



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
INNOVACION Y TRANSFERENCIA DE
TECNOLOGIA**

MAESTRÍA EN AGRICULTURA SOSTENIBLE

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MAGISTER EN AGRICULTURA SOSTENIBLE**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA INFESTACION DE CINCO ESPECIES
DE SOLANÁCEAS AL PARASITISMO DEL NEMATODO DEL NUDO
DE LA RAÍZ *MELOIDOGYNE INCOGNITA* Y EL CONTENIDO DE
ALCALOIDES EN FRUTOS DE TOMATE DE ÁRBOL Y NARANJILLA
INJERTADOS EN ESTAS ESPECIES.**

AUTOR: NAVARRETE BASTIDAS XIMENA ELIANET

DIRECTOR: VIERA, WILLIAM

SANGOLQUÌ

2017



**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
MAESTRÍA EN AGRICULTURA SOSTENIBLE**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "EVALUACIÓN DE LA INFESTACION DE CINCO ESPECIES DE SOLANÁCEAS AL PARASITISMO DEL NEMATODO DEL NUDO DE LA RAÍZ *MELOIDOGYNE INCOGNITA* Y EL CONTENIDO DE ALCALOIDES EN FRUTOS DE TOMATE DE ÁRBOL Y NARANJILLA INJERTADOS EN ESTAS ESPECIES" realizado por la Ing. NAVARRETE BASTIDAS XIMENA ELIANET, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la Sra. NAVARRETE BASTIDAS XIMENA ELIANET para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, febrero del 2017

William Fernando Viera

DIRECTOR



**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
MAESTRÍA EN AGRICULTURA SOSTENIBLE**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **XIMENA ELIANET NAVARRETE BASTIDAS**, con cédula de identidad N0 1709279739, declaro que este trabajo de titulación "EVALUACION DE LA INFESTACION DE CINCO ESPECIES DE SOLANÁCEAS AL PARASITISMO DEL NEMATODO DEL NUDO DE LA RAÍZ *MELOIDOGYNE INCOGNITA* Y EL CONTENIDO DE ALCALOIDES EN FRUTOS DE TOMATE DE ÁRBOL Y NARANJILLA INJERTADOS EN ESTAS ESPECIES" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros, considerándose en la citas bibliográficas.

Consecuentemente este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación.

Sangolquí, febrero del 2017

XIMENA ELIANET NAVARRETE BASTIDAS

C.C.1709279739



**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
MAESTRÍA EN AGRICULTURA SOSTENIBLE**

AUTORIZACIÓN

Yo, XIMENA ELIANET NAVARRETE BASTIDAS, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "EVALUACION DE LA INFESTACION DE CINCO ESPECIES DE SOLANÁCEAS AL PARASITISMO DEL NEMATODO DEL NUDO DE LA RAÍZ *MELOIDOGYNE INCOGNITA* Y EL CONTENIDO DE ALCALOIDES EN FRUTOS DE TOMATE DE ÁRBOL Y NARANJILLA INJERTADOS EN ESTAS ESPECIES" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, febrero del 2017



XIMENA ELIANET NAVARRETE BASTIDAS
C.C. 1709279730

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme fuerzas y bendiciones para poder cumplir con éxito, mis metas deseadas.

A La Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), a sus autoridades, por contribuir en nuestra formación de posgrado y en el progreso de nuestro país.

A la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD), de la cual formo parte, por darme la oportunidad de fortalecer mis conocimientos, con la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Programa de Fruticultura, que me dieron la oportunidad de realizar este estudio. Ing William Viera Dr Lenin Ron e Ing Pablo Viteri, por su aporte incondicional en la dirección y ejecución permanente para la consecución de este trabajo y a todos sus colaboradores los cuales prestaron su ayuda y colaboración.

A mis amigos y compañeros de AGROCALIDAD, Ings. Wladimir Enriquez, Patricia Garrido y Anita Garrido, que colaboraron en la parte molecular de esta investigación.

DEDICATORIA

A mis hijas Gabriela, Cynthia y mi esposo Galo, por su apoyo brindado, su paciencia y tiempo, han sido pilar fundamental para la consecución de este trabajo.

A la memoria de mi Padre y mi Madre Olga Bastidas, que ha sido mi aliento e inspiración para formarme en una mujer luchadora.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| CERTIFICACIÓN | ii |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD | iii |
| AUTORIZACIÓN | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| DEDICATORIA | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDO..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| INDICE DE FIGURAS..... | xii |
| RESUMEN..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| 1.1. Descripción del problema | 1 |
| 1.2. Justificación del problema..... | 2 |
| 1.3. Objetivos | 3 |
| 1.3.1 Objetivo general..... | 3 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 3 |
| 1.4. Revisión de literatura | 4 |
| 1.4.1. Solanáceas silvestres..... | 4 |
| 1.4.2. Mecanismos de resistencia de las plantas | 6 |
| 1.5 Principios activos encontrados en los portainjertos | 11 |
| 1.5.1. Solanina | 13 |
| 1.5.2. Solasonina..... | 15 |
| 1.5.3. Nicotina..... | 16 |
| 1.5.4 Anabasina..... | 17 |
| 1.5.5 Tomatina | 18 |
| 1.5.6 Solasodina..... | 19 |
| 1.6 Género Meloidogyne..... | 20 |
| 1.6.1 Clasificación taxonómica..... | 20 |
| 1.6.2 Ecología y distribución | 21 |
| 1.6.3 Ciclo biológico..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.6.4 Reproducción | 26 |
| 1.6.5 Sintomatología | 28 |
| 1.6.6 Interacciones entre <i>Meloidogyne spp</i> con otros fitopatógenos | 29 |
| 1.6.7.- Identificación de especies <i>Meloidogyne spp</i> | 30 |
| 1.6.7.1 Medidas Morfométricas | 34 |
| 1.6.7.2 Identificación de <i>Meloidogyne incognita</i> por Técnicas Moleculares | 35 |
| CAPÍTULO II | 39 |
| 2.1 Zona de estudio | 39 |
| 2.2 Periodo del inicio de la investigación | 39 |
| 2.3 Diseño de la investigación | 39 |
| 2.4 Metodología | 39 |
| 2.4.1 Obtención de las plántulas de solanáceas silvestres. | 39 |
| 2.4.2 Aislamiento del patógeno e inoculación | 40 |
| 2.4.2.1 Obtención del patógeno..... | 40 |
| 2.4.2.2 Multiplicación del inóculo inicial | 41 |
| 2.4.3. Morfometría | 45 |
| 2.4.3.1 Preparación de la muestra | 45 |
| 2.4.3.2 Identificación de <i>M. incognita</i> mediante morfometría..... | 45 |
| 2.4.4 Identificación molecular de <i>Meloidogyne incognita</i> | 48 |
| 2.4.4.1 Extracción de ADN genómico | 48 |
| 2.4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 50 |
| 2.4.4.4 Condiciones del perfil térmico usado para la PCR | 50 |
| 2.4.4.6 Electroforesis en gel de agarosa | 51 |
| 2.4.4.7 Secuenciación de los fragmentos de PCR amplificados | 51 |
| 2.4.5 Evaluación de infestación de las solanáceas silvestres a <i>M. incognita</i> | 52 |
| 2.4.5.1 Tratamientos..... | 52 |
| 2.4.5.2 Unidad experimental | 52 |
| 2.4.5.3 Diseño experimental..... | 52 |
| 2.4.5.4 Análisis estadístico..... | 52 |
| 2.4.6 Medición del contenido de alcaloides..... | 54 |
| 2.4.6.1 Tratamientos..... | 55 |
| 2.4.6.2 Unidad experimental | 56 |

| | |
|--|----|
| 2.4.6.3 Diseño experimental..... | 56 |
| 2.4.6.4 Análisis estadístico..... | 56 |
| 2.4.6.5 Variables | 56 |
| CAPÍTULO III..... | 57 |
| 3.1 Morfometría | 57 |
| 3.2 Identificación molecular de <i>M. incognita</i> | 64 |
| 3.3 Evaluación de infestación de las solanáceas silvestres a <i>M. incognita</i> | 66 |
| 3.4 Contenido de glicoalcaloides | 78 |
| 3.5 Difusión de resultados..... | 82 |
| CAPITULO IV..... | 84 |
| CAPITULO V | 86 |
| CAPITULO VI..... | 87 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Tratamientos del análisis morfométrico..... | 46 |
| Tabla 2: Primers específicos para la identificación molecular de <i>Meloidogyne incognita</i> | 50 |
| Tabla 3: Standarización de PCR para <i>M. incognita</i> | 51 |
| Tabla 4: Tratamientos para la evaluación de infestación de las solanáceas..... | 52 |
| Tabla 5: Escala de Bridge y Sam Page (1980)..... | 53 |
| Tabla 6: Tratamientos evaluados para el contenido de alcaloides. | 56 |
| Tabla 7: Medidas morfométricas en micras (µm) realizadas en los nematodos hembra, macho y larvas J2 (juveniles) extraídos de tomate de árbol. | 57 |
| Tabla 8: Valores de longitud del cuerpo de <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas | 60 |
| Tabla 9: Rangos de significación para ancho del cuerpo obtenidos en <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas. | 61 |
| Tabla 10: Rangos de significación para longitud del estilete obtenidos en <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas | 62 |
| Tabla 11: Rangos de significación para longitud de cola obtenidos en <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas. | 63 |
| Tabla 12: Análisis de similitud entre secuencias de <i>M. incognita</i> aisladas de <i>S. betaceum</i> en comparación con otros aislados reportados en el GenBank | 66 |
| Tabla 13: Respuesta de infestación de las Solanáceas para la variable altura de planta | 67 |
| Tabla 14: Respuesta de infestación de las Solanáceas para la variable peso fresco de raíces | 68 |
| Tabla 15: Respuesta de infestación de las Solanáceas para la variable peso seco del follaje..... | 69 |
| Tabla 16: Respuesta de Infestación de las Solanáceas inoculadas con el nematodo fitopatógeno <i>M. incognita</i> | 71 |
| Tabla 17: Número de agallas contabilizadas en las distintas Solanáceas inoculadas con el nematodo fitopatógeno <i>M. incognita</i> | 75 |

| | |
|---|----|
| Tabla 18: Valores de correlación entre la parte aérea de la planta y el peso fresco de la raíz inoculada con <i>M. incognita</i> | 76 |
| Tabla 19. Contenido de solanina en frutos de tomate de árbol y naranjilla proveniente de plantas injertadas y no injertadas. | 79 |
| Tabla 20: Contenido de chaconina en el fruto de tomate de árbol y naranjilla proveniente de plantas injertadas y no injertadas. | 79 |
| Tabla 21: Visita de Instituciones a la Granja experimental Tumbaco en el año 2016 y se han realizado las difusiones de resultados de la investigación: “Evaluar la infestación y no infestación de cinco especies de Solanáceas al parasitismo del nematodo del nudo de la raíz <i>Meloidogyne incognita</i> y el contenido de alcaloides en frutos de tomate de árbol y naranjilla injertados en estas especies” | 83 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Modelo de “zigzag” para reconocer la defensa de las plantas..... | 9 |
| Figura 2. Estructura química de la Solanina y Chaconina | 15 |
| Figura 3. Estructura química de la Nicotina..... | 17 |
| Figura 4. Estructura química de Anabasina | 18 |
| Figura 5. Estructura química de la Tomatina | 19 |
| Figura 6. Estructura química de la Solasodina..... | 20 |
| Figura 7. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne incognita</i> | 26 |
| Figura 8: a) Raíz sana tomate riñón b) Raíz infectada con <i>Meloidogyne incognita</i> | 29 |
| Figura 9: a) Cabeza de la hembra. b) corte perineal | 32 |
| Figura 10: a) Macho de <i>Meloidogyne</i> , b) hembra, c) Parte de la región cefálica de un macho <i>Meloidogyne spp</i> | 33 |
| Figura 11: a) Juvenil de segundo estadio. b) Hembra joven envuelta por las cutículas de segundo, tercero y cuarto estadio, c) Juvenil de segundo estadio vermiforme <i>Meloidogyne spp</i> | 33 |
| Figura 12: Semillero de las distintas especies de las Solanáceas..... | 40 |
| Figura 13: Obtención del inóculo inicial: a) Planta de tomate de árbol, b) raíz con agallas, c) Lavado, d) Corte de raíces, e) Proceso de extracción, f) Filtración por tamices, g) Lavado y recolección del extracto | 41 |
| Figura 14: Multiplicación del inóculo inicial: a) orificios para inoculación, b) dosificación del inóculo, c) medida de inóculo, d) inoculación en plántulas de tomate riñón. | 42 |
| Figura 15: Plántulas de Solanáceas silvestres: a) <i>S. betaceum</i> , b) <i>S. quitoense</i> , c) <i>S. auriculatum</i> , d) <i>N. glauca</i> , e) <i>S. hispidum</i> , f) <i>S. arboreum</i> , g) <i>S. hirtum</i> | 43 |
| Figura 16: Preparación del inóculo por medio de masas de huevos: a) Inoculación en plántulas de tomate riñón, b) plántulas de tomate riñón, c) raíces agalladas con masas de huevos, d) separación de raíces agalladas con masas de huevos, e) caja petri con raíces para obtención de masas de huevos, f) caja petri con masas de huevos, g) conjunto de cajas petri con masas de huevos, h) extracto de inóculo..... | 44 |
| Figura 17: Esquema del protocolo modificado a través del método de Enríquez (2015) para obtención del ADN de nematodos..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 18: a) Tomate testigo semilla, b) Tomate en patrón <i>Nicotiana glauca</i> , c) Tomate en patrón <i>S. auriculatum</i> , d) Naranjilla testigo semilla, e) Naranjilla patrón <i>S. arboreum</i> , f) Naranjilla patrón <i>S. hirtum</i> | 54 |
| Figura 19: Mediciones de morfometría realizadas en individuos hembra de <i>M. incognita</i> aisladas de <i>S. betaceum</i> : a) morfometría de estilete y bulbo medio, b) hembra, c) medición largo y ancho en hembra. | 58 |
| Figura 20: Cortes perineales de hembra <i>M. incognita</i> aislados de <i>S. betaceum</i> : a) Corte perineal, b) corte perineal con sus partes, c) corte perineal de hembra..... | 58 |
| Figura 21. Morfometría de Machos de <i>M. incognita</i> aisladas de <i>S. betaceum</i> , a) Cuerpo entero, cabeza y cola, b) Cola con medida de espículas, c) Cabeza con medida de estilete, d) Medida de cuerpo entero..... | 59 |
| Figura 22: Mediciones de morfometría realizadas en juveniles J2 de <i>M. incognita</i> aislados de <i>S. betaceum</i> : a), b) y c) medición de cuerpo completo, cabeza, cola. | 60 |
| Figura 23: Longitud del cuerpo de <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas | 61 |
| Figura 24: Ancho del cuerpo de <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas. | 62 |
| Figura 25: Longitud del estilete de <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas.... | 63 |
| Figura 26: Longitud de cola de <i>M. incognita</i> extraída de diferentes Solanáceas..... | 64 |
| Figura 27: Visualización de productos de la región IGS de ADNr de nematodos extraídos de las distintas Solanáceas que correspondieron a la especie <i>Meloidogyne incognita</i> , donde: M: Marcador molecular de peso (100bp DNA ladder, Invitrogen®), C(+): control positivo, C(-): control negativo, S1: <i>Solanum auriculatum</i> , S2: <i>Solanum hirtum</i> , S3: <i>Solanum hispidum</i> , S4: <i>Solanum arboreum</i> , S5: <i>Nicotiana glauca</i> , S6: <i>Solanum betaceum</i> (testigo susceptible), S7: <i>Solanum quitoense</i> (testigo susceptible)..... | 65 |
| Figura 28: Población final de <i>M. incognita</i> obtenida en las diferentes de Solanáceas. | 71 |
| Figura 29: Número de agallas de <i>M. incognita</i> obtenida en las diferentes de Solanáceas | 75 |
| Figura 30: Correlación entre la parte aérea de la planta y el peso fresco de la raíz | 77 |
| Figura 31: Correlación entre el índice de agallamiento y la población final de <i>M. incognita</i> | 77 |
| Figura 32. Contenido de solanina y chaconina en frutos de tomate de árbol provenientes de plantas injertadas y no injertadas (testigo)..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 33: Contenido de solanina y chaconina en frutos de naranjilla provenientes de plantas injertadas y no injertadas (testigo)..... | 80 |
| Figura 34: Difusión de resultados Agricultores | 82 |

RESUMEN

Existe una alta incidencia del nematodo *Meloidogyne incognita* en Solanáceas de importancia económica. Este patógeno ocasiona daños en la planta, llegando a producir hasta la muerte y ocasionando pérdidas para el agricultor. En la presente investigación, se evaluó la respuesta de infestación de cinco especies de Solanáceas silvestres (*Solanum auriculatum*, *S.hirtum*, *S.hispidum*, *S.arboreum* y *Nicotiana glauca*) al parasitismo de *M. incognita*. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones. Se obtuvo el inóculo de raíces infectadas de tomate de árbol (*S. betaceum*), el cual fue propagado en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedad 'Sheila'. Las Solanáceas silvestres más dos testigos susceptibles (*S. betaceum* y *S. quitoense*), fueron inoculados con una dosis de 2500 larvas. Relacionando la población inicial con la población final de *M. incognita*, se determinó que *S. arboreum*, *S. hirtum* y *N. glauca* presentaron una respuesta de no infestación al nematodo; mientras que el resto de especies se infestaron. Además, *S. hirtum* y *N. glauca* presentaron el menor número de agallas en raíces. En cuanto al rendimiento del follaje (peso fresco y seco), se observó una respuesta de no infestación en todos los tratamientos. El contenido de alcaloides (solanina y chaconina) en los frutos provenientes de las plantas injertas, en ningún caso fue superior al límite permitido. Se concluyó que es adecuado utilizar las especies *S. hirtum* y *S. arboreum* (compatibles con *S. quitoense* – naranjilla) y *N. glauca* (compatible con *S. betaceum* – tomate de árbol) como portainjertos de frutales de importancia comercial en Ecuador.

PALABRAS CLAVE:

- **INFESTACIÓN**
- **POBLACIÓN FINAL**
- **AGALLAS**
- **ALCALOIDES**
- **PORTAINJERTO**

ABSTRACT

There is a high incidence of the nematode *Meloidogyne incognita* in Solanaceae crops of economic importance. This pathogen causes damage to the plant, producing up to death and causing losses to the farmer. In this research, the infestation response of five species of wild solanaceae (*Solanum auriculatum*, *S. cotumum*, *S. hispidum*, *S. arboreum* and *Nicotiana glauca*) to the parasitism of *M. incognita* was evaluated. A completely randomized block design with three replicates was used. The inoculum was obtained from infected roots of tree tomato (*S. betaceum*), which was propagated in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) variety 'Sheila'. Wild solanaceae plants plus two susceptible controls (*S. betaceum* and *S. quitoense*) were inoculated with a dose of 2500 larvae. Relating the initial population to the final population of *M. incognita*, it was determined that *S. arboreum*, *S. hirtum* and *N. glauca* showed a non-infestation response to the nematode; while the rest of the species were infested. In addition, *S. hirtum* and *N. glauca* had the lowest number of galls in roots. Regarding to the foliage yield (fresh and dry weight), a non-infestation response was observed in all treatments. The content of alkaloids (solanine and chaconine) in fruits from grafted plants, in no case exceeded the limit allowed. It was concluded that it is appropriate to use *S. hirtum* and *S. arboreum* (compatible with *S. quitoense* - naranjilla) and *N. glauca* (compatible with *S. betaceum* - tree tomato) as rootstocks of fruit crops of commercial importance in Ecuador.

KEY WORDS:

- **INFESTATION**
- **FINAL POPULATION**
- **GALLS**
- **ALKALOIDS**
- **ROOT STOCK**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

A nivel mundial se han registrado pérdidas anuales de 100 billones de euros en alrededor de 3000 plantas hospederas de *Meloydogine incognita* (Abad, P., Favery, B., Rosso, M., Castagnone-Sereno P., 2003). A pesar del incremento de la superficie cultivable de los frutales, existe una reducción en los rendimientos debido al ataque de este nematodo fitopatógeno (Valarezo & Samaniego, 1982), el mismo que impide el crecimiento normal de la planta y limita la absorción de nutrientes del suelo.

En frutales pertenecientes a la familia Solanaceae, como tomate de árbol y naranjilla existe una alta incidencia del nematodo *M. incognita*, en interacción con otros patógenos como el hongo *Fusarium* sp., lo cual ocasiona daños en la planta, llegando a producir hasta la muerte de la misma. En el Ecuador, se estima pérdidas del 90% del rendimiento en cultivos como tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y cerca del 30% en naranjilla (*Solanum quitoense*) a causa de este nematodo. (Revelo, 2003).

Por lo mencionado anteriormente, es necesario buscar opciones de materiales silvestres que presenten características de no infestación / a la infección por este patógeno, mismos que puedan ser utilizados como portainjertos permitiendo mayor longevidad de la planta e incremento del rendimiento. Además, el uso de portainjertos no permitirán la reducción del uso de agroquímicos (nematicidas) aplicados al suelo, evitando su contaminación (Revelo & Sandoval, 2003).

1.2. Justificación del problema

En forma general, los frutales que pertenecen a la Familia de las solanáceas son muy susceptibles al ataque de insectos plaga, nematodos y enfermedades. La utilización de productos fitosanitarios como fungicidas, nematicidas e insecticidas provocan una alta toxicidad en el fruto (Corpoica, 2002).

Todos los agroquímicos utilizados son sintéticos, empleándose en dosificaciones altas, además se realizan mezclas de pesticidas del mismo grupo químico, esto evidencia la falta de capacitación de los agricultores sobre el manejo racional de los mismos, ocasionando incremento de los costos de producción y contaminación al ambiente (Revelo, 2003).

En lo que refiere al ataque de nematodos, el efecto en plantas es disminuyendo su capacidad de absorción de agua y nutrientes, provocando clorosis, enanismo, caída de flores y frutos, y la marchitez de la planta por deterioro del sistema radicular debido a las agallas que se forman en las raíces. Las pérdidas que ocasionan los nematodos en el Ecuador se estiman en un 70% por la reducción de la vida útil de la planta (Viteri *et al.*, 2010).

Para su control los productores emplean nematicidas sistémicos cada tres meses, que se acumulan en el fruto afectando la calidad y la salud de los trabajadores y consumidores (Revelo & Sandoval, 2003).

La situación fitosanitaria de los frutales en nuestro país requiere de muchos estudios para poder disponer de un entendimiento epidemiológico de las enfermedades, nematodos e insectos plaga, y desarrollar estrategias de manejo integrado, a través de la identificación de la presencia del patógeno y estimación de su incidencia, con el propósito de seleccionar y aplicar las medidas de control más adecuadas (Revelo *et al.*, 2010).

Con el fin de contribuir al mejoramiento de los cultivos, se busca reforzar el manejo integrado de plagas, como los nematodos, mediante el uso de portainjertos que permitan el adecuado desarrollo de la planta y mantengan la productividad. El nematodo del nudo de la raíz (*M. incognita*) es uno de los géneros parásitos de plantas más abundante en los cultivos comerciales frutales y se considera de importancia debido al deterioro económico que ocasiona por su distribución mundial,

su enorme grupo de hospederos y su interacción con otros agentes como hongos y bacterias, constituyéndose en uno de los mayores problemas para las plantas cultivadas en el mundo (Revelo & Sandoval, 2003).

Aunque existen información generada anteriormente en este tema, fue importante la realización de este estudio debido a que la propagación de solanáceas silvestres es mediante semilla sexual (Eguiguren, 1982). Lo que provoca variabilidad genética en la progenie obtenida, por lo que se puede producir variación en la respuesta de la planta al patógeno. Esta investigación permitió validar solanáceas silvestres que presentan infestación al nematodo en mención y que pueden ser utilizadas como portainjertos en cultivos comerciales de tomate de árbol y/o naranjilla, contribuyendo a la reducción del uso de nematicidas, menor contaminación del suelo y prolongar la vida útil del cultivo. Además, permitió determinar si se mantiene la respuesta de investigaciones previas o existe una variación provocada por la segregación genética debido a la dosis de inoculación utilizada, ya que es inferior a investigaciones anteriores, para determinar la respuesta de las solanáceas silvestres evaluadas a una menor presión de inóculo.

También sirvió para determinar si existen residuos de principios activos (alcaloides) en los frutos de tomate de árbol y naranjilla que han sido injertados con patrones silvestres, debido a que podrían ser peligrosos para la salud humana.

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la Infestación de cinco especies de Solanáceas al parasitismo del nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne incognita* y el contenido de alcaloides en frutos de tomate de árbol y naranjilla injertados en estas especies.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar mediante medidas morfométricas y pruebas moleculares la caracterización del nematodo *Meloidogyne incognita*

2. Correlacionar el índice de agallamiento de cada especie de solanácea con la población final de *Meloidogyne incognita*.
3. Determinar la infestación a *Meloidogyne incognita* de cada especie de Solanácea silvestre.
4. Correlacionar la parte aérea de la planta con el peso de la raíz inoculada con *Meloidogyne incognita*.
5. Determinar niveles de los principios activos (alcaloides) presentes en las especies silvestres y su presencia en frutos de tomate de árbol y naranjilla.
6. Difundir los resultados obtenidos en esta investigación a los productores y técnicos en el campo de la fruticultura del INIAP.

1.4. Revisión de literatura

1.4.1. Solanáceas silvestres

La familia *Solanaceae*, contiene una cantidad aproximada de 96 géneros y 2300 especies (Cuevas-Arias, *et al.*, 2008), que incluye especies domesticadas de gran importancia alimenticia como (papa, jitomate, tomate, berenjena), industrial, (tabaco), ornamental (petunias, floripondio, copa de oroy, huele de noche) y medicinal (toloache y belladona) (Villaseñor, Encima, Ortiz, & Valdés, 2015). Su distribución es cosmopolita, con mayor frecuencia en géneros tropicales, subtropicales y templados en pisos altitudinales de 0 a 4000 msnm. Tiene gran variedad de formas vegetativas y reproductivas, por lo tanto tienen la capacidad de colonizar distintos tipos de hábitats.

Se caracteriza por presentar flores hermafroditas y actinomorfas, en general pentámeras y con gran variedad de tamaño, ovario súpero, esencialmente bilocular y fruto en forma de baya o cápsula. El nombre de esta familia de plantas proviene del latín *solamen*, que quiere decir confortar o calmar y se refiere a las propiedades sedativas que caracterizan a algunas de las especies. El botánico americano Charles Heiser mencionaba que las Solanáceas eran plantas tranquilizantes en extremo y que podrían ocasionar efectos mortales (Towell, 2001).

Una de las principales características de esta familia de plantas es la presencia de alcaloides (nicotina, atropina y la solanina) que son compuestos tóxicos para el hombre y los animales, causando envenenamientos y hasta la muerte de personas que lo hayan ingerido (Raddick, 1986). Estos alcaloides se encuentran en la mayoría de órganos como el follaje y frutos en estado inmaduro. Además pueden encontrarse ciertos esteroides conocidos como glicoalcaloides usados como precursores de hormonas que sirven para la fabricación de fármacos como la cortisona, los esteroides y las pastillas anticonceptivas (Nee, 1986).

Entre las Solanáceas silvestres empleadas como portainjertos podemos mencionar a: *Nicotiana glauca*, *S. auriculatum*, *S. hispidium*, *S. arboreum*, *S. hirtum* que crecen en forma silvestre, bajo diferentes condiciones de clima y suelo del Ecuador. Estas especies silvestres, conjuntamente con otras solanáceas se colectan para emplearlos como portainjertos de tomate de árbol, con el fin de evaluar la infestación a plagas como el nematodo *M. incognita* (Viteri *et al.*, 2010; Revelo *et al.*, 2010).

El tabaquillo (*N. glauca*) es una planta silvestre de hasta 7 metros de altura, que crece en suelos pobres, zonas áridas, posee un tallo sin pubescencias y copa piramidal. Sus hojas son lanceoladas, simples y sin pubescencias, pecíolo largo de color verde azulado, la inflorescencia es una panícula terminal, con flores actinomorfas, hermafroditas de color amarillo. El fruto es una cápsula dehiscente con semillas redondas de 0.5 mm, que son muy importantes debido a su alto contenido de alcaloides (Viteri *et al.*, 2010).

El palo blanco (*S. auriculatum*) planta silvestre, que crece a 2400 msnm, en suelos franco arcillosos, con pH de 7.5. Las plantas son pubescentes y pueden alcanzar hasta los 4 m de alto. Tiene la copa abierta, las hojas son grandes, ovales, simples, de coloración verde gris y con pubescencia. La inflorescencia es un corimbo terminal, posee flores hermafroditas de color lila, los frutos son bayas de color amarillo, conteniendo semillas aplanadas de 1 a 2 mm (Viteri *et al.*, 2010).

