

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

INFORME FINAL

Evaluación de cinco especies de microorganismos, como estrategia de control biológico, sobre
quistes de *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*

Equipo de investigación

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹

Ph.D. Sergio Alejandro Melgar Valladares³

Guatemala febrero de 2020

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología³

Dr. Félix Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa de Ciencias Básicas

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹
Coordinador del Proyecto

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}
Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹
Investigador

Ph.D. Sergio Alejandro Melgar Valladares³
Investigador

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología³

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.48. durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas. Financiamiento aprobado por Digi: Q. 249,019.1Financiamiento ejecutado: Q 207,123.50

Índice

1	Resumen.....	1
2	Palabras clave	1
3	Abstract	2
4	Introducción.....	3
5	Planteamiento del problema	5
6	Preguntas de investigación:	6
7	Delimitación en tiempo y espacio.....	6
8	Marco teórico.....	7
8.1	Nematodos formadores de quistes en el cultivo de papa	7
8.2	El nematodo dorado de la papa <i>Globodera rostochiensis</i>	9
8.2.1	Ciclo de vida de <i>G. rostochiensis</i>	10
8.3	El nematodo pálido de la papa <i>Globodera pallida</i>	13
8.3.1	Ciclo de vida de <i>G. pallida</i>	13
8.4	Sintomas y daños causados por <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	15
8.5	Control químico	15
9	Estado del arte	16
9.1	Identificación molecular de <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	16
9.2	Control biológico contra <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	17
10	Objetivos.	19
11	Hipótesis estadística.....	19
12	Materiales y métodos	20
12.1	Enfoque y tipo de investigación.....	20
12.2	Recolección de información:	20
12.3	Técnicas e instrumentos.....	21

12.4	Procesamiento y análisis de la información:.....	27
13	Vinculación, difusión y divulgación	28
14	Productos, hallazgos, conocimientos o resultados	28
14.1	Presencia de <i>G. rostochiensis</i> y/o <i>G.pallida</i> , a través de métodos moleculares, en cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango.....	28
14.2	Presencia de las especies <i>T. harzianum</i> , <i>T. Virens</i> , <i>P. lilacinus</i> , <i>P. fluorecens</i> y <i>S. marcescens</i> en cada localidad de estudio, las cuales parasitan quistes de los nematodos <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	32
14.3	Diversidad genética de los microorganismos identificados.....	35
14.4	Efectividad de parasitismos de microorganismos sobre quistes de <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	38
15	Análisis y discusión de resultados	40
15.1	Presencia de <i>G. rostochiensis</i> y/o <i>G.pallida</i> , a través de métodos moleculares, en cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango.....	40
15.2	Presencia de las especies <i>T. harzianum</i> , <i>T. Virens</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Pseudomonas fluorecens</i> en cada localidad de estudio, las cuales parasitan quistes de los nematodos <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	40
15.3	Diversidad genética de los microorganismos identificados.....	41
15.4	Efectividad de parasitismos de microorganismos sobre quistes de <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	42
16	Conclusiones.....	43
17	Impacto esperado	44
18	Referencias	44
19	Apéndices	49

Índice de figuras

Figura 1. Raíces del cultivo de papa infectadas por <i>G. rostochiensis</i> (Eppo, 2013).....	8
Figura 2. Rompimiento de un quiste de <i>G. pallida</i> liberando los huevos contenidos en su interior (Eppo, 2013).....	9
Figura 3. Ciclo de vida de las especies de nematodos <i>G. rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i> (Eppo, 2013).....	11
Figura 4. Morfología de <i>G. rostochiensis</i> (A) estado juvenil completo (B) región de la cabeza del segundo estado juvenil (C) Campo lateral del segundo estado juvenil, medio cuerpo (D) Región faríngea del segundo estado juvenil (E) Región faríngea del macho (F) Cola del macho (G) Campo lateral del macho, medio cuerpo (H) Quiste entero (I) cabeza y cuello de la hembra (J) Macho entero (Stone, 1972).....	12
Figura 5. Morfología de <i>G. pallida</i> (A) nematodo entero (B) nematodo visto dorsalmente (C) cabeza (D) cola (E) Región lateral de medio cuerpo (F) cola de vista lateral (G) Cabeza y cara a nivel de los labios (H) Cabeza y cara a nivel de la base (Stone, 1972).	14
Figura 6. Mapa de ubicación de muestras de suelo para obtención de quistes y aislamiento de microorganismos.	22
Figura 7. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Trichoderma harzianum</i>	35
Figura 8. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Trichoderma virens</i>	36
Figura 9. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	37
Figura 10. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	37
Figura 11. Media del porcentaje de parasitismos, por parte de los distintos aislados de cuatro especies de microorganismos, sobre quistes de <i>Globodera rostochiensis</i> . Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $p < .05$	39

Índice de tablas

Tabla 1. Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de Concepción Chiquirichapa.....	29
Tabla 2. Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de Palestina de los Altos.....	29
Tabla 3. Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de La Esperanza.....	30
Tabla 4. Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de San Juan Ostuncalco.....	31
Tabla 5. Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de San Martín Sacatepéquez.....	31
Tabla 6. Identificación de aislados de <i>Trichoderma harzianum</i> obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.....	32
Tabla 7. Identificación de aislados de <i>Trichoderma virens</i> obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.....	33
Tabla 8. Identificación de aislados de <i>Paecilomyces lilacinus</i> obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.....	33
Tabla 9. Identificación de aislados de <i>Pseudomonas fluorescens</i> obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.....	34

1 Resumen

En Guatemala, la producción del cultivo de papa se ve afectada por el ataque de las especies de nematodos *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*. Estos tienen la capacidad de desarrollar quistes como un medio de protección para los huevos contenidos en su interior, haciendo complicada su eliminación y provocando el aumento de la población de nematodos, principalmente, en las zonas productoras del altiplano occidental del país. Dada la ineffectividad de los nematicidas ante la barrera física que representan los quistes, además de sus efectos negativos al ambiente, es necesario desarrollar soluciones alternativas para su control. La presente investigación identificó aislados nativos, con capacidad de parasitar quistes, de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* y la bacteria *Pseudomonas fluorescens* provenientes de cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango. Mediante un diseño completamente al azar, se evaluó la capacidad de parasitismo de los distintos aislados de las especies de microorganismos a través de inoculaciones in vitro sobre quistes de *G.rostochiensis*. Se identificó un 65% de incidencia de quistes de *G. rostochiensis* en las localidades muestreadas. La especie *P. lilacinus*, a través del aislado Pl 12, fue la más eficiente ($p < 0.05$) en el parasitismo de quistes de *G. rostochiensis*. Los hallazgos realizados de este estudio constituyen una alternativa novedosa y viable para el control de las especies de nematodos ya mencionadas en las zonas productoras de papa del país.

2 Palabras clave

nematodos formadores de quiste, parasitismo, diversidad genética, cultivo de papa, Quetzaltenango

3 Abstract

In Guatemala, potato crop production is affected by the attack of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* nematode species. These have the ability to develop cysts as a means of protection for the eggs contained inside, making their elimination complicated and causing the increase of the nematode population, mainly in the producing areas of the western highlands of the country. Given the ineffectiveness of the nematicides before the physical barrier represented by the cysts, in addition to their negative effects on the environment, it is necessary to develop alternative solutions for their control. The present investigation identified native isolates, with the ability to parasitize cysts, from the fungi *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* and the *Pseudomonas fluorescens* bacteria from five potato producing locations in Quetzaltenango. Through a completely randomized design, the parasitism capacity of the different isolates of microorganism species was evaluated through in vitro inoculations on *G.rostochiensis* cysts. A 65% incidence of *G. rostochiensis* cysts was identified in the sampled locations. The *P. lilacinus* species, through the isolated Pl 12 was the most efficient ($p < 0.05$) in the parasitism of cysts of *G. rostochiensis*. The findings made in this study constitute a novel and viable alternative for the control of the nematodes species already mentioned in the potato producing areas of the country.

Key words: cyst-forming nematodes, parasitism, genetic diversity, potato crop, Quezaltenango

4 Introducción

La producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Guatemala, es llevada a cabo, principalmente, por pequeños agricultores, los cuales, en su mayoría, la destinan al autoconsumo y mercado nacional. Para el 2015, la distribución de la producción por departamentos se encontraba distribuida entre Huehuetenango 32 %, Quetzaltenango 23 %, San Marcos 21%, Guatemala 6 %, Sololá 4 % y el resto de departamentos 14 % abarcando un total de 30,000 manzanas y una producción de 11,872,600 quintales, generando 12,793 empleos permanentes (Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, 2016)

El cultivo de la papa es el principal hospedero de las especies de nematodos formadores de quistes *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* (Martínez et al., 2013) y están catalogados como unos de los patógenos más destructivos en este cultivo (Gitty, Tanhamaafi, Arjmandian, & Pishevar, 2011) al causar pérdidas, alrededor del mundo, que alcanzan las 40 millones de toneladas, lo que significa el 9 % de la producción mundial, viéndose afectados 60 países (Seenivasan, Devrajan, & Selvaraj, 2007).

En Guatemala, se ha identificado la presencia de nematodos de quiste en los departamentos productores de papa como Guatemala (García, 2015), Quetzaltenango (Maldonado, 2012; Sicán, 2010), Chimaltenango (Rivas, 2005; Salguero, 2003) y Jalapa (Roldán, 2005) existiendo altos valores de hasta 5 quistes/g suelo, los cuales superan los límites permisibles de 1.3 – 2.1 quistes/g suelo (Greco, 1993) lo que pone en riesgo la producción de dicho cultivo, especialmente, en la región occidental, donde el problema se ha agudizado por la falta de control en las poblaciones de *G. rostochiensis* y *G. pallida* (Maldonado, 2012) lo que trae como consecuencia, la disminución en el rendimiento, disminución de la rentabilidad para los productores, e incluso, la restricción de mercados internacionales.

Debido a la diversidad de factores negativos en el uso de nematicidas, entre los que destacan la contaminación de cuerpos de agua subterráneos y efectos deletéreos sobre microorganismos benéficos (Stirling, 1991), el uso de microorganismos se presenta como una opción de control novedosa y viable por no representar riesgos al ambiente ni a la salud humana (Roberts et al., 2005; Sharon, Chet, & Spiegel, 2009). Existen antecedentes exitosos en el uso microorganismos de los géneros *Plectospharella*, *Purpureocillium*, *Trichoderma* y *Chaetomium*, para el control de quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida* (Dandurand, Morra, & Zasada, 2016). El uso de bacterias endófitas

de las raíces del cultivo de papa también se ha reportado eficientes en el control de los quistes (Istifadah, Pratama, Taqwim, & Sunarto, 2018). También se reporta el uso de estrategias de control biológico mediante el uso del hongo *Paecilomyces* (López, Sánchez, Carrión, & Núñez, 2013). Los géneros de bacterias *Providencia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Serratia* han sido evaluadas existosamente en el control de nematodos (Salinas et al., 2016). El uso de las especies de microorganismos *T. viridae*, *P. fluorescens*, *P. lilacinus* y *Pochonia chlamydospora* también han sido reportadas como efectivas para el control de quistes de nematodos (Umamaheswari, Manorama, & Joseph, 2012). Estos antecedentes respaldan el desarrollo de investigaciones para la identificación de especies nativas de microorganismos, como hongos y bacterias, con potencial para el control de las poblaciones de quistes de las especies *G. rostochiensis* y *G. pallida*, brindando así, una alternativa efectiva a los agricultores guatemaltecos, además de contribuir en la disminución de la dependencia del uso de nematicidas como única estrategia en el manejo de estos patógenos.

La presente investigación es de alcance exploratorio y explicativa y plantea la evaluación in vitro de las especies de hongos *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus* y de las bacterias *P. fluorecens* y *Serratia marcescens* para el control de quistes de las especies de nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida*. Las especies de microorganismos evaluadas fueron aisladas a partir de quistes parasitados provenientes de las localidades de Concepción Chiquirichapa, Palestina de los Altos, La Esperanza, San Juan Ostuncalco y San Martín Sacatepéquez. La confirmación de las especies de nematodos, así como de las especies de microorganismos a evaluar, se realizaron a través de métodos moleculares. Los aislados de los microorganismos bajo evaluación, fueron analizados con el marcador molecular AFLP con la finalidad de detallar su diversidad genética y relacionar dicho factor con el potencial en el parasitismo de los quistes, llegando a definir el microorganismos más efectivo en el control de la población de quistes en cada localidad de estudio.

La evaluación se realizó a través de la inoculación de quistes bajo condiciones in vitro, y dentro de los factores a evaluar se incluyeron (a) microorganismo (b) grupos filogenéticos de los microorganismos (c) especies de nematodos y (d) localidad de estudio. El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar, siendo la variable de respuesta a) quistes parasitados. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza y un posterior análisis de comparación múltiple de medias.

5 Planteamiento del problema

G. rostochiensis y *G. pallida* son nematodos formadores de quistes, siendo su principal hospedero el cultivo de la papa (Martínez et al., 2013) además son considerados como unos de los patógenos más destructivos de este cultivo (Gitty et al., 2011) causando una pérdida del 9 % de la producción mundial de papa, lo que se traduce en 40 millones de toneladas distribuidas en 60 países (Seenivasan et al., 2007). El control de estos nematodos es complejo debido a que los quistes, los cuales tiene una función de protección para los huevos contenidos en su interior, pueden persistir en el suelo hasta por 20 años (Turner, 1996).

El control químico, a través del uso de nematicidas, ha demostrado ser parcialmente efectivo, sin embargo, este tipo de estrategia es cara y económicamente no viable, además se ha demostrado que los nematicidas tienen efectos tóxicos para los humanos, son fitotóxicos, representan una fuente de contaminación ambiental por sus residuos tóxicos sobre cuerpos subterráneos de agua y tienen efectos deletéreos sobre los microorganismos benéficos del suelo (Stirling, 1991).

En Guatemala, se ha identificado la presencia de nematodos de quiste en los departamentos productores de papa (García, 2015; Maldonado, 2012; Rivas, 2005; Roldán, 2005; Salguero, 2003; Sicán, 2010) existiendo altos valores de quistes de hasta 5 quistes/g suelo que superan los límites permisibles de 1.3 – 2.1 quistes/g suelo (Greco, 1993) lo que pone en riesgo la producción de dicho cultivo, especialmente en la región occidental, donde el problema se ha agudizado por la falta de control en las poblaciones de *G. rostochiensis* y *G. pallida* (Maldonado, 2012). Esto trae como consecuencia la disminución en el rendimiento, disminución de la rentabilidad para los productores, incluso la restricción de mercados internacionales.

