



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE
NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* spp. EN PLANTAS DE TOMATE RIÑÓN
(*Solanum lycopersicum*)**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORAS:

SARA MADELINE AYALA HIDALGO

MELANY DAYANARA HERNÁNDEZ MORÁN

TUTOR: RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito-Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, Sara Madeline Ayala Hidalgo con documento de identificación N° 1720915766 y Melany Dayanara Hernández Morán con documento de identificación N° 0401908306; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 22 de febrero del año 2023

Atentamente,



Sara Madeline Ayala Hidalgo

1720915766



Melany Dayanara Hernández Morán

0401908306

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Sara Madeline Ayala Hidalgo con documento de identificación No. 1720915766 y Melany Dayanara Hernández Morán con documento de identificación No. 0401908306, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: **“CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* spp. EN PLANTAS DE TOMATE RIÑÓN (*Solanum lycopersicum*)”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 22 de febrero del año 2023

Atentamente,



Sara Madeline Ayala Hidalgo

1720915766



Melany Dayanara Hernández Morán

0401908306

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ramiro Daniel Acurio Vásconez con documento de identificación N° 1714819495, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* spp. EN PLANTAS DE TOMATE RIÑÓN (*Solanum lycopersicum*)”**, realizado por Sara Madeline Ayala Hidalgo con documento de identificación N° 1720915766 y por Melany Dayanara Hernández Morán con documento de identificación N° 0401908306, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 22 de febrero del año 2023

Atentamente,



Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásconez. MSc.

1714819495

DEDICATORIA

Sara Madeline Ayala Hidalgo

Dedico esta meta cumplida a mis padres Wilfrido y Cecilia por motivarme a cumplir mis sueños, especialmente a mi madre la persona más luchadora y fuerte que pude haber conocido, a quien considero mi apoyo incondicional; dedico con mucho amor este triunfo a mi abuelita Julita, mi mejor educadora de vida y mi refugio en momentos de angustia. Finalmente ofrezco mi tesis a Dios, por darme la fuerza necesaria para culminar este objetivo personal.

Melany Hernández Morán

A Elsi, Rodrigo, Katty y Junior quienes me hacen sentir la persona más afortunada y bendecida del mundo. Los amo intensamente.

AGRADECIMIENTO

A la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – Agrocalidad, por darnos la oportunidad de usar las instalaciones y equipos para el desarrollo del proyecto de investigación en los laboratorios de Diagnóstico Vegetal.

De manera muy especial a la Ing. Ximena Navarrete a Lic. Sabrina Méndez y el Ing. David Jarrín, por compartir sus conocimientos, su tiempo y guiarnos en esta travesía.

Al Ing. Daniel Acurio por su apoyo, consejos y ánimos siendo invaluable para nosotras.

¡Hay tantas personas que han colaborado en pequeñas y grandes cosas, GRACIAS!

Sara Ayala

Melany Hernández

RESUMEN

En Ecuador la producción anual de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) es de aproximadamente 62 mil toneladas al año. Sin embargo, se han reportado pérdidas económicas que representan entre 24 al 33% del cultivo, debido la presencia de nematodos del género *Meloidogyne* spp., que afectan a dos condiciones primordiales; la calidad del fruto y el rendimiento de la plantación. En ese sentido, surge el objetivo de cuantificar e identificar a través de técnicas morfométricas y moleculares a los nematodos del género *Meloidogyne* spp., en plantas indicadoras de tomate riñón, por su susceptibilidad al ataque. Se realizó comparaciones morfológicas y morfométricas basadas en 8 patrones de medida, y se complementó con la identificación molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de los genes de importancia taxonómica 28S, 5S y el 18S. Posteriormente se amplificó el fragmento D2D3 del rDNA con el par de cebadores D2A y D3B, la región espaciadora no transcrita (IGS) entre el 5S y el 18S con los cebadores 194 y 195 y las secuencias SCAR con cebadores específicos para las especies *M. incognita* (MI-R y MI-F); *M. arenaria* (Far/Rar) y *M. javanica* (Fjav/Rjav). Las evaluaciones realizadas por PCR permitieron la detección del género *Meloidogyne* spp. y la identificación de la especie *M. incognita*, no se determinó la presencia de las especies *M. arenaria* y *M. javanica*. Este estudio sugiere adoptar el uso de diferentes herramientas de identificación para un diagnóstico correcto, con el fin de mejorar la evaluación de la diversidad del género *Meloidogyne* spp. y proporciona datos sobre la identificación de este fitopatógeno en cultivos de tomate riñón del Ecuador.

PALABRAS CLAVES: nematodo, ADNr, IGS, morfología, SCARS.