El Cujacu (*Solanum hispidum*) crece a una de altitud de 1500 msnm, en suelos de textura franca arcillosa, con 2.6% de contenido de materia orgánica y 4.6 de pH. Es un arbusto pequeño que puede llegar a los 5 m de altura, copa redonda, espinoso en su tallo y ramas, sus hojas son ovaladas elípticas, más o menos oblicuas acuminadas y sinuosas con siete a once lóbulos, presenta numerosos tricomas. En su etapa juvenil siempre presentan espinas tanto en el haz como en el envés. Las flores forman inflorescencias de tipo corimbo, el fruto es globoso, amarillento y tiene 1.5 cm de diámetro (Viteri *et al.*, 2010).

***S. arboreum* (*S. grandiflorum*)** árbol erecto, de tronco robusto lignificado, ramas gruesas con abundante follaje, pecíolos llenos de espinas, hojas puntiagudas, ovaladas, elípticas sinuosas y lobuladas, que presentan tricomas en la superficie. Posee el tipo de inflorescencia cimosa, con pedúnculos robustos, aunque el árbol presenta poca floración. El botón floral es ovalado acuminado, los frutos tienen 5 cm de diámetro de forma de laúd y cáliz subcampanulado y soldado al fruto (Moller, Jorgensen, & León, 1999).

S. hirtum arbusto ramificado espinoso de 1.19 a 1.90 m de altura, con tallos de color blanquecino pubescente, hojas alternas, simples, ovales, base cordiforme, margen con lóbulos, de ápice redondeado, inflorescencias tipo cimosa lateral, con flores de corola blanca, los frutos al madurar son de color anaranjado, pubescentes, globosos, pequeños de 1.5 a 2.5 cm, que pueden ser comestibles (Revelo, *et al.*, 2010).

1.4.2. Mecanismos de resistencia de las plantas

Las plantas están predispuestas constantemente al ataque de una amplia variedad de patógenos que incluyen bacterias, virus, hongos, nematodos e insectos, lo cual hace que éstas activen sus mecanismos de defensa para contrarrestar la infección provocada por estos microorganismos. Entre estos mecanismos tenemos la resistencia inducida, que consiste en la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos ocurridos como consecuencia del proceso de reconocimiento entre la planta y el patógeno (Ordeñana, 2002).

Las reacciones que los patógenos ocasionan pueden ser diferentes en los distintos hospederos, así como su grado de patogenicidad (Collinge, Borch, Madriz-Ordeñana, & Newman, 2001). A pesar de que estos conceptos han sido discutidos por Vanderplank (1984), quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del hospedante, lo que deja entre dicho que la virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta.

Según el estudio realizado por Vanderplank (1984), la resistencia a una enfermedad no puede ser absoluta, varía desde una forma parcial de resistencia hasta la casi total inmunidad. Esta variación en la resistencia puede deberse a diferencias en la patogenicidad del agente causal o también a diferencias en los genes que gobiernan la resistencia de la planta hospedante, y a los ambientes que afectan la expresión final, así como también a la intensidad del desarrollo de la enfermedad (Renfro, 1985).

De igual manera, este autor indica que los genotipos resistentes a una enfermedad, en un determinado ambiente, pueden no ser eficientes en otro, donde hay una fuerte presión de la enfermedad u otra raza del patógeno.

Las primeras evidencias genéticas de resistencia a nematodos, fueron encontradas en la interacción tomate (*Lycopersum esculatum*) con *M. incognita*. Algunos genes de resistencia dominantes han sido identificados y mapeados, por ejemplo en tomate los genes Mi, Mi-3 y Mi-9 (Ammiraju *et al.*, 2003), pimiento el gen Me3 (Castagnone *et al.*, 2001) y en maní los genes Mae y Mag (García *et al.*, 1996), el gen Mi ha sido clonado y pertenece a la clase de genes NBS-LRR, que también incluye genes que dan resistencia a virus, bacterias y hongos (Hwang *et al.*, 2000).

En resultados obtenidos en tomate, indican que el reconocimiento de la resistencia de la planta al nematodo es a través del gen Mi-1, 2 LRR, que está implicado en la regulación de la transmisión de la respuesta de resistencia así como

también en el reconocimiento del nematodo, produciendo una rápida muerte celular localizada, o una respuesta de hipersensibilidad en el sitio de la infección (Hwang *et al.*, 2000).

1.4.3. Respuestas de defensa de las plantas

El ingreso de los nematodos a los tejidos de la planta es a través de heridas, particularmente durante la migración y expansión del sitio de alimentación. Los nematodos agalladores evitan provocar respuestas fuertes de la planta migrando entre las células de la raíz. Al contrario, los quistes de los nematodos migran a través de las células corticales en el centro de la raíz, causando necrosis desde su punto de entrada hasta el sitio donde se asientan para alimentarse. Las plantas son capaces de reconocer y reaccionar a parásitos activando varias respuestas de defensa. Las respuestas de defensa incluyen la producción de radicales oxígeno tóxicos y componentes sistémicos de señalización así como la activación de los genes de defensa que conllevan a la producción de barreras estructurales u otras toxinas diseñadas para lastimar a los patógenos (Gheysen & Jones, 2013).

El mecanismo del sistema de defensa en la planta consiste en dos tipos de respuestas y es conocido mediante un modelo “zigzag” (Figura 1). Las plantas detectan moléculas patógenas conservadas (patógenos-asociados a patrones moleculares, PAMPs) mediante receptores de reconocimiento de patrones de superficie celular (PRRs) y patrones de inmunidad activados por gatillo (PTI), también conocidos como defensas basales (Gheysen & Jones, 2013).

Sin embargo, poco es conocido acerca de PAMPs en nematodos, en otros microorganismos fitopatógenos no son muy estudiados, son específicos de los patógenos y son usualmente moléculas estructurales esenciales para la supervivencia del patógeno. PTI es relativamente duradero ya que los patógenos no son capaces de evolucionar a cambios fácilmente para PAMPs (Gheysen & Jones, 2013).

Todos los patógenos biotróficos necesitan suprimir sus patrones de inmunidad para infectar a las plantas, esto se logra usando efectores, proteínas secretadas e introducidas en el hospedero, las cuales atacan vías de señalización involucradas durante la PTI. De cualquier modo, las plantas han evolucionado subsecuentemente otro mecanismo de defensa conocida como inmunidad efector-disparador (ETI). ETI se realiza mediante los genes de resistencia y éstos reconocen a los efectores y los cambios del metabolismo del hospedero inducidos por los efectores (causantes). ETI está frecuentemente mediado por una fuerte respuesta a una célula muerta localizada (respuesta hipersensitiva), la cual indica los tejidos en los cuales el patógeno se intenta alimentar (Williamson & Roberts, 2009).

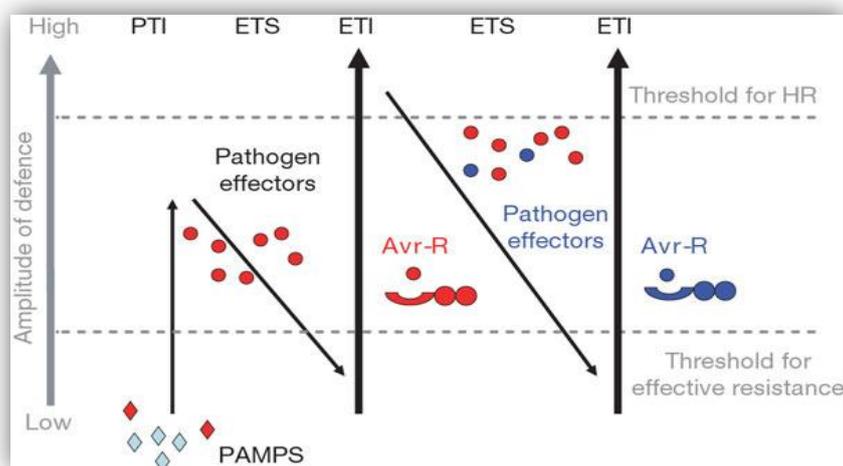


Figura 1. Modelo de “zigzag” para reconocer la defensa de las plantas
Fuente: Jones & Dangl, 2006

Los cambios genéticos relacionados con heridas o respuestas de defensa han sido estudiados en varias interacciones planta-nematodos. Justo 12 horas después de la inoculación de nematodos agalladores en raíces de tomate, los genes generales de defensa de la planta son regulados. La mayoría de estos genes son inducidos por interacciones compatibles e incompatibles, aunque con diferencias en nivel y sincronización. Los genes que codifican directamente las proteínas de defensa que son activadas incluyen inhibidores de peroxidasa, quitinasa, lipooxigenasa, extensina y proteínasa (Williamson & Roberts, 2009).

Los genes que codifican enzimas en las vías que resultan en síntesis de otros componentes de defensa son también activados durante las respuestas de defensa de

las plantas. Por ejemplo, los genes que codifican enzimas que lideran la síntesis de fitoalexinas (tales como glyceollina en soya), o deposición de barreras físicas, tales como callosa y lignina, son inducidos en las fases tempranas del proceso de infección de los nematodos (Moens , Perry, & Starr , 2009).

La aplicación de análisis moleculares de rendimiento (micro-arreglos, secuenciación de RNA) a interacciones plantas-nematodos ha permitido una mayor comprensión de las respuestas de las plantas a la invasión de nematodos, indicando que las respuestas moleculares de defensa a infecciones por nematodos son muy similares a las respuestas para otros patógenos. Estas respuestas incluyen la activación de genes que codifican proteínas relacionadas con patógenos (PR) y componentes de señalización de defensa, así como genes de respuesta a stress general y genes asociados con las respuestas hipersensitivas. Como sea, las vías de defensa específicas de las plantas pueden ser suprimidas localmente en los sitios de alimentación. Se encontró que algunos genes que codifican enzimas claves en la biosíntesis de ácido jasmónico disminuyen en sincitios inducidos por *Heterodera glycines* en soya y algunos genes para proteínas relacionadas a patógenos disminuyen en células gigantes de *Arabidopsis* (Gheysen & Fenoll, 2011).

La resistencia inducida es una respuesta activa de la planta que involucra la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia del reconocimiento específico entre la planta y el patógeno. Sin embargo, en algunos casos la defensa de la planta en tejidos sistémicos es suprimida, posiblemente causando que la planta sea más susceptible a patógenos de hojas después del ataque de nematodos. Ejemplo de esto ocurre durante la infección de *H. schachtii* en *Arabidopsis*, la expresión de los genes *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* son considerados marcadores para ácido salicílico (SA)-resistencia adquirida sistémica (SAR) dependiente, inducida en raíces y hojas (Moens , Perry, & Starr , 2009).

Las expresiones de genes *PR-3* y *PR-4*, fueron usadas como marcadores para ácido jasmónico (JA)-SAR, no fueron alterados en raíces, pero *PR-3* fue inducida, mientras que *PR-4* disminuyó en las hojas de plantas infectadas con *H. schachtii*. Sin

embargo, todos los genes *PR* (*PR-1* a *PR-5*) disminuyeron en las hojas de plantas infectadas con *M. incognita*, sugiriendo la supresión de SA- y JA- SAR (Moens , Perry, & Starr , 2009).

Similarmente, muchos genes relacionados a defensa fueron suprimidos en brotes de arroz infectado con nematodos agalladores, tres días después de la infección, pero no en brotes de arroz infectado por quistes de nematodos o nematodos migratorios. Estos resultados sugieren que los nematodos agalladores no solo son especializados en evadir las respuestas de defensa de las plantas sino también en activamente suprimir las defensas del hospedero (Gheysen & Fenoll, 2011).

1.5 Principios activos encontrados en los portainjertos

Los principios activos son sustancias con actividad biológica, que tienen la capacidad de alterar o modificar el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. Entre los principales están los aceites esenciales, alcaloides, los glucósidos o heterósidos los mucílagos o gomas y los taninos. Los alcaloides son bases nitrogenadas, producidas por las plantas en forma de metabolitos secundarios, presentan una acción fisiológica intensa sobre los animales estando aún en bajas dosis, entre los más conocidos de las solanáceas se encuentran los tropanos, las plantas que contienen estas sustancias son usadas como venenos y son utilizadas por sus propiedades farmacéuticas, entre éstos están: escopolamina, atropina, hiosciamina, nicotina, abamasina, solanina, solauricidina, etc (Hemming , 2013).

Las especies de la familia *Solanaceae* se caracterizan por la producción de diversos tipos de principios activos-alcaloides, de los cuales una gran cantidad, podrían ser beneficiosos en la medicina por sus incalculables propiedades farmacéuticas, o en la obtención de insecticidas, entre otras cualidades. Los principales alcaloides encontrados en especies de esta familia son los siguientes: solanina, glicoalcaloide presente principalmente en la papa, tomate y berenjena; alcaloides tropánicos, como la escopolamina (en especies de *Hyoscyamus* sp., *Datura* sp., *Brugmansia* sp., etc.) y atropina (*Atropa* sp.), nicotina, principalmente en el

tabaco; y la capsaicina, un capsaicinoide causante del sabor picante en especies del género *Capsicum* (Acosta, 2011).

Existen cuatro grupos de alcaloides esteroidales que son de origen vegetal: Veratrum, Solanum, alcaloides esteroidales de Apocynaceae y alcaloides Buxus. El segundo grupo se desarrolla en plantas solanáceas pertenecientes al género *Solanum*; los cuales tienen su origen en precursores no nitrogenados. La mayoría de las especies silvestres han dado lugar a la presencia de solo dos glicoalcaloides principales solanina y chaconina que comprenden el 95% del total de glicoalcaloides (Martínez, 2002; Lqbal, 1997).

El contenido de glicoalcaloides puede ser o no perjudiciales o nocivos para el ser humano dependiendo de su concentración. Por ejemplo se ha reportado en *S. tuberosum* (tubérculo maduro), una concentración de glicoalcaloides en un rango de 10 mg/100 g no produce ningún efecto (Lisinska & Leszczynski, 1989), con una concentración de 14 a 15 mg/100 g se produce un sabor amargo (Friedman, 2006, Lisinska & Leszczynski, 1989 mientras que rangos mayores a 20 mg/100 g son considerados perjudiciales para la salud humana (Korpan *et al.*, 2004).

Al contenido de glicolacaloides en solanáceas como las papas se las denomina como TGA (glicoalcaloides totales) y su contenido cuando este tubérculo maduran, oscila entre 3 a 10mg/100g., concentraciones entre 14 y 15 mg/100 g presentan un sabor amargo perceptible. Valores mayores a los 20mg/100g representan un nivel tóxico para el ser humano (Tajner-Czopek *et al.*, 2007; Esposito *et al.*, 2002; Friedman, 2006).

Lo importante de estos alcaloides es determinar el límite máximo de residuos (LMR) que es la concentración más alta de un residuo químico que esté legalmente autorizado o aceptado en un alimento, y se basa en las buenas prácticas de uso agrícola y químico. LMR son normas reguladoras que ayudan a controlar si un producto químico agrícola o veterinario se ha utilizado como se indica en la etiqueta aprobada. Si se supera un LMR, por lo general indica un mal uso de la sustancia

química pero normalmente no significa que haya un problema de salud o de seguridad pública (FAO, 2016).

Los glicoalcaloides como la solanidina, solasodina, solanina y tomatina, producen sabores amargos cuando se encuentran a concentraciones por encima de 140 mg/kg, y sensación de quemadura en la boca y garganta a concentraciones superiores a 200 mg/kg (Calvo, 2016).

Solanina y chaconina han sido relacionadas con factores de resistencia en las plantas, especialmente en la reducción del ataque de insectos (Yencho *et al.*, 2000; Celis *et al.*, 2008) y enfermedades fúngicas y bacterianas (Díaz, 2009). Los resultados obtenidos por Andrivón *et al.*, (2003) indican que ni la resistencia específica, ni la resistencia parcial a enfermedades dependen de la presencia de altas concentraciones de solanina o de chaconina.

1.5.1. Solanina

Solanina (Figura 2) es una sustancia tóxica, de sabor amargo que responde a la fórmula elemental $C_{45}H_{73}NO_{15}$. Existe en estado natural en hojas, frutos y tubérculos de varias solanáceas. Su uso es potencial en la síntesis de corticosteroides (hormonas sexuales), sirve para ser utilizado como una estrategia adaptativa de mecanismo de defensa contra la herbivoría. La intoxicación por solanina es producida con la maduración del fruto, dando cantidades elevadas de estos alcaloides, por la exposición a la luz o por daños mecánicos. Los síntomas son alteraciones gastrointestinales (diarrea, vómito, dolor abdominal) y neurológicas (alucinaciones y dolor de cabeza). La dosis tóxica es de 2 a 5 mg por kilogramo de peso corporal (Bell *et al.*, 1942; Salinas, 2012).

Las solanáceas como la papa contienen el alcaloide solanina un inhibidor de colinesterasa que interfiere en la transmisión nerviosa. Los tubérculos expuestos a una alta intensidad de luz pueden llegar a sintetizar niveles tóxicos de solanina (Martínez, 2002; Lqbal, 1997).

Bajas concentraciones de glicoalcaloides pueden considerarse sabor característico del alimento procesado (Tajner-Czopek *et al.*, 2007). En solanáceas como los tubérculos de papa, expuestos a la luz por 10 semanas pueden desarrollarse mayormente su contenido de glicoalcaloides hasta 4 veces más (Edwards *et al.*, 1998; Friedman, (2006); mientras que en los tubérculos fisiológicamente inmaduros el contenido puede ser 1.5 veces mayor con relación a las papas maduras (Tajner-Czopek *et al.*, 2007).

En general, las condiciones que promueven la formación de alcaloides aumentan también la síntesis de clorofila, por lo que al madurarse los tubérculos presentan un color verdoso, lo que representa un riesgo para la salud. Algunas variedades de patata, como la 'Lenape', se han retirado del mercado por su alto contenido en solanina, y en la introducción de nuevas variedades se exige que el contenido de solanina sea siempre menor de 200 mg/kg. Los síntomas de intoxicación como vómito, diarrea, dolores de cabeza y estómago, dificultad para ver y hablar, debilidad, sudoración, frío, alteración del pulso, alucinaciones e inconciencia, aumento de temperatura, y en casos extremos, parálisis y finalmente la muerte por fallo cardiaco, son atribuidos al efecto de la solanina y solanidina, al igual que otros alcaloides como la chaconina y solasodina. Sin embargo esta toxicidad no ha sido demostrada en Solanáceas como *S. nigrescens* o *S. americanum* (Girón , 2006; Griffiths & Dale, 2001).

La papa (*S. tuberosum*) se caracteriza por la presencia de los alcaloides esteroidales beta-chaconina, demisidina, solanisidina, alfa-solanina, solantreno, solasodieno, solasodina, tomatidina y tomatina. En el humano, el tubérculo seco ingerido por vía oral a una dosis de 193 g/individuo adulto disminuye los niveles postprandiales de glucosa e incrementa los niveles de insulina en los individuos normales (Sanabria, 2009).

La solanina (figura 2) ha sido relacionada con mecanismos de defensa, por ejemplo reduce el consumo foliar causado por *Leptinotarsa decemlineata* en plantas

de papa (Yencho *et al.*, 2000). En general, este alcaloide tiene un papel esencial en la defensa de las plantas (Díaz, 2009).

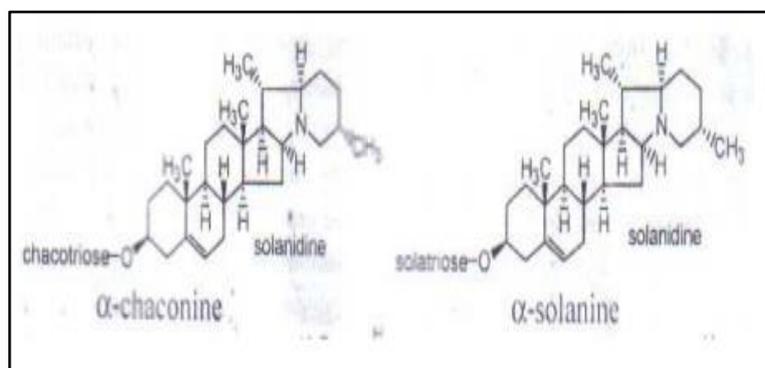


Figura 2. Estructura química de la Solanina y Chaconina

Fuente: Furer *et al.*, 2011.

1.5.2. Solasonina

La solasonina es un alcaloide esteroídico, que ha mostrado actividad antiproliferativa, que aunque inhibe la producción de células cancerígenas, puede actuar sobre células normales como las de médula ósea, intestinales, piel o cabello; también posee acción antiinflamatoria y anticonvulsivante (Rosas *et al.*, 2013).

Es parte aglicona de solasonina y presenta actividad hemolítica (concentración de eritrocitos - glóbulos rojos) y actividad tóxica (Martínez, 2002). La concentración de solanina tóxica para humanos es de 2 a 5 mg/kg de peso corporal (Tajner-Czopek *et al.*, 2007).

La solasonina, que contiene glicósidos posee actividades farmacológicas potencialmente útiles para mejorar la salud humana y es utilizado en la síntesis de esteroides. Su obtención se realiza a través de cultivos *in vitro* de tejidos provenientes de las hojas de la especie *S. marginatum* (Pinell *et al.*, 1998). Algunos preparados conteniendo glicosidos de solasonina son utilizadas en el tratamiento del cáncer en la piel (Borloz, 2009).

Un análisis del contenido de solasonina en tres estados de madurez de los frutos de *S. marginatum* presentes en Ecuador, encontró que los frutos verdes contienen 2,18%, los frutos pintones 2,23% y los frutos maduros 2,24% (Sanabria, 2009). Al realizar otro método de evaluación como el de Birner, determinó que el contenido de solasonina varió en los frutos verdes 2,5% y pintones 2,3%, observándose que al llegar a la madurez el contenido del alcaloide decrece a 1,4% (Sanabria, 2009).

La mayoría de los glicoalcaloides esteroides (solanina, tomatina, solangustidina, solasonina, etc.) presentes constituyen venenos protoplasmáticos y hemolíticos, asemejándose por su actividad a las saponinas (Espil, 2012).

1.5.3. Nicotina

La nicotina (Figura 3), se produce en altas cantidades en la misma planta (*Nicotiana tabacum*), pero también se halla en menor concentración en otras especies de solanáceas como por ejemplo, plantas de papa, frutales tomate, berenjena y el pimiento. Este alcaloide se ha encontrado en todos los órganos de la planta. Su principal función en los vegetales es actuar como defensa ante los herbívoros, siendo una excelente neurotoxina, en particular contra los insectos. De hecho la nicotina se la empleado por muchos años como insecticida, siendo su uso desplazado actualmente por moléculas sintéticas derivadas de su estructura (Furer *et al.*, 2011). A bajas concentraciones la nicotina actúa como un estimulante para los mamíferos, siendo ésta la causa de la dependencia de los fumadores.

Se le considera a la nicotina un alcaloide altamente tóxico en dosis desde 40 a 60mg/100g que puede llegar a ser letal. Se lo puede ingerir de varias maneras como: absorbido por la mucosa oral, las vías respiratorias y por la vía subepidèrmica. Produce por vía oral trastornos gástricos e intestinales con vómitos, náuseas sialorrea y diarreas. Conjuntamente produce cefaleas, palpitaciones arritmias y vasoconstricción. Los trastornos visuales y auditivos son muy frecuentes. En pequeñas dosis induce temblores, hipertensión arterial y estimulación de la respiración, mientras que en gran cantidad puede provocar convulsiones y parálisis respiratoria. Al probar en altas dosis acaba actuando como el curare (*Strychnos*

toxifera), que es una planta tóxica de América del Sur, la cual produce parálisis de los músculos respiratorios y la muerte, a corto plazo por su acción gangliopléctica (Nogué *et al.*, 2009).

La producción de nicotina es un mecanismo de defensa en la planta de tabaco contra insectos herbívoros. Sin embargo, las plantas no tienen un compuesto específico, sino una combinación de compuestos y de su interacción para tener un efecto eficiente y efectivo (Zavala, 2010).

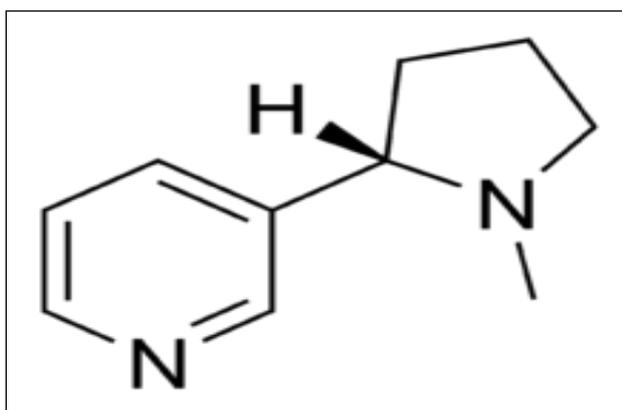


Figura 3. Estructura química de la Nicotina

Fuente: Furer *et al.*, 2011.

1.5.4 Anabasina

La anabasina (Figura 4) es un alcaloide isómero de la nicotina que se encuentra también en el tabaco y plantas de la familia quenoportáceas como *Anabasis aphylla*. Su fórmula elemental es $C_{10}H_{14}N_2$ (Furer *et al.*, 2011). Es un agonista del receptor nicotínico. En altas dosis produce un bloqueo despolarizante de transmisión nerviosa.

Según Anguisaca *et al.*, (2011) y Hans y Wolfgang (1987), afirman que el consumo de este alcaloide provoca malformaciones congénitas, esto en base a un estudio realizado cuando cerdas gestantes han consumido hojas de tabaco y plantas silvestres pertenecientes al mismo género en períodos específicos de la gestación.

La anabasina se ha identificado como un compuesto teratogénico que puede afectar porcinos, bovinos, ovinos y caprinos. La teratogénesis se manifiesta principalmente como artrogriposis y/o paladar hendido, dependiendo de la especie de *Nicotiana* y su contenido de anabasina, puede llegar a constituir el 99% de los alcaloides presentes en *N. glauca* (Lee *et al.*, 2006).

En cerdas gestantes el suministro de tallos de *N. tabacum* ocasionó artrogriposis en las crías, con flexión o extensión de los miembros delanteros en una posición fija a nivel del codo o el carpo, anquilosamiento de las articulaciones y miembros delanteros cruzados o pegados al tórax. Por otra parte, ovejas gestantes que consumieron *N. glauca* a dosis de anabasina de 1.99 a 3.42 mg/kg de peso, presentaron signos de intoxicación que incluyeron salivación excesiva, ataxia, incoordinación, recumbencia y muerte (Díaz, 2009).

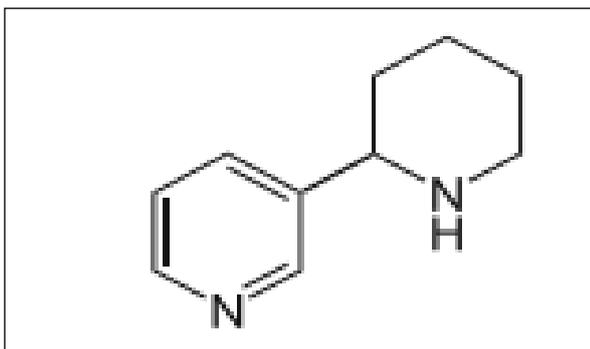


Figura 4. Estructura química de Anabasina

Fuente: Furer *et al.*, 2011.

1.5.5 Tomatina

La tomatina (Figura 5), está formada por la tomatidina, unida a cuatro moléculas de azúcares. La α -tomatina conocida también como tomatina o licopersicina es un glicoalcaloide de la clase de las saponinas que se encuentra en las plantas del tomate (especialmente en los tomates verdes). El principal sitio de síntesis de es en el tejido meristemático tomatina l Está compuesto por una aglicona de origen terpénico-esteroidal, la tomatidina y una cadena

ramificada de azúcares unidas ambas por un enlace glicosídico (Friedman, 2006; Raddick, 1986).

La tomatina es un insecticida y fungicida natural que forma una barrera natural contra microorganismos como hongos fitopatógenos y algunas bacterias (Díaz, 2009). Este alcaloide tiene actividad contra varias bacterias y hongos, actuando en la planta como un metabolito de defensa contra un amplio espectro de agentes fitopatógenos gracias a un mecanismo de acción basado en la interacción de membranas celulares (Forner, 2015).

En los humanos este alcaloide se caracteriza por sus múltiples actividades biológicas, Se lo puede usar en tratamientos terapéuticos como antiinflamatorio y antitumoral (Maxwell *et al.*, 1996).

