hirschmann, H., & Sasser, J. (1983). Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies) con una clave pictórica. *International Meloidogyne Project*, 23, 48-55.
- Elad, Y., Chet, I., & Katan, J. (1982). Degradation of plant pathogenic fungus by *Trichoderma harzianum*. *Journal of microbiology*, 28, 719-725.

- Espárrago, R., & Navas, A. (1995). Nematofauna fitoparásita asociada a cultivo hortícolas y tabaco en regadíos de Extremadura. *Bol. San. Veg. Plagas*, 21, 303-317.
- Esquinas, J., & Nuez, V. (1995). El cultivo de tomate. En *Anatomía y fisiología de la planta* (pág. 793). Mundi-Prensa.
- Facelly, E., & Smith, F. (2009). Mycorrhizal symbiosis - overview and new insights into roles of arbuscular mycorrhizas in agro and natural ecosystems. *Australian Plant Pathology*, 38, 338-344.
- FAO. (2014). Cultivo de tomate. Obtenido de www.fao.org.
- Gallagher, L., & Manoil, C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology*, 183, 6207-6214.
- Gaur, H., Beane, J., & Perry, R. (2000). The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root-knot nematode, *Meloidogyne triticoryzae*. *Nematology*, 2, 191-199.
- Giaconi, M., & Escaff, G. (2004). Cultivo de tomate. En *Cultivo de hortalizas* (Quinceava ed., pág. 337). Chile: Universitaria.
- Hamdan, H., Weller, D., & Thomashow, L. (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, 3270-3277.
- Hamid, M., Siddiqui, I., & Shahid, S. (2003). Improvement of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 biocontrol activity against root-knot nematode by the addition of ammonium molybdate. *Microbiology*, 36, 239-244.
- Hammer, D., & Van Pee, K. (1997). Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Paleontología Electrónica*, 6, 21-24.
- Hussey, R. (1985). Host-parasite relationship and associated physiological changes. En *An advanced treatise on Meloidogyne* (págs. 144-153). USA: Raleigh, N.C.

- Hussey, R., & Janssen, G. (2002). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes.*, 43-70.
- INEC. (2015). Cultivo de tomate. pág 1-5.
- Jung, C., & Wyss, U. (1999). New control parasitic nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 439-466.
- Kerry, B. (2000). Rhizosphere interactions and exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. 38, 423-441.
- Kim, G., Liem, A., Stewart, B., & Miller, J. (1999). New studies on trans-anethole oxide and trans-asarone oxide. *Carcinogenesis*, 20, 1303-1307.
- Kloepper, J., & Ryu, C. (2006). Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *Soil Biology*, 9, 33-52.
- Kloepper, J., Rodriguez, R., Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E., & Fernandez, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28, 21-26.
- Knowles, C., & Bunch, A. (1986). Microbial cyanide metabolism. *Advances in Microbiology*, 27, 73-111.
- Loper, J., & Gross, H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 . *Plant Pathology*, 11(9), 265-278.
- Ma, W., Zalec , K., & Glick, B. (2001). Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata*. *Microbiology Ecology*, 35, 137-144.
- MAGAP. (2014). Cultivo de tomate: Manejo de plagas y enfermedades. pág 8-14.
- Martínez , E., Barrios, G., Robesti, L., & Santos, L. (2006). *ECURED*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de https://www.ecured.cu/Meloidogyne_incognita
- Maurthofer, M., Hase, C., & Defago, G. (1994). Induction os systematic resistance of tobacco to TMV by the root colonizing *Pseudomonas fluorecens* strain CHA0. *Microbiol*, 84, 139-146.

- Meyer, S. (2003). Research programs on microbes for management of plant parasitic nematodes. *Pest Management Science*, 59, 665-670.
- Moens, M., Perry, R., & Starr, J. (2009). *Meloidogyne* species a diverse group of novel and important plant parasite . *CAB International*, 1-17.
- Montes, C., Altimira, F., Canchignia, H., Castro, A., & Sánchez, E. (2016). A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences* , 11(17), 1-10.
- Neidig, N., Rudiger, J., Scheu, S., & Jousset, A. (2011). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with Bacterivorous nematodes. *Environmental Microbiology*, 1-7.
- Raaijmakers, J., Weller, M., & Thomashow, S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 881-887.
- Randing , O., & Carneiro , D. (2002). Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR marker specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45, 862-870.
- Revelo, J., Cazco , C., & Sandoval, A. (2006). Avances del proyecto "Estudio epidemiológico del nematodo del rosario o falso nematodo del nudo (*Nobus* sp) en el cultivo de tomate de mesa en el Valle del Chota para optimizar su control". Quito: INIAP-UTN-SENACYT.
- Salazar, A., & Guzman, T. (2013). Nematodos fitoparásitos asociados al tomate en la zona accidental de Nicaragua. *Agronomia Mesoamericana*, 24(1), 27-36.
- Sherif, M., Ali, H., & Barakat, M. (1999). Suppressive bacteria associated with plant parasitic nematodes in Egyptian agriculture. *Japanese Journal of Nematology*, 24, 55-59.
- Shurtleff, M., & Averre, C. (2000). Diagnosing plant diseases caused by nematodes. *The American Phytopathological Society*, 187p.

