

REACCIÓN DE BABACO, CHAMBURO Y JIGACHO MICROPROPAGADOS IN VITRO AL NEMÁTODO NODULADOR MELOIDOGYNE

Response of babaco, chamburo and jigachoin vitro micropopagated to the infection of Meloidogyne's nematode-knot

Autores:

Ing.Agr.Jorge Washington Donato Ortiz¹ y MSc.Ing. Agr. Víctor Hugo Cortez Sandoval².

1- Docente Investigador, Universidad Estatal de Bolívar

2- Docente Investigador, Universidad Estatal de Bolívar

RESUMEN

Para el estudio de la reacción a Meloidogyne se recolectaron muestras de plantas infectadas con nematodos.

Como resultado se encontró que por comparación de patrones perineales entre los especímenes aislados de las caricáceas, la especie de nematodo que les infecta es Meloidogyne incognita.

Las tres especies de caricáceas respondieron con sintomatología similar en aspecto e intensidad al ataque de los nematodos. La calificación de resistencia de las tres especies estudiadas cayó dentro del grado de susceptible para babaco, chamburo y jigacho, lo que demostró que tienen igual grado de susceptibilidad al ataque en los estadios iniciales del desarrollo vegetativo.

Palabras Clave: Meloidogyne, estadios, especímenes, in vitro.

ABSTRACT

In research of Meloidogyne's reaction in babaco, chamburo, jigacho, in vitro micropopagated, were collected plant samples with nematode's infection.

For vegetative development, the factor in this investigation is the inoculum of nematodes Meloidogyne, it's from roots of investigated plants, also there is a witness without inoculation. The Caricaceae and inoculum types, from roots of investigated plants, were considered for the ovulation of resistance to nematodes.

In the results, between perineal patterns and Caricaceae's specimens isolated, were discover that the Meloidogyne incognita is the nematode that taint to these.

The Caricaceae's spices have similar symptomology in aspect and intensity to the attack of nematodes. The spices investigated have a degree of resistance susceptible, demonstrate that the babaco, chamburo and jigacho have an identical degree of resistance, in the initial stage of vegetative development.

Key Words: Meloidogyne, stage, pecimens, in vitro.

INTRODUCCIÓN

El babaco (*Carica pentagona*), chamburo (*Caricap ubescens*) y jigacho (*Carica stipulata*), son especies nativas del Ecuador, adaptadas a condiciones climáticas que van desde los 1500 hasta los 2200 msnm., según observaciones realizadas en plantas en estado natural y en forma silvestre. Además, en parcelas de agricultores se ha llegado a determinar la gran valía del chamburo y del jigacho como portainjertos para el babaco.

Entre los problemas más graves del babaco se encuentra el ataque por los nematodos noduladores del género *Meloidogyne*, porque disminuye la producción y calidad de los frutos, aunque lo más grave realmente es la disminución de la vida útil de los huertos. Las enfermedades radiculares se complican ya que los métodos de detección empleados no son efectivos y las técnicas de control empleadas son de poca eficacia y muy costosas. Cuando las plantas que son susceptibles son infectadas en la etapa de plántula, las pérdidas son considerables y pueden dar lugar a la destrucción total de la plantación. Si las infecciones ocurren en plantas adultas los efectos pueden ser ligeros o disminuir en forma considerable la producción. Los nematodos del género *Meloidogyne* son formadores de agallas, por lo que hacen que las raíces se rajen y permanezcan abiertas, propiciando así las invasiones secundarias de otros nematodos, hongos y bacterias.

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificar la (s) especie (s) de *Meloidogyne* que afecta (n) al babaco, chamburo y jigacho.
- Establecer los niveles diferenciales de resistencia/tolerancia a *Meloidogyne* sp.. En materiales de babaco, chamburo y jigacho, propagados in vitro.