Los glicoalcaloides son mal absorbidos por el tracto gastrointestinal en los mamíferos, pero una cantidad apreciable de estos glicoalcaloides se hidroliza en el intestino, separándose la tomatidina; esta fracción es la parte tóxica de la tomatina, pero es necesario cantidades relativamente grandes de estos compuestos para causar la muerte (Forner, 2015).

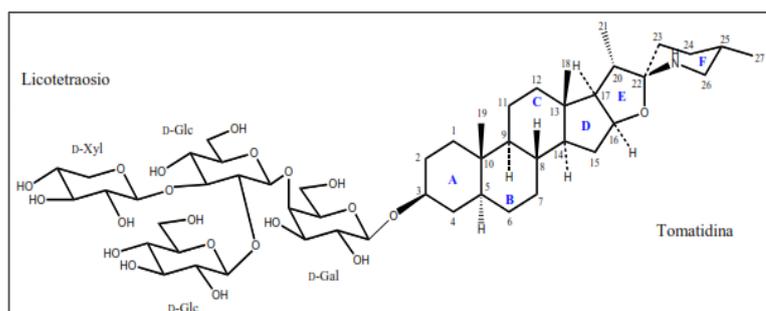


Figura 5. Estructura química de la Tomatidina

Fuente: Maxwell *et al.*, 1996.

1.5.6 Solasodina

La solasodina (Figura 6) es un alcaloide utilizado mayormente para investigaciones con animales como calmantes, antiinflamatorio diurético, dolor de cabeza, antibacterial y para tratamiento de anticilostomatosis (Bell *et al.*, 1942).

En un ensayo realizado con papa, se determinó que al extraer los brotes que fueron consumidos por los conejos, se observó la disminución en la viabilidad de los neutrófilos al 0%, a una concentración de 12.5 mg de brotes/ml. De igual forma, a una concentración de 0.5 mg de brotes/ml, la α -solanina disminuye la viabilidad a 0% y la solasodina a un 50 % (Martínez, 2002).

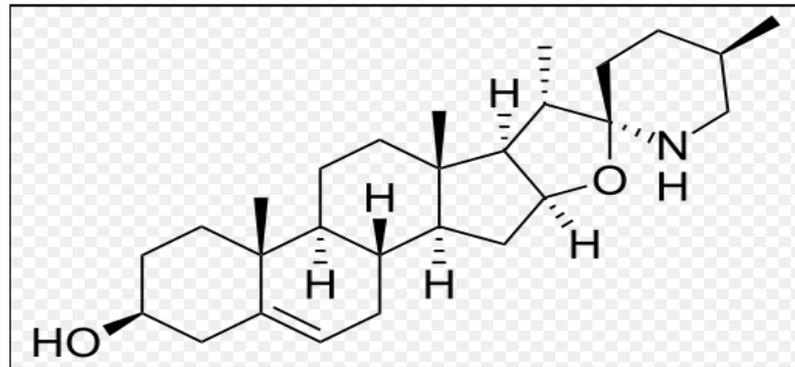


Figura 6. Estructura química de la Solasodina

Fuente: Bell *et al.*, 1942.

1.6 Género Meloidogyne

1.6.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del nematodo *M. incognita* (Taylor & Sasser, 1983) corresponde a:

- Reino: Animal
- División: Nematelmitos
- Clase: Nematoda
- Orden: Tylenchida
- Superfamilia: Meloidogyne
- Familia: Heteroderidae
- Subfamilia: Meloidogynae
- Género: *Meloidogyne*
- Especie: *incognita*

1.6.2 Ecología y distribución

Los nematodos de este género *Meloidogyne spp*, son conocidos como nematodos agalladores, debido a que inducen la formación de engrosamientos en las raíces infestadas, llamadas agallas, y son un grupo importante de patógenos de vegetales. Su amplia distribución, su amplio rango de hospedantes, su capacidad de reducir los rendimientos y calidad de los productos, su capacidad de asociarse a otros microorganismos (hongos, bacterias) y lo difícil de su control hacen que estos nematodos sean considerados los más importantes en el mundo (Crozzoli, 2014).

Según Siddiqi (2000), existen 80 especies de *Meloidogyne*, sin embargo cuatro son las causantes de más de los 95% de los daños que este grupo ocasiona en cultivos agrícolas. Estas especies de acuerdo a su orden de mayor distribución y de daños que ocasionan son: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. arenaria*. Otras especies que revisten importancia y que están presentes en América tropical y subtropical son: *M. arabicida*, *M. cruciani*, *M. exigua*, *M. enterolobii*, *M. oryzae*, *M. paranaensis* y *M. salasi*. Especies presentes en otras latitudes e igualmente importantes son: *M. artiellia*, *M. chiwoodi*, *M. citri*, *M. decalineata*, *M. ethiopica*, *M. graminícola*, *M. lusitánica*, *M. mali*, *M. megadora*, *M. naasi*, *M. ottersoni*, *M. querciana* y *M. sinensis*.

Se desconoce el hábitat original de las especies de *Meloidogyne*, la amplia distribución del material vegetal infestado por estos nematodos dificulta reconocer entre las especies nativas de una región, de las especies introducidas y adaptadas a un determinado clima, ya que son capaces de existir indefinidamente, sin embargo algunas especies introducidas son capaces de sobrevivir solo unos pocos meses o unos cuantos años (Moens *et al.*, 2009).

En climas fríos donde la media de temperatura del mes más frío del año es de cerca de 0°C o inferior, y el promedio de temperatura del mes más cálido del año es

cerca de 15°C, la especie más común es *M. hapla*. La información actual indica que *M. hapla* está adaptada para una existencia prolongada en el norte de los Estados Unidos y en el sur de Canadá, en el norte de Europa y en el norte de Asia. En América del Sur, se encuentra a partir de los 40° de latitud sur y en las regiones más comunes del lado occidental del subcontinente (Crozzoli, 2014).

En la zona tórrida, las especies más comunes son *M. incognita* y *M. javanica*. En Norteamérica y Suramérica, *M. javanica* se encuentra muy escasamente sobre los 30° de latitud norte y 35° de latitud sur, y se va haciendo más común a medida que nos acercamos al Ecuador. En muchas partes de la zona tórrida de África, Australia y el sur de Asia, *M. javanica*, probablemente es la más común, sin embargo *M. incognita* y *M. arenaria* también se encuentra ampliamente distribuidas en las mismas regiones (Crozzoli, 2014).

Así las partes del mundo entre 35° de latitud sur y 35° de latitud norte están ampliamente infestadas por tres especies (*M. javanica*, *M. incognita* *M. arenaria*) adaptadas a una existencia permanente en climas cálidos. En el hemisferio norte a más de 35° de latitud, *M. hapla* es la más común (Taylor & Sasser, 1983; Karssen & Moens, 2006).

Triviño (2004), indicó que *Meloidogyne spp.*, es el nematodo plaga de mayor importancia económica en Ecuador y que se encuentra distribuido en todos los estratos geográficos. De igual forma indica que dentro de este género, *M. incongnita* es la especie más abundante con el 80% de incidencia, sobre todo en áreas climáticas cálidas, incluyendo los valles de la sierra en cultivos como frutales, hortalizas, flores de corte y especies ornamentales.

1.6.3 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Meloidogyne spp.* (Figura 7), comienza en el estado de huevo, usualmente en estado celular, depositado por una hembra, la cual está completamente o parcialmente embebida dentro de la raíz de la planta hospedera. Los huevos son depositados dentro de un saco gelatinoso, llamado matriz la cual

sostiene conjuntamente las masas de huevos que puede llegar hasta en número de mil (Taylor & Sasser, 1983).

Los huevos depositados comienzan su desarrollo unas horas después de su eclosión, hasta completar una larva formada con un estilete visible y una envoltura falsa como membrana del huevo, formándose así el primer estadio, que puede ser móvil en el huevo, pero no es muy activo. Posteriormente ocurre una muda dentro del huevo y la larva emerge haciendo repetidos pinchazos en la falsa cutícula, a este estado se lo conoce como juvenil 2 (Taylor & Sasser, 1983).

En este estado la larva puede o no salir de la masa gelatinosa, normalmente hay larvas en las masas de huevos y huevos en varios estados de desarrollo; luego las larvas empiezan a salir poco a poco de las masas gelatinosas y se mueven a través del suelo en busca de una raíz sobre la cual alimentarse. La larva es guiada por algunas sustancias emanadas por las raíces y se mueven directamente al extremo de la raíz (Taylor & Sasser, 1983; Eisenbanck & Hunt, 2009).

Según Eisenbanck y Hunt (2009), estos microorganismos se caracterizan por presentar un dimorfismo sexual, las hembras son abultadas, más o menos periformes o redondeadas, mientras que los machos son vermiformes. Los juveniles son de forma vermiforme en su segundo estadio temprano y obesas en su estadio tardío (tercero y cuarto estadio).

Son endoparásitos obligados de las raíces, aun cuando se pueden encontrar en tallos aéreos, bulbos, rizomas y hasta en las hojas. El ciclo de vida de las especies de *Meloidogyne* es esencialmente el mismo, sin embargo, algunos autores (Eguiguren, 1982), menciona que el tipo de hospedero y las condiciones ambientales modifican el ciclo. La duración del ciclo depende mucho de la temperatura. En ambientes menores a 5°C y mayores a 40°C, la actividad es muy baja, de este modo, a 14°C por ejemplo, el ciclo es de 56 días, mientras que, alrededor de 26°C es de solo 21 días.

Taylor y Sasser (1983), en un estudio con *S. lycopersicum*, indicaron que la muda de *Meloidogyne spp.* se produjo entre 8.5 y 11 días, cuando la temperatura fluctuó entre 22 y 26 °C; en tanto que, el segundo estadio larval infectivo emergió entre los 15 y 17 días. Un gran número de larvas penetró en las raíces en 24 horas y que las larvas se hicieron sedentarias en posición alimenticia en 2 ó 3 días. El cuerpo comenzó a ensancharse más o menos en 6 días después de la penetración y la diferenciación sexual fue evidente luego de 12 días. La segunda muda ocurrió a los 18 días, seguida por la tercera muda entre 18 y 24 días. Entre los 24 y 30 días, la hembra creció rápidamente y la matriz gelatinosa se apreció después de 27 a 30 días. Los huevos fueron depositados a partir del trigésimo al cuadragésimo día. En conclusión, una vez que el nematodo cumple su ciclo de vida, emerge de determinada manera de acuerdo al ambiente y en base a la temperatura y humedad existente.

Al inicio de sequía los huevos están sujetos a un estrés osmótico, cesando una continua emergencia y desarrollo de los huevos, de modo que todos los huevos viables pronto contendrán segundos estados larvales. Si se vuelven muy secos las larvas mueren, pero las larvas sobreviven hasta comienzos de la temporada lluviosa, cuando las larvas pueden emerger e infectar las plántulas (Taylor & Sasser, 1983).

Si un suelo agrícola es utilizado para cultivos anuales susceptibles, su distribución es casi la misma que la de las raíces de la planta cultivada. La mayoría de la población se localiza de 5 a 30 cm debajo de la superficie del suelo, disminuyendo su densidad hasta 1 m de profundidad. Por otra parte en suelos con gran porcentaje de arcilla, el daño del nematodo es mínimo, y se convierte en máximo en suelos arenosos. Si el pH del suelo está en un intervalo de 4.8 a 8.0 tiene poco efecto directo en las actividades de *Meloidogyne* (Taylor, 1968).

Para poder entender mejor el ciclo de vida, se debe diferenciar los estados larvales hasta llegar a un adulto, como se indica a continuación:

Huevos. El ciclo de vida se inicia a partir de huevos en estado unicelular, que son depositados por la hembra y permanece en la raíz. Cuando la hembra está implantada en la raíz, deposita los huevos en una ooteca (sustancia gelatinosa); pero con mucha frecuencia la vulva queda expuesta a la superficie y la masa de huevos se forma por fuera conteniendo una cantidad aproximada de 500 huevecillos en cada una (Eisenbanck & Hunt, 2009).

Primer estadio larval (J1). Empieza con el desarrollo del huevo pocas horas después de la oviposición, resultando en 2, 4, 8 o más células hasta formar una larva con un estilete que puede movilizarse dentro del huevo, la misma que no es muy activa. Hasta esta etapa se tiene el primer estado larvario y en él sucede la primera muda (Triviño & Escobar, 2003).

Segundo estadio larval (J2). Una vez que llega al segundo estado larvario, la larva emerge del huevo si las condiciones ambientales son favorables, y empieza su fase parasítica, empezando con la penetración en las raíces, llegando con cabeceos hasta la estela de desarrollo, cerca de la zona de elongación celular y se localiza en el córtex. Las paredes celulares son atravesadas con el estilete y secreciones (ciertas enzimas llamadas pectasas contenidas en su saliva) de la glándula esofágica son inyectadas, provocando elongación de las células en el cilindro vascular e incrementan la tasa de división en el periciclo. Esto conduce a la formación de células gigantes, ensanchamiento del núcleo y cambios en la composición del contenido celular, resultando en engrosamiento de las raíces (agallas) (Taylor & Sasser, 1983).

Taylor y Sasser (1983), mencionan que el citoplasma de una célula gigante contiene 10 veces más proteína que el de una célula normal, al igual que las trazas de carbohidratos y grasas. Por otro lado, al mismo tiempo que ocurre la hipertrofia, se produce una intensa multiplicación de las células vegetales (hiperplasia) como un mecanismo de defensa de la planta, que trata de bloquear el avance del nematodo a través de una división anormal de las células lindantes. Todos estos cambios son acompañados por el engrosamiento de la raíz para la formación de las agallas.

Tercera muda y estado adulto. En individuos como hembras, una vez que termina la segunda y tercera muda, el estilete y el bulbo medio esofágico desaparecen. Posteriormente en la cuarta muda, estas estructuras se regeneran, se forma el útero y la vagina, y adquieren una forma ensanchada como de pera. En comparación, en el macho después de la segunda y tercera muda, el estilete no es muy visible, el bulbo medio se degenera y solo la gónada se alarga. Finalmente, ocurre una metamorfosis y el cuerpo alargado del nematodo posee el estilete, esófago con el bulbo medio, espículas y esperma en los testículos (Jenkins & Taylor, 1968).

Después de la cuarta muda, el macho adulto, puede abandonar o no la raíz a través del suelo. Por su parte, la hembra permanece de modo sedentario en la raíz y deposita los huevos en una ooteca (Jenkins & Taylor, 1968).

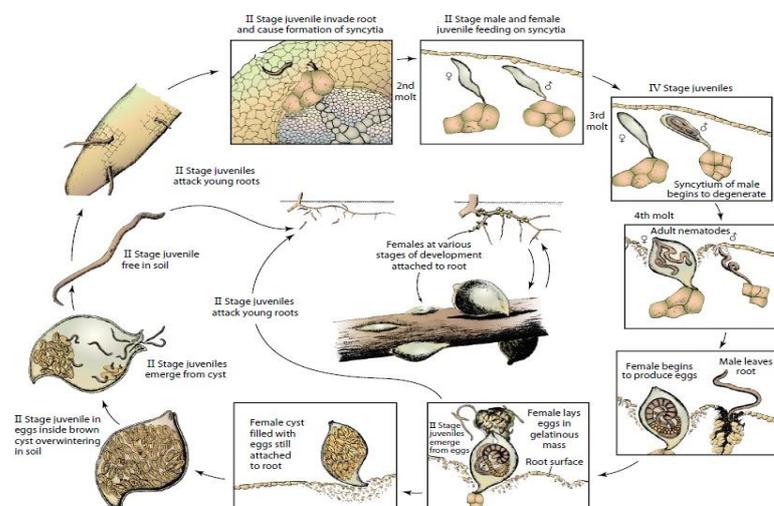


Figura 7. Ciclo de vida de *Meloidogyne incognita*

Fuente: Agrios, 2012.

1.6.4 Reproducción

La reproducción se realiza por fertilización cruzada (Anfimixis) reproducción de dos seres diferentes de sexos diferentes) dependiendo de la especie de nematodos que se trate. Si en la reproducción hay la carencia de machos, los nematodos poseen un mecanismo facultativo de reproducción por partenogénesis meiótica este es el

caso habitual o, más escasamente por hermafroditismo. El proceso de partenogénesis se inicia en el extremo distal de las gónadas donde existen células que se dividen formando oogonios, después las células maduran y por una nueva división mitótica se forma el oocito. Posteriormente comienza la maduración del huevo conservando el número diploide de cromosomas (Perry *et al.*, 2009).

El Sistema reproductor de la hembra de *Meloidogyne* consiste de dos ovarios, cada uno con una zona genital, zona de crecimiento, oviducto, espermateca y útero. El útero conduce a la vagina. En la instancia final del sistema reproductor del adulto, las células germinales se dividen muchas veces formando oogonios, con número somático de cromosomas $2n$. La mayoría de oogonios detiene la división para convertirse en oocitos, los cuales pasan a través de la zona de crecimiento, haciéndose cada vez más grandes y pasando por el oviducto y la espermateca. Otra división mitótica tiene lugar y los huevos se vuelven ovalados y forman una cubierta flexible, finalmente pasan a través de la vagina y son depositados en masas de huevos en un primer estado celular. Este tipo de reproducción es llamada partenogénesis y es usual en *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* y otras especies. Los cromosomas diploides son preservados, la esperma no es necesaria, no hay fecundación (Eisenbanck & Hunt, 2009).

Todas las especies con reproducción partenogenética tienen machos en un número que varía de acuerdo al suplemento del alimento y otros factores (condiciones adversas, como disminución de la calidad de alimento e infecciones graves en plantas viejas). Cuando la alimentación está en abundancia, la mayoría de larvas se desarrollan como hembras. En este tipo de reproducción, los huevos reducen su número de cromosomas a $1n$ y se desarrollan normalmente sin fecundar (Eisenbanck & Hunt, 2009).

En el caso de la hembra la determinación del tiempo de vida no ha sido estudiado, por observaciones realizadas en el campo, Taylor y Sasser (1983) indican que las hembras continúan produciendo huevos durante dos o tres meses y viven por algún tiempo, después de que la producción de huevos se detiene.

1.6.5 Sintomatología

La formación de agallas es un síntoma de ataque del nematodo, sin embargo la detección de una infección por nematodos mediante la observación de la parte aérea de la planta es difícil, ya que las deficiencias nutricionales e hídricas son esencialmente las mismas resultantes de una patología ocasionada a nivel radicular. Las plantas afectadas se presentan débiles y poco resistentes a la sequía, sus hojas son cloróticas y se desprenden fácilmente, en forma general se puede observar en el cultivo parches amarillentos con plantas pequeñas y marchitas (Agrios, 2012).

La presencia de raíces agalladas no siempre se puede dar por hecho que es, una especie de *Meloidogyne* porque también causan agallas las especies de otros géneros de nematodos como *Nacobbus* spp., *Meloidodera* spp y otros géneros de nematodos, o ser causadas por otros microorganismos como *Plasmodiophora brassicae*, o por nódulos de *Rizhobium* spp. En leguminosas, las cuales pueden ser confundidos con las agallas de nematodos del nódulo de la raíz (Agrios, 2012).

La sintomatología particular para *Meloidogyne* spp (figura 8) son raíces infectadas con agallas, las cuales forman ramificaciones cortas que nacen de la parte superior de la agalla formando un sistema radicular muy denso y tupido. En raíces altamente infestadas, se puede observar un acortamiento y disminución de las raíces laterales y de los pelos radiculares, así como una pudrición o necrosamiento. Las lesiones en las raíces favorecen posteriores invasiones de hongos, bacterias, virus y otros nematodos que causan también pudriciones, causando posteriormente hasta la muerte de la planta (Eisenbanck & Hunt, 2009)

Fraga (1984) y (Arias *et al.*, 2009), mencionan que por efecto del agallamiento, en el follaje se observa sintomatología de clorosis, necrosis, disminución del ritmo de crecimiento y achaparramiento general. En algunos casos la planta muere, pero si esto no sucede, su producción disminuye completamente.



Figura 8: a) Raíz sana tomate riñón b) Raíz infectada con *Meloidogyne incognita*

1.6.6 Interacciones entre *Meloidogyne spp* con otros fitopatógenos

Crozzoli (2014) menciona que *Meloidogyne incognita* es la especie del nematodo agallador más común y difundida del mundo, ha causado pérdidas de rendimiento en innumerables cultivos, hortalizas de la familia Solanaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Liliaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Umbelliferae, Cruciferae, Hypericace y Malvaceae, siendo también muy patogénica en la mayoría de los cultivos industriales, ornamentales y frutales. Las infecciones ocasionadas en los cultivos frecuentemente son resultado de interacciones entre nematodos especialmente del género *Meloidogyne spp*, ya que perforan las raíces con sus estiletes y dejan entrada libre para otros microorganismos patógenos como hongos, bacterias, virus hacia el interior de la raíz (Revelo J. , 2003; Manzanilla & Marbán, 2012).

En el caso de los nematodos pertenecientes a la familia Dorylaimidae que son transportadores de virus vegetales, pueden transmitir la enfermedad de planta en planta, se conoce de géneros como *Longidorus spp*, *Xiphinema spp*, *Trichododru spp*, que son trasmisores de virus, algunas de éstas interacciones y complejos de enfermedades se han descrito por autores (Barbetti *et al.*, 2006; Haseeb *et al.*, 2005; Back *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2001; Dullarhide *et al.*, 1994).

Son polífagos se alimentan de forma ectoparasitaria de raíces de plantas perennes y de ciclo corto, eventualmente la raíz principal deja de crecer y se desarrollan raíces laterales que también son atacadas, formándose un sistema radicular muy pobre y con raicillas muy cortas, hasta que la planta queda muy débil, susceptible a la entrada de otros patógenos que en asociación pueden llegar a tener otras enfermedades, produciéndose hasta la muerte de la planta (Revelo J, 2003).

Existen varias interacciones de la enfermedad hongos-nematodos, por ejemplo marchitez causada por *Fusarium*, ahogamiento de las plántulas por *Pythium aphanidermatum* pudrición de la raíz por *Rhizoctonia*. *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora parasítica*, *Ralfstonia spp* y *Agrobacterium tumefaciens* entre otros (Roberts, Smith, Mathews , & W. C., 1985).

Variedades de plantas que son susceptibles a estos hongos sufren daños mucho más graves cuando son infectados por nematodos. Además, variedades resistentes a estos hongos son infectados por ellos una vez que han sido lesionadas previamente por nematodos. A diferencia de lo anterior, se conocen pocos casos de interacciones de nematodos con bacterias. Algunas de las enfermedades más comunes constituyen el marchitamiento del tabaco causado por *Pseudomonas solanacearum* y *M. incognita*, y la marchitez bacteriana del clavel ocasionada por *Pseudomonas caryophylli* y *Meloidogyne spp*. Karssen y Moens (2006), concluyeron que las plantas que crecen a campo abierto están constantemente expuestas a padecer infecciones múltiples del sistema radicular. Los nematodos son componentes móviles del suelo y al penetrar en las raíces de las plantas, producen cambios fisiológicos en el hospedero, afectando su susceptibilidad a los patógenos.

1.6.7.- Identificación de especies *Meloidogyne spp*

La identificación de especies de *Meloidogyne* se facilita cuando se analizan todos los factores relacionados con el entorno como localidad, clima, relaciones botánicas del hospedante y plantas relacionadas (Eisenbanck & Hunt, 2009).

La morfología básica es bastante similar, así como su morfometría, sin embargo, existen ciertos caracteres distintivos en hembras, machos y juveniles de segundo estadio que son de utilidad en su identificación. Estos caracteres incluyen la morfología de la cabeza en las hembras (Figura 9), machos y juveniles del segundo estadio y la morfología del estilete de las hembras y machos (Eisenback *et al.*, 1983).

Los modelos perineales de las hembras y las formas de la cabeza de los machos parecen ser las características más útiles. Para obtener patrones perineales típicos o promedios de longitud larval es necesario examinar una muestra representativa de una población. Esta muestra debe contener nematodos de varias partes del campo y es muy importante que sean examinadas por lo menos de 10 a 20 hembras o larvas (Eisenbanck & Hunt, 2009).

Las hembras se caracterizan por ser hinchadas, en forma de pera o de limón, mientras que los machos por poseer espículas en el extremo, con una cola redonda y carente de bursas. Las larvas del segundo estadio son delgadas y de cola aguda, con estilete mediano a fuerte y su esófago en forma inclinada en la unión con el intestino (Eisenbanck & Hunt, 2009).

El modelo perineal de la hembra comprende la parte final de la cola, fasmidios, líneas longitudinales, ano o desembocadura de la glándula matriz y vulva, rodeados por pliegues cuticulares o estrías. El diseño perineal de individuos y poblaciones dentro de la misma especie varía, sin embargo, las características básicas no cambian significativamente, éstas incluyen la forma (circular, oval, periforme o de reloj de arena), la presencia o ausencia de marcas en las áreas laterales y de puntuaciones al final de la cola, la forma de las estrías (lisas, enteras, onduladas, quebradas, zig-zag), y si las estrías forman alas en uno o ambos lados de diseño. Pueden existir diferencias significativas entre especies y poblaciones con respecto a la posición relativa de la vulva, ano, terminación de la cola y fasmidios (Hunt & Handoo, 2009; Perry *et al.*, 2009).

Los modelos perineales de *M. incognita* tienen un arco dorsal alto formado por estrías que pueden ser desde lisas hasta onduladas. Algunas estrías se bifurcan cerca de las líneas laterales las que no están claramente visibles. Frecuentemente se observan estrías que se dirigen hacia la vulva. El arco dorsal alto y cuadrado es la característica determinante para identificar esta especie (Hunt & Handoo, 2009).

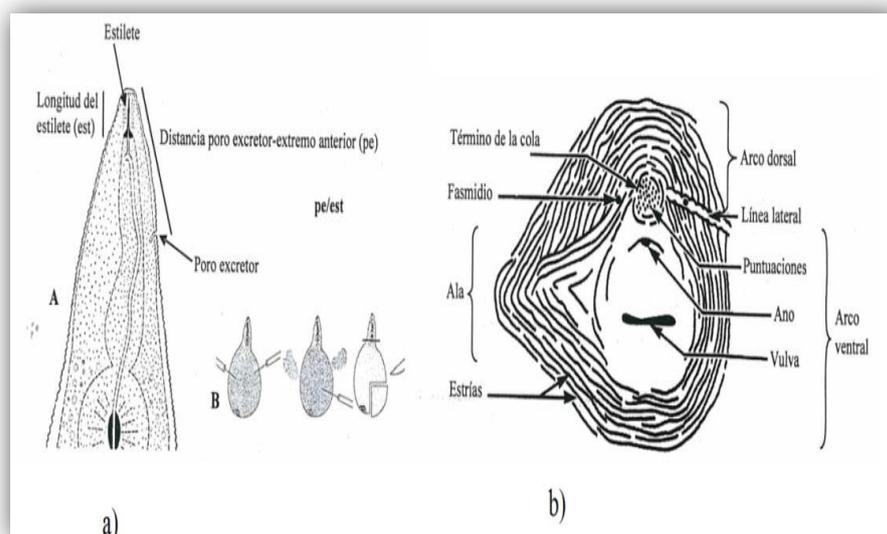


Figura 9: a) Cabeza de la hembra. b) corte perineal
Fuente: Eisenback, 1983.

En la especie *M. arenaria*, el carácter determinante son las líneas laterales visibles que separan las estrías dorsales de las ventrales. Posee el arco dorsal con “hombros” formados por ondulaciones pronunciadas de las estrías dorsales cerca de las líneas laterales. Las estrías se bifurcan también cerca de las líneas laterales, siendo éstas las características más importantes. Por otro lado, la forma hexagonal, redondeada u ovalo aplanado, y la presencia de puntuaciones en el área en que termina la cola, son los caracteres determinantes para *M. hapla* (Eisenback *et al.*, 1983).

M. incognita representa alrededor del 52% de las especies de este género. Está presente donde el promedio anual de temperatura fluctúa entre 18 a 30° C y la temperatura alta óptima mensual es aproximadamente de 27°C (Hunt y Handoo, 2009).