ABSTRACT

In Ecuador, annual production of tomato (*Solanum lycopersicum*) is approximately 62 thousand tons per year. However, economic losses have been reported that represent between 24 to 33% of the crop, due to the presence of nematodes of the genus *Meloidogyne* spp. that affect two main conditions: fruit quality and plantation yield. The objective was to quantify and identify, through morphometric and molecular techniques, the nematodes of the genus *Meloidogyne* spp. in tomato indicator plants for their susceptibility to attack. Morphological and morphometric comparisons were made based on 8 measurement patterns and were complemented with the molecular identification by polymerase chain reaction (PCR) of the taxonomically important genes 28S, 5S and 18S. Subsequently, the D2D3 fragment of the rDNA was amplified with primer pair D2A and D3B, the untranscribed spacer region (IGS) between 5S and 18S with primers 194 and 195 and the SCAR sequences with specific primers for the species *M. incognita* (MI-R and MI-F); *M. arenaria* (Far/Rar) and *M. javanica* (Fjav/Rjav). PCR evaluations allowed the detection of the genus *Meloidogyne* spp. and the identification of the species *M. incognita*; the presence of the species *M. arenaria* and *M. javanica* was not determined. This study suggests adopting the use of different identification tools for a correct diagnosis, in order to improve the evaluation of the diversity of the genus *Meloidogyne* spp. and provides data on the identification of this phytopathogen in tomato crops in Ecuador.

KEY WORDS: rDNA, IGS, morphology, SCARS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	3
2.1. Generalidades del cultivo de <i>Solanum lycopersicum</i>	3
2.1.1. Características botánicas	4
2.1.2. Importancia económica	5
2.1.3. Principales plagas y enfermedades.....	6
2.2. Generalidades de los nematodos fitoparásitos.....	7
2.2.1. Morfología de los nematodos	7
2.2.2. Morfometría para identificación de géneros de fitonematodos.....	9
2.2.3. Tipos de alimentación	10
2.2.4. Nematodos fitopatógenos descritos en el Ecuador.....	11
2.3. <i>Meloidogyne</i> spp.....	12
2.3.1. Taxonomía.....	12
2.3.2. Ciclo de vida.....	13
2.3.3. Sintomatología	14
2.3.4. Identificación morfométrica	15
2.3.5. Identificación molecular.....	15
2.3.5.1. Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
2.3.5.2. Genes utilizados para la detección molecular de <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Ubicación del ensayo.....	18

3.2.	Descripción general del experimento	18
3.2.1.	Diseño Completamente al Azar (DCA)	18
3.2.2.	Inoculación de plantas	19
3.3.	Material vegetal para el ensayo	19
3.4.	Extracción de <i>Meloidogyne</i> spp. por centrifuga	19
3.5.	Extracción de <i>Meloidogyne</i> spp. por bandeja.....	20
3.6.	Cuantificación de la población de <i>Meloidogyne</i> spp.	21
3.7.	Medidas morfométricas	21
3.8.	Análisis estadístico	22
3.9.	Análisis moleculares.....	22
3.9.1.	Extracción de ADN a partir de nematodos.....	22
3.9.2.	Cuantificación de las muestras	23
3.9.3.	Identificación de especies de nematodos mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1.	Evaluación poblacional de los nematodos.....	27
4.2.	Identificación morfométrica de <i>Meloidogyne</i> spp.	28
4.3.	Extracción y cuantificación de ADN.....	29
4.4.	Identificación de <i>Meloidogyne</i> spp. mediante PCR.....	31
4.4.1.	Ensayos de detección con los primers D2A / D3B	31
4.4.2.	Ensayos de detección con los primers 194 / 195.....	32
4.4.3.	Ensayos de detección con los primers SCAR.	34

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
5.1. Conclusiones.....	36
5.2. Recomendaciones	37
6. BIBLIOGRAFÍA	38
7. ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de <i>Solanum lycopersicum</i>	3
Tabla 2 Parámetros usados para la morfometría de nematodos	9
Tabla 3 Taxonomía de <i>Meloidogyne spp.</i>	12
Tabla 4 Descripción de los tratamientos	18
Tabla 5 Criterios de integridad del ADN	24
Tabla 6 Primers utilizados para la identificación de <i>Meloidogyne spp.</i>	25
Tabla 7 Concentraciones y volúmenes para PCR	25
Tabla 8 Perfil térmico.....	26
Tabla 9 Conteo de nematodos del género <i>Meloidogyne spp.</i>	27
Tabla 10 Test Duncan.....	28
Tabla 11 Medidas (μm) de los parámetros registrados para <i>Meloidogyne spp.</i> aislado de maceta	29
Tabla 12 Cuantificación y análisis de calidad de las extracciones de ADN	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características botánicas de <i>Solanum lycopersicum</i>	4
Figura 2. Anatomía del nematodo según su sexo.....	8
Figura 3. Hábitos de alimentación de los nematodos fitoparásitos	11
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.	14
Figura 5. Estructura de la familia de genes de ADN ribosómico en los nematodos.....	16
Figura 6. Diagrama esquemático de ADN ribosomal con regiones intergénicas (IGS) y sitios de hibridación de los cebadores 194/195.	17
Figura 7. Medidas morfométricas del nematodo filiforme de J2 <i>Meloidogyne</i> spp.	22
Figura 8. Resultado de PCR con los primers D2A y D3B	32
Figura 9. Resultado de PCR con los primers 194- 195	34
Figura 10. Resultado de PCR con los primers MI-R y MI-F	35