MATERIALES

En el presente trabajo se utilizaron plantas de babaco, chamburo y jigacho, además de nódulos de raíces como fuente de inóculo de las especies antes señaladas, entre los equipos y materiales de laboratorio tenemos la cámara de flujo laminar, horno microondas, estufa, refrigerador, balanza analítica, autoclave, agitador magnético, pH-metro, microscopio de disección con cámara incorporada, microscopio compuesto con cámara incorporada, reloj, pinzas, bisturí de oculista, bisturís, magentas, material de asepsia, cajas Petri con cuadrículas, vidrio reloj de 5 cm de diámetro, contador de mano, agujas rectas y transportadoras, agua destilada esterilizada. Reactivos para los medios de cultivo como macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento. El material de invernadero utilizado fue cajones para enraizamiento de las estacas de babaco, chamburo y jigacho, macetas, micro invernaderos, jiffy pellets.

MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y del Ambiente de la Universidad Estatal de Bolívar. Para la recolección de muestras de las plantas infectadas con nematodos se eligió el sector de La Villita, situada a una altitud de 2350 m.s.n.m. a 7 km de la ciudad de Ambato. Para el muestreo se tomó en cuenta daños aparentes en el follaje y nudosidades en la raíz.

FACTORES EN ESTUDIO

Para la identificación de especies de *Meloidogyne* así como para evaluar la resistencia/tolerancia, se consideró como factor las especies de caricáceas hospederas del patógeno. Para el desarrollo vegetativo de las plantas en estudio propagadas in vitro e inoculadas con *Meloidogyne* se trabajó con inóculos de babaco, chamburo, jigacho y un testigo sin inóculo, por cada especie.

TRATAMIENTOS

Para la identificación de especies de *Meloidogyne*, en la comparación de patrones perineales no se pudieron establecer tratamientos por cuanto es un procedimiento visual. Para el desarrollo vegetativo los tratamientos fueron a través de inóculos de babaco, jigacho, chamburo más el testigo sin inóculo.

En lo que se refiere a resistencia/tolerancia a nematodos se utilizaron plantas de cada una de las especies infectadas con inóculos provenientes de las otras dos.

PROCEDIMIENTO

Cada unidad experimental estuvo constituida por una planta de babaco, de chamburo y de jigacho en los ensayos para identificación de especies de *Meloidogyne* como para la evaluación de desarrollo vegetativo y resistencia a nematodos. El diseño experimental para la identificación de la (s) especie (s) de *Meloidogyne* que afecta (n), se realizó mediante un muestreo al azar de las raíces de las plantas en estudio, con diez repeticiones en cada caso. En los ensayos que evaluaron el desarrollo vegetativo se aplicó un diseño de bloques completamente al azar, con 4 tratamientos y 4 repeticiones. Para la evaluación de resistencia/tolerancia al nematodo nodulador se aplicó un diseño de bloques completamente al azar, con arreglo factorial 3², con 4 repeticiones.

DATOS TOMADOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN

Para la identificación de especies de *Meloidogyne* se

realizaron medidas micrométricas de longitud y diámetro de larvas juveniles obtenidas a partir de matrices de huevos provenientes de las plantas infectadas. Se determinaron la longitud y el diámetro en micras, con la ayuda de un microscopio compuesto con escala. Se efectuaron 20 mediciones por cada especie de *Carica hospedera*.

Para el conteo de número de huevos por matriz se utilizaron cajas de Petri con cuadrículas para tener mayor facilidad en el conteo en el microscopio de disección. Se contaron 50 matrices de huevos obtenidos de plantas, luego se sacó un promedio por unidad de observación.

Para evaluar el desarrollo vegetativo se tomó en cuenta la altura de la planta, el diámetro del tallo, el número de hojas verdaderas por planta y el peso de la raíz.

En la evaluación de resistencia/tolerancia a *Meloidogyne* se determinó el índice de nodulación, el número de nódulos en 1 g de raíz/planta, matrices por nódulo y por gramo y el factor de producción.

MÉTODOS ESPECÍFICOS DE MANEJO DEL ENSAYO

Cultivos in vitro

Se preparó el medio de cultivo donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales Macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co). Normalmente es imprescindible una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética de los tejido in vitro. Además, el medio fue enriquecido con Aminoácidos, Vitaminas y Reguladores del Crecimiento para introducción, selección, desinfección de brotes y siembra; y transferencia in vitro.