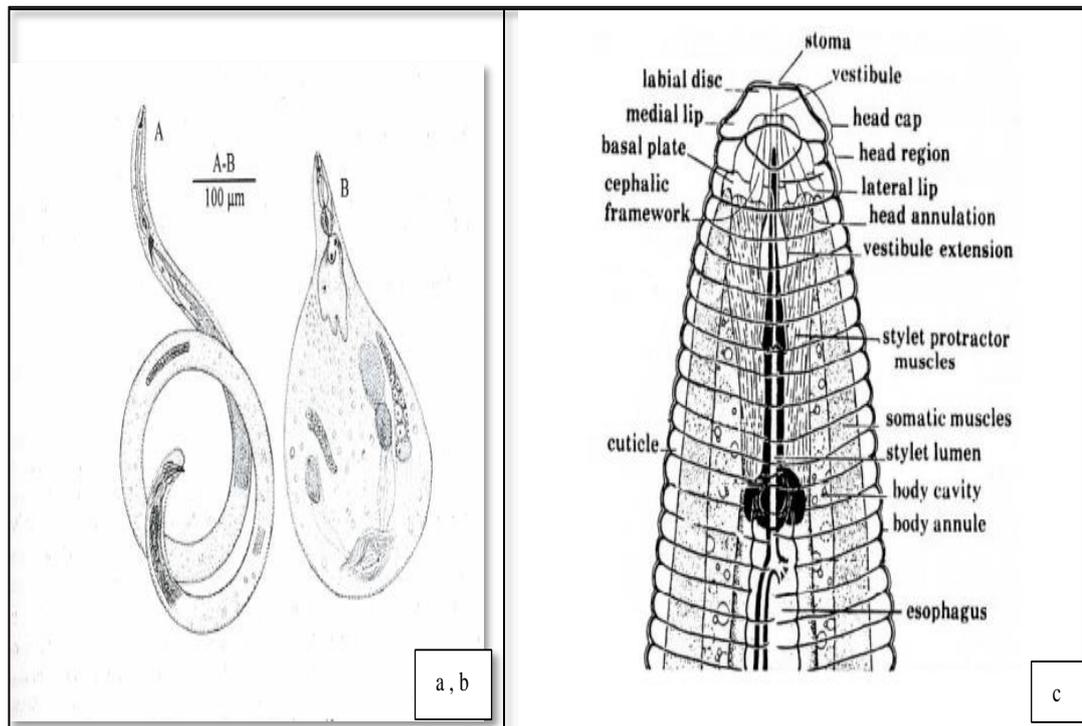


Figura 10: a) Macho de *Meloidogyne*, b) hembra, c) Parte de la región cefálica de un macho *Meloidogyne spp*

Fuente: Karsen y Moens, 2006.

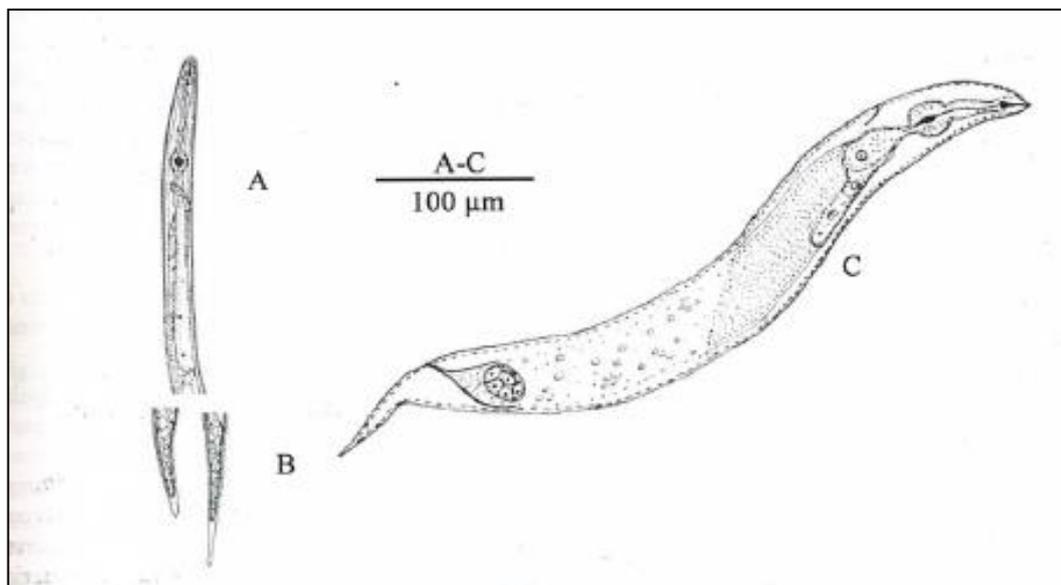


Figura 11: a) Juvenil de segundo estadio. b) Hembra joven envuelta por las cutículas de segundo, tercero y cuarto estadio, c) Juvenil de segundo estadio vermiforme *Meloidogyne spp*

Fuente: Karsen y Moens, 2006.

1.6.7.1 Medidas Morfométricas

Para determinar los caracteres importantes del nematodo, existen diferencias significativas que se pueden determinar con las medidas morfométricas. Dentro de esta variabilidad de caracteres morfológicos se destacan la región cefálica o cabeza, labios, boca, cavidad bucal, cuello, la base de la faringe y cola. La cabeza posee una delicada estructura cefálica, el disco labial es ligeramente levantado y está fusionado con los labios medios y laterales, posee dos anfidios y diez pequeñas unidades sensoriales alrededor del estoma del estilete.

El estilete promedia entre 10 a 25 micras, en la mayoría de las especies, el cono es ligeramente curvado y el eje es recto e incluye tres nódulos basales, la forma de los nódulos basales del estilete varía de redondeada a transversalmente alargada y posteriormente pueden ser inclinados. La abertura de glándula esofágica dorsal (DGO) está localizada entre 2.5 a 9 micras detrás de los nódulos del estilete.

Las hembras inmaduras se caracterizan por la estructura de los campos laterales que poseen el mismo estadio, mientras que los machos por los anillos cuticulares, la presencia de anfidios que se abren en la región de los labios, estilete hueco en la pared axial del estoma que sobresale para su alimentación, sistema excretor con un único campo lateral, faringe, procorpus anterior, metacorpus con placas, istmo rodeado de anillos nervioso, pared del cuerpo con fibras musculares longitudinales. La posición de la vulva y la cantidad de anillos del cuerpo entre la vulva y el ano en las hembras inmaduras y machos, es uno de los caracteres menos variables, por lo cual constituye un parámetro de excelente valor de diagnóstico para la especie (Perry *et al.*, 2009).

El macho es vermiforme (figura 10), no sedentario, claramente anillado y con un rango de longitud de 600 a 2500 micras. La cabeza está compuesta de un anillo post-labial. La región de la cabeza puede ser compensada y/o en parte subdividida por una cisura transversal o anillamientos. La capa protectora de la cabeza tiene un largo disco labial redondeado y está usualmente fusionado con los cuatro labios medios. Seis labios interiores están centrados alrededor de la abertura oral y una

sensilia cefálica está presente en cada labio medio, las aberturas anfidiales están localizadas entre el disco labial y el labio lateral, en algunas especies de *Meloidogyne* estos labios laterales son reducidos o están ausentes. El estilete y la región cefálica están bien desarrollados, los rangos de estos últimos varían de 13 a 33 micras. (Hussey & Janssen, 2002; Perry *et al.*, 2009).

La abertura de la glándula dorsal (DGO) está localizado 2 a 13 micras, atrás de los tres nódulos basales del estilete; la forma del nódulo basal del estilete es como la de las hembras. En la mayoría de las especies el campo lateral tiene cuatro incisiones y las bandas de afuera son a veces areoladas, la cola es muy corta, pequeña, redondeada y sin bolsa, los fasmidios están localizados cerca de la cloaca, las espículas son finas y de 20 a 40 micras de largo, mientras que el gubernáculo tiene 10 micras de largo (Perry *et al.*, 2009).

Los juveniles de *Meloidogyne* (figura 11), son vermiformes, anillados y con rangos de longitud de 250 a 600 micras, la cabeza casi igual a la de los machos, más pequeña con una débil región cefálica esclerotizada. El estilete es recto tiene una longitud de 9 a 16 micras y la posición del DEGO (Dorsal Esophageal Gland Orifice) está de 2 a 12 micras detrás del nódulo basal del estilete.

La cola tiene de 15 a 100 micras de largo y la punta de cola es estrecha y termina en una parte hialina, los fasmidios son pequeños y están localizados a un tercio de la longitud de la cola abajo del nivel del ano, los campos laterales tienen cuatro incisiones con bandas usualmente areoladas, la tercera etapa juvenil y cuarta etapa son sedentarias están localizadas dentro de la raíz; no tienen estilete y se desarrolla dentro de la cutícula de la larva. (Perry *et al.*, 2009).

1.6.7.2 Identificación de *Meloidogyne incognita* por Técnicas Moleculares

Para la identificación de las especies de *Meloidogyne* por los métodos tradicionales, se ha determinado que no es exacta, por lo tanto se han buscado otras alternativas basados en marcadores moleculares específicos para identificación de

especies, tales como sondas de ADN y primers de PCR, los cuales se han enfocado principalmente en las especies de mayor interés como *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* (Velasco, 2005; Qui *et al.*, 2006).

La reacción en cadena polimerasa (PCR), es una metodología que tiene como objetivo principal la amplificación enzimática de una región determinada del genoma entre dos regiones conocidas del ADN, en este proceso una polimerasa trabaja a elevadas temperaturas de entre 79 y 85°C, de tal manera que la reacción del PCR simula la síntesis del ADN, como la que es producida en el interior de la célula (Dale *et al.*, 2011).

Al realizar una PCR, es importante tener en cuenta las condiciones y componentes que esta técnica involucra, la presencia de primers que conllevan las partes conocidas del ADN que se desean amplificar, dNTP's (dinucleótidos trifosfatados) que constituyen las bases nucleotídicas de la cadena complementaria, cofactores como el MgCl₂ y un amortiguador de reacción o Buffer que optimiza la actividad del ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa o *Pful*) (Espinosa, 2007; Adams *et al.*, 2009).

La Metodología de la PCR posee una alta sensibilidad, al ser una técnica cuantitativa existe una probabilidad muy alta de obtener falsos positivos por contaminación (Okada, 2010). Por lo tanto es necesario optimizar la temperatura precisa de los primers para detectar la unión de las partes conocidas del ADN que se quiere amplificar, así como mantener un adecuado manipuleo de los reactivos (Tesarova *et al.*, 2003).

La temperatura que se emplea en la técnica de amplificación (Dale *et al.*, 2011), que actuará sobre el ADN es: **a)** Desnaturalización: el ADN bicatenario por fusión de temperatura a 94°C por el período de un minuto se desnaturaliza hasta quedar una hebra sencilla de ADN monocatenario; **b)** Apareamiento o anelling: el diseño adecuado de primers se acopla a los sitios de reconocimiento específicos por complementariedad de bases utilizando como cebador el ADN al reducirse la

temperatura de recorrido (temperatura annealing 62.1 °C) de los imprimidores utilizados; y c) Polimerización o extensión: el ADN polimerasa coloca deoxynucleótidos (dNTP's) a lo largo de la extensión flanqueada por los primers de la secuencia problema, sintetizando una hebra complementaria de ADN a una temperatura de extensión de 72°C hasta que la polimerización sea inactivada a 94°C.

En los primeros ciclos de la PCR se sintetizan los primeros fragmentos a partir del ADN genómico, pequeños fragmentos que no tendrán el tamaño específico. Posteriormente al repetirse los ciclos de temperaturas se obtendrán los fragmentos del tamaño esperado, de tal forma que con cada ciclo la Taq polimerasa aumentará exponencialmente el número de fragmentos del tamaño esperado (Espinosa, 2007).

Actualmente, la prioridad de obtener técnicas confiables, precisas y prácticas para la identificación de especies de nematodos, ha ido incrementando rápidamente, debido a la implementación de nuevas metodologías, para la detección de nematodos patógenos, el manejo de plantas resistentes y el diseño de rotación de cultivos, ponen a prueba nuevas alternativas destinadas a mejorar la productividad en los cultivos (Jenkins & Taylor, 1968).

El empleo de regiones de ADN_r se está convirtiendo en la herramienta más utilizada para la identificación de especies de microorganismos patógenos del suelo (Zijlstra, 2000) ,por su amplia variabilidad, convirtiéndose en una “huella digital” que favorece la implementación de técnicas de diagnóstico ya que son específicos, muy sensitivos y permiten el análisis de un número considerable de muestras en menor tiempo que los métodos morfológicos o bioquímicos (Powers *et al.*, 2005).

Powers *et al.*, (2005), menciona que no existe uniformidad en la distribución de nematodos en suelo y raíz, esto hace que el diagnóstico de muestras por microscopia requiera de mucho tiempo y experiencia para realizar una identificación. Este proceso se va atenuando con la implementación de técnicas moleculares que tienden a mejorar la eficiencia y sensibilidad para el proceso, sin embargo la realización de la técnica de PCR en extracciones de nematodos para suelo y raíz se

dificulta debido a que existen contaminantes orgánicos e inorgánicos que interfieren atenuando o inhibiendo la acción de la Taq polimerasa (Siddiqi, 2000).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Zona de estudio

La presente investigación se realizó en los invernaderos de la Granja Experimental del Programa de Fruticultura del INIAP y en los laboratorios e invernaderos de Agrocalidad ubicados en el Cantón Quito, Parroquia Tumbaco de la Provincia de Pichincha, con una altitud de 2348 msnm, latitud 0° 13' 0" S y longitud 78° 24' 0" W. Las temperaturas promedios del invernadero fueron de 29°C y en el laboratorio de 23°C.

2.2 Periodo del inicio de la investigación

La presente investigación tuvo una duración de 12 meses iniciándose en noviembre del 2015 y culminó en el mes de octubre del 2016.

2.3 Diseño de la investigación

El diseño de la investigación se la realizó en tres fases: **fase de laboratorio** para el aislamiento del patógeno, la preparación del inóculo inicial, morfometría e identificación molecular; **fase de invernadero** en la cual se inoculó *M. incognita* en plántulas de Solanáceas silvestres para evaluar la respuesta a la infestación de *M. incognita* y por último una **fase de campo** en la cual se recolectaron frutos de tomate de árbol y naranjilla de plantaciones comerciales injertadas con las solanáceas silvestres para determinar su nivel de alcaloides.

2.4 Metodología

2.4.1 Obtención de las plántulas de solanáceas silvestres.

En los invernaderos del Programa Nacional de Fruticultura del INIAP, se germinaron semillas de las siete especies de solanáceas (Anexo 1, Figura 12), que

sirvieron para la obtención de plántulas que fueron utilizadas en la inoculación del nematodo *M. incognita* y poder evaluar la infestación y no infestación de las plantas al nematodo. Las semillas fueron sembradas en camas de germinación de 1 x 3 m de largo con un sustrato estéril (tierra negra más pomina, en una proporción de 2:1).

Se realizaron dos riegos por semana y fertilización cada 15 días con un fertilizante completo (Yaramila complex 10g/ planta). Se esperó tres meses para que las plántulas se desarrollen y posteriormente se trasplantó a macetas de 1 kg de capacidad, conteniendo el mismo sustrato estéril utilizado en la germinación. El mantenimiento de las mismas se basó en el manejo del Programa de Fruticultura de INIAP (riego, fertilización y controles fitosanitarios).



Figura 12: Semillero de las distintas especies de las Solanáceas.

2.4.2 Aislamiento del patógeno e inoculación

2.4.2.1 Obtención del patógeno

A partir del extracto obtenido de raíces de plantas de tomate de árbol que presentaban agallas y consecuentemente infectadas por el nematodo fitopatógeno, se obtuvo el inóculo inicial de *M. incognita*. Se utilizó el procedimiento de extracción de raíces por la técnica de (Stemerding *et al.*, 1963), (PEE/N//02) (Anexo 2) procedimiento específico de ensayo del laboratorio de Nematología (AGROCALIDAD, 2014).

Esta metodología consistió en recolectar las raíces de plantas infectadas de tomate de árbol, se lavó sus raíces con agua potable para eliminar tierra y evitar

desprender los sitios que contenían nodulaciones y presencia de masas de huevos. Posteriormente, se retaceó en pedazos pequeños de 2 a 5 mm y se licó en dos tiempos de 15 segundos, agitando por 3 minutos, se filtró en tamices de 250, 45 y 38 micras de apertura, recogiendo el extracto del último tamiz que es el que contiene nematodos. De este extracto se obtuvo el inóculo inicial que fue multiplicado para su inoculación en las distintas especies de Solanáceas (Figura 13).

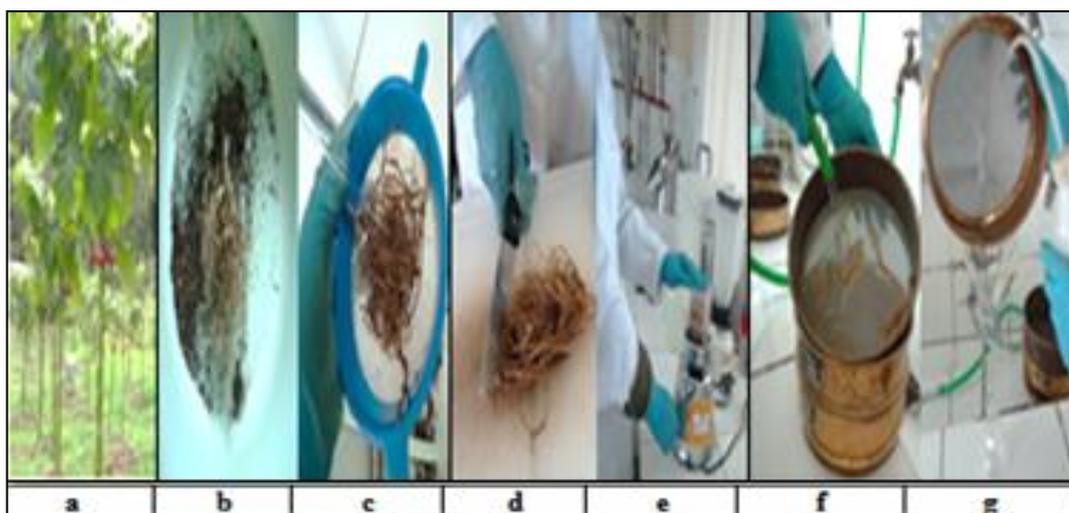


Figura 13: Obtención del inóculo inicial: a) Planta de tomate de árbol, b) raíz con agallas, c) Lavado, d) Corte de raíces, e) Proceso de extracción, f) Filtración por tamices, g) Lavado y recolección del extracto

2.4.2.2 Multiplicación del inóculo inicial

Se sembró semilla de tomate riñón variedad ‘Sheila’, estas plántulas se utilizaron para la multiplicación del inóculo obtenido a partir de raíces de plantas de tomate de árbol. Cuando las plántulas de tomate riñón tuvieron un par de hojas se las trasplantó a macetas de 1 kg de capacidad. El sustrato utilizado fue tierra negra más pomina, en una proporción de 2:1.

Se realizaron dos riegos por semana y fertilización cada 15 días con un fertilizante completo (Yaramila complex 10g/planta). En un mes aproximadamente, las plantas tuvieron 15 cm de altura y 5 mm de diámetro y se procedió a la inoculación realizando cuatro orificios de 3 a 4 cm de profundidad con un palito de madera con punta, se colocó 20 cm³ de inóculo por planta, distribuidos en forma

equidistante y se esperó tres meses para observar síntomas o nodulaciones en sus raíces (figura 14).



Figura 14: Multiplicación del inóculo inicial: a) orificios para inoculación, b) dosificación del inóculo, c) medida de inóculo, d) inoculación en plántulas de tomate riñón.

2.4.2.3 Preparación del inóculo e inoculación de las plántulas de solanáceas

La figura 15 indica las especies de solanáceas utilizadas en el ensayo. Una vez agalladas las raíces de plántulas de tomate riñón, se procedió a cortar, lavar, abrir, examinar y sacar las masas ovales de huevos. Con la ayuda de pinzas y alfileres entomológicos se observó en un estereoscopio óptico que en estas masas ovales se encuentran embebidos huevos y larvas de *M. incognita*.

Se separó estas masas del tejido vegetal y se las colocó en cajas petri previamente impregnadas de agua potable, recubiertas con una malla plástica y con papel clínex, se las dejó por 72 horas a temperatura de 28°C en el laboratorio, tiempo durante el cual eclosionaron los huevos y juveniles J2 del nematodo fitopatógeno.

Transcurrido este tiempo, se colocó la suspensión agua-nematodos de las cajas petri y se recolectó la misma en vasos de precipitación y matraces de 500 ml. Al matraz que contenía el extracto de nematodos se le colocó un agitador de pecera con el que se mantuvo constante agitación. Se cogió una alícuota de 5 ml con una pipeta

automática, se colocó en una caja contadora y utilizando un estereoscopio óptico marca Leitz Wetzlar; modelo 884808 se procedió a contar las larvas existentes para finalmente ajustar a la dosis de inoculación (2500 larvas por maceta de 1kg de capacidad).

Se menciona autores como Sasser (1979) y Dong *et al.*, (2007), los cuales realizaron trabajos en tomate riñón con juveniles J2 en dosis de 2000 a 10.000 larvas por planta, en el presente ensayo se realizó con un volumen de 2500 larvas por planta de 1 kg de capacidad. Se repitió este proceso hasta obtener el volumen individual y total de larvas para poder infectar todas las plantas del ensayo.

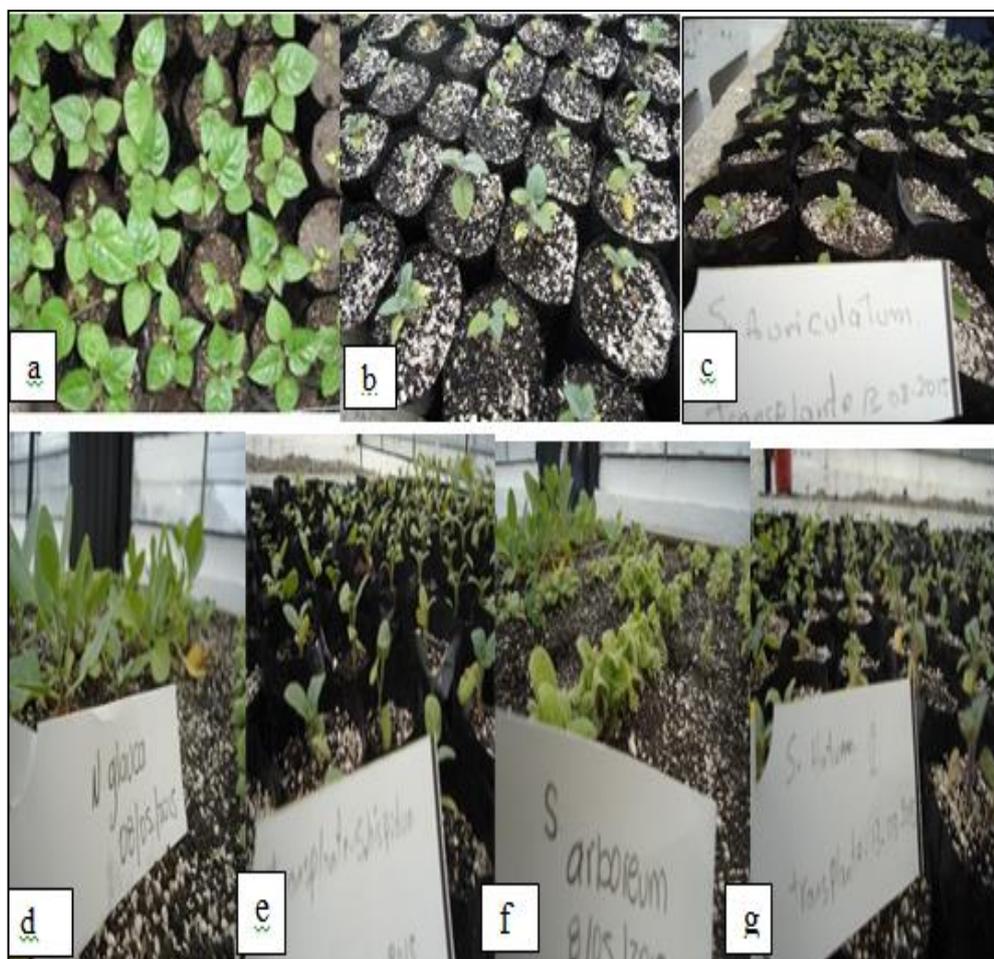


Figura 15: Plántulas de Solanáceas silvestres: a) *S. betaceum*, b) *S. quitoense*, c) *S. auriculatum*, d) *N. glauca*, e) *S. hispidum*, f) *S. arboreum*, g) *S. hirtum*

Del extracto obtenido de plantas de tomate riñón realizado mediante el procedimiento de extracción de raíces por la técnica de Stemerding (PEE/N//02) procedimiento específico de ensayo del laboratorio de Nematología (AROCALIDAD, 2014), se sacó raicillas con agallas representativas, se sacudió la tierra y se lavó con agua potable y con ayuda de pinzas entomológicas se extrajeron masas de huevos (figura 16) y se colocó en cajas petri, se volvió a replicar las cajas hasta obtener suficientes larvas J2 del nematodo *M. incognita* para todas las solanáceas silvestres del ensayo (*S. betaceum*, *S. quitoense*, *S. auriculatum*, *N. glauca*, *S. hispidum*, *S. arboreum*, y *S. hirtum*); se colocó 2500 larvas por maceta de 1 kg de suelo, que se obtuvo por cálculo matemático, y posterior a esto se procedió a la identificación por morfometría y por biología molecular .



Figura 16: Preparación del inóculo por medio de masas de huevos: a) Inoculación en plántulas de tomate riñón, b) plántulas de tomate riñón, c) raíces agalladas con masas de huevos, d) separación de raíces agalladas con masas de huevos, e) caja petri con raíces para obtención de masas de huevos, f) caja petri con masas de huevos, g) conjunto de cajas petri con masas de huevos, h) extracto de inóculo.

2.4.3. Morfometría

2.4.3.1 Preparación de la muestra

Una vez que se extrajo el nematodo, mediante la técnica de Stemerding (PEE/N//02), de las raíces de las plantas inoculadas, utilizando un estereoscopio óptico se identificaron larvas J2, machos y hembras en cada solanácea. Una parte de estos individuos se utilizaron para obtener las fotografías en las cuales se realizaron las medidas para morfometría, y el resto de individuos se utilizaron para la extracción de ADN para análisis molecular.

2.4.3.2 Identificación de *M. incognita* mediante morfometría

Se fotografió los individuos de larvas J2, machos y hembras utilizando un microscopio invertido *Olympus*. CellSeens IX53 PIF serie 3G3741. Las microfotografías de los nematodos se enfocaron, calibraron y registraron en el software con los objetivos de: 4X, 10X, 20X y 40X. Para realizar las mediciones de morfometría se utilizó el software CellSeens Estándar versión 9.7. La descripción de las partes anatómicas del cuerpo como cabeza, cuerpo, cola, estilete, esófago, vulva y espícula, permitió diferenciar caracteres generales de nematodos correspondientes al género *Meloydogine* y con el resultado de las medidas morfométricas se confirmó la especie.

La morfometría se realizó de las **larvas** J2 obtenidas de todas las Solanáceas inoculadas para posteriormente determinar si existían diferencias relacionadas al hospedero, mientras que para el caso de **machos y hembras**, se realizó medidas únicamente con individuos provenientes de raíces de plantas tomate de árbol con el propósito de comprobar que el nematodo pertenecía a la especie *M. incognita*.

Para determinar la morfometría de las hembras se utilizó cortes perineales, utilizando la metodología descrita por Sasser y Carter, (1985), ésta metodología consistió en observar en el interior de raíces con agallas la presencia de hembras. Se colocó en un portaobjeto la hembra con una gota de agua potable, utilizando un bisturí se cortó las partes superiores y laterales para dejar la zona genital, eliminando

todos los fragmentos de la parte interna. Las microfotografías fueron tomadas con microscopio óptico con un objetivo de 100X, marca Motic, modelo BA 310.

Una vez realizado este procedimiento, se colocó una gota de lactofenol en otro portaobjetos, y se colocó la zona genital de la hembra, procurando que quede hacia arriba, se colocó el cubreobjetos y se observó el corte en el microscopio óptico, usando el aumento de 100X bajo inmersión, y de esta forma observar la morfología de los patrones perineales (Perry *et al.*, 2009).

En el caso de los **machos** se tomó en cuenta la longitud y ancho del cuerpo, longitud del estilete, longitud de las espículas, parámetros a y b, y la distancia desde la base del estilete a la desembocadura de la glándula faríngea dorsal, (DGO), longitud media del bulbo. (Sasser & Carter, 1985).

2.4.3.2.1 Tratamientos

Estuvieron constituidos por las distintas especies de Solanáceas (Tabla 1).

Tabla 1:
Tratamientos del análisis morfométrico.

| Tratamiento | Descripción |
|--------------------|----------------------------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> |

2.4.3.2.2 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo constituida por una larva J2 extraída de cada solanácea en estudio.

2.4.3.2.3 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 observaciones.

2.4.3.2.4 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico R versión 3.3.2. Se realizó comparaciones utilizando el método combinatorio “Pairwise testing (contraste de pares)”; para no tomar en cuenta la homogeneidad de varianza. Adicionalmente se calculó rangos de significación utilizando la prueba de Holm ($p < 0,05$).