Esta situación hace necesaria la búsqueda de nuevas opciones para el control de las poblaciones de quistes, pero además deben ser seguras para el ambiente, biodegradables y bioeficaces (Aires, Carvalho, Da Conceição, & Rosa, 2009; Lord, Lazzeri, Atkinson, & Urwin, 2011) siendo el control biológico, a través del uso de microorganismos, una alternativa atractiva para disminuir la dependencia hacia los nematicidas (Roberts et al., 2005; Sharon et al., 2009) ya que se ha llegado a reportar un decremento de hasta 89 % en la población de quistes mediante el uso de microorganismos (López et al., 2013). Por esta razón, se pretende realizar la evaluación de microorganismos nativos en el control de las poblaciones de quistes, debido a que estos se han

desarrollado en el mismo entorno ecológico que los quistes, situación contraria a las cepas comerciales importadas, por lo que se espera que el proceso de parasitismo sea más efectivo.

6 Preguntas de investigación:

Principal

1. ¿Cuál será la capacidad de las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* para parasitar los quistes *G. rostochiensis* y *G. pallida* en las diferentes localidades productoras de papa en Quetzaltenango?

Específicas

2. ¿Cuáles de las especies de nematodos del género *Globodera* que afectan la papa están presentes en las zonas de estudio?
3. ¿Cuáles de las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* con capacidad para parasitar quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*, existen en las zonas productoras de papa en Quetzaltenango?
4. ¿Cuál de las especies de los microorganismos identificados es más efectiva en el parasitismo de los quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*?
5. ¿Cómo se relaciona el factor de diversidad genética de las especies de microorganismos bajo evaluación, con el parasitismo de los quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*?

7 Delimitación en tiempo y espacio

La investigación fue realizada durante los meses de febrero a noviembre del año 2019 constando de tres fases: campo, laboratorio y gabinete. En la fase de campo se realizó la colecta de las muestras de suelo en las parcelas del cultivo de papa en los municipios de Concepción Chiquirichapa, Palestina de los Altos, La Esperanza, San Juan Ostuncalco y San Martín Sacatepéquez, todos pertenecientes al departamento de Quetzaltenango. Esta fase se desarrolló desde el mes de febrero hasta junio.

Durante el mes de marzo hasta octubre, durante la fase de laboratorio, se realizó la extracción de los nematodos, la multiplicación de estos, el aislamiento de los microorganismos bajo evaluación y el ensayo de parasitismo. También se realizó la estandarización y desarrollo de los

protocolos de extracción de ADN de los microorganismos, así como el marcador molecular a utilizar para determinar la diversidad genética de estos. Posteriormente, se analizó la información generada para determinar la efectividad en el parasitismo de los microorganismos sobre los quistes. Durante el mes de noviembre y diciembre se elaboró el informe final de investigación y los manuscritos científicos para su publicación. La fase de laboratorio y gabinete se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía.

8 Marco teórico

8.1 Nematodos formadores de quistes en el cultivo de papa

El género *Globodera* incluye entre otras a las especies *rostochiensis* y *pallida*, las cuales han sido catalogadas como una seria limitante para la producción de papa, de manera que ambas especies se encuentran reguladas por casi todos los países. En los países considerados como centros de origen del mencionado cultivo, ambas especies de nematodos son causantes de pérdidas económicas. Para el caso de otros países como Reino Unido, Alemania, Polonia y México la especie que ha reportado mayores complicaciones en la producción de papa es *G. rostochiensis*. Por otra parte, *G. pallida* ha ido desplazando a *G. rostochiensis* en el territorio de Reino Unido debido a su agresividad, razón por la cual, muchos países han considerado a este patógeno como un agente de alto riesgo dentro de sus regulaciones fitosanitarias, debido a su alto índice de reproducción, agresividad y la dificultad en el control una vez establecido. Se considera que, tanto *G. rostochiensis* como *G. pallida*, tienen capacidad de sobrevivir hasta por 30 años, incluso en ausencia de algún hospedero. Es importante mencionar que el estado fenológico de estos nematodos, conocido como quiste, es fácilmente dispersado por el movimiento del suelo y material propagativo (Ramírez, 2014).



Figura 1. Raíces del cultivo de papa infectadas por *G. rostochiensis* (Eppo, 2013)

Ambos nematodos son endoparásitos sedentarios, los cuales pueden permanecer en el suelo hasta por 30 años. Cada quiste joven puede contener 200-500 huevos. Después de la siembra, los exudados producidos por las raíces de las plantas ejercen un efecto estimulante sobre los huevos, por lo cual, de estos emergen los juveniles de segundo estadio. Estos miden entre 470 – 500 μm de largo y entre 18 – 19 μm de ancho. Luego de la eclosión se presenta el único estado infectivo y migra hacia el ápice radicular por donde penetra y después de recorrer algunos milímetros, el

juvenil se establece y continúa su desarrollo como sedentario, pasando por tres estados juveniles antes de llegar al estado adulto (Schots, Bakker, Gommers, Bouwman, & Egberts, 1987).

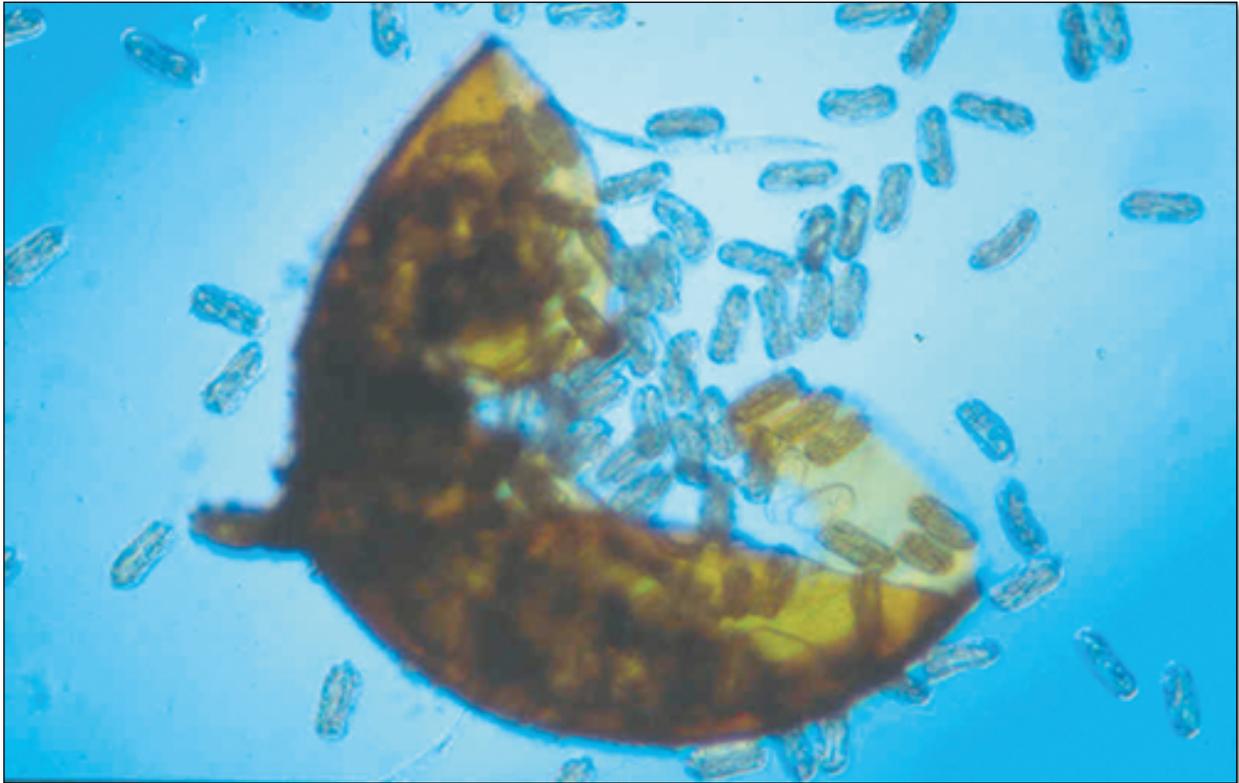


Figura 2. Rompimiento de un quiste de *G. pallida* liberando los huevos contenidos en su interior (Eppo, 2013)

8.2 El nematodo dorado de la papa *G. rostochiensis*

G. rostochiensis Woll es conocido como el nematodo dorado de la papa. Turner y Evans (citados en Salinas et al., 2016) consideran este fitófago como responsable de causar daños severos en las plantaciones del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) mientras que Aires y colaboradores añaden que la actividad radicular de la planta se ve afectada, con lo que se reduce el volumen de suelo que la planta puede explorar en búsqueda de agua y nutrientes, finalizando en el decremento del tamaño y cantidad de tubérculos. El control de este nematodo representa un serio problema debido a la poca aceptación de las prácticas culturales por parte de los productores, quienes prefieren el control químico a través del uso excesivo de nematicidas, los cuales tampoco ofrecen

una solución al problema, debido a que, las poblaciones de nematodos no disminuyen (Franco & González, 2011).

8.2.1 Ciclo de vida de *G. rostochiensis*

El ciclo de vida se completa en 45-60 días aproximadamente. Durante este período los machos mudan y pasan a un estado vermiforme, arraigándose en la raíz de la planta hospedante e intentando fertilizar a las hembras antes de morir (Evans, 1970). Los adultos y juveniles de este nematodo pueden diseminarse a través de bulbos, tubérculos, cormos, rizomas, raíces y tallos. Los quistes y los huevos constituyen las estructuras más persistentes durante el ciclo de vida. Se estima que cada quiste contiene alrededor de 500 huevos (Perry & Beane, 1988). La eclosión de los huevos es estimulada por exudados producidos por las raíces de la papa. Posterior a la eclosión, el nematodo se encuentra en un estado infectivo y migra hacia el ápice radical donde recorre pocos milímetros y el juvenil se fija a las raíces donde continúa su desarrollo como sedentario, pasando por tres estados juveniles antes de lograr el estado adulto.

Para completar una generación, desde la penetración del juvenil de segundo estadio hasta la formación de quistes con huevo, el nematodo necesita de 45-60 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Una temperatura de 10°C es considerada como la mínima en la cual puede desarrollarse una generación (Mulvey & Stone, 1976). Las hembras fecundadas aumentan de tamaño y cambian a una forma subesféricas, esto depende probablemente de las características de la planta hospedante y la nutrición durante su desarrollo. En comparación con la hembra madura, el quiste tiene una cutícula más gruesa y de color castaño oscuro para proteger los huevos contenidos. Los quistes no se alimentan y se desprenden fácilmente de las raíces o de los tubérculos. Los huevos, al final del desarrollo embrionario, aproximadamente después de 2-3 semanas, contienen juveniles de segundo estadio (Mulvey & Stone, 1976).

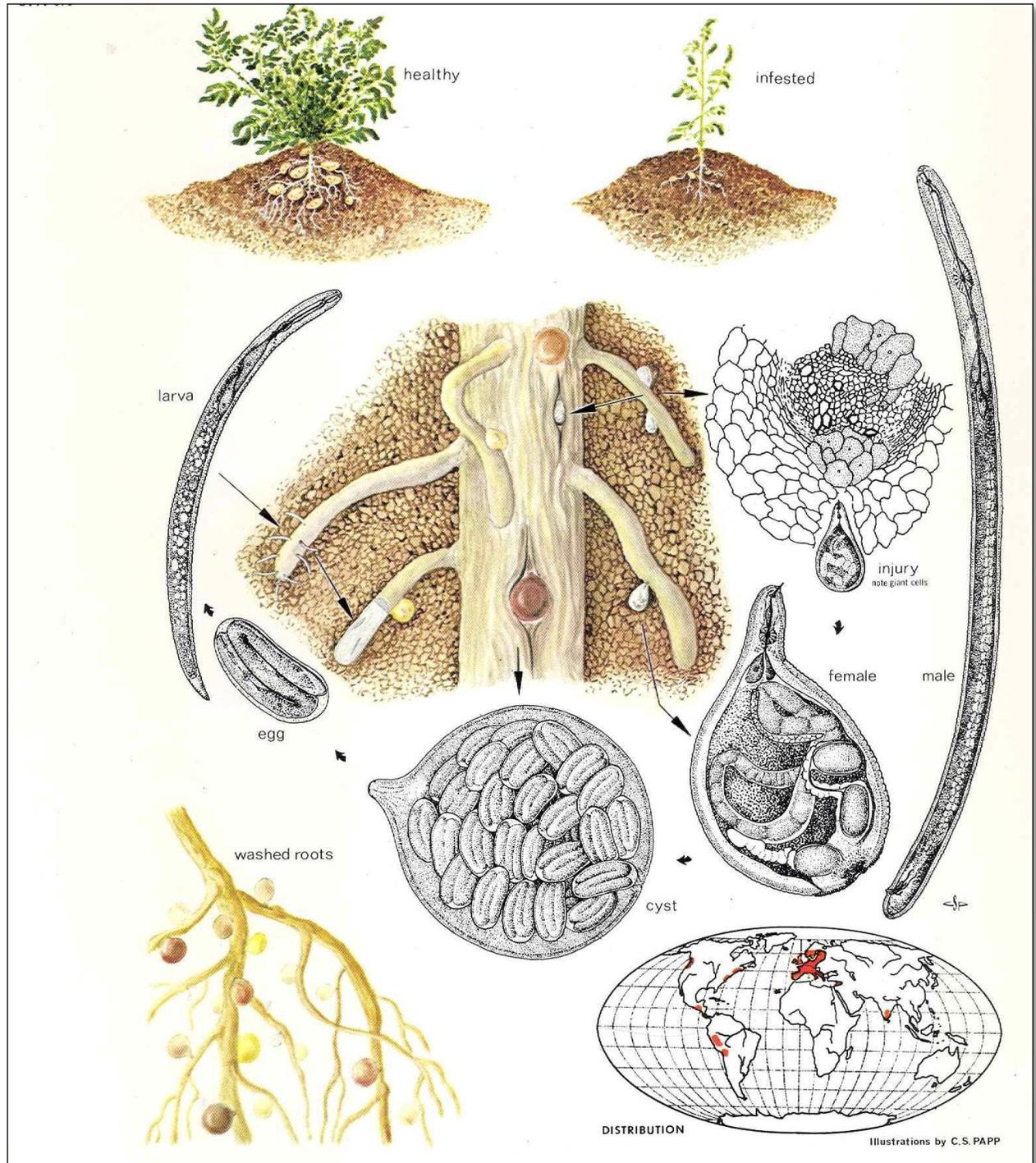


Figura 3. Ciclo de vida de las especies de nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida* (Eppo, 2013)