Recolección e identificación de *Meloidogyne*

Para la obtención de los nematodos se recolectaron raíces de plantas con síntomas de estar infectadas. La identificación de especies de *Meloidogyne* se realizó por medio de patrones perineales para lo cual, las hembras que se obtuvieron por disección de las raíces de las plantas en estudio, en la cuarta etapa larvaria (forma de pera) fueron observadas en el microscopio de disección y el cuerpo cortado lo más cerca posible al extremo posterior con un bisturí de oculista, luego se colocó al pedazo cortado sobre una placa portaobjeto, de tal manera que el patrón quede en el lado superior y cubierto con la placa cubreobjetos. Se observó al microscopio compuesto a 400X utilizando la clave de Sasser y Carter. Se registraron micrografías al microscopio compuesto.

Inoculación

La fuente de inóculo se obtuvo de plantas infectadas.

Para evitar que se sequen se utilizaron fundas de polietileno y se almacenaron en la refrigeradora a $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para la inoculación se lavaron las raíces con agua destilada y se separaron las matrices de *Meloidogyne* utilizando el microscopio de disección a 10X y agujas rectas esterilizadas.

Las matrices se colocaron en cajas Petri con 10 ml de agua destilada esterilizada. Para la inoculación se utilizaron 10 matrices de huevos para cada planta. Se distribuyó la suspensión agua-matrices en un pequeño canal alrededor del cuello de la planta. Las macetas se incubaron bajo condiciones de invernadero, manteniendo regularmente la humedad del sustrato.

Niveles diferenciales de resistencia/tolerancia a *Meloidogyne*.

Para determinar el nivel de resistencia/tolerancia en los materiales propagados in vitro se cumplieron los siguientes pasos:

- Recolección y desinfección de estacas.
- Desinfección del sustrato
- Enraizamiento de las estacas en cajones de madera con sustrato (75% suelo agrícola más 25% de arena).
- Obtención, propagación y enraizamiento de los brotes.
- Inoculación con *Meloidogyne*.
- Evaluación de índices de evaluación y matrices.

Se contaron las matrices de huevos existentes en el sistema radicular de la planta parcela y se determinaron los índices al comparar los valores obtenidos con la escala propuesta por Taylor y Sasser, (cuadro 1). De igual forma se procedió en el caso de número de nódulos y el índice de nodulación.

NÚMERO DE NODULOS O MATRICES DE HUEVOS	ÍNDICE DE NODULACIÓN O MATRICES DE HUEVOS
0	0
1 - 2	1
3 - 10	2
11 - 30	3
31 - 100	4
<100	5

Tabla 1: Escala Para Índice De Nodulación

El factor de reproducción que establece el nivel de susceptibilidad del hospedero, ante el ataque de *Meloidogyne* se encuentra por medio del cociente entre la población final y la población inicial ($R = Pt/Pi$). La población inicial para esta investigación fue de 5000

huevos por maceta y la población final se determinó por medio de la técnica de Hague, la cual indica que antes de procesar la muestra es necesario mezclar y cernir bien el suelo de las macetas en un tamiz.

La muestra normal debe ser de 200 ml, la misma que proviene de varias sub-muestras. Para mezclar bien el suelo, es necesario colocar la muestra tamizada en una hoja de plástico cuadrada. Posteriormente se toma un extremo y se sacude al lado contrario, para luego, proceder en la misma forma con los otros extremos. Antes de tomar la muestra se requiere mover y sacudir el suelo por lo menos unas 10 veces.

Finalmente, la suspensión agua-nematodo se limpia a través de un embudo de Bearman por 24 horas, para luego contar la población de nematodos *Meloidogyne* en una caja Petri cuadrada. Se determinó también el número final de huevos desmenuzando las raíces en una licuadora. Los huevos extraídos son coloreados con unas pocas gotas de solución de fuscina más ácido acético.

Identificación de especies de *Meloidogyne*

Obtención de medidas micrométricas de larvas juveniles

Los nematodos fueron colocados en un vidrio reloj y puestos en una cámara húmeda hasta que eclosionen los huevos. En una placa portaobjeto se puso una gota de formalina al 2% en la cual se colocó las larvas capturándolas con una aguja apropiada para hacer medidas en el microscopio compuesto a 200X, luego se transformaron a micras multiplicando por 50 el valor obtenido.