2.4.3.2.5 Variables

Las variables que se registraron en larvas J2 obtenidos de la extracción de las raíces de las siete solanáceas inoculadas en este estudio fueron:

- a) **Longitud del cuerpo (μm):** Para determinar la medida de longitud del cuerpo se utilizó una polilínea sobre la microfotografía capturada del nematodo, en la cual se midió desde el inicio de la cabeza hasta el extremo de la cola.
- b) **Ancho del cuerpo (μm):** Para determinar la medida del ancho del cuerpo se utilizó la herramienta para medir distancias paralelas que nos permitieron tomar un dato de acuerdo a la posición del cuerpo del nematodo. Esta variable se la obtuvo de medir tres puntos distintos del ancho del cuerpo y se obtuvo un promedio de los datos.
- c) **Longitud del estilete (μm):** Esta medida se realizó localizando los nódulos basales del estilete y trazando una línea hasta el final del mismo en la parte anterior del cuerpo hasta el final de la cabeza.
- d) **Longitud de la cola (μm):** Se localizó el ano, se trazó una línea transversal para delimitar la mitad de la porción donde se encuentra el ano y se midió hasta el extremo terminal del cuerpo.

Los datos obtenidos fueron comparados con las claves taxonómicas del Commonwealth Institute of Helminthology (Franklin, 1980), las cuales sirven de referencia para el laboratorio de Agrocalidad.

2.4.4 Identificación molecular de *Meloidogyne incognita*

Diez especímenes (machos, hembras y larvas J2) aislados de cada especie de Solanáceas fueron colocados en tubos eppendorf con alcohol al 70% y almacenados a -20°C para su posterior análisis molecular e identificación en el laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad.

2.4.4.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN, se utilizó el protocolo descrito por Castillo *et al.*, (2003). Con ciertas modificaciones realizadas por Enríquez, 2015 Se utilizó especímenes de hembras maduras, machos y filiformes J2. Se colocó cada ejemplar en un tubo individual, con una solución buffer de lisis, y se realizó variaciones de temperatura y centrifugación (Figura 17).

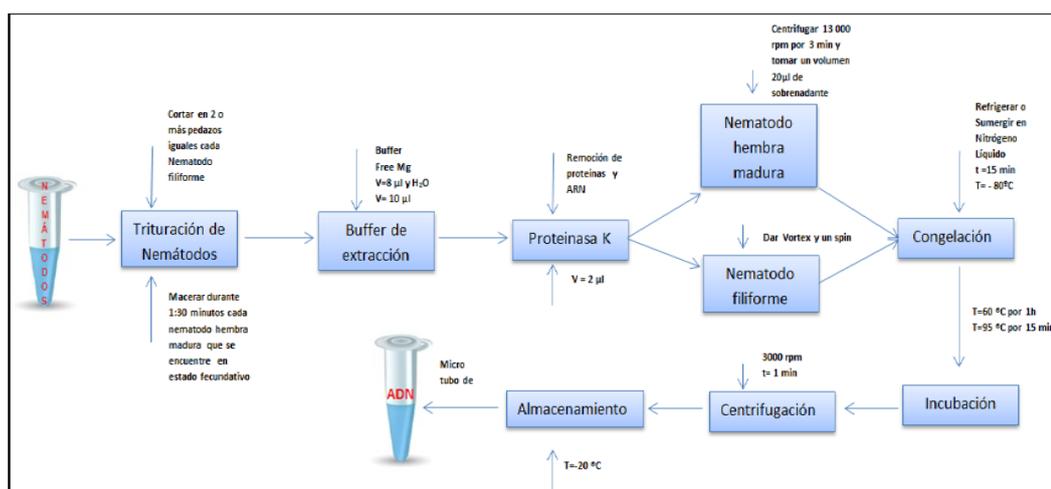


Figura 17: Esquema del protocolo modificado a través del método de Enríquez (2015) para obtención del ADN de nematodos.

Para la extracción del ADN de hembras, cada ejemplar fue colocado en un tubo eppendorf de 0.2 ml con 2 μl de agua libre de nucleasas y con la ayuda de una micropipeta con cabeza redonda se realizó la maceración y trituración de la hembra en el interior del tubo por un minuto y medio. Posteriormente, se colocó 18 μl de buffer de lisis y se puso el tubo con la muestra macerada y homogenizada en un vórtex.

Se colocó 2 μl de proteínasa K (Promega), con una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, manteniendo todo el tiempo las muestras en refrigeración para evitar la digestión

proteica. Nuevamente se homogenizó las muestras y se centrifugó a 13000 rpm por tres minutos, para luego tomar 20 μ l del sobrenadante. Se lo mantuvo en congelación en nitrógeno líquido a -80° C por 15 minutos y se procedió a incubar el ADN en un termociclador (marca Biorrad Thermocycle) por 15 minutos a una temperatura de 95° C.

Para la extracción del ADN de larvas, se colocó la larva en una siracusa con 2 μ l de agua libre de nucleasas y se realizó 2 a 3 cortes utilizando un bisturí estéril, con la ayuda de un mechero para evitar la contaminación del ADN. Se tomó toda la muestra contenida en la siracusa y se la colocó en el tubo eppendorf de 0.2 ml. Utilizando una micropipeta se tomó 18 μ l de buffer de lisis 5x de promega y se adicionó al tubo con la muestra.

La cadena de frío se mantuvo utilizando hielo hasta continuar con todos los ejemplares y continuar con el proceso. Se adiciono 2 μ l de proteinasa K con una concentración de 20 μ g/ μ l, manteniendo la muestra en una gradilla refrigerada, con el objeto de evitar la digestión proteica. Utilizando un vórtex se homogenizó y se centrifugó a 3.500 rpm por 15 segundos. Las muestras se refrigeraron por 15 minutos a una temperatura de -80° C. A continuación se incubaron en el termociclador por 60 minutos a 65° C, después 10 minutos a 95° C, se centrifugaron por 10 segundos, y se congelaron a -20° C para su uso en el PCR., 2.4.4.2 Cuantificación y verificación de la calidad de ADN

Se procedió a cuantificar el ADN mediante espectrofotometría de longitud de onda 260/280 y 260/230 utilizando el equipo NanoDrop 8000 UV – Vis Spectrophotometer (Thermoscientific). Este proceso permitió determinar la integridad y cantidad del ADN extraído de los nematodos.

El promedio para la cuantificación del ADN en muestras de **larvas**, fue de una concentración de 55.26 ng/ μ L, con una absorbancia de 0.62; **machos** de 73.80 ng/ μ L; con una absorbancia de 0.87 y **hembras** concentración de 84.98 ng/ μ L, con una absorbancia de 0.88; lecturas que dio el equipo, para la comprobación de la pureza del ADN en muestras de las solanáceas en estudio.

2.4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los primers utilizados para la amplificación para la región IGS fueron:

Tabla 2:

Primers específicos para la identificación molecular de *Meloidogyne incognita*

| Primer | Secuencia | Bibliografía |
|---------------|-------------------------|---|
| MI-F | GTGAGGATTCAGCTCCCCAG | M. incognita-specific SCAR (Meng <i>et al.</i> , 2004) |
| MI-R | ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC | |

2.4.4.4 Condiciones del perfil térmico usado para la PCR

El 1er ciclo de **desnaturalización**, ocurrió a una temperatura de 94°C por 2 minutos, posteriormente se realizaron 45 ciclos de reacción con una **desnaturalización** de 94°C, por 30 segundos, y una temperatura de **alineamiento** de 61.2°C y para la **extensión** fue de 72°C por 1 minuto. Con lo que se demostró que bajo estas condiciones se realizó la amplificación de la banda de las muestras de solanáceas en estudio.

Tabla 3:**Standardización de PCR para *M. incognita***

Para la Estandarización de la PCR (reacción de la cadena de Polimerasa) se realizó bajo las condiciones del laboratorio de biología molecular de Agrocalidad (Enríquez, 2015); las condiciones óptimas de reacción, fueron las siguientes:

| REACTIVO | CONC. INICIAL | CONC. FINAL | VOL X 1 (ul) |
|---------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| H2O | | | 16,075 |
| BUFFER PCR | 5X | 1X | 5 |
| MgCl ₂ | 25Mm | 1,4mM | 1,4 |
| DNTPS | 10mM | 0,2 Mm | 0,5 |
| PRIMER MI-F | 25uM | 0,2 uM | 0,2 |
| PRIMER MI-R | 25 uM | 0,2 uM | 0,2 |
| ENZIMA TAQ POLYMERASE HOT START | 5u/ul | 0,625 ul/25uL | 0,125 |
| TOTAL | | | 23,5 ul |

2.4.4.6 Electroforesis en gel de agarosa

En una cámara de electroforesis, se preparó un gel de la agarosa al 1.5% (p/v), teñido con SYBR (colorante) Safe DNA gel stain, con corrida electroforética de 100V, por 45 minutos, el marcador molecular fue de peso (*100bp DNA ladder, invitrogen*).

2.4.4.7 Secuenciación de los fragmentos de PCR amplificados

Los fragmentos amplificados de la región IGS mediante PCR, fueron enviados para su secuenciación en Macrogen (Korea). Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un alineamiento con el programa BLAST para analizar los porcentajes de identidad de los aislados con las secuencias que se hallaban en la base de datos de GenBank.

2.4.5 Evaluación de infestación de las solanáceas silvestres a *M. incognita*

2.4.5.1 Tratamientos

Los tratamientos estuvieron constituidos por las distintas especies de Solanáceas descritas en el punto 2.4.4.2.1 (Tabla 4)

Tabla 4:

Tratamientos para la evaluación de infestación de las solanáceas

| Tratamiento | Descripción |
|-------------|----------------------------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> |

2.4.5.2 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por una planta de cada Solanácea.

2.4.5.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con 5 repeticiones.

2.4.5.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico R versión 3.3.2. Se estimó los intervalos de confianza al 95% para determinar el índice de incremento de la población del nematodo en base al modelo de Poisson. Si el incremento es estadísticamente superior a la población inicial inoculada, demuestra la susceptibilidad del hospedero, por el contrario incrementos menores a la población inicial inoculada demuestran la no infestación. Respecto de la infestación del hospedero al ataque del nematodo, se realizó contraste de medias entre el rendimiento (peso seco del follaje) del testigo sin inocular para cada Solanácea y el tratamiento inoculado, a través de una prueba “T” al 5% de significación estadística.

2.4.5.5 Variables (infestación a *M. incognita*)

Transcurridos 90 días después de la inoculación del nematodo a las solanáceas, se evaluaron las siguientes variables:

- a) **Altura de la planta (cm):** Utilizando un flexómetro manual, se midió la longitud desde el cuello de la planta hasta el meristemo apical. Esta medición se la realizó a los 90 días después de la inoculación.
- b) **Peso fresco de raíces (g):** Se cortó el sistema radicular de cada plántula, se lavó con agua potable las raíces y se la dejó escurrir por 30 minutos, para proceder a pesar utilizando una balanza digital. Esta variable se evaluó al a los 90 días después de la inoculación días.
- c) **Peso fresco del follaje (g):** Se cortó el follaje de cada planta a la altura de la unión entre el cuello de la raíz y el tallo, para proceder a pesarlo en una balanza digital. Esta variable se registró a los 90 días después de la inoculación.
- d) **Peso seco del follaje (g):** Se colocó el follaje fresco en fundas de papel y se las puso en una estufa a 60°C durante 72 horas, para posteriormente pesarlo utilizando una balanza digital.
- e) **Número de agallas:** Para determinar esta variable se analizó según la escala de Bridge y San Page (1980) (Tabla 4), en la que se contó el número de agallas existentes en la raíz y de acuerdo a esto se asignó un valor de la escala (valor de 0 a 5). Esta variable se la tomó a los 90 días después de la inoculación.

Tabla 5:

Escala de Bridge y Sam Page (1980)

| Número de Agallas | Índice |
|-------------------|--------|
| 0 | 0 |
| 1-2 | 1 |
| 3-10 | 2 |
| 11-30 | 3 |
| 31-100 | 4 |
| +100 | 5 |

f) Población final (Pf): Se evaluó a los 90 días después de la inoculación, tiempo en el cual las plantas mostraron nodulaciones en las raíces. Se procesó las raíces de las distintas solanáceas mediante la técnica de Stemerding (PEE/N//02) y se obtuvo la población final de cada tratamiento.

2.4.6 Medición del contenido de alcaloides

Se colectaron frutos de tomate de árbol (provenientes de Tungurahua) injerto en *Nicotiana glauca* y *S. auriculatum* y frutos de naranjilla (provenientes del Napo) injerta en *S. arboreum* provenientes de plantaciones comerciales de estos frutales. Los frutos fueron colocados en una estufa a 70°C por 5 días para secarlos y posteriormente fueron liofilizados.

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP para su análisis. Mediante espectrofotometría se determinó la concentración de alcaloides. De acuerdo a lo establecido en la literatura, se determinó el límite permitido de cada alcaloide para la salud humana y se comparó con los datos obtenidos del análisis.

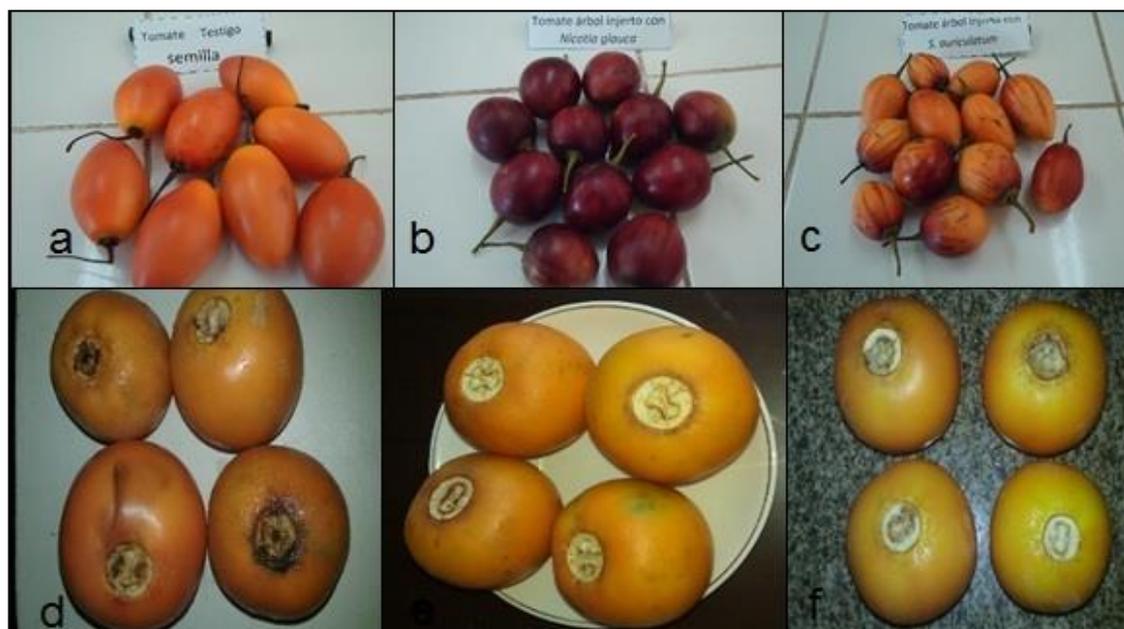


Figura 18: a) Tomate testigo semilla, b) Tomate en patrón *Nicotiana glauca*, c) Tomate en patrón *S. auriculatum*, d) Naranjilla testigo semilla, e) Naranjilla patrón *S. arboreum*, f) Naranjilla patrón *S. hirtum*

La metodología espectrofométrica utilizada para la determinación de glicoalcaloides totales esta descrita por Hellenas (1986), la cual consta de los siguientes pasos:

1. Pesar 5 g de muestra liofilizada.
2. Hidratar la muestra con 20 ml de agua destilada durante una hora.
3. Preparar 210 ml de la mezcla extractora metanol: Cloroformo (2:1 v/v) y adicionar 100 ml de esta mezcla a la muestra hidratada y agitarla durante 10 minutos a baja velocidad.
4. Filtra la mezcla en un Buchner al vacío con doble papel de filtro Whatman N^o 40. Lavar el agitador y los filtros con la mezcla metanol/cloroformo restante.
5. La solución filtrada se coloca en un rotavapor (60°C y 500 mm Hg de presión), conectado al refrigerante y se concentra hasta un volumen aproximado de 20 ml.
6. Esta solución acuosa se transfiere a una pera de decantación donde se agregan 20 ml de solución de ácido acético (agua: ac. acético glacial, 98:2, v/v) y 15 ml de éter de petróleo, fracción 40-60. Agitar vigorosamente y dejar reposar hasta el siguiente día.
7. Separar y filtrar la fase acuosa con papel filtro Whatman N^o 40, en una fiola de 50 ml y enrasar con la mezcla de agua – ácido acético (98:2 v/v). Transferir el extracto a botellas de vidrio y almacenar en refrigeración (soporta hasta 15 días sin variación).
8. Del extracto tomar una alícuota de 5 ml y colocarla en un Erlenmeyer de 50 ml donde se le adiciona 1,5 ml de hidróxido de amonio concentrado.
9. Colocar el Erlenmeyer en baño maría a 85°C por 10 minutos y luego enfriar a 5°C por 30 minutos, donde los glicoalcaloides son floculados.
10. Centrifugar el contenido del Erlenmeyer a 219000 rpm por 40 minutos.

2.4.6.1 Tratamientos

Los tratamientos estuvieron constituidos por frutos de tomate de árbol (*S. betaceum*) y naranjilla (*S. quitoense*) injertadas en solanáceas silvestres (Tabla 6).

Tabla 6:**Tratamientos evaluados para el contenido de alcaloides.**

| Tratamiento | Descripción |
|-------------|--|
| F1 | fruto de tomate de árbol injertado en <i>Nicotiana glauca</i> |
| F2 | fruto de tomate de árbol injertado en <i>Solanum auriculatum</i> |
| F3 | fruto de tomate proveniente de semilla |
| F4 | fruto de naranjilla injertado en <i>Solanum arboreum</i> |
| F5 | fruto de naranjilla injertado en <i>Solanum hirtum</i> |
| F6 | fruto de naranjilla proveniente de semilla |

2.4.6.2 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por una muestra de 10 g de pulpa liofilizada del fruto.

2.4.6.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres observaciones.

2.4.6.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico R versión 3.3.2. Se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias estadísticas y rangos de significación utilizando la prueba de Tukey al 5%.

2.4.6.5 Variables

Se determinó el contenido de los siguientes alcaloides: Solanina y Chaconina.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Morfometría

Los resultados obtenidos al realizar las mediciones morfométricas en los nematodos extraídos de las plantas de tomate de árbol (*S. betaceum*), de donde se obtuvo el inóculo original, indicaron que se trataba de la especie *M. incognita* (Tabla 7). Datos que concuerdan con la clave taxonómica C.I.H Descriptions of Plant-parasitic nematodes Set 2, No.18, *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919; Chitwood, 1949; Eisenback, J. 1983).

Tabla 7:

Medidas morfométricas en micras (μm) realizadas en los nematodos hembra, macho y larvas J2 (juveniles) extraídos de tomate de árbol.

| PARÁMETROS DE MEDIDA DE NEMATODOS | | Longitud total cuerpo(L) μm | Ancho del cuerpo μm | LARGO ESTILETE (μm) | ancho del bulbo medio μm | longitud medio del bulbo μm | Longitud espículas μm | Longitud cola μm | DISTANCIA DGO (μm) | a(longitud del cuerpo/diámetro mayor del cuerpo) μm | b(longitud del cuerpo/esófago) μm | c(longitud del cuerpo/longitud de la cola) μm |
|---|--|--|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|--|--|
| Hembra <i>M. incognita</i> | C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, Set 2, No 18. Eisenback (1983) y Williams (1974) | 337 - 723 | - | 13-16 | 31-49 | 37-63 | - | - | 2-4 | - | - | - |
| | <i>S. betaceum</i> | 490,3 | 262,4 | 15,9 | 36,1 | 40,4 | - | - | 3,8 | - | - | - |
| Macho <i>Meloidogyne incognita</i> | C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, Set 2, No 18. Eisenback (1983) y Williams (1974) | 1108-1953 | - | 23-32,7 | - | 5,8 - 9,0 | 28,8 - 40,3 | - | 1,4-2,5 | 31,4 -55,4 | 13,8 - 20,5 | - |
| | <i>S. betaceum</i> | 1632,1 | 51,6 | 25,3 | - | 6,6 | 36,5 | - | 2,5 | 31,6 | 19,5 | - |
| juvenil <i>Meloidogyne incognita</i> | C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, Set 2, No 18. Eisenback (1983) y Williams (1974) | 337 - 403 | - | 9,6 - 11,7 | - | - | - | - | - | 24,9-31,5 | - | 6,9-10,6 |
| | <i>S. betaceum</i> | 432,8 | 16,3 | 10,2 | - | - | - | 42,1 | - | 26,7 | - | 10,3 |

La identificación inicial se realizó por medio de cortes perineales de hembras adultas (Figura 19 y 20) extraídas de raíces de *S. betaceum*, las cuales se

caracterizaron por ser abultadas, más o menos periformes o redondeadas, el patrón perineal permitió observar la zona terminal de la cola, el arco dorsal, la vulva y el ano, las líneas laterales, estrías cuticulares y fasmidios. Lo que concuerda con los resultados obtenidos por Hunt y Handoo (2009) y Perry *et al.*, (2009).

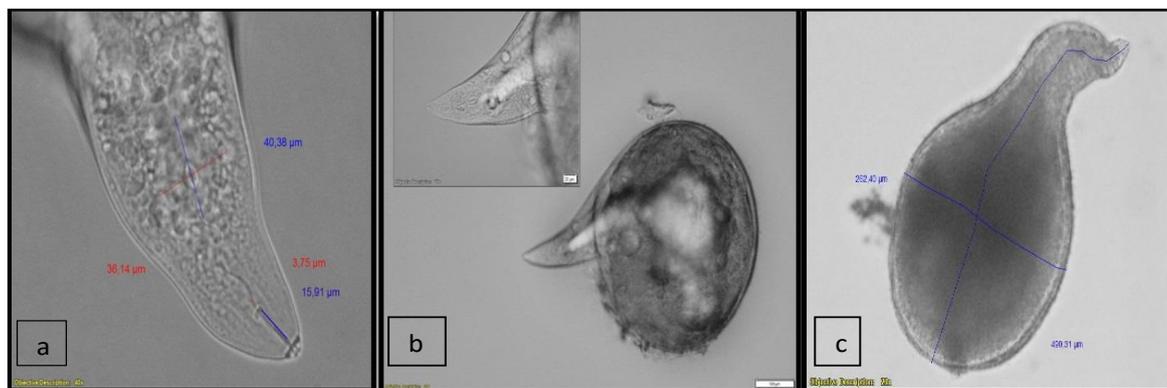


Figura 19: Mediciones de morfometría realizadas en individuos hembra de *M. incognita* aisladas de *S. betaceum*: a) morfometría de estilete y bulbo medio, b) hembra, c) medición largo y ancho en hembra.

Los resultados morfométricos permitieron ser comparados con claves taxonómicas (Description of Plant-Parasitic Nematodes) de corte perineal y determinar la especie del nematodo presente (Karssen, 2002).

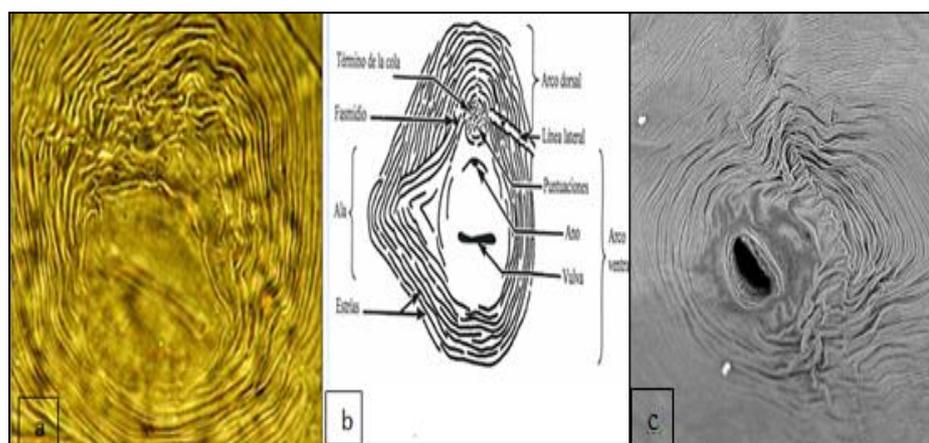


Figura 20: Cortes perineales de hembra *M. incognita* aislados de *S. betaceum*: a) Corte perineal, b) corte perineal con sus partes, c) corte perineal de hembra.

Fuente: Eisenback *et al.*, 1983.

Los machos de *M. incognita* (Figura 21) se caracterizan por poseer espículas en el extremo final del cuerpo, con cola redonda y carente de bursas (Eisenback *et*

al., 1983). Los resultados obtenidos permitieron confirmar lo reportado en la clave taxonómica de Description of a Plant- Parasitic Nematodes (Franklin, 1980).

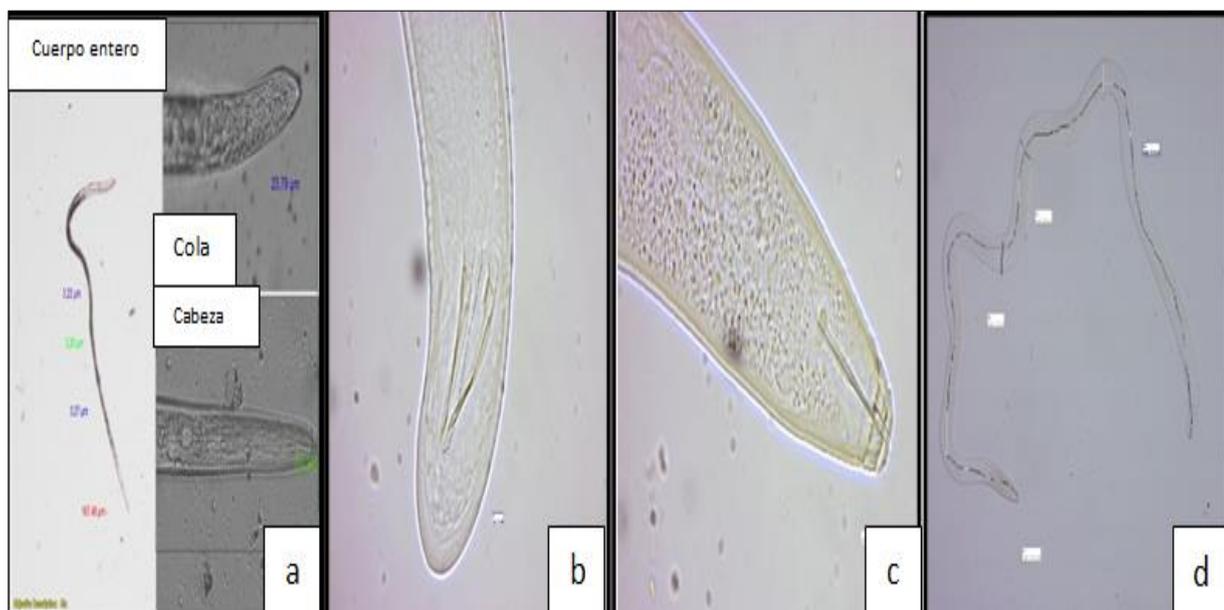


Figura 21. Morfometría de Machos de *M. incognita* aisladas de *S. betaceum*, a) Cuerpo entero, cabeza y cola, b) Cola con medida de espículas, c) Cabeza con medida de estilete, d) Medida de cuerpo entero.

3.1.1 Morfometría de larvas J2 aisladas de las solanáceas evaluadas

Los datos encontrados en los parámetros morfológicos de juveniles (Anexo 3 al 16) y (figura 22) como longitud del cuerpo, cola, estilete, y ancho del cuerpo, indicaron que los especímenes estuvieron dentro del rango establecido (Sasser y Carter, 1985), aunque existe una pequeña variación dentro de los parámetros siendo aún la misma especie. Las diferencias observadas en las distintas variables evaluadas, pueden deberse principalmente al alimento (hospedero) y estar ligadas a condiciones externas, ambientales que influyeron directamente con el desarrollo de los estados juveniles (Kofoid & White, 1919; Chitwood, 1949).