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Población total de los nematodos	21
-----------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Carta de compromiso.....	53
Anexo 2 Medidas (μm) de los distintos parámetros registrados de Tratamiento 1 (tierra contaminada + 1 inóculo) sobre <i>Meloidogyne spp.</i>	61
Anexo 3 Medidas (μm) de los distintos parámetros registrados de Tratamiento 2 (Tierra contaminada + 3 inóculos) sobre <i>Meloidogyne spp.</i>	62
Anexo 4 Medidas (μm) de los distintos parámetros registrados de Tratamiento 3 (Tierra estéril +1 Inóculo) sobre <i>Meloidogyne spp.</i>	63
Anexo 5 Raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> después de 120 días.....	64

1. INTRODUCCIÓN

El tomate riñón *Solanum lycopersicum* ha destacado en la actualidad como la hortaliza más cultivada a nivel mundial por su contenido nutricional y su alta demanda en la dieta diaria, produciendo millones de toneladas ya sea para consumo fresco y/o procesado (Frías, 2021; Khan, 2017; Phani et al., 2021; Pincay et al., 2021), generando gran interés económico por su masiva comercialización (Délices et al., 2019). En Ecuador se estima que la producción anual es de aproximadamente 62 mil toneladas al año (Agro Bayer Ecuador, 2020), según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2017), las provincias de Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Azuay y Loja han sido las principales provincias productoras de esta hortaliza (Curay et al., 2021; INEC, 2017). Sin embargo, en el 2013 se notificó una pérdida de 27 ha por plagas y enfermedades fitosanitarias (INEC, 2014). Entre las más importantes plagas que afectan al cultivo de tomate están: minador (*Tuta absoluta*), mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), trips (*Frankliniella occidentalis*), ácaros (*Tetranychus* sp.) y nematodos (*Meloidogyne incognita*) (Pincay et al., 2021).

Los fitonematodos, son considerados una plaga de importancia por su alta capacidad de adaptación, fácil diseminación, alta persistencia en el tiempo, difícil control, alto potencial reproductivo y principalmente por la afectación que causan en el desarrollo y crecimiento de las plantaciones, que desencadena en un bajo rendimiento y productividad del cultivo, o en casos extremos puede desembocar en la muerte de las plantas, por coacción con otros agentes fitopatógenos (Jima, 2012). Los síntomas visibles que se perciben son: atrofia, marchitamiento, achaparramiento, falta de vigor y/o clorosis, los cuales pueden ser confundidos con estrés hídrico, falta de nutrientes u otras enfermedades, el síntoma característico de este nematodo se manifiesta en las raíces a manera de abultamientos o agallas (Camues, 2019; López, 2017; Mendoza et al., 2019), al ser su sintomatología inespecífica se recurre a las técnicas de identificación para realizar una correcta implementación de estrategias

de control (Janssen et al., 2017). La identificación de especies de *Meloidogyne* spp., se basa tradicionalmente en observaciones de características morfométricas a través de microscopía óptica especialmente en el patrón perineal (Ye et al., 2019; Zhang et al., 2020), por esto el diagnóstico morfológico de especies relacionadas de nematodos no es suficiente para aclarar su estatus, debido a que existen convergencias morfológicas o bien sus rasgos morfométricos son solapados, por esta razón, los nematólogos requieren complementar su estudio con análisis moleculares como la reacción de la cadena (PCR) para implantar técnicas de control y/o erradicación de nematodos (Saucet et al., 2016; Singh, 2013).

Conociendo la importancia de la identificación de nematodos fitopatógenos, los objetivos de esta investigación fueron: determinar por microscopia la población en cada unidad experimental inoculada con nematodos del género *Meloidogyne* spp; identificar mediante morfometría nemátodos del género *Meloidogyne* spp.; determinar su presencia en plantas indicadoras; identificar mediante PCR convencional los especímenes del género *Meloidogyne* spp para confirmar la identificación morfométrica; y establecer un banco de especímenes de nematodos vivos del género *Meloidogyne* spp. en plantas hospederas como referencia para futuras investigaciones.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. Generalidades del cultivo de *Solanum lycopersicum*

Solanum lycopersicum es una planta herbácea nativa de América Central y Sudamérica, originaria de la región de los andes, de hecho, actualmente aún es posible encontrar ejemplares de estas variedades silvestres en las montañas costeras de Ecuador, Perú y el norte de Chile (Chidozie et al., 2019; Chime et al., 2017), se cree que su domesticación se dio en el sur de México y el norte de Guatemala (Jiménez y Balladares, 2019) por los pueblos pre-mayas de América Central, dando inicio a su extensa distribución por el territorio Americano (Chidozie et al., 2019). La Taxonomía Tabla 1, indica que esta hortaliza pertenece a la especie *Lycopersicum*, (Jiménez y Balladares, 2019) de la familia de las solanáceas con más de 3000 especies (Knapp y Peralta, 2016).