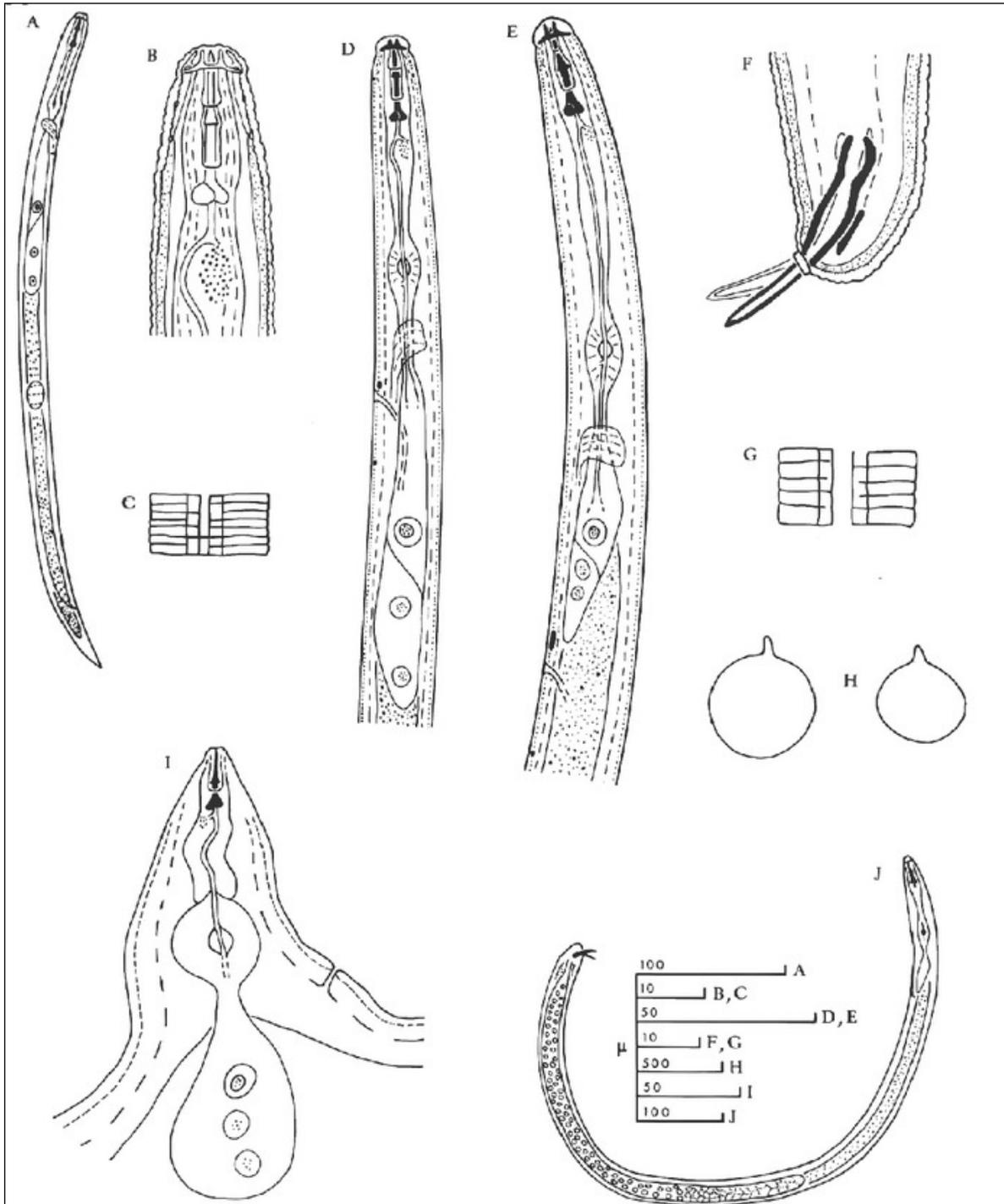


Figura 4. Morfología de *G. rostochiensis* (A) estado juvenil completo (B) región de la cabeza del segundo estado juvenil (C) Campo lateral del segundo estado juvenil, medio cuerpo (D) Región faríngea del segundo estado juvenil (E) Región faríngea del macho (F) Cola del macho (G) Campo lateral del macho, medio cuerpo (H) Quiste entero (I) cabeza y cuello de la hembra (J) Macho entero (Stone, 1972)

8.3 El nematodo pálido de la papa *G. pallida*

Este nematodo es el causante de grandes pérdidas en el cultivo de papa, y al igual que *G. rostochiensis*, ha sido clasificado como un patógeno que limita la producción de papa, razón por la cual ha sido colocado en la lista de especies cuarentenadas en muchos países. Este nematodo ha sido encontrado en Latinoamérica y recientemente en Canadá en 2006, quistes de *G. pallida* fueron encontrados en suelo proveniente de campos de cultivo de papa en Idaho. El proceso infectivo ocurre cuando el segundo estado juvenil emerge del huevo y entra en el ápice radicular a través de las células de la epidermis abriéndose paso con su estilete. Tras el ataque del nematodo, la planta presenta dificultad para la absorción de agua, lo que conduce a la muerte (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2004).

8.3.1 Ciclo de vida de *G. pallida*

G. pallida completa su ciclo en un periodo comprendido entre 6 y 10 semanas, tiempo el cual, de no existir competencia interespecífica, principalmente por alimento, la población puede incrementarse hasta 50 veces. El ciclo biológico de este nematodo comprende tres etapas de desarrollo, en los cuales no se presenta cambios en el exterior del cuerpo (Franco, 1986). Dicho ciclo inicia en el segundo estado juvenil (J2) y surgen a partir de los huevos, los cuales son estimulados para eclosionar por los exudados producidos por las raíces de las plantas de papa, los cuales también atraen a los nematodos para establecerse allí. El tercer estado juvenil se produce cuando los nematodos se desarrollan y definen el sexo, influenciado, principalmente, por el tipo de alimento disponible, de manera que, si la población es baja y el alimento no es una limitante, la población será predominantemente constituida por hembras; sin embargo, cuando la población es abundante y el alimento representa una limitante, la población es dominada por la presencia de machos (Franco, González & Matos, 1993).

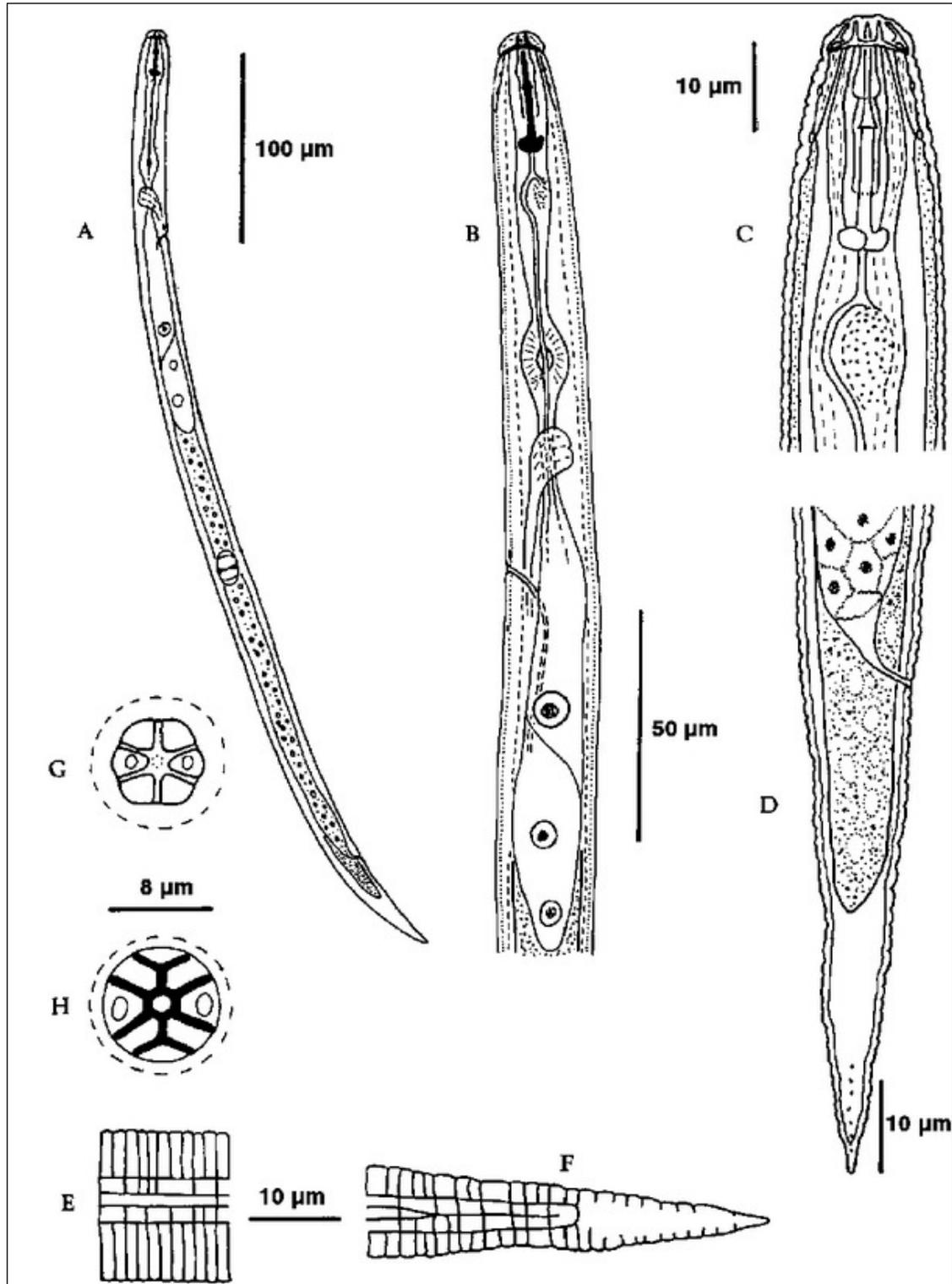


Figura 5. Morfología de *G. pallida* (A) nematodo entero (B) nematodo visto dorsalmente (C) cabeza (D) cola (E) Región lateral de medio cuerpo (F) cola de vista lateral (G) Cabeza y cara a nivel de los labios (H) Cabeza y cara a nivel de la base (Stone, 1972).

8.4 Síntomas y daños causados por *G. rostochiensis* y *G. pallida*

La marchitez temprana en las plantas de papa es el síntoma típico causado por *G. rostochiensis*. El daño mecánico causado por la alimentación del nematodo causa un daño histológico que se manifiesta a través de la necrosis de las células de las raíces, las cuales son perforadas por los estados juveniles larvarios cuando estos se vuelven sedentarios en esta área, además estas células sufren una profunda transformación a causa de la hiperplasia que terminan por formar unidades multinucleadas denominadas sincitio que ocasionan la interrupción de los vasos cribosos y leñosos limitando la funcionalidad de las raíces (Evans & Stone, 1977). Las plantas de papa atacadas por el nematodo presentan reducción en el tamaño y rendimiento, una anticipada senectud, ligero amarillamiento en el follaje y hojas individuales pequeñas a causa de la baja división celular. Existe una reducción fotosintética significativa, a causa de la interrupción en la traslocación de nutrientes y agua producto del mal funcionamiento del sistema radicular, provocada por los nematodos enquistados; también se produce un incremento de la materia seca y decremento en la producción de tallo, hojas y tubérculos según Evans y Trudgill (citados en Núñez, 2002).

8.5 Control químico

En el cultivo de la papa es frecuente el uso de nematicidas para el control de nematodos formadores de quistes, sin embargo, este tipo de control no es económicamente viable debido al alto costo, uso de implementos especiales para su aplicación y el alto grado de fitotoxicidad de algunos de ellos, además muchos de los nematicidas inician su actividad cuando el crecimiento de la planta es avanzado, sin embargo, cuando el suelo está mojado y frío, los materiales o sustancias aplicadas tienden a difundirse menos, a degradarse y a disminuir su efectividad, aunque las condiciones sean óptimas, la eliminación de las larvas casi siempre es incompleta (Winslow & Willis, 1972).

Los principales nematicidas utilizados son el DD (1,3 dicloropropeno, 1,2- diclopropano con hidrocarbano, el DB (etileno dibromo) y el DBCP (1,2 dibromo-3 cloropropano) los cuales son altamente tóxicos y solubles en agua. El DD ha sido el nematicida mayormente utilizado y es fitotóxico. El uso del DBCP fue suspendido en California durante 1977 y cancelado su registro en diversos lugares de Estados Unidos, ya que se demostró que los mantos freáticos estaban contaminados con nematicidas como el EDP y el DD (Whitehead, Nichols, & Senior, 1994).

9 Estado del arte

9.1 Identificación molecular de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

La identificación de nematodos formadores de quistes en el cultivo de papa, ha sido basada en características morfológicas, sin embargo, ambas especies están muy relacionadas en cuanto a sus características morfológicas y morfométricas. La identificación morfológica es muy demandante en tiempo y exige la visualización clara de algunas características, las cuales dependen del estado de desarrollo del nematodo, de manera que no siempre puede realizarse una identificación confiable. El análisis de ADN, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece un método alternativo en el diagnóstico de nematodos, entre los cuales se encuentran los formadores de quistes (Powers, 2004). Por otra parte, varios métodos bioquímicos han sido desarrollados en busca de poder identificar ambas especies de *Globodera* (Ibrahim et al., 2001) pero la identificación a través del análisis del ADN ha sido preferida por su rapidez y confiabilidad (Quader, Nambiar, & Cunningham, 2008).