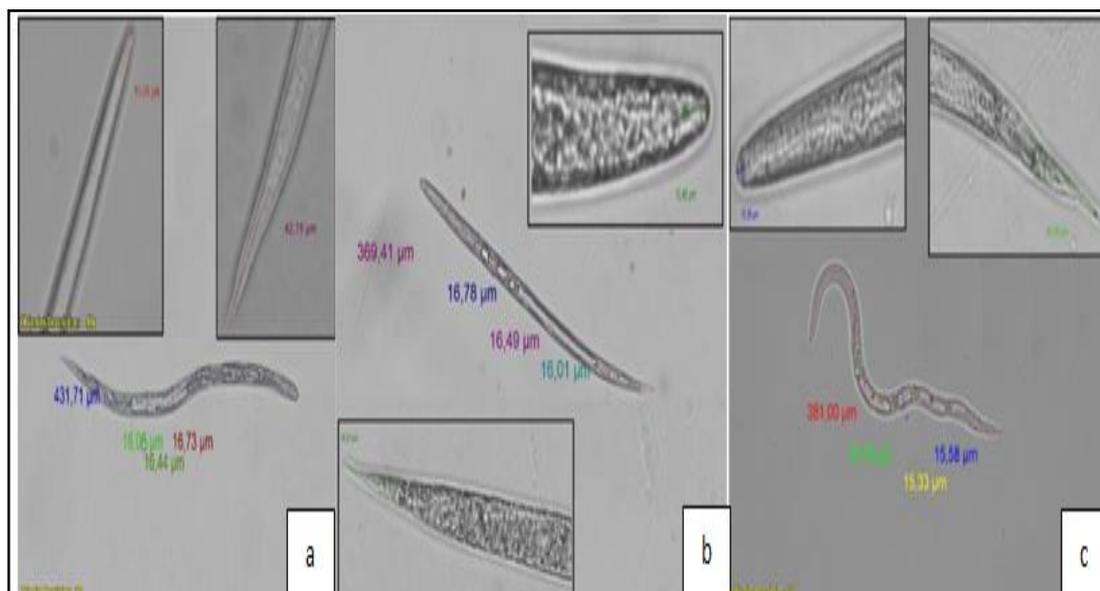


Figura 22: Mediciones de morfometría realizadas en juveniles J2 de *M. incognita* aislados de *S. betaceum*: a), b) y c) medición de cuerpo completo, cabeza, cola.

Para la variable longitud del cuerpo (Tabla 8, Figura 23), no se determinó diferencias estadísticas entre los tratamientos, sin embargo se puede observar que el mayor crecimiento del nematodo se produjo en la especie *S. quitoense*, mientras que el menor crecimiento se observó en *S. hirtum* que fue una de las especies donde se observó no infestación al patógeno.

Tabla 8:

Valores de longitud del cuerpo de *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas

| Tratamiento | Descripción | Longitud del cuerpo (um) |
|-------------|----------------------------|--------------------------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 432,55 |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 391,05 |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 446,64 |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 447,37 |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 439,02 |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 455,81 |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 432,75 |

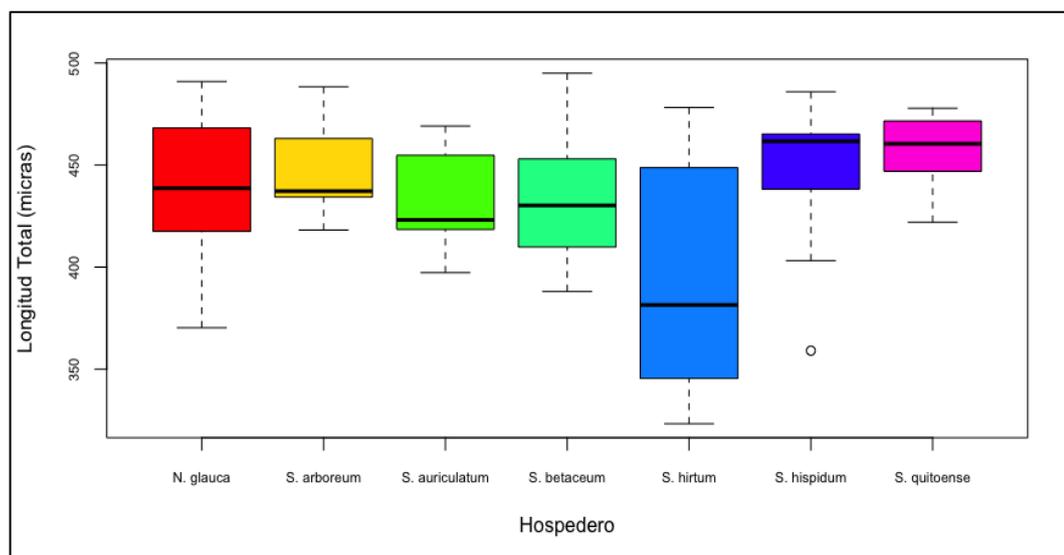


Figura 23: Longitud del cuerpo de *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas

Se observó diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de tukey al 5% para la variable **ancho del cuerpo** (Tabla 9, Figura 24), encontrándose 2 rangos de significación. Los nematodos extraídos de *S. auriculatum* presentaron el mayor ancho del cuerpo (16,85 μm); mientras que los menores valores se obtuvieron en los nematodos extraídos de *S. hispidum* y *N. glauca* (15,56 μm). Lo que concuerda con López y Salazar (1972), quienes obtuvieron similares resultados para caracterizar morfométricamente algunas poblaciones de *M. hapla*.

Tabla 9:

Rangos de significación para ancho del cuerpo obtenidos en *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas.

| Trata | Descripción | Ancho del cuerpo (μm) | Rango |
|-------|----------------------------|------------------------------------|-------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 16,85 | a |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 16,43 | ab |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 15,59 | b |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 16,67 | ab |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 15,56 | b |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 16,04 | ab |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 16,34 | ab |

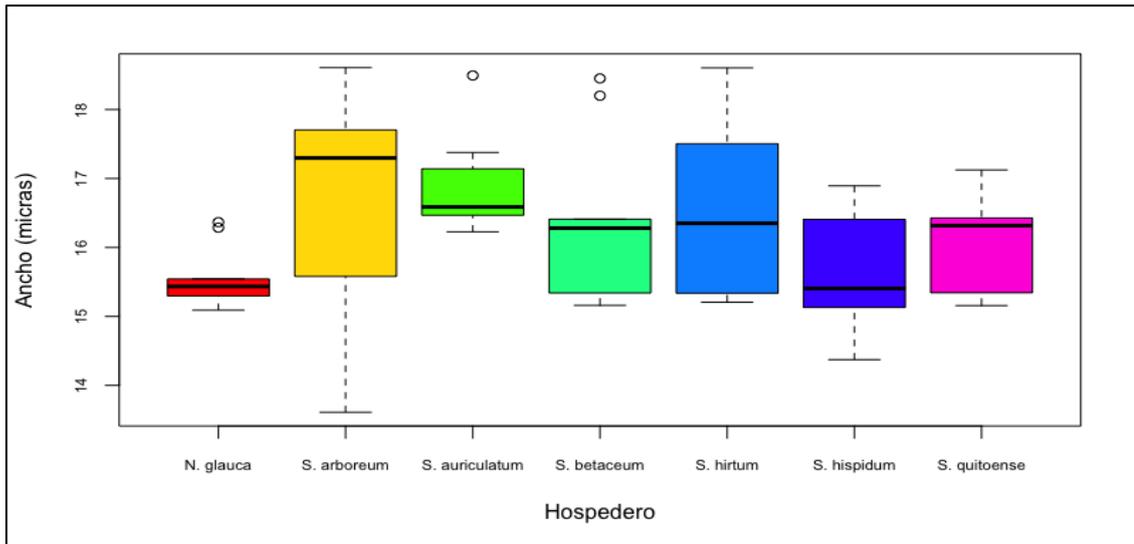


Figura 24: Ancho del cuerpo de *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% se observó 4 rangos de significación, observándose la mayor longitud del estilete (Tabla 10, Figura 25) en la especie *S. arboreum*; mientras que la menor fue en *S. hispidum*.

Según Eisenback *et al.*, (1983) morfológicamente el estilete es bastante distintivo, en las especies de *Meloidogyne*. La longitud del estilete y forma de los nódulos del estilete son características cuantitativas importantes, su valor va entre 9 a 14 μm , los datos de este estudio se encuentran dentro de este rango.

Tabla 10:

Rangos de significación para longitud del estilete obtenidos en *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas

| Tratamiento | Descripción | Longitud del estilete (μm) | Rango |
|-------------|----------------------------|---|-------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 10,42 | bcd |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 11,27 | b |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 9,79 | d |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 12,69 | a |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 10,87 | bc |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 10,69 | bcd |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 10,16 | cd |

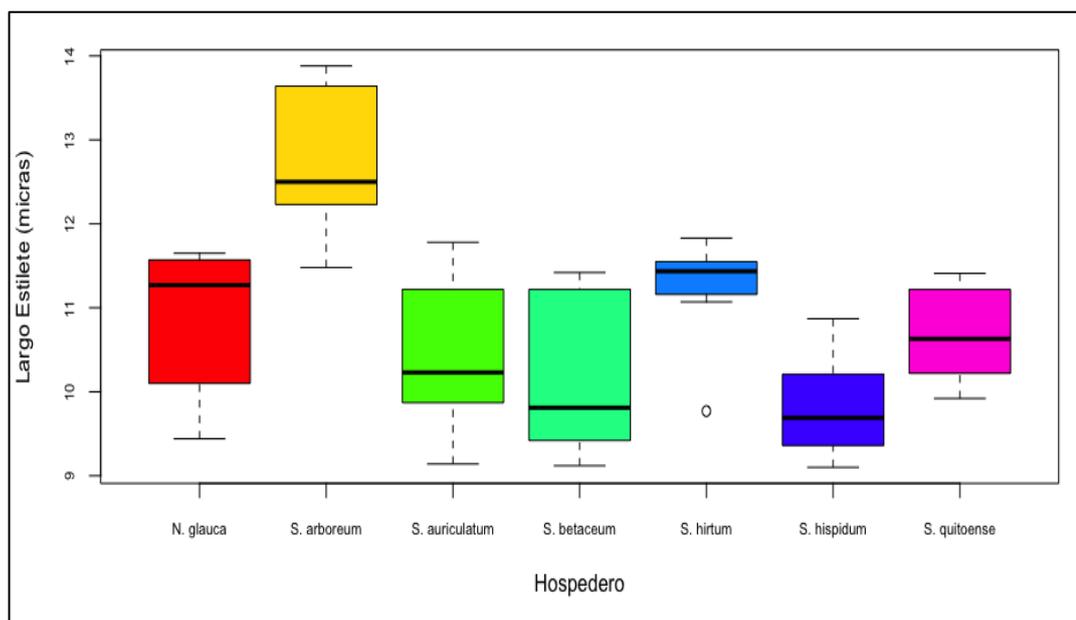


Figura 25: Longitud del estilete de *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas.

Se observó una mayor longitud de la cola (Tabla 11, Figura 26) en la especie *S. arboreum*; sin embargo el resto de especies se ubicaron todas dentro del mismo rango, destacándose *S. hirtum* como la especie que presentó la menor longitud.

La longitud de la cola presenta un rango bastante estrecho, entre las diferentes especies pudiendo ser entre 38,0 a 55,2 μm (Taylor y Sasser, 1983). Por otro lado, la forma de la cola no es determinante y solo sirve para agrupar especies con copias similares (Jepson, 1987).

Tabla 11:

Rangos de significación para longitud de cola obtenidos en *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas.

| Tratamiento | Descripción | Longitud de cola (μm) | Rango |
|-------------|--------------------------|------------------------------------|-------|
| S1 | <i>Solanuauriculatum</i> | 42,12 | b |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 41,93 | b |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 42,15 | b |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 45,04 | a |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 41,88 | b |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 42,05 | b |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 42,12 | b |

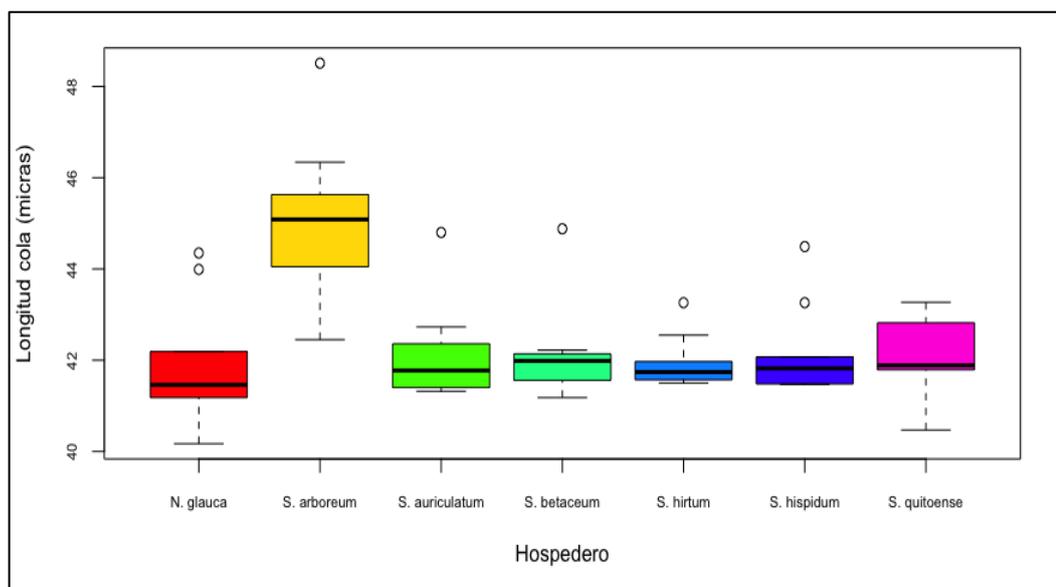


Figura 26: Longitud de cola de *M. incognita* extraída de diferentes Solanáceas.

3.2 Identificación molecular de *M. incognita*

Los resultados para la identificación a nivel molecular (Anexo 19), de las muestras de las solanáceas en estudio, fueron realizados con la extracción y cuantificación del ADN genómico, la cual es fundamental para la investigación del material genético (Surzycki, 2003).

En la presente investigación, para la cuantificación del ADN obtenido en muestras de machos, hembras, y larvas (De Ley *et al.*, 2002), realizado con un método manual de ADN, mostró una pureza baja en un rango de 0.6 a 0.9 ya que Zárate *et al.*, (2009), menciona que el ratio aceptado de pureza para el ADN de doble hebra debe ser mayor o igual a 1.8 en absorbancias A260/A280, proporciones inferiores a este valor indican la presencia de proteínas, sin embargo, el ADN extraído permitió obtener amplificaciones que se enviaron a secuenciar.

La concentración promedio para estados larvarios fue de 55.26 ng/ul, con una absorbancia de A260:0.62; hembras una concentración de 84.98 ng/ul, con una absorbancia de A260:0.88; machos una concentración de 73.80 ng/ul, con una absorbancia de A260:0.87, resultados que fueron suficientes, tomando en cuenta que se trabajó la extracción con un solo ejemplar.

Los productos PCR de la región IGS del ADNr amplificado con los primers específicos MI-F y MI-R en las muestras (machos, hembras y larvas J2) provenientes de las distintas Solanáceas indicaron un patrón de bandas de peso molecular de 999 pb (Figura 27), lo que nos indicó que los nematodos extraídos pertenecieron en todos los casos a la especie *M. incognita*. Las muestras se corrieron con controles positivos de referencia, además de un control negativo en el cual no se observó amplificación.

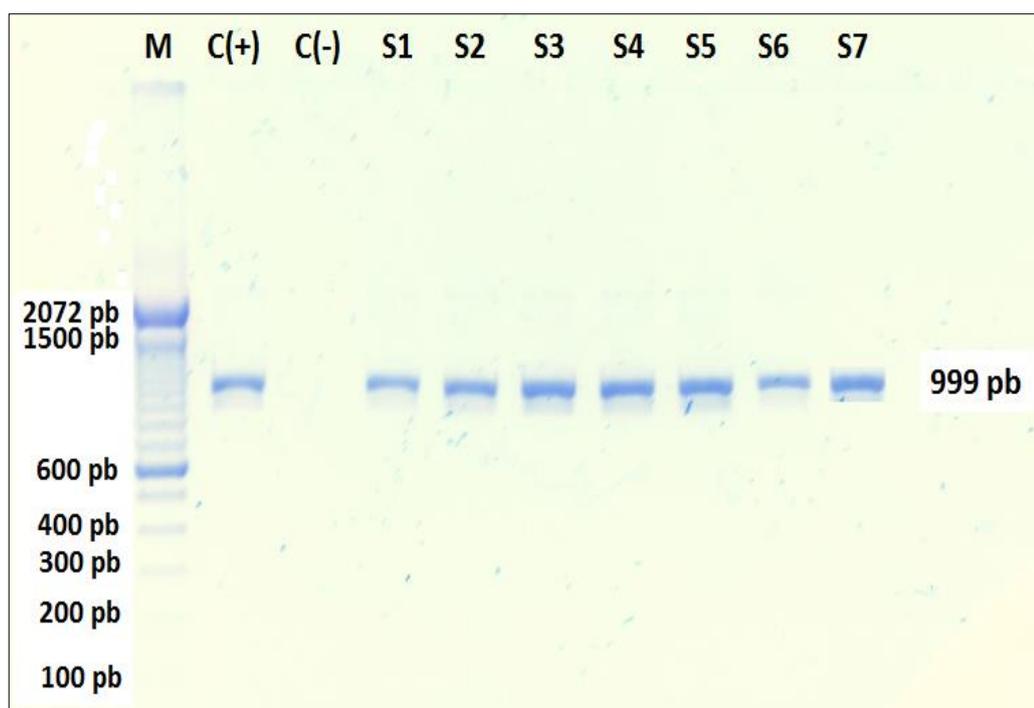


Figura 27: Visualización de productos de la región IGS de ADNr de nematodos extraídos de las distintas Solanáceas que correspondieron a la especie *Meloidogyne incognita*, donde: **M:** Marcador molecular de peso (100bp DNA ladder, Invitrogen®), **C(+):** control positivo, **C(-):** control negativo, **S1:** *Solanum auriculatum*, **S2:** *Solanum hirtum*, **S3:** *Solanum hispidum*, **S4:** *Solanum arboreum*, **S5:** *Nicotiana glauca*, **S6:** *Solanum betaceum* (testigo susceptible), **S7:** *Solanum quitoense* (testigo susceptible).

Al comparar los fragmentos de los especímenes en estudio obtenidos por secuenciación, con las secuencias de las bases de datos del NCBI en el GenBank, se observó que existió una identidad del 99%, con aislados de *M. incognita* descritos en otros países como China, Indonesia, India y Malaysia (Tabla 12).

Tabla 12:

Análisis de similitud entre secuencias de *M. incognita* aisladas de *S. betaceum* en comparación con otros aislados reportados en el GenBank.

| Número de Acceso GenBank | Codificación | Origen | Identidad (%) |
|---------------------------------|---------------------|---------------|----------------------|
| J005841.1 | JS2 SCAR | China | 99 |
| KP253749.1 | M3 SCAR | Indonesia | 99 |
| KP411876.1 | OP 5 PAU SCAR | India | 99 |
| KP234265.1 | MALINO SCAR | Indonesia | 99 |
| KP411873.1 | OPFrz SCAR | India | 99 |
| KF041337.1 | JIK4 SCAR | Malaysia | 99 |
| KF041330.1 | FIK4 SCAR | Malaysia | 99 |

3.3 Evaluación de infestación de las solanáceas silvestres a *M. incognita*

Los datos de las mediciones de las distintas variables para la evaluación de la infestación de *M. incognita* en las distintas solanáceas se muestran en el Anexo 20.

a) Altura de planta

En la variable **altura de la planta**, se observó que todas las Solanáceas presentaron una respuesta de no infestación (Tabla 13), debido a que las diferencias de los valores obtenidos en plantas con y sin inoculación no fueron estadísticamente significativos (p-valor <0,05).

Tabla 13:**Respuesta de infestación de las Solanáceas para la variable altura de planta**

| Trata mit | Descripción | Plantas inoculadas* (cm) | Plantas sin inoculación * (cm) | p-valor | Respuesta |
|--------------|--------------------------|--------------------------------|---|---------|--------------|
| S1 | <i>Solanum</i> | 17,4 4 | 18,33 | 0,41 | no infestado |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 43,2 2 | 39,33 | 0,23 | no infestado |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 39,6 6 | 42,33 | 0,60 | no infestado |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 28,6 6 | 26,88 | 0,28 | no infestado |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 39,2 2 | 39,22 | 1,00 | no infestado |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 14,6 7 | 16,11 | 0,21 | no infestado |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 17,6 6 | 18,55 | 0,35 | no infestado |

* Valores promedio expresados en cm.

La respuesta de no infestación en las solanáceas de este estudio para la variable altura, demuestra que no fue significativa en plantas con y sin inóculo, lo que significa que se requeriría un tiempo mayor a los tres meses de la evaluación para poder encontrar diferencias entre los hospederos.

La variable altura es posible que no sea un buen índice para medir resistencia al nematodo lo que se manifiesta en la falta de diferenciación, en el peso de las raíces con y sin inóculo (Revelo *et al.*, 2003).

b) Peso fresco de raíces

Bird, (1974), manifiesta que la respuesta de las plantas a la infección de *Meloidogyne sp.* ocurre en dos niveles el primero afecta a toda la planta, con reducción en la fotosíntesis, el crecimiento y el rendimiento debido a que se interfiere la síntesis y translocación de reguladores de crecimiento producidos por

las raíces, la segunda forma ocurre a nivel celular en raíces y modifica su morfología y fisiología y las transforma en células gigantes multinucleadas altamente especializadas, llamadas sincitias o células de transferencia.

De igual manera que en la variable anterior, para peso fresco de raíces también se observó que todas las Solanáceas presentaron una respuesta de no infestación (Tabla 14). Cabe destacar que en el caso de *S. hirtum*, se obtuvo un p-valor altamente significativo (0,007) lo que indicó que hubo diferencia entre la planta inoculada y no inoculada, sin embargo el peso de la planta inoculada fue mayor por lo que se corrobora la no infestación de esta especie y su uso como portainjerto.

Tabla 14:

Respuesta de infestación de las Solanáceas para la variable peso fresco de raíces

| Tratamiento | Descripción | Plantas inoculadas (g) * | Plantas sin inoculación (g)* | p-valor | Respuesta |
|-------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|---------|--------------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 4.25 | 3.72 | 0.14 | no infestado |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 7.26 | 5.97 | 0.007 | no infestado |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 5.38 | 9.95 | 0.414 | no infestado |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 3.63 | 3.3 | 0.17 | no infestado |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 3.11 | 2.8 | 0.277 | no infestado |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 4.02 | 9.26 | 0.57 | no infestado |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 4.77 | 3.57 | 0.014 | no infestado |

* Valores promedio expresados en g.

El efecto del nematodo en el peso de la raíz se ha reportado como no importante debido a que este efecto puede deberse al funcionamiento de la raíz como medio para el transporte de nutrientes desde la raíz a la parte superior de la planta (Eguiguren, 1982). Por otro lado, Sikora y Fernández (2005), manifiestan que cuando las plantas son severamente infestadas por *Meloidogyne spp*, el sistema radicular se reduce a un número limitado de raíces funcionales, se observa agallas con diferentes tamaños y los sistemas vasculares completamente desorganizados, hay escasas raíces secundarias, afectándose la toma y transporte de agua y nutrientes, por lo tanto los rendimientos decrecen totalmente.

Revelo *et al.* (2010), reportó que naranjillas injertadas en solanáceas silvestres en seis meses de cosecha obtuvieron rendimientos alrededor de 25 t/ha, superando de esta manera al cultivo común, cuya producción es afectada principalmente por plagas del suelo. El mismo autor manifiesta que la calidad de suelo favorece a que la planta atacada compense con mayor desarrollo radical, ya que el volumen del sistema radicular está directamente relacionado con la textura y estructura del suelo lo que favorece una buena nutrición y desarrollo del injerto.

Además, Gómez *et al.*, (2006), mencionan que el daño en la planta es proporcional a la intensidad del ataque, esto es a menudo proporcionalmente mayor en suelos arenosos donde los nematodos pueden moverse más libremente, que en suelos más pesados donde el movimiento es limitado. La humedad adecuada del suelo es esencial para el movimiento libre, por lo que el ataque suele limitarse a medida que los suelos se secan. La temperatura también influye en la velocidad de movimiento de los nematodos, así como el crecimiento de las plantas suele ser igualmente afectado.

c) Peso seco del follaje

Para la variable peso seco del follaje (Tabla 15), también se observó una respuesta de no infestación por parte de todas las Solanáceas al nematodo fitopatógeno.

Tabla 15:

Respuesta de infestación de las Solanáceas para la variable peso seco del follaje.

| Tratamiento | Descripción | Plantas inoculadas (g) * | Plantas sin inoculación (g)* | p-valor | Respuesta |
|-------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------|--------------|
| S1 | <i>Solanum</i> | 1.05 | 0.8 | 0.066 | no infestado |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 1.14 | 1.02 | 0.395 | no infestado |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 1.66 | 1.29 | 0.165 | no infestado |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 1.06 | 1.00 | 0.055 | no infestado |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 0.92 | 1.03 | 0.052 | no infestado |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 1.18 | 0.97 | 0.058 | no infestado |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 1.53 | 1.03 | 0.001 | no infestado |

* Valores promedio expresados en g.

En general la respuesta de no infestación observada en las variables altura de planta, peso fresco de raíz y peso seco del follaje está relacionada con el tiempo de evaluación (90 días después de la inoculación) debido a que constituye un período corto, por lo que al realizar evaluaciones en períodos largos de tiempo (mayores a 180 días), seguramente varias de las Solanáceas, especialmente la especies susceptibles (*S. quitoense* y *S. betaceum*), mostrarían una no infestación al nematodo fitopatógeno inoculado.

d) Población final

Según Gómez *et al.*, (2006), manifiesta que la resistencia genética es uno de los pilares fundamentales del manejo integrado de plagas, las plantas injertadas son utilizadas para conferir resistencia a enfermedades y nematodos.

La sensibilidad de un hospedante no solo depende de su genotipo, sino de cuantos nematodos la afectan. A densidades poblacionales altas las plantas sufren una reducción considerable de su crecimiento, sin embargo también la sensibilidad de la planta está sujeta a la influencia del ambiente (Starr *et al.*, 2002).

Por otro lado, Revelo *et al.* (2010), menciona que el tipo de suelo puede influir en la supervivencia de los nematodos durante los períodos de estrés y sin duda influirá en la composición de las especies de las comunidades de nematodos.

El intervalo de confianza estimado para la variable población final (Tabla 16), indicó que existió una respuesta de no infestación de tres de las especies de Solanáceas (*N. glauca*, *S. hirtum* y *S. arboreum*) debido a que el valor de la población inicial (2500 larvas) fue superior a los valores obtenidos en el intervalo; mientras que las especies control (*S. quitoense* y *S. betaceum*) se mostraron susceptibles puesto que los valores del intervalo de confianza superaron a la población inicial.

La Figura 28 muestra que *S. hirtum* y *N. glauca* obtuvieron los valores más bajos de la población final del nematodo fitopatógenos. Sin embargo, Revelo *et al.* (2003), manifiesta que el comportamiento de *M. incognita* con una población inicial baja es fácilmente soportado por plantas solanáceas sin sufrir decremento de su

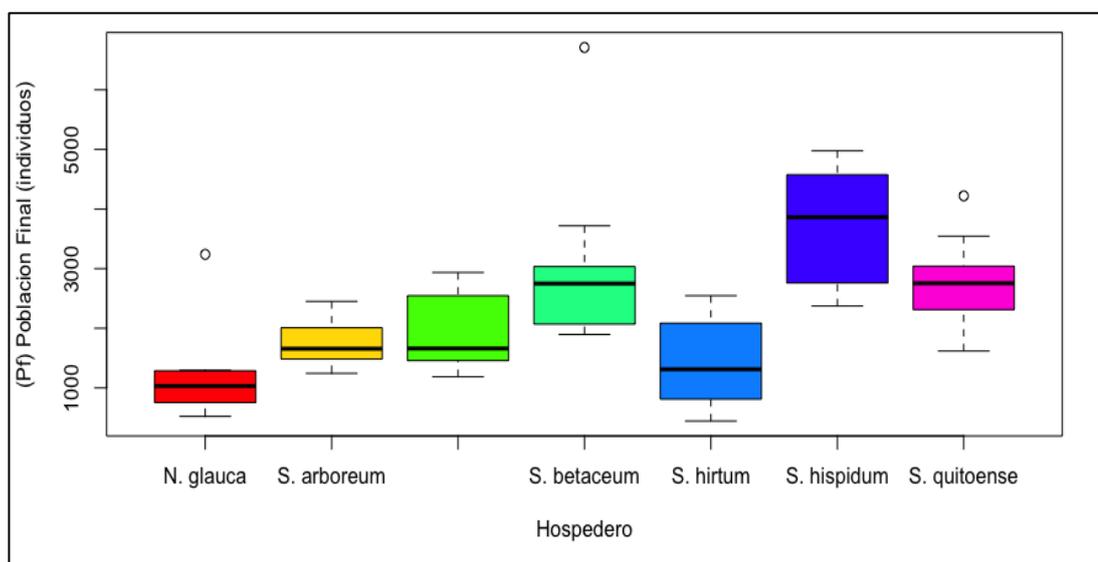
rendimiento. Este hecho permite comprender lo aseverado por agricultores quienes señalan en obtener cosechas representativas en presencia de nematodos agalladores.