Comparación de patrones perineales

Se realizó la comparación de patrones perineales de especímenes hembras obtenidas en el presente estudio y fotomicrografías de *Meloidogyne incognita* reportadas por Taylor y Sasser. Ambas fuentes fotográficas fueron procesadas con rastreador computarizado para su inclusión al texto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la especie de *Meloidogyne*

Las secciones perineales de los especímenes hembras aislados en las muestras experimentales, comparados con los patrones perineales detallados en (Taylor y Sasser, 1983) mostraron ser similares entre sí, por lo que se concluye que los nematodos encontrados atacando al babaco, chamburo y jigacho pertenecen a la especie *M. incognita*.

protuberancias del estilete (Taylor y Sasser, 1983). La forma del poro excretor es alargada con un arco dorsal más o menos achatado. Presenta estrías de lisas a onduladas con algunas bifurcaciones en las líneas laterales.

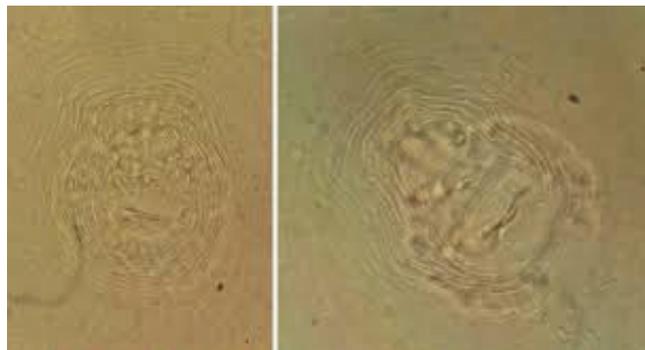


Figura 1: Fotomicrografías de patrones perineales de *M. incognita*

Se observa además la distribución típica de las estrías onduladas y lisas señaladas anteriormente y la forma del poro excretor es alargada con el arco dorsal algo achatado.

Al comparar estadísticamente las características de los nematodos en estudio, se encontró que las condiciones de reproducción definidas como el número de huevos por matriz son similares para las matrices encontradas en las tres especies de caricáceas.

La morfología y longitud de las larvas del nematodo, también presentó similitud entre las muestras de las tres caricáceas, al presentar ausencia de significación en el análisis de varianza para longitud y diámetro de larvas juveniles calculado en base a los datos obtenidos, lo que por analogía confirma que la especie *M. incognita* ataca indistintamente a cualquiera de las especies de caricáceas estudiadas. Se debe indicar que los estados juveniles en el presente ensayo mostraron un diámetro de 14.97 μm y una longitud de 438 μm , valores similares a los reportados por Sasser y Carter, quienes indican que las larvas juveniles de esta especie tienen una longitud de 400 μm y un grosor de 15 μm . Es importante señalar que los nematodos de las plantas de babaco, chamburo y jigacho se encontraron únicamente en el interior de los nódulos radiculares.

Desarrollo vegetativo de las plantas propagadas In Vitro e inoculadas con *Meloidogyne*

En cuanto al desarrollo vegetativo según los análisis de varianza realizados, no se aprecia efecto diferencial de los tratamientos aplicados, es decir del tipo de inóculo empleado, deduciéndose que el crecimiento de las plantas no se ve afectado por la presencia de los nema-

todos en su sistema radicular en forma diferente para cada tipo de inóculo, sino más bien que todas pueden sufrir el mismo grado de detrimento en su desarrollo, ya que se trata de una misma especie de patógeno y la reacción de los hospederos es similar.

Resistencia/tolerancia a *Meloidogyne*

Para la evaluación de resistencia a nematodos se modificó el diseño experimental a un factorial 3², eliminándose al testigo por no ser absoluto y tomando en cuenta a la especie como un factor en estudio. Al igual que el desarrollo vegetativo, no se aprecian diferencias significativas para los factores en estudio, siendo evidente que las tres especies hospederas estudiadas son igualmente susceptibles a *Meloidogyne*.