La identificación basada en el ADN ribosomal (r-DNA) ha probado ser una herramienta confiable para la identificación de *G. rostochiensis* y *G. pallida* (Bulman & Marshall, 1997; Vejl, Skupinová, Sedlák, & Domkárová, 2002). El espacio interno transcrito (ITS) es una región variable que ha sido ampliamente utilizada para el estudio de poblaciones, incluyendo la identificación de especies. Vejl y colaboradores (2002) utilizaron la región ITS 1 para la identificación de nematodos formadores de quiste en Europa, y Bullman y Marshall (1997) también desarrollaron un método basado en la reacción de PCR múltiple sobre el ITS 1 obteniendo una alta eficiencia en la detección de *G. pallida* y *G. rostochiensis* a partir de poblaciones mezcladas. La detección basada en PCR en tiempo real es más rápida, específica y sensible que el PCR convencional (Gachon, Mingam, & Charrier, 2004; Schaad & Frederick, 2002) debido al desarrollo de sondas de tipo SYBR green, a partir de los primers específicos empleados por Bullman y Marshall (1997), propuestos por Bates, Taylor, Gans y Thomas (2002).

La amplificación de una región del gen *rbp-1*, así como una región nuclear no codificante (ITS), y una región mitocondrial no codificante; fue empleada para la detección de *G. pallida*, obteniendo resultados similares entre estos tres marcadores moleculares (Hoolahan, Blok, Gibson, & Dowton, 2012). La identificación de nematodos formadores de quistes fue llevada a cabo mediante el uso de sondas TaqMan empleadas en reacciones múltiples de PCR en tiempo real con

primers específicos para *G. rostochinesis* y *G. pallida*, así como un primer específico para identificación a nivel de género, el cual fue diseñado a partir de la región ITS. Esta técnica demostró ser rápida, sensible y específica en la identificación de ambas especies (Nakhla, Owens, Li, & Wei, 2010).

En países del este de Europa, la identificación molecular también ha sido empleada para confirmar la presencia de ambas especies de *Globodera*, las cuales habían sido identificadas únicamente por descripción morfológica (Bacic, Geric, Sasa, & Urek, 2013; Grubišić et al., 2013). Los métodos moleculares también han sido empleados, no solo para la identificación a nivel de especies, también ha sido utilizada para definir el tipo de patotipo de estos nematodos (Mulyadi, Bambang, & Triman, 2014). Debido a que, la identificación morfológica puede presentar traslapes de algunas características entre ambas especies, la confirmación molecular es recomendada, siendo el desarrollo de primers, a partir de las regiones ITS, uno de los mayores avances para una identificación confiable (Camacho, Nóbrega, Lima, Mota, & Inácio, 2017)

9.2 Control biológico contra *G. rostochiensis* y *G. pallida*

El uso de microorganismos para el control de las poblaciones de los nematodos formadores de quistes ha llevado a realizar pruebas para identificar una solución que ante esta amenaza, y a que a la vez, no tenga un impacto negativo en el ambiente, como lo es el caso del control químico. Se ha reportado que *B. thuringensis* var. Verliner y var. Kurstaki, *Saccharopolyspora spinosa*, *Fusarium spp.* y *Trichoderma spp.* han sido utilizados obteniendo resultados positivos en el decremento de la población de *G. rostochiensis* que va de 27.7 % a 33.3 % para el caso de hongos, y 36.0 % a 44.44 % para las bacterias (Trifanova, 2010). A partir de quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*, colectados en indonesia, fueron aisladas las especies de hongos *Fusarium oxysporium*, *F. lateritium*, *P. tritinum*, *Taralomyces* y *T. virens*, las cuales mostraron procesos de infección sobre los quistes de dichos nematodos, especialmente *T. virens* con un 100 % de efectividad en la infección de los quistes (Indarti, Widiyanto, Kim, & Suryanti, 2010).

Bajo condiciones de laboratorio e invernadero, la efectividad de *P. oxalicum* en el control de *G. pallida* fue evaluada, logrando rangos de 74.1 % - 98.6 % en los estados juveniles y un 30.9 % para el caso de *G. rostochiensis*(Martínez et al., 2013). Otro agente de control empleado a sido *Paecilomyces sp.* en combinación con rotación de cultivos como *Pisum sativum* y *Vicia faba*,

obteniendo resultados que alcanza hasta un 89.2 % en la reducción de la población de *G. rostochiense*, mientras que, la rotación por sí sola, alcanzó solo un 30.7 % demostrando que este nematófago posee un alto potencial para el control de este nematodo (López et al., 2013). Otras especies como *T. viridae*, *P. fluorescens* y *Pochonia chlamydospora* en el control de *G. rostochiense* y *G. pallida*, obteniendo mejorías en el rendimiento de la producción (18.44 t/ha) (Umamaheswari et al., 2012).

También ha sido demostrado que, bajo condiciones in vitro, las bacterias del género *Providencia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Serratia*; son capaces de causar distorsión y desintegración de los nematodos formadores de quiste en el estado de desarrollo juvenil 2, aunque ninguno de estos mostró tener capacidad de causar daño a los quistes (Salinas et al., 2016). La universidad de Idaho ha obtenido resultados prometedores con los género de hongos *Plectosphaerella*, *Purpureocillium*, *Trichoderma* y *Chaetomium*; reportando la destrucción de los quistes, y en algunos casos infectando las larvas en el suelo. También se reportó que tras la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Plectosphaerella cucumerina* se redujo la población de huevos en un 25 % - 30 % (Dandurand et al., 2016). Recientemente, se ha realizado evaluaciones con bacterias endofíticas, las cuales, además de estimular el crecimiento de las plantas de papa, también tienen el potencial para control las poblaciones de *G. rostochiense*. Las evaluaciones in vitro demostraron que estas bacterias causan mortalidad sobre dicho nematodo en el estado juvenil 2 en un rango de 67.5 % - 97.7 %, sin embargo, no fue efectivo para causar daño sobre los huevos. Por otra parte, con los experimentos en invernadero se obtuvo un control entre 51.7 % y 65.4 % sobre los quistes y 48.6 % - 76.4 % sobre los juveniles 2 de *G. rostochiense* (Istifadah et al., 2018)

10 Objetivos.

General:

- Evaluar la capacidad de las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* nativas de cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango, para parasitar los quistes de los nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida*.

Específicos:

- Demostrar la presencia de *G. rostochiensis* y/o *G.pallida*, a través de métodos moleculares, en cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango.
- Identificar la presencia de las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* en cada localidad de estudio, las cuales parasitan quistes de los nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida*.
- Definir el microorganismo más efectivo para parasitar los quistes de *G. rostochiensis* y *G.pallida* para cada localidad de estudio.
- Caracterizar la diversidad genética de las especies de microorganismos bajo evaluación y determinar si este factor incide en el parasitismo de quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*.

11 Hipótesis estadística

Las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* identificadas en las localidades de estudio, tienen la capacidad de parasitar los quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida* existiendo una mayor efectividad en el proceso de parasitismo en los microorganismos que presentan mayor diversidad genética, siendo *Paecilomyces lilacinus* la mejor opción para el control de las poblaciones de quistes de los nematodos asociados al cultivo de papa.

12 Materiales y métodos

12.1 Enfoque y tipo de investigación

La presente investigación tiene un enfoque cuantitativo debido a la naturaleza de las variables de respuesta, las cuales sirvieron para determinar la efectividad de los microorganismos en el parasitismo de los quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida* a través de análisis estadístico. El alcance de la investigación es exploratorio, en su primera fase de identificación de los nematodos y microorganismos con capacidad de parasitismo, debido a que no existen registros sobre la evaluación de microorganismos nativos en el control de ambas especies de nematodos formadores de quistes, ni de estudios de diversidad genética de las especies de microorganismos a evaluar. La segunda fase es de tipo explicativa por consistir de una evaluación experimental de los microorganismos encontrados.

12.2 Recolección de información:

Se listan los municipios de estudio y la superficie cosechada del cultivo de papa basado en la información del Censo Nacional Agropecuario 2003. Concepción Chiquirichapa (361 ha, 21 %), Palestina de los Altos (361 ha, 21 %), La Esperanza (42 ha, 3 %), San Juan Ostuncalco (350 ha, 20.7 %) y San Martín Sacatepéquez (571 ha, 33.8 %), todos pertenecientes al departamento de Quetzaltenango. Estos municipios han sido escogidos por ser los mayores productores de papa, además de existir registros sobre la presencia de nematodos de quiste en esta región (Maldonado, 2012; Sicán, 2010). Se realizó un muestreo en cada una de las localidades hasta completar el requerimiento técnico de 150 quistes, los cuales serán empleados en las dos fases del experimento. Se utilizó un muestreo simple aleatorio estratificado y los puntos de colecta se muestran en la Figura 7.

Para la obtención de las muestras en los puntos de sub-muestreo se utilizó una pala y se tomó el suelo de los primeros 0.20 m de profundidad. Posteriormente, se tomó una porción equivalente de 1/10 de kg y se colocó en una bolsa plástica. El suelo obtenido de las sub-muestras se mezcló para obtener una muestra compuesta de 2 Kg aproximadamente. Las muestras fueron etiquetadas por lugar de origen y trasladadas hacia el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía para proceder a hacer la extracción de quistes y posteriores análisis.

12.3 Técnicas e instrumentos

Extracción de quistes a partir de muestras de suelo

La extracción de quistes se realizó por método del flotador Fenwick (1940) el cual consiste en un aparato hecho de acero, con una altura de 30 cm, la cual se estrecha hacia la cima y presenta una base inclinada en donde se encuentra un agujero de 2.5 cm de diámetro. Este agujero se ubica en el lado más bajo de la base inclinada que se cierra con un tapón de caucho cuando se utiliza. También posee un embudo grande de acero de 20.5 cm de diámetro, con un eje de 20.5 cm de largo, el cual posee en su interior un cedazo de 1 mm de abertura. En la salida del tubo se colocan tamices de 840 μm y 250 μm como se observa en la Figura 6. El suelo seco se coloca en un receptor con una pantalla > 2 mm sobre la lata y se lava a través de él, las partículas pesadas del suelo caen al fondo de la lata, mientras que los quistes secos y restos de suciedad ligera flotan a la superficie y son desviados por encima del borde de un tamiz de recolección

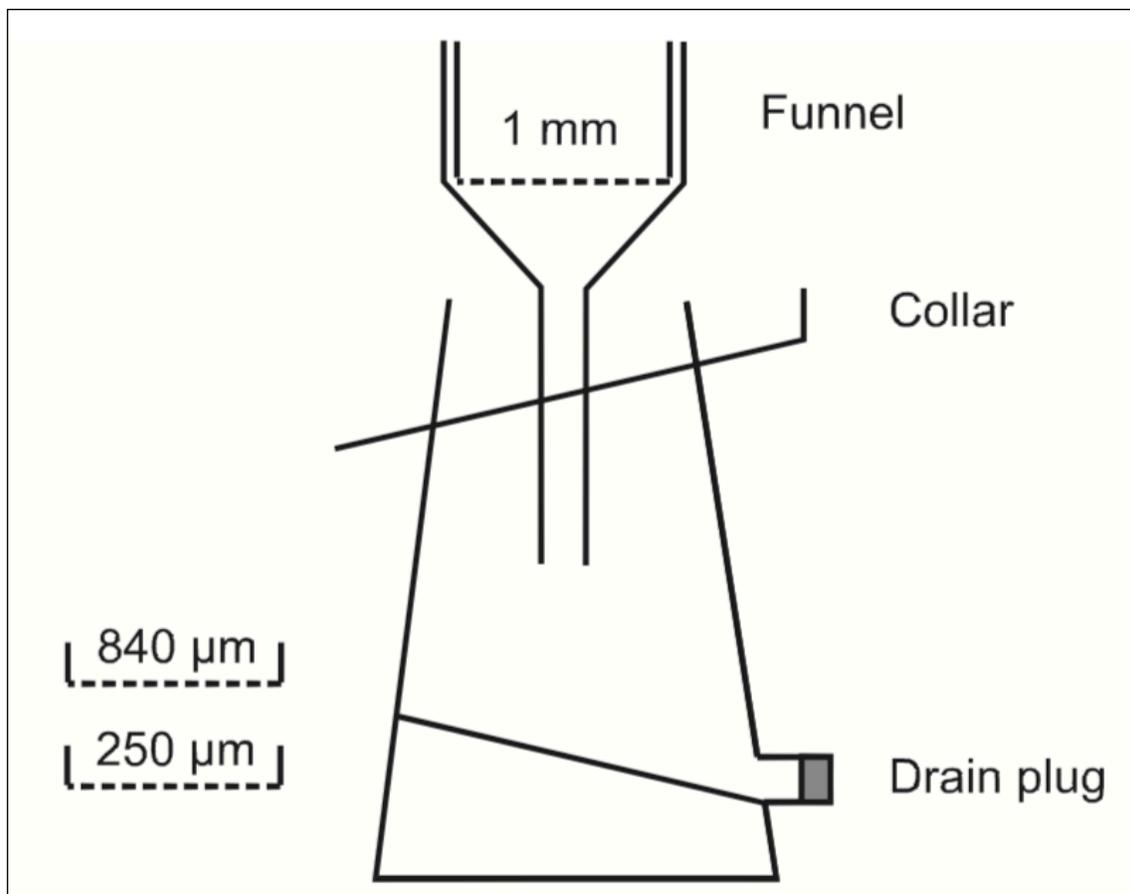


Figura 6. Esquema de la sección vertical del embudo de Fenwick (Eppo, 2013)