Tabla 1

Taxonomía de Solanum lycopersicum

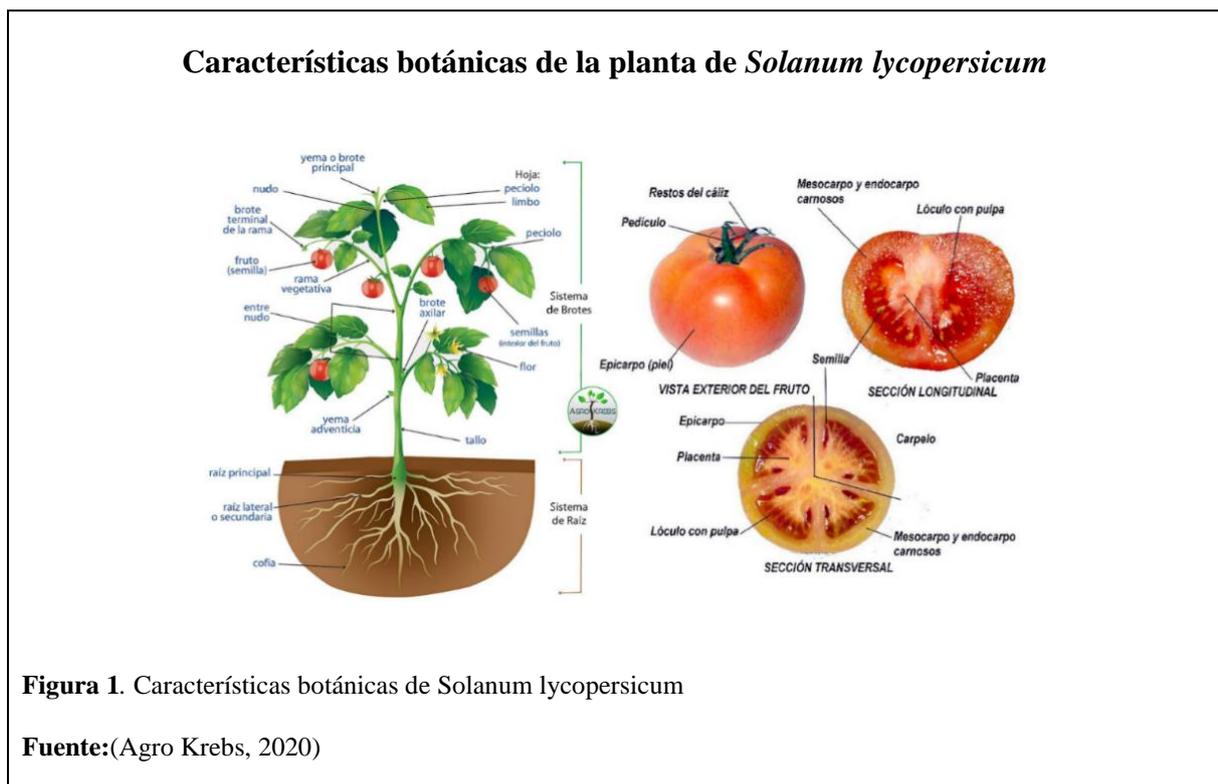
Superreino	Eukaryota
Reino	Viridiplantae
Filo	Estreptofita
Subfilo	Estreptofitina
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanáceas
Subfamilia	Solanoideae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum lycopersicum</i>

Fuente: (Schoch et al., 2020)

Esta hortaliza brinda calidad alimenticia y una multitud de beneficios saludables para el organismo por sus propiedades antioxidante, antihipertensiva y la presencia de compuestos, compuestos bioactivos como sólidos solubles (fructosa y glucosa), carotenoides, betacarotenos, vitamina C, licopeno, ácido ascórbico, potasio, folato, ácido fólico compuestos fenólicos y antioxidantes naturales (Dascón, 2018). Su alta demanda y popularidad se percibe en los cientos de cultivos presentes en todo el mundo, y su consumo puede ser de forma fresca o procesado industrialmente (Pineda, 2022).

2.1.1. Características botánicas

Solanum lycopersicum es una dicotiledónea, de porte arbustivo que se desarrolla de forma rastrera, semierecta o erecta (Jiménez y Balladares, 2019).