- Siddiqui, A., & Shaukat, S. (2004). Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against root.knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production . *Journal of Phytopathology*, 152, 48-54.
- Siddiqui, A., Qureshi, A., & Akhtar, M. (2009). Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*. *Phytopathology and Plant Protection* , 42(12), 1154-1164.
- Siddiqui, I., & Shaukat, S. (2003). Endophytic bacteria prospect and opportunities for the biology control of plant-parasitic nematodes. *Nematología Mediterránea*, 31, 111-120.
- Siddiqui, I., Hass, D., & Heeb, S. (2005). Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Environmental Microbiology*, 71, 5646-5649.
- Siddiqui, Z. (2006). Prospective biocontrol agents of plant pathogens. En *Biocontrol and Biofertilization* (págs. 11-142). Springer.
- Sikora, R., & Fernández, E. (2005). Nematode parasites of vegetables. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. *CABI Publishing*, 2, 319-392.
- Sikora, R., Niere, B., & Dababat, A. (2008). Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control*, 46(1), 15-23.
- Solomonson, L. (1981). Cyanide as a metabolite inhibitor . *In Cyanide in Biology*, 11-28.
- Subbotin, S., & Moens, M. (2006). Molecular taxonomy and phylogeny. Washington : *Plant Nematology*. 12, 33 - 51.
- Suslow, T., & Schroth, M. (1982). Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Protección de Plantas*, 72, 199-206.
- Taylor, A., & Sasser, J. (1983). Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. En *Especies de Meloidogyne* (pág. 109). Carolina del Norte.

- Timper, P., Kone, D., Yin, J., Ji, P., & McSpadden, B. (2009). Evaluation of an Antibiotic- Producing strain of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 41(3), 234-240.
- Triviño, C. (2004). Control biológico de *Meloidogyne* spp. con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción . *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias* (98), 46.
- Trudgill, D., & Blok, V. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes:exception damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 53-77.
- Verdejo, L. (1999). Nematodes. *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops.*, 34, 61-68.
- Verdejo, L., Blanco, M., & Cortada, L. (2013). Resistencia al nematodo *Meloidogyne* en patrones de tomate a temperaturas del suelo superiores a los 28 °C. *Hortícolas Transferencia Tecnológica* 249, 5.
- Vidhyasekaran, P. (2004). Concise encyclopedia of plant pathology. Haworth Press. 345 p.
- Walia , R., Sharma, S., & Vats, R. (2000). *Biocontrol Potential and is its Exploitation in Sustainable Agriculture, Uno*, 173-186.
- Weller, D. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Phytopathology*, 26, 379-407.
- Weller, D., & Cooke, R. (1983). Suppression of take - all of wheat by seed- treatment with fluorescent pseudomonads. . *Phytopathology*, 73, 463-469.
- Wenke, K., Kai, M., & Piechulla, B. (2010). Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots soil organisms. *Planta*, 231, 499-506.
- Xu, H. (2000). Soil-root interface water potential in sweet com as affected by organic fertilizer and a microbial inoculant. *Journal of Crop Productions*, 3, 139-156.

- Yongsan, Z., Weimin, Y., & James , K. (2014). First report and morphological and molecular characterization of *Meloidogyne incognita* from *Radermachera sinica* in China. *Nematropica*, 44(2), 118-128.
- Zenhder, G., Klooper, J., & Yao, C. (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *Plant Disease*, 90, 391-396.
- Zijlstra, C., Donkers, V., & Fargette, M. (2000). Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2, 847-853.

CAPÍTULO VII
ANEXOS

Anexo 1 Protocolo del **DNeasy® Plant Mini Kit**

The DNeasy Plant Mini Kit can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year. For more information, please refer to the DNeasy Plant Handbook, which can be found at www.qiagen.com/handbooks. For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting ,,

Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C). ,,

If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.

”

Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates. ,, Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser, or a mortar and pestle.
2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation. Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
3. Add 130 μ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. Discard the flowthrough.

9. Add another 500 μl Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.

10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.

11. Add 100 μl Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. 12. Repeat step 11.

Anexo 2 Evaluación de los ensayos antagonista hacia *M. incognita in vitro*



Anexo 3 Proceso para el tamizaje y recuperación de huevos y nematodos del *M. incognita*



Cortes de raíces de tomate con agallas en segmentos



Mezcla de raíces con hipoclorito al 1 % durante 1 min



Licuido de las raíces



Muestras tamizadas para la recolección de huevos y nematodos



Tamices de 500, 90 y 25 μm

Anexo 4 Lavado de las *Pseudomonas* spp