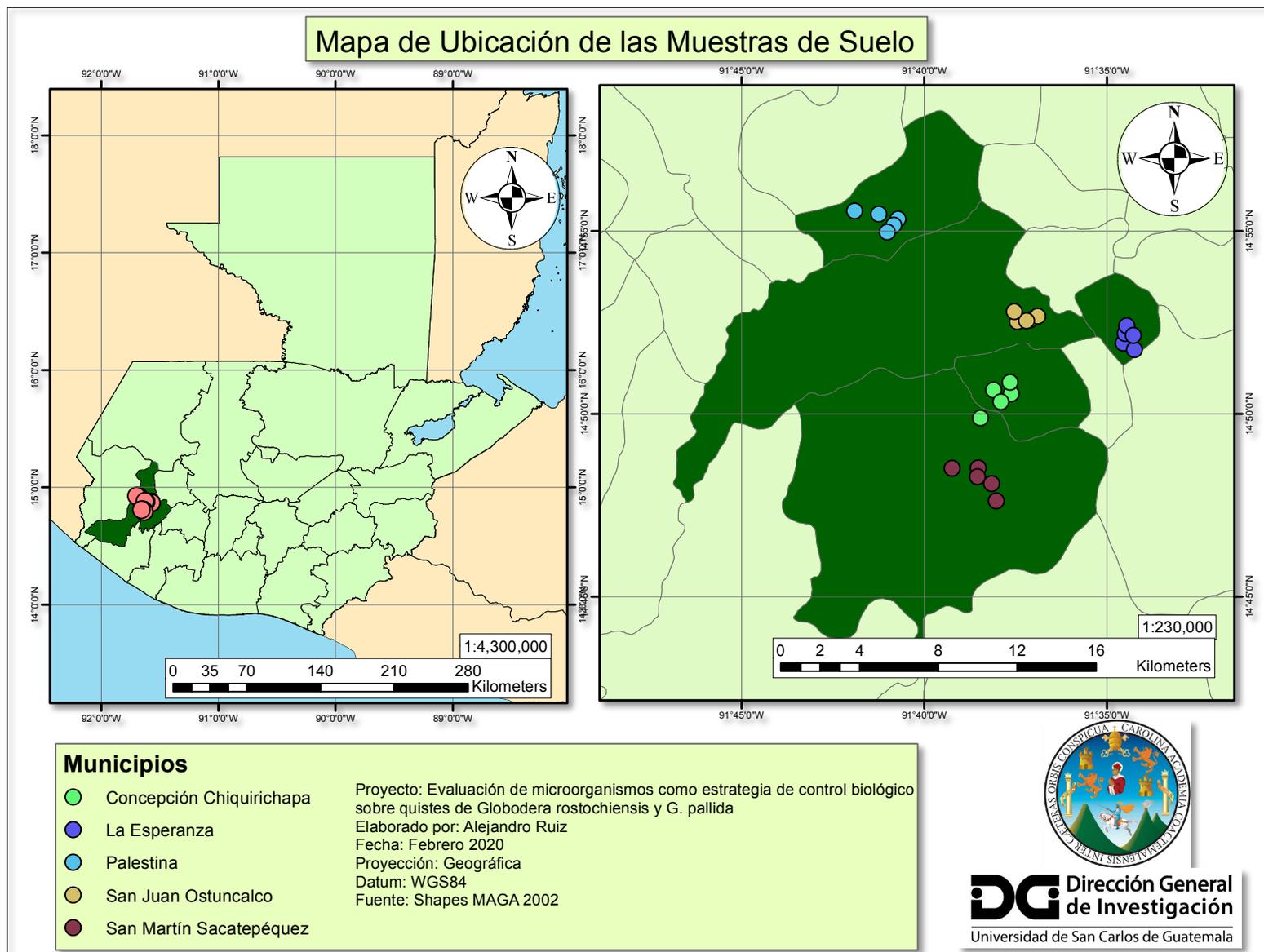


Figura 7. Mapa de ubicación de muestras de suelo para obtención de quistes y aislamiento de microorganismos.

Identificación de *G. rostochiensis* y *G. pallida* a través de la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

De los quistes extraídos se tomaron de manera aleatoria 50 de estos de cada localidad de estudio. Se procedió a realizar el aislamiento y extracción del ADN genómico de los quistes empleando el Puregene Core Kit A (QUIAGEN), siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. La cantidad y calidad serán evaluadas a través de la visualización con luz ultra violeta y una tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1 %. Se emplearon los cebadores ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') y PITSr3 (5'-AGC GCA GAC ATG CCG CAA-3') para la identificación de *G. rostochiensis* esperando la amplificación de una banda de 434 pb, y los cebadores ITS5 y PITSp4 (5'-ACA ACA GCA ATC GTC GAG-3') para *G. pallida* el cual se ha reportado una banda de 265 pb según Camacho y colaboradores (2017).

Aislamiento de hongos y bacterias a partir de los quistes extraídos

De los quistes extraídos, se tomaron 100 individuos de cada localidad, los cuales fueron organizados en 5 grupos de 20 quistes cada uno. Posteriormente, los 20 quistes correspondientes al primer grupo, fueron colocados en grupo de 4 quistes por cada caja de Petri con el medio de cultivo basal PDA suplementado con rifampicina (50 ug/mL), clorotalonil (1.25 ug/mL) y thiabendazole (0.6 ug/mL) (Howell, 1999) por su especificidad para el aislamiento de *T. virens*. Para el aislamiento de *T. harzianum*, se tomaron los quistes del segundo grupo (20 quistes) y se colocaron 4 quistes en cada caja de Petri con el medio TSM (Trichoderma Selective Medium) suplementado con Cloranfenicol (50 ug/mL) y rosa bengala 0.15 g/L (Attitalla, Adbelrawaf, Saeed, El-Komy, & Sarwar, 2012).

Para el aislamiento de *P. lilacinus*, se tomaron los quistes del tercer grupo (20 quistes) y se colocaron 4 quistes en cada caja de Petri con el medio basal PDA suplementado con cloranfenicol 0.01 % y cloruro de sodio 3 % (Chen et al., 2012). Para el aislamiento de *P. flourecens*, se procedió a colocar los quistes del cuarto grupo (20 quistes) y se colocaron 4 quistes en cada caja de Petri con el medio King B (King, Wood, & Raney, 1954). Para el aislamiento de *S. marcescens*, se colocaron los quistes del cuarto grupo (20 quistes) y se distribuyeron 4 quistes en cada caja de Petri con el medio Caprylate-Thallos Agar Medium (Starr, Grimont, Grimont, & Starr, 1976).

Las cajas fueron selladas con cinta parafilm, etiquetadas por localidad de procedencia y numeradas de forma correlativa. Las cajas se mantuvieron a una temperatura de 22-24°C. Los quistes fueron examinados diariamente para detectar el desarrollo de micelio y desarrollo de colonias bacterianas, y a partir de estos, se procedió a generar cultivos puros en nuevas placas de medio de cultivo PDA basal con los cuales se realizó la posterior confirmación de las especies con métodos moleculares.

El aislamiento para los hongos y bacterias de las restantes cuatro localidades, se realizó con la metodología previamente descrita.

Identificación molecular para confirmación de especies de hongos y bacterias

Para llevar a cabo la identificación de los microorganismos, se realizó el aislamiento y extracción del ADN genómico de los aislados empleando el DNeasy UltraClean Microbial kit (QUIAGEN), siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. Para realizar la identificación de las especies de hongos y bacterias se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR (Mullis, 1990). Para el caso de *T. harzianum*, se emplearon los cebadores específicos THITS-F2 (CGGGTTTTTTATAATCTGAGCC) y THITS-R3 (CATTCAGAAGTTGGGTG) los cuales amplificaron una región de 400 pb para una reacción positiva siguiendo el protocolo de Miyazaki, Tsuchiya y Okuda (2009). Para la identificación de *T. virens* se emplearon los cebadores específicos T1F (3'-CCGTTTGATGCGGGGAGTCTA-5') Y T1R (3'-GGCAAAGAGCAGCGAGGTA-5') los cuales amplificaron una región de 330 pb siguiendo el protocolo de Devi, Prabhakaran, Kamil, Borah y Pandey (2012) T1F (5'-CCGTTTGATGCGGGGAGTCTA-3') y T1R (5'-GGCAAAGAGCAGCGAGGTA-3')

Para la identificación de *P. lilacinus* se emplearon los cebadores específicos PaeF (5'CTC AGT TGC CTC GGC GGG AA 3') y PaeR (5' GTG CAA CTC AGA GAA GAA ATT CCG 3') los cuales amplificaron una región de 130 pb para una reacción positiva siguiendo el protocolo de Atkinks, Clark, Pande, Hirsch y Kerry (2005). Para la identificación de *P. flourecens* se emplearon los cebadores específicos 16SPSEfluF (5' - TGCATTCAAACTGACTG - 3') Y 16SPSER (5'-AATCACACCGTGGTAACCG - 3') los cuales amplificaron una región de 850 pb para una reacción positiva siguiendo el protocolo de Scarpellini, Franzetti y Galli (2004). Para la identificación de *S. marcescens* se emplearon los cebadores específicos Fpfs1 (5'-CCGGCATCGGCAAAGTCT - 3') y Rpfs2 (5' - ATCTGGCCCGGCTCGTAGCC -3') los cuales

amplifican una región de 193 pb para una reacción positiva siguiendo el protocolo de Zhu, Sun y Dang (2008).

Análisis de diversidad genética de los hongos y bacterias mediante el marcador molecular AFLP

Una vez confirmada, a través de PCR, cada una de las especies de hongos y bacterias, se procedió a emplear el marcador molecular AFLP para determinar la diversidad genética existente en cada una de estas especies. Para ello, se tomaron muestras de ADN de los diferentes aislados de las especies de hongos y bacterias, de cada localidad, provenientes de los cultivos puros generados a partir de los medios de cultivo selectivos. Con los resultados obtenidos, se generaron grupos filogenéticos.

La técnica de AFLPs, sobre microorganismos, se basa en la digestión de fragmentos de ADN usando las enzimas EcoRI/MseI y la posterior ligación de adaptadores y luego estos son amplificados con cebadores que no tienen nucleótidos selectivos en el extremo 3' del cebador, posteriormente se realiza otra amplificación con cebadores que contienen uno o dos nucleótidos selectivos en el extremo 3' del cebador. El análisis se realizó mediante el Kit AFLP Análisis System for Microorganism de Invitrogen®. En resumen la metodología utilizada fue la siguiente: se utilizó ADN a una concentración de 25 ng/μl, el cual fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI/MseI e incubado por 2 horas a 37°C, después a 70°C por 15 min. La ligación de los adaptadores se hizo con los reactivos del kit y se incubó 2 horas a 20°C. Seguidamente se hizo una preamplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa con el siguiente perfil térmico en el termociclador: 94°C por 30 seg, 56°C por 60 seg, 72°C por 60 seg, el termociclador será programado para 20 ciclos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Se realizó una amplificación selectiva para *Pseudomonas fluorescens* con los cebadores M-A + E-C y para las especies de hongos los cebadores M-C + E-AC por haber mostrado el mayor polimorfismo. Los productos de PCR se corrieron en una gel de poliacrilamida al 5% en la cual se visualizaron las bandas amplificadas.

Bioensayo de infección de hongos y bacterias sobre quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Preparación del inóculo

Los aislados de los hongos aislados fueron reproducidos sobre el medio de cultivo PDA, y luego de 4 semanas, desde la inoculación, se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 10^6 esporas/mL medido en una cámara de Neubauer. Partiendo de los cultivos puros de las bacterias aisladas, se preparó una suspensión a una concentración de 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC).

Obtención de quistes sanos de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Para garantizar que los quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida* se encuentren libres de cualquier microorganismo parásito, se realizó la esterilización por autoclave de muestras de suelo colectadas de cada sitio de estudio. Posterior a la esterilización, las muestras de suelo fueron secadas en horno y colocadas en macetas plásticas, en las cuales se sembraron tubérculos de papa de la variedad Loman, los cuales fueron previamente lavados y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % v/v. Al momento de realizar la siembra de los tubérculos de papa, también se realizó la inoculación de 1 quiste en cada maceta, previamente identificado morfológicamente. Se colocaron 10 macetas inoculadas con quistes individuales por cada localidad. Posterior a la eclosión del quiste, se esperó para que el nematodo completara su ciclo de vida y poder realizar la extracción de los nuevos quistes, los cuales fueron empleados para las evaluaciones posteriores. La extracción se realizó a través de la técnica del flotador de Fenwick, anteriormente descrita.

Inoculación de los quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

El estudio de la efectividad de los microorganismos consistió de dos fases. Durante la primera fase, se realizó la identificación de los microorganismos presentes en cada localidad; así mismo, se llevó a cabo el estudio de diversidad genética de dichos organismos para establecer el número de grupos filogenéticos a evaluar. Por otra parte, también se confirmó la presencia de ambas especies de nematodos en cada localidad.

Los quistes sanos de *G. rostochiensis* y *G. pallida*, recuperados de las macetas, fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 1 minuto, seguido de cinco enjuagues con agua destilada estéril y fueron colocados en grupos de 10 quistes por cada caja de

Petri con agar agua. Para el caso de la evaluación de los hongos, los quistes fueron aplicando 0.5 mL de la suspensión de esporas de cada uno de los hongos a evaluar sobre cada caja de Petri, previamente preparada. La aplicación se realizó con un atomizador manual de gota fina. Para el caso de las bacterias, la inoculación se realizó aplicando 1 mL de la solución de unidades formadoras de colonia preparada previamente. La aplicación también se realizó a través de un atomizador manual. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y se procedió a realizar la toma de datos a los 5, 10 y 15 días. Cada uno de los 10 quistes contenidos en cada unidad experimental fue observado bajo microscopio compuesto para determinar cuáles de ellos fueron parasitados por el microorganismo. La variable de respuesta fue el porcentaje de quistes parasitados.

12.4 Procesamiento y análisis de la información:

Para el análisis de los datos generados con el marcador molecular AFLP en el estudio de diversidad genética de los microorganismos, los fragmentos obtenidos a través de la PCR y visualizados tras la electroforesis, fueron codificados como (1) para indicar presencia y (0) para indicar ausencia. Estos datos se almacenaron en una matriz binaria mediante Microsoft® Excel. La determinación de la proporción de loci polimórficos fue calculada con la siguiente fórmula: $P = n/N \times 100\%$ donde “n” representa el número de bandas polimórficas y N el número total de bandas analizadas. La matriz binaria se exportó como un archivo de terminación “.txt” para realizar el cálculo de la matriz de similitud genética mediante el coeficiente de Dice (Dice, 1945). Para el análisis de los datos se utilizará el programa *Dissimilarity analysis and representation for Windows* 6.0.012 (<http://darwin.cirad.fr>). Posteriormente se realizó un dendrograma basado en el método de unión de vecinos (neighbor joining)(Saitou & Nei, 1987).