Según la morfología del tomate Figura 1 tenemos; el sistema radicular que absorbe nutrientes y agua a través de los pelos de la epidermis y los transporta a la parte superior de la planta por medio del córtex y el cilindro vascular, se constituye por una raíz principal, raíces secundarias y raíces adventicias (Infoagro, 2018; López, 2017). Presenta un tallo principal verdoso y

pubescente del cual se generan tallos secundarios, nuevas hojas y racimos florales, su diámetro vario de entre 2 a 4 cm de ancho y se va adelgazando en la parte superior; este órgano se compone básicamente de una corteza, cilindro vascular y tejido medular (López, 2017). Sus hojas son color verde, pinnadas, compuestas, de forma oblonga u ovalada, pubescentes recubiertas de pelos glandulares por el haz y cenicientes por el envés, poseen de entre 5 a 9 foliolos con bordes dentados, ápices agudos y bases oblicuas, la disposición de las mismas es en posición alternada sobre el tallo (Leiva, 2022; López, 2017). Las inflorescencias pueden ser de cuatro tipos: racimo simple, cima unípara, bípara y multípara y pueden llegar a tener hasta cincuenta flores por racimo (Florez, 2021), sus flores son regulares y con forma perfecta, conformadas por 5 sépalos y 5 pétalos de color amarillo en su corola, usualmente en la yema apical se forma la primera flor (Leiva, 2022; López, 2017). El Fruto la parte preferida y más aprovechada de la planta (Chidozie et al., 2019) es una baya subesférica globosa o alargada, pueden presentarse en coloraciones que varía de verde a rojo por lo común cuando ya ha madurado (López, 2017).

2.1.2. Importancia económica

Los frutos de *Solanum lycopersicum* se los consume frescos, o en presentaciones como concentrados, sopas, salsas, entre otros (Calderón, 2021); es por esta versatilidad que el tomate representa un componente importante de la dieta básica humana además de ser una rica fuente de micronutrientes, carotenoides, ácido ascórbico, potasio, folato, compuestos fenólicos y antioxidantes naturales (Pinela et al., 2019). Frente a la alta demanda de consumo por este fruto, debido al aumento de la población; constantemente se siguen mejorando las variedades de tomate para obtener productos de primera calidad (Bertin y Génard, 2018), pues se estima que se consume 140 millones de toneladas al año según registros del 2018 a nivel mundial (Velasco et al., 2019). En Ecuador la agricultura representa el 8% del producto interno bruto total anual del país (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019), uno de los cultivos de mayor

predominancia es el de *Solanum lycopersicum* más conocido como tomate riñón o tomate de mesa, el cual en el 2016 ocupó el cuarto lugar en cultivo de hortalizas de importancia, con 3 333 ha sembrada, una producción total de 6 1426 Tm y un valor fluctuante entre 26,98 a 7,58 USD el cartón de 25 lb y (CGSIN, 2018); en los últimos años ha incrementado el cultivo de tomate en las provincias de Tungurahua, Imbabura y Pichincha (Calderón, 2021).

2.1.3. Principales plagas y enfermedades

Los principales daños en el cultivo de tomate son propiciados por los problemas fitosanitarios los cuales pueden afectar severamente si no son tratados a tiempo (Jiménez y Balladares, 2019), las plagas son uno de ellos provocan importantes pérdidas económicas porque disminuyen el rendimiento y la calidad del fruto, entre estas están: la araña roja (*Tetranychus urticae*), mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*), pulgón (*Aphis gossypii* y *Myzus persicae*), minadores de hoja (*Liriomyza bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. strigata* y *L. trifolii*), orugas (*Chrysodeisis chalcites*, *Heliothis armigera*, *H. peltigera*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera littoralis*, *S. exigua*) y los nematodos (Infoagro, 2018; Jiménez y Balladares, 2019; Morales, 2019), otro problema fitosanitario son las enfermedades, causadas por bacterias, nematodos, protozoarios flagelados, virus y/o viroides. Se sabe que el tomate es susceptible a más de 200 enfermedades las cuales causan daños severos para los productores de este cultivo con pérdidas que ascienden hasta 90% en las cosechas (Velasco et al., 2019), algunas de las enfermedades y sus causales más importantes son; Oidio, Ceniza u Oidiopsis (*Leveillula taurica*) podredumbre gris o botritis (*Botrytis cinerea*), podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), mildiu (*Phytophthora infestans*), alternariosis del tomate (*Alternaria solani*), fusarium (*Fusarium oxysporum*), Verticillium (*Verticillium dahliae*), caída de plántulas o damping-off Mancha negra del tomate (*Pseudomonas syringae p.v. tomato*), agallas y lesiones en la raíz (*Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp.) entre otras (Laboratorios Ferlabs, 2021; Syngenta, 2020). Actualmente, los nematodos

son unos de los principales responsables de la reducción del rendimiento en la agricultura y la horticultura mundial, se conoce que más de 4100 especies de nematodos parásitos de las plantas (NPP) tienen gran impacto en esta actividad económica relacionada con el cultivo de la tierra (Phani et al., 2021).