Tabla 16:

Respuesta de infestación de las Solanáceas inoculadas con el nematodo fitopatógeno *M. incognita*

| Tratamiento | Descripción | Población final del nematodo* | Intervalo de confianza | Respuesta |
|-------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 1881,1 | 1293,2 – 2736,3 | infestado |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 1283,2 | 882,1 – 1866,6 | no infestado |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 3574,9 | 2457,6 – 5200,2 | infestado |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 1711,6 | 1176,7 – 2484,8 | no infestado |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 1024,8 | 786,2 – 1335,7 | no infestado |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 2636,1 | 1814,3 – 3838,9 | infestado |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 2823,7 | 1941,2 – 4107,4 | infestado |

* Número de individuos



*

Valores promedio.

Figura 28: Población final de *M. incognita* obtenida en las diferentes de Solanáceas.

Jacquet *et al.*, (2005) y Devran (2004), han estudiado la naturaleza de la resistencia a los nematodos del género *Meloidogyne spp*, concluyendo que la alta

cantidad de compuestos fenólicos sintetizados en la planta y traslocados hacia las raíces, confieren resistencia a la infestación del nematodo. En general las plantas resistentes a los nematodos tienen un nivel mayor de fenilalanina amonioliasa, enzima clave del metabolismo fenólico, conocida por estar relacionada con la resistencia de las plantas a las enfermedades (Sorribas *et al.*, 2005).

Piedra-Buena *et al.*, (2005), manifestó que un mecanismo de resistencia a nematodos se considera como bueno cuando restringe o previene la reproducción de estos. Lamentablemente la búsqueda de este tipo de plantas requiere de años de investigación, aspecto que ha sido limitado por la disponibilidad de variedades resistentes (Anwar & Mckenry, 2002), por lo tanto alternativas como el gen *Mi* ha permitido desarrollar portainjertos y variedades tolerantes, que bloqueen la reproducción de nematodos de una manera muy significativa, gracias a una respuesta de hipersensibilidad que genera una necrosis de las células localizadas en la zona de infección, lo que impide el crecimiento de larvas, y puede causar su muerte. Sin embargo, su eficacia disminuye con temperaturas superiores a 27°C (Riggs, 1992). Además, se ha reportado una ruptura de esta resistencia debido a la presión de selección ejercida sobre el patógeno debido al uso repetido de genotipos resistentes en terrenos con monocultivos.

Emiliozzi (2014), en un estudio realizado en plantas de tomate riñon para ver la respuesta de la planta al nematodo *M. javanica*, se reportó que tanto la respuesta de defensa basal como la genómica por genes R están influenciadas por patrones de regulación hormonal, que incluye a las principales hormonas vegetales ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). En *S. lycopersicum* uno de los genes R es el gen MiG1, que confiere resistencia a nematodos formadores de nódulos (*M. javanica*, *M. incognita* y *M. arenaria*). (Gómez *et al.*, 2012).

Lo más importante en la resistencia es la reacción de hipersensibilidad (HR) en el hospedero, en la cual la planta activa enzimas como las peroxidasas (PRXs) Clase III. Su función es importante tanto para limitar el establecimiento y expansión

del nematodo, ya que genera toxinas, produciendo barreras estructurales en el sitio de infección.

Además las plantas pueden desarrollar resistencia sistémica adquirida que ocurre en la naturaleza en ocasiones en una fase posterior a que la planta haya sufrido el ataque de un patógeno. Así mismo hay diferentes productos de origen químico como el benztiazol o BTH (ácido S-metil benzol-(1, 2, 3)-tiadiozole-7-carbónico ester) que puede generar esta misma respuesta. Como resultado, la planta adquiere resistencia sistémica frente a nuevos ataques de patógenos. Emiliozzi (2014).

Varios autores han demostrado la efectividad del gen Mi de resistencia sobre la reducción de las enfermedades provocadas por la incidencia de los nematodos (Pérez *et al.*, 2006) ejemplo, Sorribas *et al.* (2005) demostraron la efectividad de la resistencia del gen Mi en el patrón de tomate SC 6301, con el objeto de reducir la densidad poblacional de *M. javanica* en un invernadero infestado por nematodos, demostrando que con la utilización de este patrón se logró reducir el número y grado de agallamiento así como la población final de *M. javanica* en un (58 y 65%). La moderada reproducción de este nematodo sobre el patrón confirmó su alto nivel de no infestación a dicho patógeno, además de alcanzar rendimientos sustanciales (420 kg por ha) con relación a las plantas no injertadas (Arias *et al.*, 2009).

Además, López *et al.* (1972), concluyó que las altas densidades poblaciones de *M. incognita* fueron encontradas sobre patrones portadores del gen Mi considerandos como tolerantes y no resistentes al nematodo.

Se han realizado estudios para evaluar la resistencia de otras Solanáceas a *M. incognita*, por ejemplo, Rahmanma *et al.*, (2002), evaluó la resistencia de patrones de especies de *Solanum* a nematodos formadores de agallas para su uso como porta-injertos de variedades cultivadas de berenjena, obteniéndose que *S. torvum* y *S. sisymbriifolium* mostraron reacción resistente frente a *M. incognita*.

Las plantas injertadas mostraron resistencia en condiciones semi-controladas y en campo, así como mayores rendimientos que las plantas no injertadas. Además, reportaron que berenjena injertada sobre patrones *S. torvum* produjo mayores rendimientos, las plantas fructificaron durante un periodo de tiempo mayor y fueron menos infestadas por *M. incognita*.

Por otro lado, Gómez *et al.* (2006), evaluó la resistencia /susceptibilidad de cuatro genotipos *S. lycopersicum* frente a *M. incognita*, y la influencia de este nematodo sobre el crecimiento de las plantas. Los resultados revelaron que todos los genotipos fueron buenos hospedantes del nematodo y todos se ubicaron en la categoría de muy susceptibles, excepto un genotipo (Aro8484) al igual que el control que salió susceptible.

En el caso de tomate de árbol, Espinosa (2007), demostró que plantas de este frutal injertadas en *N. glauca* alcanzaron mejor rendimiento con 22.7 kg/ha de fruta, comparadas con plantas injertadas en *S. auriculatum* que alcanzaron 15,6 kg/ha. De igual manera, lo demuestra Yupanqui (2013), quien comprobó que el mejor portainjerto es *N. glauca*, con el cual se obtuvieron brotes vigorosos y desarrollados encontrándose con el 92,6 % de injertos prendidos.

e) Número de agallas

Para la variable número de agallas (Tabla 17), se observó de acuerdo a la prueba de Tukey al 5% dos rangos de significación. Demostrándose que las especies *S. hirtum* y *N. glauca*, las cuales resultaron ser no infestadas a *M. incognita*, (rango a); obtuvieron valores bajos de agallamiento (Figura 29). Consecuentemente, estas dos especies serían consideradas como las mejores alternativas para su uso como portainjerto de naranjilla (*S. quitoense*) y tomate de árbol (*S. betacum*). Mientras que las demás solanáceas del estudio si resultaron ser infestadas, (rango b).

Tabla 17:

Número de agallas contabilizadas en las distintas Solanáceas inoculadas con el nematodo fitopatógeno *M. incognita*.

| Tratamiento | Descripción | Número promedio de agallas | Intervalo de confianza | Rango |
|-------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 25,11 | 22,54 – 27,67 | a |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 14,88 | 12,67 – 17,11 | a |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | 64,88 | 54,27 – 75,51 | b |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | 81,22 | 69,75 – 92,70 | b |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 22,67 | 19,59 – 25,74 | a |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | 62,53 | 53,81 – 70,84 | b |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 87,88 | 84,17 – 91,60 | b |

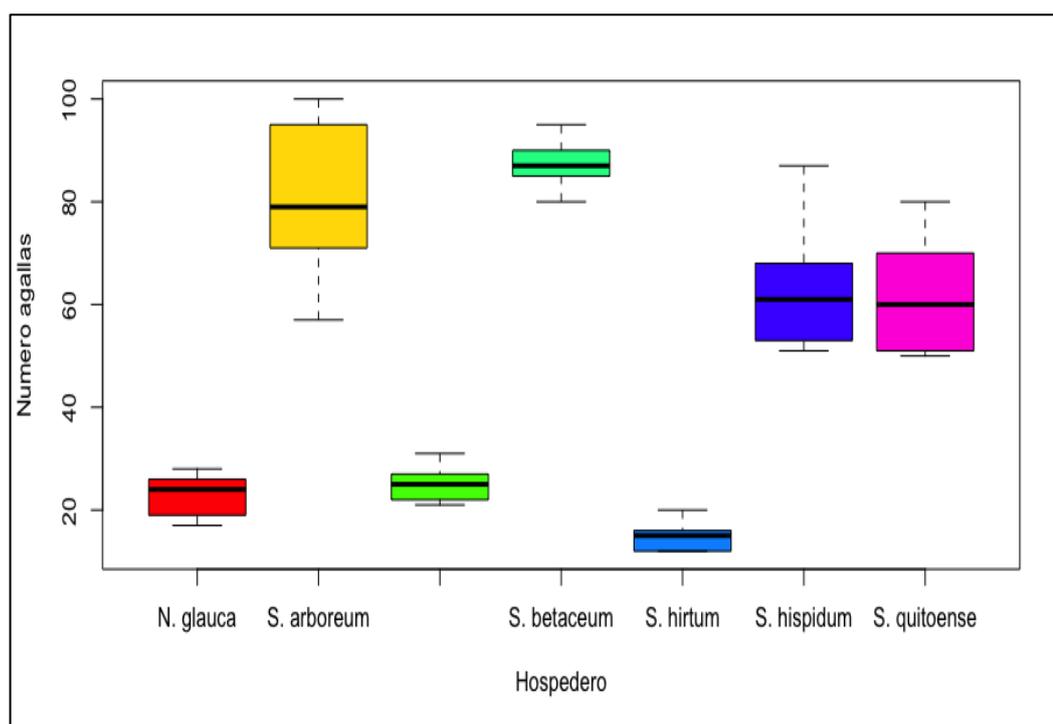


Figura 29: Número de agallas de *M. incognita* obtenida en las diferentes de Solanáceas

Según Oka *et al.*, (2003) y Halbrendt (1996), la disminución en la formación de agallas no solo depende de la especie vegetal sino también de la especie de

Meloidogyne involucrada, así una especie de planta puede presentar efecto antagonista hacia una o más especies de nematodos, pero no a todas.

f) Correlación entre parte aérea (follaje) y peso de raíz

La correlación (Pearson) general entre la parte aérea (follaje) y el peso de la raíz inoculada con *M. incognita* fue de 0,13; valor débil que indica que esta relación depende más del hospedero que una asociación general entre estas dos variables (Figura 30). Es decir, de acuerdo a la estimación de Spearman no se observó correlación entre la parte aérea y la raíz. Únicamente la especie *S. hispidum* obtuvo significación estadística (Tabla 18), lo que nos indica que hubo relación negativa entre la parte aérea y la raíz de la planta, es decir, mientras se produjo más parte aérea existió menos raíz o viceversa.

Tabla 18:

Valores de correlación entre la parte aérea de la planta y el peso fresco de la raíz inoculada con *M. incognita*.

| Tratamiento | Descripción | Correlación | p-valor |
|-------------|----------------------------|-------------|---------|
| S1 | <i>Solanum auriculatum</i> | 0,29 | 0,45 |
| S2 | <i>Solanum hirtum</i> | 0,43 | 0,24 |
| S3 | <i>Solanum hispidum</i> | -0,73 | 0,02* |
| S4 | <i>Solanum arboreum</i> | -0,14 | 0,71 |
| S5 | <i>Nicotiana glauca</i> | 0,20 | 0,60 |
| S6 | <i>Solanum quitoense</i> | -0,04 | 0,92 |
| S7 | <i>Solanum betaceum</i> | 0,27 | 0,48 |

* Significación estadística

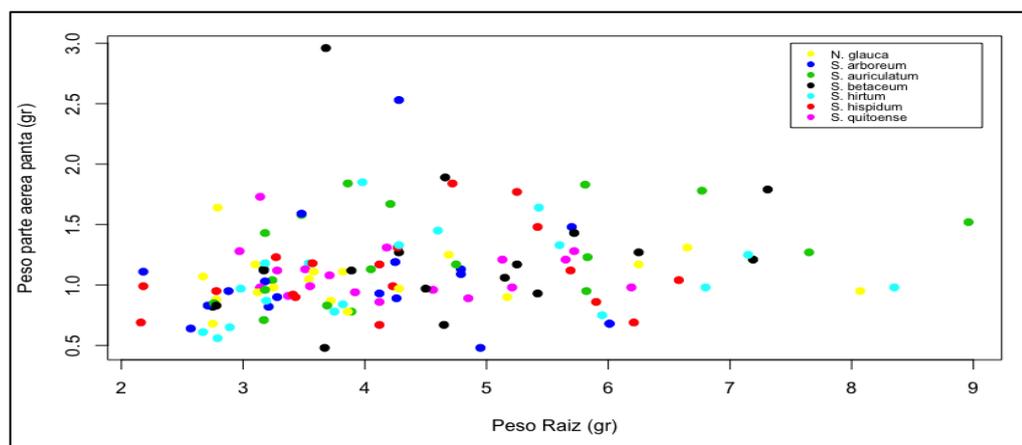


Figura 30: Correlación entre la parte aérea de la planta y el peso fresco de la raíz

g) Correlación entre el índice de agallamiento y población final

La correlación (Spearman) general entre el índice de agallamiento y la población final fue de 0,58; lo que nos indica que a mayor agallamiento se produce incremento de la población final del nematodo (Figura 31). También la misma figura nos demuestra que los datos se encuentran en los extremos, en valores de 3 y 4 que corresponde a los valores de la escala de Bridge y San Page (1980) para evaluar índice de agallamiento.

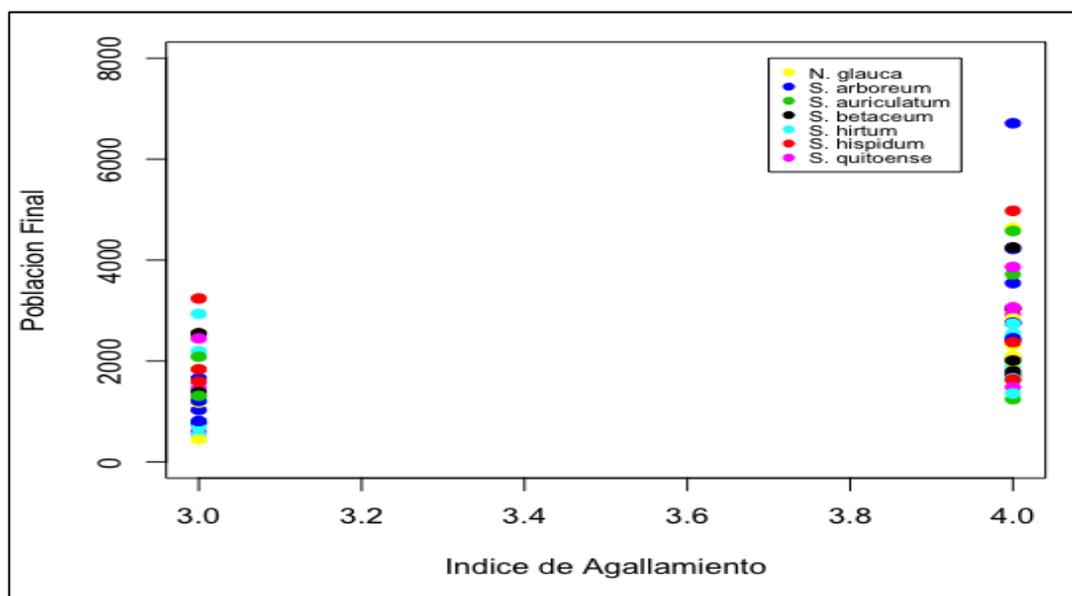


Figura 31: Correlación entre el índice de agallamiento y la población final de *M. incognita*

Según Starr *et al.* (2002), la formación de agallas no es imprescindible para el desarrollo del nematodo, por tanto, los cultivos susceptibles pueden mostrar bajos IA (índices de agallamientos) y altos niveles de reproducción del nematodo, o viceversa.

Navarro *et al.*, (2009), mencionan que el índice de agallamiento no debe ser utilizado como único elemento para determinar la resistencia de un genotipo o cultivar frente a *M. incognita*, aun cuando sea considerado elemento importante por el daño provocado por esta plaga.

Sasser y Carter (1985) y Hussey y Janssen (2002), coinciden en que los índices de agallamiento no necesariamente se relacionan directamente con el número de individuos que se encuentran parasitando las raíces, ya que una agalla puede contener uno o varios individuos de *Meloidogyne*. Además, los mismos autores manifiestan que la respuesta de la planta a la infestación está en estrecha relación con el tipo de hospedero y su susceptibilidad a la especie del nematodo. En consecuencia, la manifestación sintomática de agallas mostrará solamente una aproximación del número de juveniles que lograron penetrar la raíz y posteriormente establecerse.

3.4 Contenido de glicoalcaloides

Los resultados de las mediciones de contenidos de solanina y chaconina en frutos de tomate de árbol y naranjilla se muestran en el Anexo 21. Las Tablas 19 y 20 muestran los contenidos de glicoalcaloides: (solanina y chaconina) contenidos en los frutos de tomate de árbol y naranjilla de plantas injertadas y no injertadas.

Tabla 19:

Contenido de solanina en frutos de tomate de árbol y naranjilla proveniente de plantas injertadas y no injertadas.

| Injerto | Estadístico F | F valor | Solanácea | Media (mg/100g) |
|-------------------|---------------|---------|--|--------------------|
| Tomate | 62,22** | 0,0001 | <i>S. betaceum</i> sin injertar (testigo) | 2,73 b |
| | | | <i>N. glauca</i> | 3,46 a |
| | | | <i>S. auriculatum</i> | 2,89 b |
| Naranjilla | 0,26 | 0,63 | <i>S. quitoense</i> sin injertar (testigo) | 3,24 |
| | | | <i>S. arboreum</i> | 3,47 |
| | | | <i>S. hirtum</i> | 2,88 |

Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales, Prueba de Tukey al 5%.

Tabla 20:

Contenido de chaconina en el fruto de tomate de árbol y naranjilla proveniente de plantas injertadas y no injertadas.

| Injerto | Estadístico F | F valor | Solanácea | Media (mg/100g) |
|-------------------|---------------|---------|--|--------------------|
| Tomate | 1,68 | 0,26 | <i>S. betaceum</i> sin injertar (testigo) | 0,69 |
| | | | <i>N. glauca</i> | 1,10 |
| | | | <i>S. auriculatum</i> | 1,10 |
| Naranjilla | 30.85** | 0,0006 | <i>S. quitoense</i> sin injertar (testigo) | 0,95 ^a |
| | | | <i>S. arboreum</i> | 0,58b |
| | | | <i>S. hirtum</i> | 0,68c |

Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales, Prueba de Tukey al 5%.

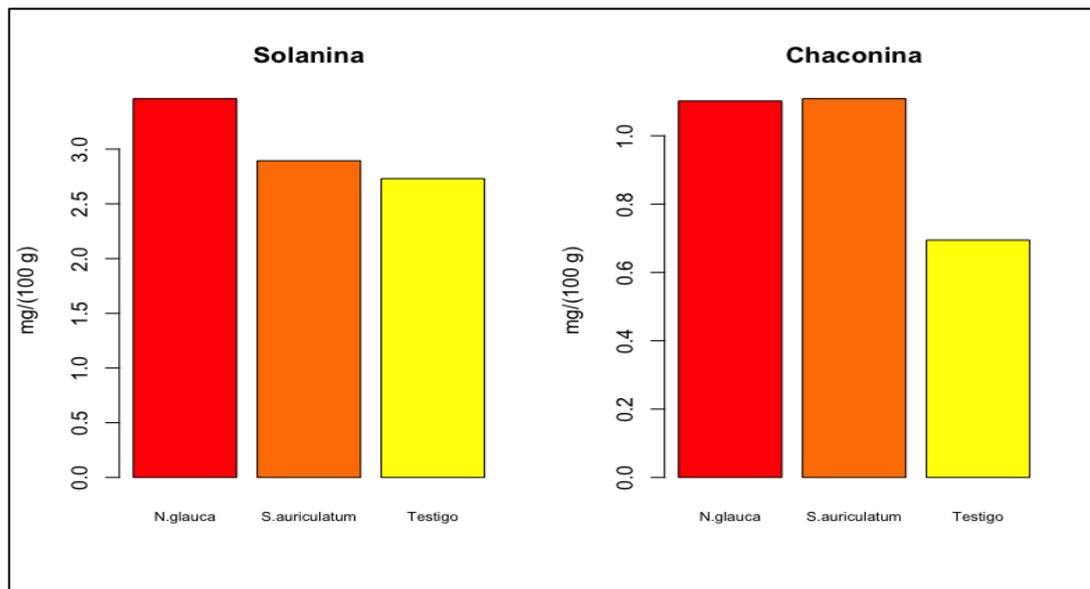


Figura 32. Contenido de solanina y chaconina en frutos de tomate de árbol provenientes de plantas injertadas y no injertadas (testigo).

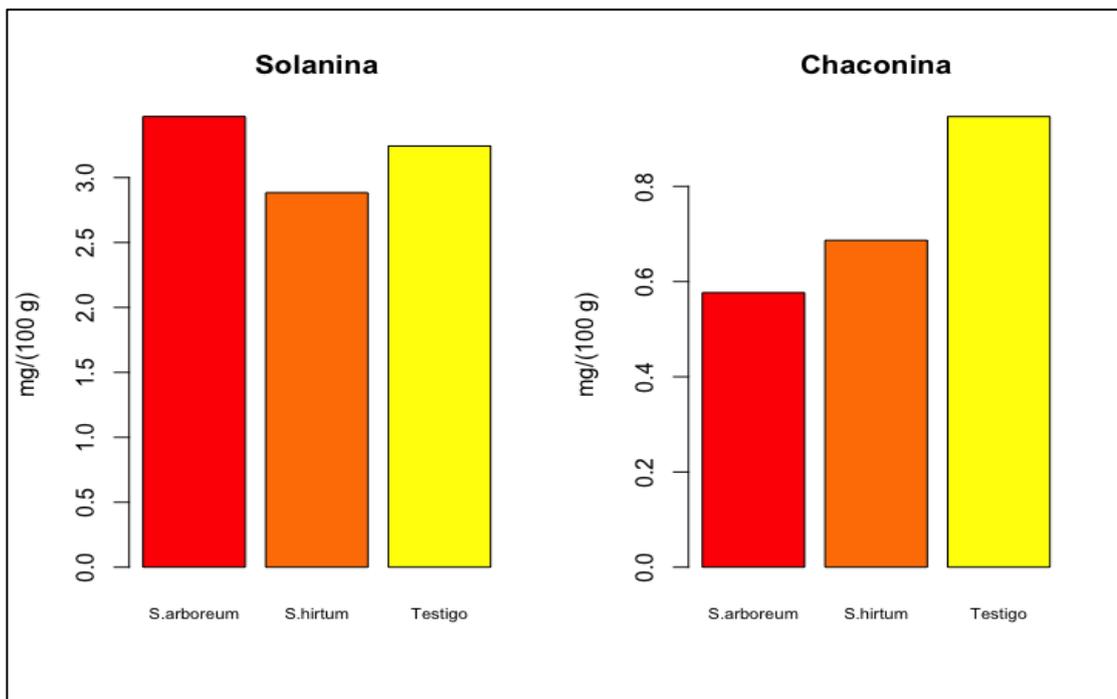


Figura 33: Contenido de solanina y chaconina en frutos de naranjilla provenientes de plantas injertadas y no injertadas (testigo).

Se pudo observar que existieron diferencias estadísticas en el contenido de solanina de los frutos analizados, encontrándose la mayor cantidad en el fruto proveniente de la planta injerta con *N. glauca*; mientras que para los otros dos tratamientos los contenidos son similares. Para el caso de la chaconina no se observaron diferencias entre tratamientos. Sin embargo ninguno de los niveles registrados tanto para solanina como chaconina alcanzó valores perjudiciales (20 mg/100 g) (Esposito *et al.*, 2002; Friedman, 2006; Tajner-Czopek *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha reportado en *S. tuberosum* que al pelar o cocinar el tubérculo maduro, el contenido de glicoalcaloides se reduce de 50 a 95% (Frydecka-Mazurczyk & Zgórska, 1997), este efecto se produce más marcadamente en los productos procesados (snacks y chips) debido a que se los fríe, hornea o cocina en microondas. Este fenómeno se produce porque se altera la estabilidad termal de los glicoalcaloides (Tajner-Czopek, 2007). Usualmente el tomate de árbol se lo consume pelado, incluso algunos consumidores lo cocinan previo a ingerirlo, por lo que su contenido de glicoalcaloides se reduciría aunque de acuerdo a los resultados de esta investigación, no alcanza niveles nocivos.

3.5 Difusión de resultados



Figura 34: Difusión de resultados Agricultores

Los avances y resultados de ésta investigación han sido difundidos a agricultores, técnicos y estudiantes a través de las visitas técnicas a la Granja Experimental Tumbaco. En estas visitas se mostró el ensayo de validación de las Solanáceas silvestres para evidenciar su respuesta al efecto de **la infestación** del nematodo fitopatógeno *M. incognita*. Además, en la Granja de Tumbaco del INIAP se mostró el proceso de injertación y se explicó los beneficios de las plantas injertadas en relación a la longevidad de la misma y su respuesta a factores bióticos.

En la tabla N° 21 se describen las instituciones que han visitado la Granja Experimental Tumbaco durante el año 2016 y fueron parte de la difusión de estos resultados.

Tabla 21:

Visita de Instituciones a la Granja experimental Tumbaco en el año 2016 y se han realizado las difusiones de resultados de la investigación: “Evaluar la infestación y no infestación de cinco especies de Solanáceas al parasitismo del nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne incognita* y el contenido de alcaloides en frutos de tomate de árbol y naranjilla injertados en estas especies”

| Fecha | Institución | N° de Participantes |
|-------------------|---|----------------------------|
| 8-01-2016 | UDLA (Universidad de las Américas) | 14 |
| 22-02-2016 | Misión Social Rumiñahui | 20 |
| 10-03-2016 | Unidad.Educativa Puruha | 25 |
| 21-04-2016 | Parque recreacional y bosque productor JERUSALEN | 09 |
| | Fruticultores de parroquias | |
| 06-07-2016 | Guasuntos,Pistishi,Sevilla,Pumallacta, cantón Alausí, Provincia Chimborazo | 45 |
| 08-07-2016 | Fundación Marco, cantón Pelileo,provincia de Tungurahua | 30 |
| 20-07-2016 | Estrategica Agropecuaria de Tungurahua | 40 |
| 21-07-2016 | Gobierno Descentralizado Municipal Rumiñahui | 8 |
| 02-08-2016 | Universidad Central del Ecuador | 7 |
| 04-08-2016 | Escuelas de Chacras, zona los chillos | 99 |
| 29-09-2016 | Cooperativa Pululahua | 11 |
| 10-10-2016 | Misión Social Rumiñahui | 28 |
| 27-10-2016 | FONCONDES | 15 |
| 31-10-2016 | GAD El Chical | 4 |
| 02-12-2016 | UDLA (Universidad de las Américas) | 31 |

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos mediante morfometría en larvas J2, hembras y machos estuvieron dentro de los rangos establecidos para la caracterización de la especie *M. incognita*.
- Las diferencias morfométricas observadas en los especímenes de larva J2 en las distintas solanáceas estuvieron influenciadas por el hospedero (alimento).
- Mediante la técnica de PCR convencional, utilizando los primers específicos MI-F y MI-R, que amplificaron la región IGS del ADNr en los especímenes de nematodos obtenidos de las distintas Solanáceas en estudio, se confirmó que pertenecían a la especie de *M. incognita*.
- Existió una ligera correlación (positiva) entre el índice de agallamiento y la población final, concluyéndose que a mayor agallamiento se incrementa la población final del nematodo.
- Las Solanáceas silvestres *Solanum hirtum*, *Solanum arboreum* y *Nicotiana glauca* presentaron una respuesta de no infestación a la inoculación del nematodo fitopatógeno; mientras que *Solanum auriculatum*, *Solanum hispidum*, *Solanum quitoense*, y *Solanum betaceum* mostraron infestación.
- Se concluye que a pesar de haber trabajado con una dosis de inoculación baja de 2.5 larvas/gramo de suelo, existió infección del nematodo en todas las Solanáceas en estudio.
- Se observó una respuesta de no infestación de todas las Solanáceas para las variables altura de la planta, peso seco de follaje y peso fresco de raíces; sin embargo con un período superior de evaluación (> 6 meses) se podrían producir respuestas de infestación debido a que existiría un mayor tiempo de interacción entre planta y patógeno.
- No existió correlación entre el peso de la parte aérea de la planta (follaje) con el peso de la raíz, por lo que no se puede relacionar directamente una disminución del sistema radicular con el mismo efecto en el follaje.