Con los datos obtenidos en el ensayo de las inoculaciones de los quistes con los diferentes microorganismos, se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 % con base en el diseño experimental propuesto en la metodología, empleando el software estadístico SAS, para determinar si existió diferencia significativa en el porcentaje de parasitismo. Posteriormente, se realizó una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5 %.

13 Vinculación, difusión y divulgación

- Se incluyó a un estudiante de la facultad de agronomía quienes se involucraron en el muestreo y pruebas moleculares e in vitro con el fin de desarrollar su tesis de grado.
Tesisista: Eduardo Antonio Rodríguez Villagrán
Título: Identificación molecular de especies de nematodos formadores de quistes del genero *Globodera* que afectan el cultivo de papa *Solanun tuberosum* L. de las localidades productoras de los Departamentos de Quetzaltenango y Huehuetenango
- Para la publicación del artículo científico se escogió la revista Ciencia Tecnología y Salud de la Digi.

14 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

14.1 Presencia de *G. rostochiensis* y/o *G.pallida*, a través de métodos moleculares, en cinco ocalidades productoras de papa en Quetzaltenango

Para la identificación de la presencia de ambas especies de nematodos, se tomaron un total de 71 muestras distribuidas en las cinco localidades de estudio. Para el caso de Concepción Chiquirichapa se presentó un 63% de presencia de *Globodera rostochiensis* sobre las 16 muestras analizadas. No se reporta la presencia de *G. pallida*. El detalle de cada muestra analizada se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. *Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste G. rostochiensis y G. pallida en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de Concepción Chiquirichapa.*

No. Muestra	Localidad	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
1		+	-
2		+	-
3		+	-
4		+	-
5		+	-
6		+	-
7		-	-
8	Concepción Chiquirichapa	+	-
9		-	-
10		-	-
11		+	-
12		-	-
13		-	-
14		+	-
15		+	-
16		-	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En la localidad de Palestina de los Altos, el porcentaje de incidencia de *G. rostochiensis* fue del 67% del total de las 15 muestras analizadas. No se identificó la presencia de *G. pallida*. El detalle de cada muestra analizada se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. *Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste G. rostochiensis y G. pallida en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de Palestina de los Altos.*

No. Muestra	Localidad	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
1		+	-
2		+	-
3		+	-
4		+	-
5	Palestina de los Altos	+	-
6		+	-
7		-	-
8		+	-
9		-	-
10		-	-

11	+	-
12	-	-
13	-	-
14	+	-
15	+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En la localidad de La Esperanza, el porcentaje de incidencia de *G. rostochiensis* fue del 75% del total de las 12 muestras analizadas. No se identificó la presencia de *G. pallida*. El detalle de cada muestra analizada se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. *Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste G. rostochiensis y G. pallida en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de La Esperanza.*

No. Muestra	Localidad	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
1		+	-
2		+	-
3		+	-
4		+	-
5		+	-
6	La Esperanza	+	-
7		-	-
8		+	-
9		-	-
10		-	-
11		+	-
12		+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En la localidad de San Juan Ostuncalco, el porcentaje de incidencia de *G. rostochiensis* fue del 62% del total de las 13 muestras analizadas. No se identificó la presencia de *G. pallida*. El detalle de cada muestra analizada se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. *Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste G. rostochiensis y G. pallida en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de San Juan Ostuncalco.*

No. Muestra	Localidad	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
1	San Juan Ostuncalco	-	-
2		-	-
3		+	-
4		+	-
5		+	-
6		+	-
7		-	-
8		+	-
9		-	-
10		-	-
11		+	-
12		+	-
13		+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En la localidad de San Martín Sacatepéquez, el porcentaje de incidencia de *G. rostochiensis* fue del 60% del total de las 15 muestras analizadas. No se identificó la presencia de *G. pallida*. El detalle de cada muestra analizada se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. *Presencia de las especies de nematodos formadores de quiste G. rostochiensis y G. pallida en zonas productoras del cultivo de papa de la localidad de San Martín Sacatepéquez.*

No. Muestra	Localidad	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
1	San Martín Sacatepéquez	-	-
2		+	-
3		-	-
4		-	-
5		+	-
6		+	-
7		+	-
8		+	-
9		+	-
10		-	-
11		+	-
12		-	-
13		-	-
14		+	-
15		+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

14.2 Presencia de las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* en cada localidad de estudio, las cuales parasitan quistes de los nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Durante el proceso de aislamiento de las especies de microorganismos, se identificaron un total de 33 aislados pertenecientes a tres especies de hongos y una especie de bacteria. Para el caso de *T. harzianum*, se identificaron siete aislados positivos para el aislamiento en medio de cultivo selectivo y confirmación molecular. Se presentaron tres falsos positivos en medio de cultivo, lo cual se confirmó tras la amplificación selectiva por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados por cada localidad se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Identificación de aislados de *T. harzianum* obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.

No. aislado	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Th 1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Concepción Chiquirichapa	+	+
Th 2			+	+
Th 3			+	+
Th 4		La Esperanza	+	+
Th 5			+	+
Th 6		San Juan Ostuncalco	+	+
Th 7			+	+
Th 8		Palestina de los Altos	+	-
Th 9			+	-
Th 10			+	-
Th 11			+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En cuanto a *T. virens*, se identificaron cuatro aislados positivos para el aislamiento en medio de cultivo selectivo y confirmación molecular. Se presentaron dos falsos positivos en medio de cultivo, lo cual se confirmó tras la amplificación selectiva por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados por cada localidad se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Identificación de aislados de *T. virens* obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.

No. aislado	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Tv 1	<i>Trichoderma virens</i>	La Esperanza	+	+
Tv 2			+	+
Tv 3			+	+
Tv 4		San Martín Sacatepéquez	+	+
Tv 5			+	-
Tv 6			+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En cuanto a *P. lilacinus*, se identificaron trece aislados positivos para el aislamiento en medio de cultivo selectivo y confirmación molecular. Se presentaron cuatro falsos positivos en medio de cultivo, lo cual se confirmó tras la amplificación selectiva por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados por cada localidad se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Identificación de aislados de *P. lilacinus* obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.

No. aislado	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Pl 1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Concepción Chiquirichapa	+	+
Pl 2			+	+
Pl 3			+	+
Pl 4			+	+
Pl 5		La Esperanza	+	+
Pl 6			+	+
Pl 7			+	+
Pl 8		Palestina de los Altos	+	+
Pl 9			+	+
Pl 10			+	+
Pl 11			+	+
Pl 12			+	+
Pl 13		San Juan Ostuncalco	+	+
Pl 14		Concepción Chiquirichapa	+	-
Pl 15			+	-
Pl 16		San Martín Sacatepéquez	+	-
Pl 17			+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

En cuanto a *P. fluorescens*, se identificaron nueve aislados positivos para el aislamiento en medio de cultivo selectivo y confirmación molecular. Se presentaron tres falsos positivos en medio de cultivo, lo cual se confirmó tras la amplificación selectiva por PCR. Los sitios de colecta y el número de aislados por cada localidad se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Identificación de aislados de *P. fluorescens* obtenidos a partir de quistes parasitados tomados de zonas productoras del departamento de Quetzaltenango.

No. aislado	Especie	Sitio de colecta	Prueba por medio selectivo	Prueba por PCR
Pf 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	La Esperanza	+	+
Pf 2			+	+
Pf 3			+	+
Pf 4		Concepción Chiquirichapa	+	+
Pf 5			+	+
Pf 6			+	+
Pf 7		San Juan Ostuncalco	+	+
Pf 8			+	+
Pf 9			+	+
Pf 10		San Juan Ostuncalco	+	-
Pf 11			+	-
Pf 12			+	-

Nota: *+ = reacción positiva, - = reacción negativa.

Luego de analizar la totalidad de las muestras, no se identificaron aislados positivos para la especie *S. marcenses*.

14.3 Diversidad genética de los microorganismos identificados

Tras la lectura y análisis del gel de poliacrilamida, para los siete aislados de *T. harzianum*, se obtuvo un total de 29 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 81.5. Con el análisis de conglomerados se generó un dendrograma en el cual se muestra el grado de similitud genética entre los aislados que fueron analizados. En la Figura 8 se observa que el aislado Th 2, proveniente de Concepción Chiquirichapa, resultó ser el más diverso con respecto al resto de aislados, mostrando únicamente un 25% de similitud genética con el resto de aislados. Por otra parte, los aislados Th 4 (La Esperanza) y Th 6 (San Juan Ostuncalco) fueron los aislados genéticamente más cercanos con un valor de similitud del 75%.

Para el caso de los aislados de *T. virens*, se obtuvo un total de 34 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 87.3. En la Figura 9 se observa que los cuatro aislados resultaron ser altamente diversos entre ellos, siendo el aislado Tv4, proveniente de San Martín Sacatepéquez, el aislado genéticamente más distante con un valor de similitud del 30%. Los aislados más cercanos en el índice similitud genética fueron el Tv2 (La Esperanza) y Tv3 (San Martín Sacatepéquez).

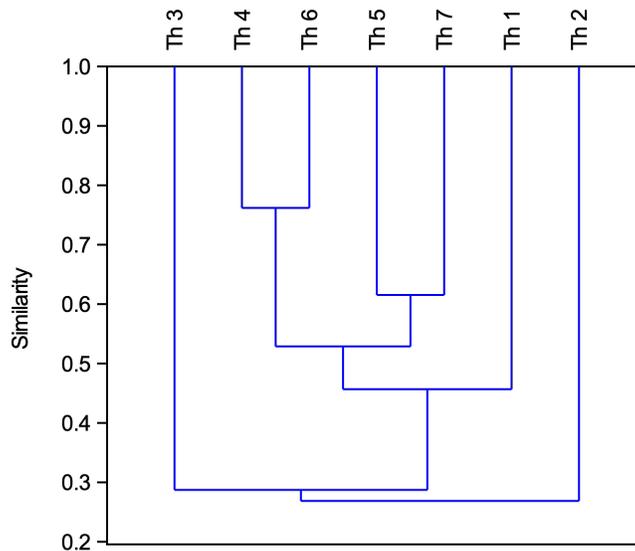


Figura 8. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *T. harzianum*.

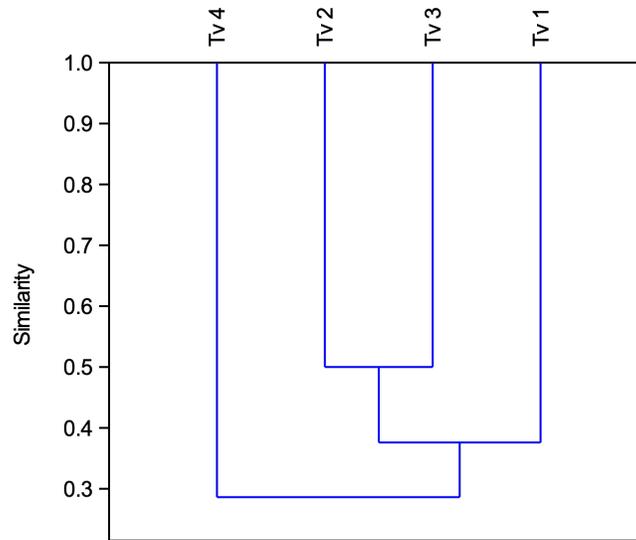


Figura 9. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *T. virens*.

En cuanto a los aislados de *P. lilacinus*, se obtuvo un total de 42 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 86.9. En la figura 10 se observa que los aislados mostraron ser altamente diversos, observándose que los aislados PI 1 (Concepción Chiquirichapa), PI 8 (Palestina de los Altos) y PI 11 (Palestina de los Altos) se agruparon dentro de un grupo filogenético totalmete separado del resto, compartiendo menos del 20% de similitud genética con los restantes 10 aislados. Dentro del segundo grupo filogenético los aislados PI 7 (La Esperanza) y PI 10 (Palestina de los Altos) estuvieron más cercanos en términos de similitud genética con un valor del 75%.

Para el caso de los aislados de *P. fluorescens*, se obtuvo un total de 31 loci identificados con un porcentaje de polimorfismo del 79.7. Estos aislados también resultaron ser altamente diversos, siendo el aislado Pf 1 (La Esperanza) el más distante genéticamente formando un grupo filogenético por si mismo con tan solo un 25% de similitud genética con el resto de aislados. En cuanto a los aislados Pf 3 y Pf 9 provenientes de Concepción Chiquirichapa y San Martín Sacatepéquez, respectivamente, fueron los más cercanos genéticamente con una similitud del 85%. El detalle de la relación genética de los aislados se observa en la figura 11.

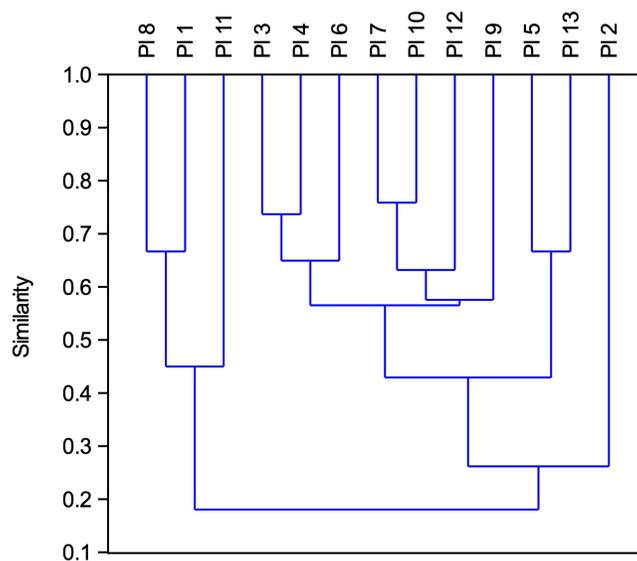


Figura 10. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Paecilomyces lilacinus*.