Para determinar el grado de reacción de las especies hospederas a *Meloidogyne*, se realizó una comparación entre la altura de la planta y el factor de reproducción del patógeno, en base a la escala de Starr 1990, encontrándose similares respuestas en las tres especies hospederas.

CONCLUSIONES

- El análisis microscópico de patrones perineales de los nematodos hembra aislados de los nódulos radiculares de babaco, chamburo y jigacho determinó que la especie que les ataca es *M. incognita*.
- Las tres especies de caricáceas investigadas responden de manera similar al ataque del nematodo en inoculaciones cruzadas.
- El desarrollo vegetativo de las tres especies inoculadas con *Meloidogyne* fue significativamente diferente, demostrando similar comportamiento de susceptibilidad.

RECOMENDACIONES

- Probar la reacción de babaco, chamburo y jigacho propagados in vitro en condiciones de invernadero y suelo con inóculo natural de campo. Investigar la reacción de las tres especies propagadas in vitro en condiciones de campo

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. (1995). *Fitopatología* (No. SB731. A3718 1986.). Uteha.

Abd-Elgawad, M. M., & Anter, E. A. (1989). A modified rating for screening plant genotypes against root-knot and reniform nematodes. *International nematology network newsletter (USA)*.

Andrés, M. F., Delibes, A., & López-Braña, I. (2008). Utilización de marcadores moleculares en el estudio de nematodos fitoparásitos. In *Herramientas biotecnológicas en fitopatología* (pp. 189-204). Mundi Prensa Libros

SA.

Bridge, J. (1975). Nematodos parásitos de plantas en la costa y sierra del Ecuador. *Nematropica*, 5(2), 19-20.

Colbert, B. (1979). Los nemátodos reducen el rendimiento del cafeto [*Coffea arabica*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*]. *Revista Cámara del Agro (Guatemala)*. (May, 1(3), 28-29.

Daffari, E. F. (2000). Los nemátodos fitoparásitos.

Fabara, J. (1988). Diagnóstico y estudio fenológico del cultivo del babaco en los cantones Baños y Patate.

López, R. Q. (2003). Estudio realizado en el sureste de la Península Ibérica, de cuarenta especies de nematodos de vida libre. Universidad de Jaén.

Starr, J. L., & Starr, J. L. (1990). Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes (No. C/581 M4).

Tiyagi, S. A., & Alam, M. M. (1988). Pathogenicity of root-knot nematode on mung bean. *International nematology network newsletter (USA)*.

Tiyagi, S. A., & Alam, M. M. (1988). Pathogenicity of root-knot nematode on mung bean. *International nematology network newsletter (USA)*.

Velastegui, J. R., & Fiallos, B. E. (1987). Plant-parasitic nematode problems in some horticultural crops in Ecuador. *International Nematology Network Newsletter*, 4(4), 3-5.

Viteri, D., & Soria, I. (1999). Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador.

Webgrafías

Jaraba, J.D., Lozano, Z., & Espinosa, M. (2007). Nematodos agalladores asociados al cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en el departamento de Córdoba, Colombia. *PROTECCIÓN DE CULTIVOS, Agronomía Colombiana* 25(1), 124-130 disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n1/v25n1a14.pdf>

Carillo, J.A., Allende, R., Marquez, I., Cruz, J.E., & García, R. S., (2000). Identificación y Distribución de Especies del Nematodo Nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Hortalizas, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Disponible en: http://www.researchgate.net/profile/Raymundo_Garcia-Estrada/publication/237037381_Identificacin_y_Distribucion_de_Especies_del_Nematodo_Nodulador_%28Meloidogyne_spp.%29_en_Hortalizas_en_Sinaloa_Mxico/links/0046352a5f51798a3b000000.pdf

Quiñones Galvez, J., Sosa, D., Demey, J., Alemán, S., Sosa, M., Parra, D., . . . Infante, D. (2015). Caracterización bioquímica de hojas de clones de *Theobroma cacao* y su relación con los tricomas. 2015, 17(2), 11. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54265