- Los niveles de glicoalcaloides, específicamente solanina, en los frutos de tomate de árbol y naranjilla alcanzaron valores muy bajos en comparación con el límite nocivo para la salud humana, por lo que el consumo de este tipo de frutas no es perjudicial.
- Se difundió los resultados obtenidos en esta investigación, enfocando el aspecto patológico (infestación o no infestación de *M. incognita* en las Solanáceas validadas) y el uso de estas especies como portainjerto para tomate de árbol y naranjilla.

CAPITULO V

RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar las técnicas de biología molecular (PCR) como herramienta de diagnóstico para realizar una identificación precisa de nematodos fitopatógenos.
- Promover la utilización como portainjerto de naranjilla a *Solanum arboreum* y/o *Solanum hirtum*; mientras que para tomate de árbol usar *Nicotiana glauca*, con la finalidad de reducir el uso de nematicidas al suelo en plantaciones de estos frutales.
- Realizar nuevos ensayos con mayor número de repeticiones y extender el período de evaluación hasta la cosecha del cultivo, para determinar la respuesta de las plantas en campo y su efecto en el rendimiento.
- Realizar estudios del contenido de alcaloides de cada componente de la fruta (cáscara, pulpa, semilla) para determinar valores independientemente debido a que de acuerdo a la literatura se concentran mayoritariamente en la cáscara del fruto. Además se debe analizar fruta en diferentes estados de desarrollo para determinar la fluctuación o tendencia de estos compuestos desde el cuajado del fruto hasta su cosecha.
- Realizar estudios que permitan determinar el modo de acción de los principios activos (alcaloides) relacionado a su función como mecanismos de defensa de la planta.
- Se recomienda que se realicen estudios de compuestos tóxicos, nocivos como los alcaloides en laboratorios oficiales del Estado, con el objeto de descartar indicios de estas sustancias en alimentos que son consumidos y pueden ser perjudiciales para la salud humana.
- Se recomienda realizar estudios moleculares de las especies de Solanáceas resistentes al nematodo *M. incognita* para identificar genes de resistencia.
- Los resultados de investigaciones que ayuden a mejorar la producción y productividad de cultivos deben ser difundidos a agricultores, técnicos y estudiantes involucrados en el campo de la agricultura.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, P., Favery, B., Rosso, M., Castagnone-Sereno P. (2003). Root knot nematode parasitism and host response: Molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4 (4), 217-224. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00170.x
- Acosta, P. Caracterización morfológica y molecular de tomate de árbol, *Solanum betaceum* Cav. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Adams, J., Dillman, A., & Finlinson, C. (2009). Molecular Taxonomy and Phylogeny. In R. Perry, M. Moens, & J. Starr, *Root-Knot Nematodes* (pp. 119-138). Wallingford: UK. CABI.
- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad, d. (2014). *Procedimiento específico de ensayo para extracción de nemátodos de raíz y partes vegetales por el método de Stemerding Procedimiento PEE/N/02*. Quito, Ecuador: AGROCALIDAD.
- Agrios, G. (2012). *Fitopatología*. DF, México: Editorial Limusa.
- Ammiraju, S., Veremis, C., Huang, X., Roberts, A., & Kaloshian , I. (2003). The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is on the short arm of the chromosome 6. In *Theoretical and Applied Genetics* (Vol. 106 (3), pp. 478-484). doi:10.1007/s00122-002-1106-y
- Andrivón, D., Corbiere , R., Lucas , J., Pasco, C., Gravouelle , R., Dantec, J., & Ellisseche, D. (2003). Resistance to late Blight and Soft in Six Potato Progenies and Glycoalkaloid Contents in the Tubers. *American Journal of Potato Research*, 80 (2), 125-134. doi:10.1007/BF02870211

- Anguisaca, I., Cadena, L., Guzmán, J., & Ochoa, K. (2011). *Alcaloides*. (Q. U. Ecuador, Ed.) Retrieved from http://q-organicauce.wikispaces.com/file/view/alcaloides.pdf_qo3_iv%c3%a1nanguisaca_t3.pdf
- Anwar, S., & Mckenry, M. (2002). Penetration, development, and reproduction of *Meloidogyne arenaria* two new grape rootstocks. *Journal of Nematology*, *34*(2), 143-145.
- Arias, Y., Gonzáles, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suarez, Z., & Perteira, B. (2009). Patógenos y plantas interacción. *Revista protección vegetal*, *24*(2), 1-13.
- Back, M., Haydock, P., & Jenkinson, P. (2003). Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathology*, *51*(6), 683-697. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00785.x
- Barbetti, M., Riley, I., You, M., Li, H., & Sivasithamparam, K. (2006). The association of necrotropic fungal pathogens and plant parasitic nematodes with the loss of productivity of annual medic-based pastures in Australia and options for their management. *Australasian Plant Pathology*, *35*(6), 691-706. doi:10.1071/APO6075
- Bell, C., Briggs, L., & Carroll, J. (1942). Solanum alkaloids. Part III. The alkaloids from *Solanum auriculatum*. *Journal of chemical society*, *1*, 12-16. doi:10.1039/JR9420000012
- Bertrand, B., Anthony, F., & Lashermes, P. (2001). Breeding for resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *coffea canephora*. *Plant Pathology*, *50*(5), 637-643. doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00597
- Bird, A. (1974). Plant Response to Root-Knot Nematode. *Annual Review of Phytopathology*, *12*, 69-85. doi:10.1146/annurev.py.12090174.000441

- Borloz, R. Potencialidad del *Solanum americanum* "Hierba mora" como enjuague oral eficaz para eliminar: Infección, dolor e inflamación en la cavidad oral. *Tesis doctoral*. Universidad Latinoamericana de Ciencia y Tecnología, Costa Rica.
- Calvo, M. (2016). *Bioquímica de los alimentos*. (U. d. Zaragoza, Producer) Retrieved from <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/otrassubstancias.html>
- Castagnone, S., Bongiovanni, M. P., & Djian-Caporalino, C. (2001). New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes Me1 and Me3 in pepper . In *Plant Breeding* (Vol. 120 (5), pp. 429-433). doi:10.1046/j.1439-0523.2001.00637.x
- Castillo, P., Vovlas, N., Subbotín, S., & Troccoli, A. (2003). A New Root-Knot Nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), Parasitizing Wild Olive in Southern Spain. *Phytopathology*, 93(9), 1093-102. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.9.1093
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae Una revisión. In *Agronomía Colombiana* (Vol. 26 (1), pp. 97-106).
- Chitwood, B. (1949). Root-Knot nematodes - Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi. In *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* (Vol. 16(2), pp. 90-104).
- Collinge, D. B., Borch, J., Madriz-Ordeñana, K., & Newman, M. A. (2001). The responses of plants to pathogens. In M. J. Hawkesford, & Buchner (Eds.), *Molecular analysis of plant adaptation to the environment* (pp. 131-158). Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers.
- Corporación Colombiana de Investigación, A. (2002). *El cultivo del Lulo*. Manizales, Colombia: CORPOICA.

- Crozzoli, R. (2014). *La Nematología Agrícola en Venezuela*. Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela .
- Cuevas-Arias, C., Vargas, O., & Rodríguez, A. (2008). Solanaceae diversity in the State of Jalisco, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79, 67-79.
- Dale, J., Von Schantz, M., & Plant, N. (2011). *From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology*. Oxford: UK: Wiley-Blackwell.
- De Ley, I., De Ley, P., Vierstraete, A., Karsen, G., Moens, M., & Vanfleteren, J. (2002). Phylogenetic Analyses of Meloidogyne Small Subunit rDNA. *Journal of Nematology*, 34(4), 319-327.
- Devran, Z. (2004). The Screening of F2 Plants for the Root Knot Nematode Resistance Gene, Mi by PCR in Tomato. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 28(4), 253-257.
- Díaz, L. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 32-55.
- Dong, W. C., Corley, H. P., Timper, T. B., Brenneman, & Mullinix, B. G. (2007). Comparison of Methods for Assessing Resistance to Meloidogyne arenaria in Peanut. *Journal of Nematology*, 39(2), 169-175.
- Dullarhide, S., Stirling, G., Nikulin, A., & Stirling, A. (1994). The role of nematode de fungi bacteria and abiotic factors in the etiology of applw replant problems in the granite belt of Queensland. *Journal of Experimental Agriculture*, 34(8), 1177-1182. doi:10.1071/EA9941177
- Edwards, E., Saint, R., & Cobb, A. (1998). Is there a link between greening and light-enhanced glycoalkaloid accumulation in potato (Solanum tuberosum) tubers? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (3), 327-332. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199803)76:3<327::AID-JSFA934>3.0.CO;2-G

- Eguiguren, R. (1982). Prospección, búsqueda de resistencia a nematodos asociados con el cultivo de naranjilla. In *Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla*. (pp. 103-108). Quito, Ecuador: INIAP.
- Eisenback, J., Hirschmann, H., Sasser, J., & Triantaphyllou, A. (1983). Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nemátodo agallador. In *International Meloidogyne Project* (p. 48). North Carolina, USA.
- Eisenbanck, J. D., & Hunt, D. J. (2009). General Morfology . In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr, *Root-knot nematodes* (pp. 18-54). Oxorfdshire: UK: CABI.
- Emiliozzi, M. Expresión de la Resistencia en plantas de tomate a nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne javánica*). *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Enríquez, W. Identificación de nematodos fitopatógenos relacionados al cultivo del pimiento (*Capsicum annum* l.) en la provincia de Imbabura-Ecuador. Mediante microscopia y PCR. *Tesis de pregrado*. Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí.
- Espil, N. (2012). *Plantas tóxicas: "Duraznillo blanco" (Solanum glaucophyllum, Solanaceae), reconocimiento y potencial aprovechamiento industrial*. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Belgrano.
- Espinosa, L. (2007). *Guía práctica sobre la técnica de la PCR*. Retrieved from <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/530/cap17.pdf>.
- Esposito, F., Fogliano, V., Cardi, T., Carputo, D., & Filippone, E. (2002). Glycoalkaloid Content and Chemical Composition of Potatoes Improved with Nonconventional Breeding Approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1553-1560.
- Forner, D. (2015). *Tomatina, el ataque de los insectos asesinos tomatina*. Retrieved from Valencia: Radical Liber : <http://didacforner.net/tomatina>

- Fraga, P. (1984). *Introducción a la Nematología Agrícola*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Hemisferio Sur S. A.
- Franklin, M. (1980). Nematology at the Commonwealth Institute of Helminthology. *Bulletin OEPP EPPO*, 10(3), 409-410. doi:10.1111/j.1365-2338.1980.tb02717
- Friedman, M. (2006). Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. *Agricultural and Food Chemistry*, (54) 23, 5223 - 5225. doi:10.1021/jf061471t
- Frydecka-Mazurczyk, A., & Zgórska, K. (1997). The content of glycoalkaloids in potato tubers. In *Ziemniak Polski* (Vol. 4, pp. 10-12).
- Furer , V., Hersch, M., Silvetzki, M., Breuer, G., & Zevin, S. (2011). Nicotiana glauca (tree tobacco) intoxication -- two cases in one family. *Journal of Medical Toxicology* , 7(1), 47-51. doi:10.1007/s13181-010-0102
- García , G., Stalker, H., Shroeder, E., & Kochert, G. (1996). Identification of RAPD and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenassi* into *Arachis hypogea*. *Genome*, 39, 836 - 845.
- Gheysen , G., & Fenoll, C. (2011). Arabidopsis as a Tool for the Study of Plant-Nematode Interactions. In G. Gheysen, & C. Fenoll, *Genomics and Molecular Genetics of plant-Nematode Interactions*. Springer-Verlag, Berlín: Ghent University.
- Gheysen, G., & Jones, H. (2013). Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions. En R. Pery, & M. Moens, *Plant Nematology*. Wallingford: UK CAB International.
- Girón , C. Eficacia del tratamiento contra la viruela cutánea aviar utilizando la pomada elaborada a base de hierba mora (*Solanum americanum*, *Solanum*

nigrescens). *Tesis de pregrado* . Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Gómez, L., R. , E., Hernández-Ochandia, D., Miranda, E., Leane, M., González, B., & Rodríguez, M. (2012). Susceptibilidad de genotipos de *Solanum lycopersicum* frente a *Meloidogyne incognita*. Kofoid y White (Chitwood). *Revista Protección Vegetal*, 27, 2.

Gómez, L., Rodríguez, M., Díaz, Viruliche, L., González, E., & Wagner, F. (2006). Evaluación de materiales orgánicos para la biofumigación en instalaciones de cultivos protegidos para el manejo de *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal*, 21(3), 178-185.

Griffiths, W., & Dale, F. (2001). Effect of light exposure on the glycoalkaloid content of *Solanum phureja* tubers. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5223-5227.

Halbrendt, J. (1996). Allelopathy in the management of Plant-Parasitic Nematodes. *Journal Nematology*, 28(1), 8-14.

Hans, B., & Wolfgang, W. (1987). *Manual de Química Orgánica*. Barcelona, España: Reverté.

Haseeb, A., Shama, A., & Shukla, P. (2005). Studies on the management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*-wilt fungus, *Fusarium oxysporum* disease complex of green gram, *Vigna ra diate* cv ML-1108. *Journal of Zhejiang*, 6(8), 736-742. doi:10.1631/jzus.2005.B0736

Hellenas , K. (1986). A simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloides in tuber extracts by H.p.l.c.; comparision with ELISA and a colorimetric method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(8), 776-782.

- Hemming , C. (2013). Compuestos secundarios Nitrogenados: Alcaloides. In J. Ringuelet, & S. Viña, *Productos Naturales Vegetales* (pp. 18 - 51). Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Hunt , J., & Handoo, Z. (2009). Taxonomy, Identification and Principal Species. In R. Perry, & J. Start, *Root-knot nematodes* . Wallingford: UK: CABI.
- Hussey, R., & Janssen, G. (2002). Root Knot Nematodes: Meloidogyne Especies. In L. Start, R. Cook, & J. Bridge, *Plant Resistance to Parasitic Nematodes* (pp. 43-70). Wallingford: UK: CABI.
- Hwang, C., Bhakta , A., Truesdell, G., Pudlo, W., & Williamson, V. (2000). Evidende for a Role of the N Terminus and Leucine-Rich Repeat Region of the Mi Gene Product in Regulation of Localized Cell Death. *The Plant Cell American Society of Plant Biologists*, 12 (8), 1319 - 1330.
- Jacquet, M., Bongiovanni, M., Martínez, M., Verschave, P., Wajnberg, E., & Castagnone-Sereno, P. (2005). Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the Mi gene. In *Plant Pathology* (Vol. 54(2), pp. 93-99).
- Jenkins, W. R., & Taylor, D. (1968). Plant Nematology. *Science*, 161(3837), 152-153. doi:10.1126/science.161.3837.152-a
- Jepson, S. (1987). Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from greenhouses in the Middle Black Sea Region of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 40(5), 675-685. doi:10.3906/zoo-1508-19.
- Jones , & Dengl. (2006). Molecular Aspects of plant-Nematode Interactions. In G. Godelieve, T. John, & Jones, *Plant Nematology* (pp. 274-298). Wallinford, USA.
- Karssen, G. (2002). *The Plant – parasitic Nematode Genus Meloidogyne Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe*. Boston, USA: Brill.

- Karssen, G., & Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. In R. Perry, & M. Moens, *Plant nematology* (pp. 73-108). Wellingford: UK CAB International.
- Kofoed, C., & White, W. (1919). A new nematodes infection of man. *Journal of the American Medical Association.*, 72, 567-569. doi:10.1001/jama.1919.02610080033010
- Korpan, Y. I., Nazareno, E. A., Skryshevskaya, I., Martelet, C., Jaffrezin-Renault, N., & El'skaya, A. V. (2004). Potato glycoalkaloids: True safety or false sense of security. *Trends in Biotechnology*, 22(3), 147 - 151. doi:10.1016/j.tibtech.2004.01.009
- Lee, S., Wildeboer, K., Panter, K., Kem, W., Gardner, D., Molyneux, R., . . . Pfister, J. (2006). Relative toxicities and neuromuscular nicotinic receptor agonistic potencies of anabasine enantiomers and anabaseine. *Neurotoxicology y Teratology*, 28(2), 220-228. doi:10.1016/j.ntt.2005.12.010
- Lisinska, G., & Leszczynski, W. (1989). *Potato science and technology*. New York, USA: Elsevier Applied Science Publishers.
- López, C., & Salazar, F. (1972). Morfometría y algunos hospedantes de Meloidogyne hapla en la Cordillera Volcánica Central de Costa Rica. In *Agronomía Costaricense* (Vol. 2(1), pp. 29-38).
- Lqbal, Z. Estudios en los alcaloides esteroides de Buxus papillosa y otras plantas relacionadas. *Tesis doctoral*. Universidad de Karachi, Pakistán.
- Manzanilla, R., & Marbán, N. (2012). *Practical Plant Nematology*. Guadalajara, México: Colegio de Postgraduados.
- Martínez, J. Prueba de viabilidad de neutrófilos para la detección de sustancias tóxicas en extractos de plantas como fuente de alimentos en los animales. *Tesis de Maestría*. Universidad de Colima, México.

- Maxwell, A., Pingal, R., Reynolds, W., & McLean, S. (1996). Two Steroidal Glycoalkaloids from *Solanum arboreum*. *Phytochemistry*, 42(2), 543-545. doi:org/10.1016/0031-9422(95)00846-2
- Meng, Q., Long, H., & Xu, J. (2004). PCR assaya for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *M. incognita*, *M. javánica* and *M. arenaria*. In *Acta Phitopatologica Sinica* (Vol. 34, pp. 204-210).
- Moens , M., Perry, R., & Starr , J. (2009). Meloidogyne Species - a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. In M. Moens, R. Perry, & J. Starr, *Root-Knot Nematodes* (pp. 6-17). Wallinford: UK: CABI.
- Moller, P., Jorgensen, P., & León, S. (1999). *Catalogue of vascular plants of Ecuador*. Missouri, USA: Missouri Botanical Garden.
- Navarro, Barthelemy, L., Gómez, L., R., E., González, E., & Rodríguez, M. (2009). Comportamiento de genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) frente a *M. incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de protección Vegetal*, 24(1), 54-57.
- Nee, M. (1986). *Flora de Veracruz: Solanaceae I*. Veracruz, México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.
- Nogué , S., Simón , J., Blanche , C., & Piquera, J. (2009). *Intoxicación por plantas y setas*. Retrieved from Barcelona: Menarini: http://www.fetoc.es/asistencia/intoxicaciones_plantas_y_setas_completo_2009
- Oka , Y., Karssen, G., & Mor, M. (2003). Identification, host range and infection process of *Meloidogyne marylandi* from turf grass in Israel. *Nematology*, 5(5), 727-734. doi:10.1163/156854103322746904
- Okada, H. (2010). *Technical Report on the PCR-DGGE Analysis of Soil Nematode Community*. Tokio, Japan: National Institute for Agro - Environmental.

- Ordeñana, K. (2002). Mecanismo de Defensa en las Interacciones Planta-Patógeno. In *Manejo Integrado de Plagas* (Vol. 63, pp. 22-32).
- Organización de las Naciones Unidas para la , A. (2016). *Normas Internacionales de los Alimentos*. (R. FAO, Editor) Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/que-es-el-codex/es>
- Pérez, J., Strage, M., Kalosbis, L., & Plocg, A. (2006). Diferencial response of Mi gene resistant tomato rootstock to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Crop Protection*, 25, 382-388. doi:10.1016/j.cropro.2005.07.001
- Perry, R., Moens, M., & Starr, J. (2009). *Root-Knot Nematodes*. WK: CABI.
- Piedra-Buena, A., Díez-Rojo, M., Robertson, I., López-Perez, J., Escuer, M., & De León, L. (2005). Comportamiento de *Meloidogyne incognita* sobre tomate y pimiento resistente en Uruguay. In *Nematropica* (Vol. 35(2), pp. 111-120).
- Pinell, S., Sauvain, M., & Cuevas, H. (1998). *Producción de solasodina a través del cultivo in vitro de tejidos de la especie Solanum marginatum*. San Paulo, Brasil : Biofarbo.
- Powers, T., Mullin, P., Harris , T., & Sutton , L. (2005). Incorporating Molecular Identification of *Meloidogyne* spp. into a large – scale regional Nematode Survey. *The Journal of Nematology*, 37(2), 226-235.
- Qui, J., Westerdahl, B., Anderson, C., & Wiliamson, V. (2006). Senitive PCR detection of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javánica* Extracted from soil. *Journal of Nematology*, 38, 434-441.
- Raddick, J. (1986). Steroidal alkaloids of the solanaceae. In W. G. Darcy, & C. U. Press (Ed.), *Solanaceae: biology and systematics* (pp. 321-330). New York, USA.
- Rahmanma, M., Rashid, M., Salam, M., Masud, M., & Hossain, M. (2002). Performance of Some Grafted Eggplant Genotypes on wild *Solanum* Root

Stocks Against Root-Knot Nematode. *Journal of Biological Sciences*, 2(7), 446-448. doi:10.3923/jbs.2002.446.448

Renfro, B. L. (1985). Breeding for disease resistance in tropical maize and its genetic control. In A. Brandolini, & F. Salamini (Eds.), *Breeding strategies for maize production improvement in the tropics* (pp. 341-365). Rome, Italy: Instituto Agronómico per l'oltremare.

Revelo, J. (2003). *Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria: FONTAGRO*. Retrieved from Manejo Integrado de Plagas para el Mejoramiento de la Producción sostenible de frutas en la zona andina. : <http://s1.fontagro.org/proyectos/manejo-integrado-de-plagas-para-el-mejoramiento-de-la-produccion-sostenible-de-frutas-en-l>

Revelo, J., & Sandoval, P. (2003). *Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (Solanum quitoense Lam.) en la Región Amazónica del Ecuador*. Quito, Ecuador: INIAP.

Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., Valverde, F., León, J., & Gallegos, P. (2010). *Manual del Cultivo Ecológico de la Naranjilla*. Quito, Ecuador: INIAP.

Riggs, R. (1992). Host range. In J. Riggs, & J. Wrather, *Biology and Management of the Sobebean Cyst Nematode* (pp. 107-114). Minnesota: USA: CABI.

Roberts, P., Smith, S., Mathews, & W. C. (1985). Quantitative aspects of the interaction of *Meloidogyne incognita* with *Fusarium* wilt on *Alcala* cotton.

Rosas, V., Cortés, A., López de la Cruz, D., Vega, J., Meza, S., & Smith, S. (2013). *Síntesis Eficiente de Solasodina: importante alcaloide con actividad biológica*. Retrieved from Costa Rica Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina: <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/clinica/article/view/13145/12417>

Salinas, P. (2012). *Plantas tóxicas comunes en el Estado de Mérida*. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes.

- Sanabria, A. (2009). Alcaloides de *Solanum marginatum*. Extracción directa de solasodina y contenido de la misma en tres estados de madurez de los frutos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 3(3), 29-35.
- Sasser, J. (1979). Root-knot nematodes: a global menace to crop production. In *Plant Disease* (Vol. 64, pp. 36-41).
- Sasser, J., & Carter, C. (1985). *An advanced treatise on Meloidogyne: volume I Biology and Control*. North Carolina, USA: North Carolina State University Graphics.
- Siddiqi, M. (2000). *Tylenchida parasites of plants and insects*. London: UK: CABI International Publishing.
- Sikora, & Fernández, E. (2005). Nematode parasites of vegetables. En L. Sikora y D. Bridge (Eds). In L. Sikora, & D. Bridge, *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, (pp. 319-392). London: UK: CABI International.
- Sorribas, F., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., & Valero, J. (2005). Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, 111 (1), 29-38. doi:10.1007/s10658-004-1982-x
- Starr, J., Bridge, J., & Cook, R. (2002). Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential. *Plant resistance to parasitic nematodes*, 1(1), 1-22. doi:10.1079/9780851994666.0001
- Stemerding, S., Lumb, E., & Lips, J. (1963). *Chemie-Ingr-Tech* (Vol. 35).
- Surzycki, S. (2003). *Human Molecular Biology*. Berlin, Germany: Wiley-Blackwell.
- Tajner-Czopek, A., Jarych-Szyszk, G., & Lisinska, G. (2007). Changes in glycoalkaloids content of potatoes destined for consumption. *Food Chemistry*, 106(2), 706-711. doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.034

- Taylor, A. (1968). *Introducción a la Nematología vegetal aplicada. Guía de la FAO para el estudio y combate de los nemátodos parásitos de las plantas*. Roma, Italia: FAO.
- Taylor, A., & Sasser, J. (1983). Biology, Identification and control of Root-Knot nematode (Meloidogyne Species). *Carolina State University Graphyics*.
- Tesarova, B., Zouhar, M., & Rysanek, P. (2003). Development of PCR for specific determination of root-knot nematode Meloidogyne incognita. *Plant Protection Sciences*, 39(1), 23-28.
- Towell, J. (2001). Una semblanza de las Solanaceas. In *Entobiología* (pp. 18-24).
- Triviño, C. (2004). *Control Biológico de Meloidogyne spp. con la bacteria Pasteruria penetrans en campus de producción*. Guayaquil, Ecuador: INIAP.
- Triviño, C., & Escobar, J. (2003). Síntesis de los nemátodos fitoparásitos en plantaciones comerciales de flores del Ecuador. In *Nematrópica* (Vol. 33(2), pp. 122-123).
- Valarezo, C., & Samaniego, V. (1982). El cultivo de la naranjilla (*S. quitoense* lam) en el área del proyecto Zamora- Nangaritzza. En: F. Dennis y S. Camacho. In *Memorias de la primera conferencia internacional de naranjilla* (pp. 33-45). Quito, Ecuador: INIAP.
- Valdés, J., Villaseñor, J., Encina, J., & Ortiz, E. (2015). The grass family (poaceae) in Coahuila, Mexico: Diversity and Distribution. *Botanical Sciences*, 93(1), 1-11. doi:10.17129/botsoci.79
- Vanderplank, J. E. (1984). *Disease Resistance in plants*. Pretoria, South Africa: Academi Press.
- Velasco, R. (2005). Marcadores Moleculares y la extracción de ADN. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3(1), 1-5.

- Viteri, P., León, F., Vásquez, C., Encalada, C., Martínez, A., Revelo, J., . . . Honojosa, M. (2010). INIAP 700 Nicotiana, INIAP 701 Auriculatum, INIAP 702 Cujacu: Solanáceas silvestres utilizadas como portainjertos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) con alto rendimiento, resistencia a enfermedades y mayor longevidad. *Solanáceas Silvestres utilizadas como portainjertos de tomate de árbol (Solanum betaceum cav con alto rendimiento, resistencia a enfermedades y mayor longevidad.)*.
- Williamson, V., & Roberts, P. (2009). Mecanismos y Genética de Resistencia. In P. Perry, M. Moens, & J. L. Starr, *Root-Knot Nematodes* (pp. 301 - 325). Wallingford: UK: CABI.
- Yencho, C., Kowalski, S., Kennedy, G., & Sanford, L. (2000). Segregation of Leptine Glycoalkaloids and Resistance to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* (Say) in F2 *Solanum tuberosum* (4x) x *S. chacoense* (4x). In *American Journal of Potato Research* (Vol. 77(3), pp. 167-168).
- Yupanqui, M. Evaluación de tres patrones en el cultivo de tomate de árbol. *Cyphomandra betacea. Tesis de Pregrado*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Zárate, P., Jiménez, C., Badillo, J., Garibay, C., & Oliver, M. (2009). *Manual de Laboratorio de Biotecnología Molecular*. México: Instituto Politécnico Nacional: Departamento de Bioprocesos.
- Zavala, A. J. (2010). Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. *Revista Ciencia Hoy*, 20(117), 52-59.
- Zijlstra, C. (2000). Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* y *M. hapla* base on scar-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology*, 106(3), 283-290. doi:10.1023/A:1008765303364