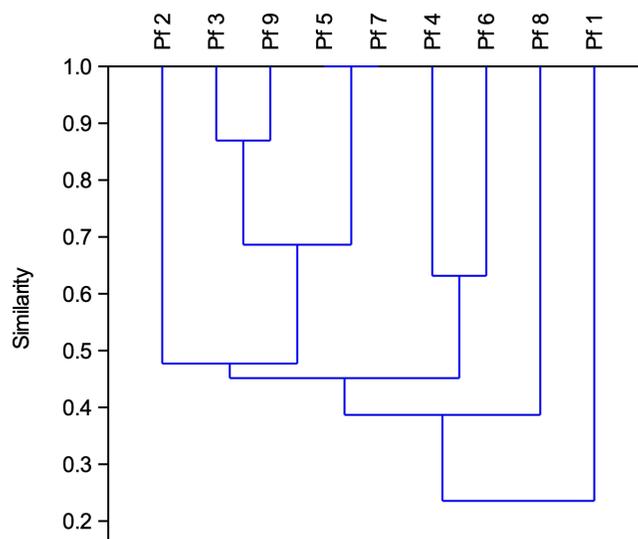


Figura 11. Dendrograma UPGMA generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) utilizando las distancias genéticas de Nei que muestra la diversidad genética de los aislados de *Pseudomonas fluorescens*.

14.4 Efectividad de parasitismos de microorganismos sobre quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Tras la evaluación in vitro, de cada uno de los 33 aislados de las cuatro especies de microorganismos, se identificó que el aislado Pl 12 perteneciente a la especie *P. lilacinus*, fue el más efectivo en el parasitismo de quistes de *G. rostochiensis*, con un porcentaje de quistes parasitados del 70%. Cabe resaltar que los ensayos de parasitismo se realizaron, únicamente, sobre quistes de *G. rostochiensis*, ya que no se identificó la presencia de *G. pallida*. Los aislados Pl 9, Pl3, Pl 1 y Pl 6, pertenecientes a la especie *P. lilacinus*, completan los primeros cinco lugares en cuanto a efectividad de parasitismo. Estos aislados variaron su porcentaje de parasitismos entre 66.7% y 60%.

Seguido se ubicó el aislado Tv 2 perteneciente a la especie *T. virens* con un 56.67 al igual que los aislados Pl 2 y Pl 11, con lo cual se confirma la efectividad de la mayor parte de aislados de *P. lilacinus*. El aislado de *P. fluorescens* más efectivo mostró un valor de 53.3%, mientras que el aislado más efectivo de *T. harzianum* presentó un valor de 50 %. Los aislados menos efectivos fueron Pf 9, Pf 3, Th 2 y Th 5 con un porcentaje de parasitismo del 23.33%. El detalle en el comportamiento del resto de aislados se muestra en la Figura 12.

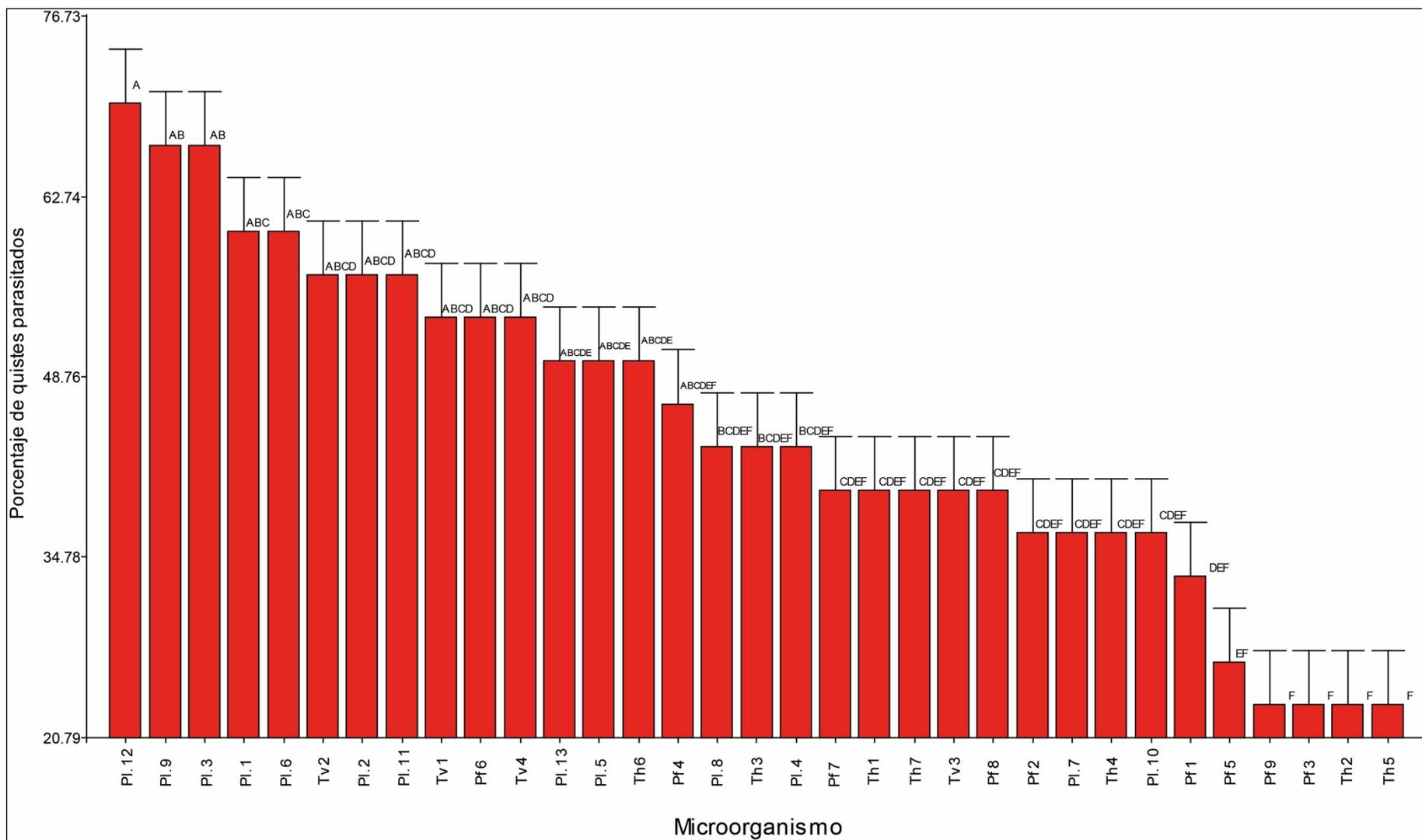


Figura 12. Media del porcentaje de parasitismos, por parte de los distintos aislados de cuatro especies de microorganismos, sobre quistes de *G. rostochiensis*. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $p < .05$

15 Análisis y discusión de resultados

15.1 Presencia de *G. rostochiensis* y/o *G. pallida*, a través de métodos moleculares, en cinco localidades productoras de papa en Quetzaltenango

La presencia de quistes, en las regiones productoras de papa de Quetzaltenango, coincidió con los reportes anteriores (García, 2015; Maldonado, 2012; Rivas, 2005; Roldán, 2005; Salguero, 2003; Sicán, 2010) basados en determinación morfológica. En todos los puntos de muestreo se encontraron, al menos, 7 quistes/g suelo, superando ampliamente los límites permisibles de 1.3 – 2.1 quistes/g suelo. Cabe mencionar que todas las localidades reportaron la presencia de la especie *G. rostochiensis* con valores de incidencia que alcanzaron el 75%, valor que es considerado alto y por lo cual es importante el desarrollo de estrategias efectivas para el control del patógeno. En cuanto a la presencia de la especie *G. pallida*, todas las muestras resultaron ser negativas, sin embargo, se recomienda una revisión del protocolo empleado para la detección molecular, el cual se basó en los reportes de Camacho y colaboradores (2017). En base a las experiencias obtenidas durante el desarrollo de la investigación, las pruebas para la validación del protocolo de identificación molecular de *G. pallida* deberán ir encaminadas a la revisión del perfil térmico de la PCR, así como las concentraciones de los reactivos utilizados en dicha técnica. El protocolo propuesto por Nakhla, Owens, Li y Wei (2010), mediante el uso de sondas TaqMan con PCR en tiempo real, es una opción viable a evaluar por ser una técnica más sensible y específica.

15.2 Presencia de las especies *T. harzianum*, *T. Virens*, *P. lilacinus*, *P. fluorecens* y *S. marcescens* en cada localidad de estudio, las cuales parasitan quistes de los nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida*

El uso de los medios selectivos, sin bien no presentaron un 100% de especificidad, sí fueron útiles al momento de restringir el desarrollo de un amplio número de especies no deseadas para los objetivos de la investigación. En las tablas de resultados se observa que existen casos en los cuales los resultados positivos para el aislamiento en el medio de cultivo coincidieron con los resultados de la confirmación molecular. Sin embargo, en todas las especies se presentaron falsos positivos en los medios de cultivo, pues al realizar la confirmación molecular, esta dio resultados negativos. Para el caso del medio de cultivo TSM (Attitalla et al., 2012) utilizado para el aislamiento selectivo de *T. harzianum*, a pesar de permitir el desarrollo de dicha especie, también presentó falsos

positivos. Su uso no se descarta, pero si se sugiere el uso de los primers específicos primers THITS-F2 y THITS-R3 descrito por Miyazaki, Tsuchiya y Okuda (2009), los cuales ayudaron a descartar los aislados que no pertenecían a la especie de interés.

En el aislamiento de *T. virens*, la confirmación molecular demostró la presencia de falsos positivos, lo cual indica que el medio de cultivo descrito por Howell (1999), si bien restringe el libre desarrollo de muchos microorganismos, no es selectivo por completo. Por otra parte, los primers T1F y T1R si fueron específicos al amplificar bandas de 330 pb como lo describen Devi, Prabhakaran, Kamil, Borah y Pandey (2012). La situación durante el aislamiento de *P. lilacinus* fue similar a la anteriormente descrita, al igual que la especie *P. fluorescens*. Por esta razón, la confirmación molecular, a través de amplificaciones específicas en el ADN, resultan ser sumamente necesarias para garantizar la identidad de las especies como lo sugieren Atkinks, Clark, Pande, Hirsch y Kerry (2005) para el caso de *P. lilacinus* y Scarpellini, Franzetti y Galli (2004) para la especie *P. fluorescens*.

15.3 Diversidad genética de los microorganismos identificados

Los resultados obtenidos con el marcador molecular AFLP determinó que existen altos valores de diversidad genética al analizar los aislados obtenidos de cada especie de microorganismos. Como era de esperarse, se presentaron aislados que, a pesar de haber sido colectados en la misma localidad, no fueron clasificados dentro el mismo grupo filogenético. El caso contrario también se presentó, ya que hubo aislados procedentes de regiones geográficas distantes, pero a pesar de esto, se clasificaron en el mismo grupo filogenético. Para el caso de *T. harzianum*, los valores de diversidad genética encontrada es similar a los reportados en otros estudios que evaluaron el comportamiento de la misma especie. La alta diversidad genética encontrada en este estudio coincide con lo reportado en distintos estudios (Sosa et al., 2014; Yasser et al., 2014).

La situación con el resto de aislados de los microorganismos identificados, *T. virens*, *P.s lilacinus* y *P. fluorescens*; presentaron el mismo patrón. Esto demuestra que los aislados obtenidos con el desarrollo de la investigación, son genéticamente diversos y esto tendrá un impacto directo sobre su capacidad de parasitismo sobre los quistes de nematodos, así como en su adaptación a factores bióticos y abióticos. La alta diversidad genética encontrada coincide con lo reportado por diversos autores (Charana & Min-Ho, 2012; Karpagam & Nagalakshmi, 2014).

15.4 Efectividad de parasitismos de microorganismos sobre quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Tras la evaluación de los aislados de las especies de microorganismo, se observó claramente que los mejores resultados se obtuvieron con varios de los aislados de la especie *P. lilacinus*, obteniendo valores de parasitismo que superan ampliamente a los reportados por Trifanova (2010) quien también evaluó la efectividad de dicha especie sobre quistes de *G. rostochiensis*. El estudio de López (2013) reportó valores cercanos al 90% de parasitismo para aislados de *P. lilacinus*, sin embargo, dicho autor realizó la evaluación bajo situaciones diferentes a las planteadas en este estudio. A pesar de esto, los valores obtenidos por los aislados de *P. lilacinus* nativos evaluados en esta investigación, sobrepasan los valores reportados en otros estudios (Indarti, Widiyanto, Kim, & Suryanti, 2010). Al relacionar la diversidad genética, se observa que los aislados PI 12, PI 9, PI 3 y PI 6; los cuales presentaron los valores más altos de parasitismo, fueron clasificados en el mismo grupo filogenético. Por tanto, es claro que existe una relación directa entre la efectividad de parasitismo y la similitud genética que posean los aislados de la especie.

El comportamiento de los aislados de *T. virens* son sensiblemente menores a los reportados en evaluaciones similares en las cuales se obtuvieron datos cercanos al 100% (Indarti, Widiyanto, Kim, & Suryanti, 2010). Sin embargo, el aislado Tv 2 presenta valores comparables con los mejores aislados de *T. harzianum*, por lo cual, la especie *T. virens* sigue siendo recomendable en el proceso de parasitismo de quistes de nematodos. A pesar de que solamente se contó con cuatro aislados de *T. virens*, es claro que los aislados Tv 2 y Tv 1, los cuales mostraron los mejores porcentajes de parasitismo, fueron clasificados en el mismo grupo filogenético, tras realizarse el análisis de diversidad genética. Este resultado ayuda a confirmar que la diversidad genética tienen un papel fundamental en la capacidad de parasitismos de los aislados. El mejor aislado de *P. fluorescens* presentó valores similares a los de *T. virens* y son comparables con los reportados por Umamaheswari (2012) y Salinas y colaboradores (2016). Finalmente, los aislados de *T. harzianum* mostraron valores de parasitismo que los colocan como medianamente efectivos como lo ha reportado Dandurand y colaboradores (2016). Los valores de parasitismo de todos los aislados evaluados, fueron tan variables como amplia fue la diversidad genética que se observa en el dendrograma de la Figura 5, de similitud genética de dicha especie.

16 Conclusiones

Del total de las 71 muestras analizadas, se identificaron 46 muestras positivas para la especie de nematodo *G. rostochiensis*, lo que equivale al 65% de incidencia sobre las zonas muestreadas. Dicha especie de nematodo se encuentra presente en las cinco localidades productoras del cultivo de papa en el departamento de Quetzaltenango.

Tras el proceso de identificación de microorganismos con capacidad para parasitar los quistes de nematodos se confirmó la presencia de 7 aislados de *T. harzianum*, 4 aislados de *T. virens*, 13 aislados de *P. lilacinus* y 9 aislados de *P. fluorescens* obtenidos de las 5 localidades de estudio.