2.2. Generalidades de los nematodos fitoparásitos

El filo Nematodo es uno de grupos más diversos del Reino Animalia, cuenta con alrededor de 25,000 especies descritas en todo el mundo (Navone et al., 2017), entre los que viven de forma libre dispersos en diferentes hábitats ya sea en ambientes acuático o terrestre, y como parásitos de especies animales y vegetales. Los nematodos son organismos multicelulares, vermiformes usualmente de tamaño microscópico, son animales invertebrados, a los cuales se los llama también gusanos redondos por su característica estructura tubular cilíndrica de forma alargada, y sección transversal redonda (Admasu-Hailu y Admasu-Hailu, 2019; Marin, 2019; Navone et al., 2017; Treonis et al., 2018)

Los nematodos parásitos de las plantas (NPP) son organismos microscópicos patógenos que se alimentan de las plantas hospedantes, a través de una interacción específica como biotrofos obligados, pues extraen toda su fuente de nutrientes del citoplasma de las plantas tras la perforación de las mismas a través de su estilete protráctil (Treonis et al., 2018; Vieira y Gleason, 2019).

2.2.1. Morfología de los nematodos

Estos organismos pluricelulares, son triblásticos (Gómez, 2020), poseen una morfología cilíndrica no segmentada, con una longitud que varía generalmente de entre los 0,3 a 2,5 mm, siendo usualmente los machos más pequeños que las hembras (Admasu-Hailu y Admasu-Hailu, 2019; Crozzoli, 2014). El cuerpo de estos nematodos Figura 2 es de simetría bilateral, su parte externa está constituida por la cutícula la cual está compuesta de colágeno, y una capa de hipodermis, mientras que su cavidad interna es un *pseudoceloma* un relleno de fluido gelatinoso

con células mesenquimales que forman la capa muscular, este fluido sirve como esqueleto hidrostático, soporte para los órganos internos, medio de circulación de los nutrientes y otros elementos, así como almacenamiento de los desechos, (Gelambi, 2019; Marin, 2019), por este motivo ellos no tienen sistema respiratorio ni circulatorio y presentan un tubo digestivo completo con boca y ano. Los NPP presentan un sistema excretor que no posee células flamígeras, asimismo su sistema nervioso central diverge, por ser un anillo nervioso que se sitúa alrededor de la faringe. La reproducción de los nematodos mayoritariamente es anfimictica entre hembras y machos, aunque pueden darse hermafroditismo o partenogénesis en algunas especies, y son solo los nematodos adultos los que presentan los órganos reproductores (vulva o espículas) (Crozzoli, 2014; Taipe, 2018).

Anatomía del nematodo

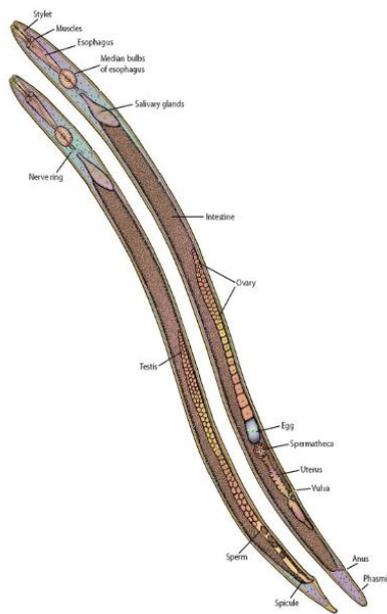


Figura 2. Anatomía del nematodo según su sexo

Nota: el nematodo de la izquierda representa un ejemplar macho mientras que el de la derecha corresponde a una hembra.

Fuente:(Cristina, 2015)

2.2.2. *Morfometría para identificación de géneros de fitonematodos*

El análisis morfométrico es la técnica más conocida y utilizada para determinar la identidad del nematodo (Geisen et al., 2018) este método basa su diagnóstico en parámetros morfológicos, de las diversas estructuras del cuerpo del nematodo como: estilete, glándulas esofágicas, región cefálica, cutícula, patrón perineal, vulva, espículas, bursa, cola, entre otros (Peraza, 2021; Taipe, 2018). Se evalúa la morfometría a través de índices desarrollados entre los años de 1876 y 1880 para la caracterización de géneros y sólo en algunos casos de especies (Taipe, 2018), sin embargo, las limitantes que este diagnóstico presenta es que conlleva mucho tiempo, requiere una amplia capacitación de los analistas (Geisen et al., 2018; Jima, 2012). y en el caso de identificación de especies los resultados no son concluyentes debido a que las miles de especies de nematodos son morfológicamente muy similares entre sí (Peraza, 2021). En la Tabla 2 se muestran los parámetros usados para la morfometría de nematodos.