Luego del análisis con el marcador molecular AFLP, se identificó una alta y compleja diversidad genética en todo los aislados de las especies de microorganismos. El efecto del factor de diversidad genética sobre la capacidad de parasitismos fue evidente en todas las especies, sobre todo, en los aislados de *P. lilacinus*, los cuales, al clasificarse bajo un mismo grupo filogenético, mostraron los mejores porcentajes de parasitismo.

Bajo condiciones in vitro y tomando como variable de respuesta el porcentaje de quistes parasitados, el aislado PI 12 perteneciente a la especie *P. lilacinus*, mostró la mayor capacidad de parasitismo, por lo cual, bajo las condiciones mencionadas, se presenta como el aislado más eficiente en esta evaluación. En términos generales, la especie *P. lilacinus* tuvo los aislados más eficientes en el parasitismo de los quistes de *G. rostochiensis*.

17 Impacto esperado

Se cuenta con una colección de 33 aislados de 4 especies de microorganismos con capacidad de parasitar quiste de la especie de nematodo *Globodera rostochiensis*. Estos aislados constituirán la base para futuras investigaciones en las cuales se podrá evaluar el efecto de dichos aislados bajo condiciones de campo esperando que los resultados se conduzcan en la misma vía que los obtenidos bajo condiciones in vitro. De esta forma, se espera contribuir con una solución viable a la problemática actual que atraviesan los productores de papa de la región occidental del país.

18 Referencias

- Aires, A., Carvalho, R., Da Conceição, M., & Rosa, E. (2009). Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, with extracts of Brassicacea plants. *American Journal of Potato Research*, 86, 327–333. doi:10.1007/s12230-009-9086-y
- Atkins, S., Clark, I., Pande, S., Hirsch, P., & Kerry, B. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 257–264.
- Attitalla, I., Adbelrawaf, S., Saeed, K., El-Komy, H., & Sarwar, M. (2012). Occurrence and microbiological characteristics of *Trichoderma* in Al-Jabal Al-Akhdar Region, Libya. *Journal of Biological Sciences*, 12(4), 209–217.
- Bacic, J., Geric, B., Sasa, S., & Urek, G. (2013). Morphometric and molecular analysis of potato cyst nematodes from Serbia. *Plant Protection Society of Slovenia*, 11, 369–372.
- Bulman, S., & Marshall, J. (1997). Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25(123–129).
- Camacho, M., Nóbrega, F., Lima, A., Mota, M., & Inácio, M. (2017). Morphological and molecular identification of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in Portuguese potato fields. *Nematology*, 9(8), 883-889.
- Charana, B., & Min-Ho, Y. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6600–6605. Doi:10.5897/AJMR12.889
- Chen, P., Chan, S., Wong, S., Eng, L., Jiwan, M., Kundat, F., ... Majid, N. (2012). Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistics activity against *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14, 197–203.
- Dandurand, L., Morra, M., & Zasada, I. (2016). Pale cyst nematode eradication research. *Potato*

- Progress*, 16(17), 1–4.
- Devi, T., Prabhakaran, N., Kamil, D., Borah, J., & Pandey, P. (2012). Development of species specific markers for detection of *Trichoderma* species. *Vegetos*, 25(2), 207–217.
- Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26, 297–302. Doi: 10.2307/1932409
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2013). *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin*, 43(1), 119-138. doi: 10.1111/epp.12025
- Evans, K. (1970). Longevity of males and fertilization of females of *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16, 369–374.
- Evans, K., & Stone, A. R. (1977). A review of the distribution and biology of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica*, 23, 178–189.
- Fenwick, D. W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18(4), 155–172.
- Franco, J., & González, A. (2011). Pérdidas causadas por el nematodo quiste de la papa (*Globodera* sp.) en Bolivia y Perú. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 16(2), 234–249.
- Gachon, C., Mingam, A., & Charrier, B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 1445–1454.
- García, N. (2015). *Distribución y presencia del complejo de nematodos de quiste en el cultivo de papa (Solanum tuberosum) en la aldea Concepción, Palecia, Guatemala y servicios realizados en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario MAGA, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Gitty, M., Tanhamaafi, Z., Arjmandian, A., & Pishevar, S. (2011). Occurrence of potato golden cyst nematode in Iran and its distribution in Hamedan province. *Agricultural Biotechnology*, 10, 53–61.
- Greco, N. (1993). Nematode problems affecting potato production in subtropical climates. *Nematropica*, 23(2), 213–220.
- Grubišić, D., Pajač, I., Gotlin, T., Čuljak, M., Benković, T., & Mešić, A. (2013). First molecular detection of croatina potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *Entomologia Croatica*, 17, 35–40.
- Hoolahan, A., Blok, V., Gibson, T., & Downton, M. (2012). A comparison of three molecular markers for the identification of populations of *Globodera pallida*. *Journal of Nematology*, 44(1), 7–17.
- Howell, C. (1999). Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media. *Mycologia*, 91(6), 930–934.
- Ibrahim, S., Minnis, S., Barker, A., Russell, M., Haydock, P., Evans, K., ... Wilcox, A. (2001). Evaluation of PCR, IEF and ELISA techniques for the detection and identification of potato cyst nematodes from field soil samples in England and Wales. *Pest Management Sciences*, 57(11), 1068–1074.
- Indarti, S., Widiyanto, D., Kim, Y., & Suryanti, S. (2010). Survey of egg- and cyst-parasitic fungi

- of potato cyst nematode in Indonesia. *The Plant Pathology Journal*, 26(1), 32–36.
- Istifadah, N., Pratama, N., Taqwim, S., & Sunarto, T. (2018). Effects of bacterial endophytes from potato roots and tubers on potato cyst nematode. *Biodiversitas*, 19(1), 47–51.
- Karpagam, T., & Nagalakshmi, P. K. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 601–614.
- King, E., Wood, M., & Raney, E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44(2), 301–307.
- López, D., Sánchez, P., Carrión, G., & Núñez, A. (2013). 89 % reduction of a potato cyst nematode population using biological control and rotation. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), 425–431.
- Lord, J., Lazzeri, L., Atkinson, H., & Urwin, P. (2011). Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of Brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7882–7890.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (2016). El Agro en cifras 2016. (MAGA. Dirección de Planeamiento, Ed.). Guatemala.
- Maldonado, C. (2012). *Identificación de nematodos de quiste en el cultivo de papa (Solanum tuberosum) en seis localidades de la parte sur del municipio de Palestina de los altos, del departamento de Quetzaltenango, Guatemala* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Martínez, M., Salto, T., Vázquez, G., Larena, I., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2013). *Penicillium oxalicum* reduces the number of cysts and juveniles of potato cyst nematodes. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 199–206.
- Miyazaki, K., Tsuchiya, Y., & Okuda, T. (2009). Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *The Mycological Society of Japan*, 50, 94–99.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. Doi:10.1038/scientificamerican0490-56
- Mulvey, R. H., & Stone, A. R. (1976). Description of *Puntodera matadotiensis* n. gen. n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Saskatchewan and with list of species and generic diagnoses of *Globodera* (n. rank), *Heterodera* and *Sarisodera*. *Canadian Journal of Zoology*, 54, 772–785.
- Mulyadi, S., Bambang, R., & Triman, B. (2014). Molecular and pathotype identification of potato cyst nematodes. *Journal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 18(1), 17–23.
- Nakhla, M., Owens, K., Li, W., & Wei, G. (2010). Multiplex Real-Time PCR assays for the identification of the potato cyst and tobacco cyst nematodes. *Plant Disease*, 94, 959–965.
- Núñez, A. (2002). *Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos asociados a quistes de Globodera rostochiensis (Woll.) en la región del Cofre de Perote* (Tesis de maestría). Universidad de Colima.

- Organization, E. and M. P. P. (2004). Diagnostic protocols for regulated pests, *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin*, 34, 309–314.
- Perry, R. N., & Beane, J. (1988). Effects of activated charcoal on hatching and infectivity of *Globodera rostochiensis* in pot tests. *Revue de Nématologie*, 11, 229–233.
- Powers, T. (2004). Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 367–383.
- Quader, M., Nambiar, L., & Cunnington, J. (2008). Conventional and real-time PCR-based species identification and diversity of potato cyst nematodes (*Globodera spp.*) from Victoria, Australia. *Nematology*, 10(4), 471–478.
- Ramírez, A. (2014). Especies cuarentenadas de nematodos fitoparásitos para México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 39–40.
- Rivas, E. (2005). *Determinación de la presencia de nematodos de quiste asociados al cultivo de papa Solanum tuberosum L., en los municipios de Patzún y Zaragoza, Chimaltenango* (Tesis de pregrado) Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Roberts, P., Lohrke, S., Meyerb, L., Buyer, S., Bowers, H., Baked, C., ... Lewis, C. (2005). Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression for of soilborne disease of cucumber. *Crop Protection*, 24, 141–155.
- Roldán, E. (2005). *Estudio de los nematodos formadores de quistes en papa Solanum tuberosum L., para descartar la presencia del nematodo dorado de la papa en el municipio de Jalapa, Jalapa* (Tesis de pregrado) Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425. doi:citeulike-article-id:93683
- Salguero, M. (2003). *Determinación de la presencia de nematodos de quiste asociados al cultivo de papa Solanum tuberosum L. en el municipio de Patzicia, Chimaltenango* (Tesis de pregrado) San Carlos de Guatemala.
- Salinas, A., Nava, C., Luna, M., San Martín, R., Rivera, A., & Trigos, A. (2016). Antagonistic bacteria affecting the Golden cyst potato nematode (*Globodera rostochiensis* Woll .) in the region of Perote, Veracruz, México. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 5(2), 16–22.
- Scarpellini, M., Franzetti, L., & Galli, A. (2004). Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Ecology*, 236, 257–260.
- Schaad, N., & Frederick, R. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24, 250–258.
- Schots, A., Bakker, J., Gommers, F., Bouwman, L., & Egberts, E. (1987). Serological differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*: partial purification of species-specific proteins. *Parasitology*, 95, 421–428.
- Seenivasan, N., Devrajan, K., & Selvaraj, N. (2007). Management of potato cyst nematodes, *Globodera spp.* through biological control. *Indian Journal of Nematology*, 37, 27–29.

- Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y. (2009). Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 291–299.
- Sicán, C. (2010). *Determinación de la presencia y distribución de nematodos de la sub-familia Heteroderinae, asociados al cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) en Concepción Chiquirichapa* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Starr, M., Grimont, P., Grimont, F., & Starr, P. (1976). Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(3), 270–276.
- Stirling, G. . (1991). *Biological control of plant parasitic nematodes. Progress, problems and prospects*. (C. International, Ed.), *Environmental Entomology*. Wallingfor.
- Stone, A R. (1972). *Heterodera pallida* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) a second species of potato cyst nematode. *Nematologica* 18, 591– 606.
- Trifanova, Z. (2010). Studies on the efficacy of some bacteria and fungi for control of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Agricultural Sciences*, 55(1), 37–44.
- Turner, S. . (1996). Population decline of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) in field soils in Northern Ireland. *Annals of Applied Biology*, 129, 315–322.
- Umamaheswari, R., Manorama, K., & Joseph, T. (2012). Eco-friendly management of potato cyst nematodes in the Nilgiris of Tamil Nadu. *Potato Journal*, 39(2), 185–190.
- Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P., & Domkárová. (2002). Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. *Rostlinná Vyroba*, 48(11), 486–489.
- Whitehead, A. G., Nichols, A. J. F., & Senior, J. C. (1994). The control of potato pale cyst-nematode (*Globodera pallida*) by chemical and cultural methods in different soils. *Journal of Agriculture Science Cambridge*, 22, 207–218.
- Winslow, D. R., & Willis, J. R. (1972). Nematode diseases of potatoes. In M. J. Webster (Ed.), *Economic nematology*. London: Academic Press.
- Yasser, M. M., Mousa, A. S. M., Massoud, O. N., & Nasr, S. H. (2014). Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 4(1), 83–90.
- Zhu, H., Sun, S., & Dang, H. (2008). PCR Detection of *Serratia spp.* Using primers targeting pfs and luxS genes involved in AI-2-dependent quorum sensing. *Current Microbiology*, 57, 326–330.

19 Apéndices



Figura A1. Preparación de medio de cultivo selectivo TSM con rosa bengala para aislamiento de *Trichoderma harzianum*.



Figura A2. Quiste parasitado por aislado de *Paecilomyces lilacinus*.



Figura A3. Quistes extraídos a partir de muestras de suelo de Concepción Chiquirichapa, Quetzaltenango.

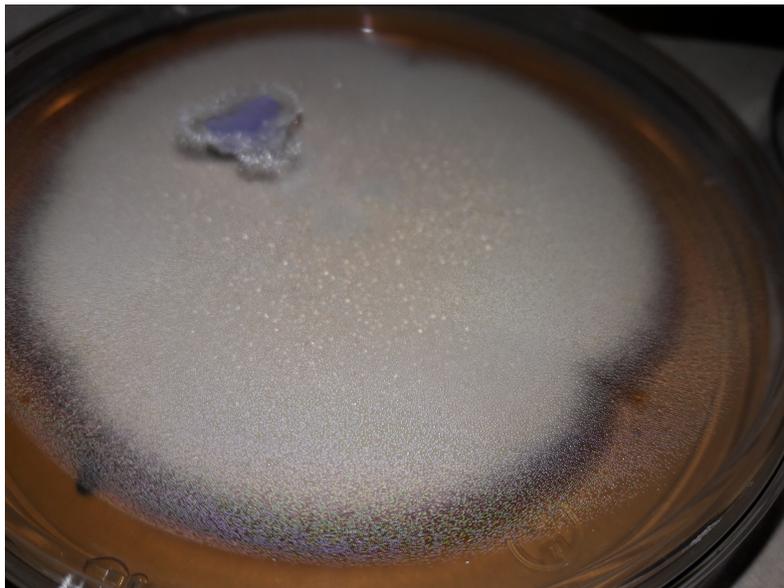


Figura A4. Desarrollo de la especie de hongo *Paecilomyces lilacinus* en medio de cultivo selectivo.

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Gregorio Amílcar Sánchez Pérez	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	Investigador	20101438	X		
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	X		

Guatemala ____27____ de noviembre ____2019____

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
 Coordinador del proyecto de Investigación

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Programa Universitario de Investigación

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Coordinador General de Programas