Tabla 2

Parámetros usados para la morfometría de nematodos

Parámetro	Descripción
a	longitud del cuerpo / ancho máximo del cuerpo
b	longitud del cuerpo / longitud del esófago
c	longitud del cuerpo / longitud de la cola
c'	longitud de la cola / ancho del cuerpo en la región anal
L	longitud del nematodo
Cola	longitud del ano o cloaca al extremo terminal del cuerpo
Estilete	longitud del estilete

Fuente: (Crozzoli, 2014; Willmott et al., 1976)

2.2.3. Tipos de alimentación

Según los hábitos de alimentación, los nematodos fitoparásitos pueden ser ectoparásitos, semi-endoparásitos, endoparásitos migratorios y endoparásitos sedentarios (Migunova y Sasanelli, 2021) como se muestra en la Figura 3. Los ectoparásitos permanecen en el suelo fuera de la planta, se alimentan del tejido periférico o la corteza de las raíces, entre los que más destacan están los nematodos de aguja (*Longidorus* spp.) y los nematodos daga (*Xiphinema* spp.); los semi-endoparásitos son nematodos que ingresan parcialmente, pues sólo su parte anterior penetra en las raíces, mientras que los nematodos endoparásitos residen dentro del tejido vegetal en una o más etapas de su vida y pueden subdividirse en sedentarios o migratorios. Los endoparásitos migratorios migran de forma destructiva alimentándose de las células radiculares de la planta y salen de ella para terminar su ciclo, usualmente la sintomatología de su paso es la necrosis, ejemplo de ellos son: *Pratylenchus* spp. y/o *Radopholus* spp. Los endoparásitos sedentarios denominados nematodos nudos de raíz (*Meloidogyne* spp.) y los nematodos del quiste (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.), se caracterizan porque las hembras pasan la mayor parte de su ciclo de vida dentro de la raíz alimentándose de ella, en un sitio fijo tornándose globosas para formar y depositar los huevos (NEVAL, 2017).

Clasificación de los nematodos fitoparásitos según su forma de alimentación de la raíz

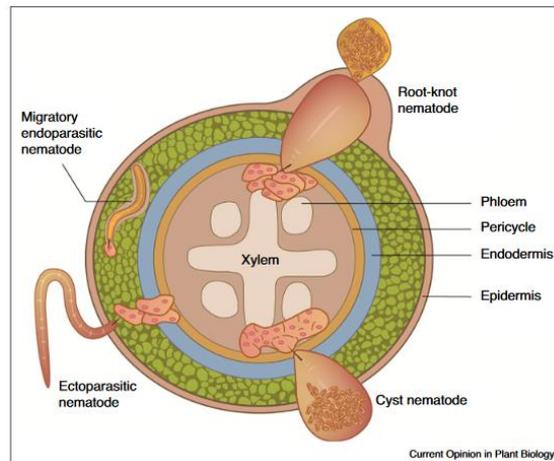


Figura 3. Hábitos de alimentación de los nematodos fitoparásitos

Nota: Sección transversal de una raíz que ilustra los diferentes hábitos alimenticios de los nematodos ectoparásitos, endoparásitos sedentarios y migratorios

Fuente: (Vieira y Gleason, 2019)

2.2.4. Nematodos fitopatógenos descritos en el Ecuador

En Ecuador se ha asociado a los parásitos de las plantas con algunos cultivos de importancia económica; en los cultivos de arroz los nematodos más frecuentes han sido *H. oryzae* y *M. graminícola* (Bardales, 2021(García et al., 2021), por el contrario, en las plantaciones de banano las afecciones propiciadas han sido principalmente por cuatro géneros de nematodos: *Radopholus similis*, *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. (Aguirre et al., 2016). En el cultivo de tomate se ha identificado *M. incógnita*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. arenaria*, siendo *M. incógnita* el que mayor incidencia de afección ha causado con una pérdida de 24-33% en los cultivos. El género *Meloidogyne* spp., está distribuido en las tres regiones del Ecuador; Costa, Sierra y Oriente, afectando a diversos cultivos de hortalizas, leguminosas y hasta frutales (Revelo, 2007).

2.3. *Meloidogyne* spp.

Los nematodos agalladores son parásitos obligados, polífagos, que se encuentran en todo el mundo infectando a miles de especies vegetales económicamente importantes, incluidas las hortalizas, frutales, ornamentales y flores cultivadas, incluso hasta plantas con genes resistentes (Adam et al., 2007; Vásquez, 2021). El género *Meloidogyne* spp. comprende más de 90 especies descritas, sin embargo, las especies más dañinas han demostrado ser las tres especies tropicales, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, y otras especies como *M. hapla*, *M. ethiopica*, *M. luci* y *M. enterolobii* (Adam et al., 2007; Jones et al., 2013).

2.3.1. Taxonomía

Tabla 3

Taxonomía de Meloidogyne spp.

Superreino	Eukaryota
Reino	Animalia - Metazoos
Clado	Ecdisozoos
Filo	Nematodos
Clase	Cromadorea
Orden	Rabdítida
Suborden	Tylenchina
Infraorden	Tylenchomorpha
Superfamilia	Tylenchoidea
Familia	Meloidogynidae
Subfamilia	Meloidogyninae
Género	<i>Meloidogyne</i>

Fuente: (Schoch et al., 2020)

2.3.2. *Ciclo de vida*

Los nematodos *Meloidogyne* desarrollan una parte de su ciclo en el suelo y otra parte dentro de los tejidos vegetales de su planta hospedera, los individuos juveniles de segundo estadio (J2) y los machos adultos viven en el suelo, mientras que juveniles de tercer (J3), cuarto (J4) estadio y las hembras se desarrollan en los tejidos de la planta. El ciclo de vida en promedio es de tres a cuatro semanas (De-Souza y Gonzaga, 2020), aunque puede prolongarse por varios meses si las condiciones ambientales y las posibilidades de alimentación, son favorables. *Meloidogyne* spp. se desarrolla mejor en climas tropicales, pues la temperatura ejerce una influencia positiva en la reproducción y/o capacidad infectiva del nematodo (Picca, 2022).

Cada hembra es capaz de colocar entre 600 y 800 huevos, el nematodo dentro del huevo se denomina juvenil de primer estadio J1, que al salir se convierte en un J2, una larva preparásitica móvil con capacidad infectiva que viaja hacia el cilindro vascular de la raíz (Picca, 2022; Siddiqui, 2018) y generar su sitio de alimentación, donde se va a completar el desarrollo, como se visualiza en la Figura 4. En la etapa adulta, los machos salen de la raíz y se trasladan por el suelo, las hembras por otro lado permanecen en los tejidos radiculares, tras ser fecundas se convierte en una masa de huevos mucilaginosos, dando la apariencia de un nódulo o agalla en la raíz (Picca, 2022; Vásquez, 2021).

Proceso de inserción de la hembra *Meloidogyne* spp., en la raíz y su maduración

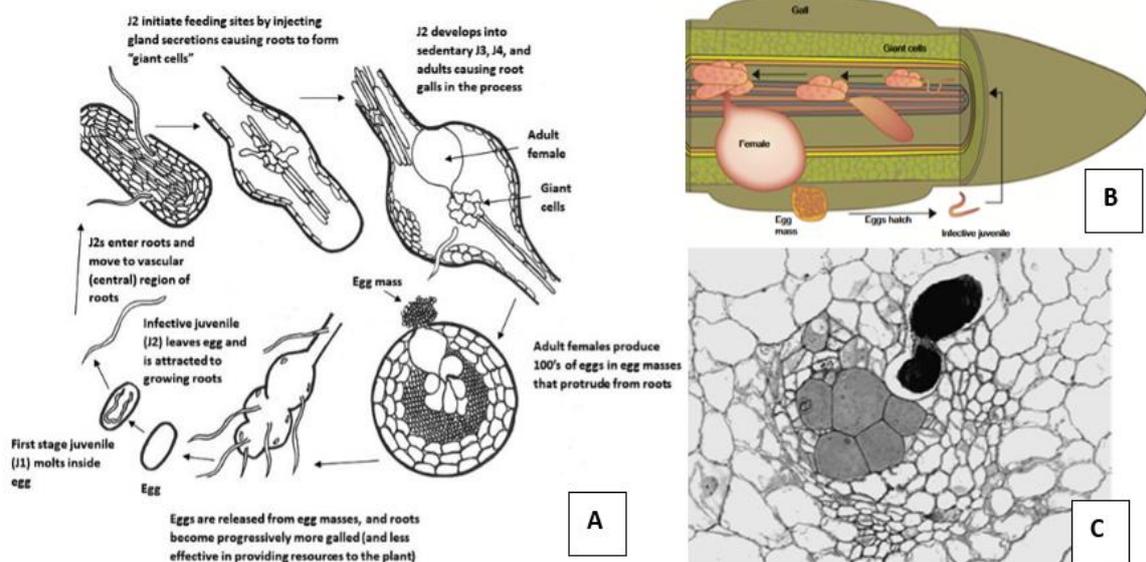


Figura 4. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Nota: (A) representan los estadios por los que atraviesa el nematodo *Meloidogyne*, y su ubicación en la planta, (B) la ubicación de la hembra en la raíz, (C) formación de los sitios de alimentación conocidos como células gigantes.

Fuente: (Lezaun, 2016; Siddiqui, 2018)

2.3.3. Sintomatología

La severidad del nematodo *Meloidogyne* spp. es favorecida por la siembra continua de cultivos susceptibles tal es el caso de las solanáceas (pimiento, ají, papa, tomate), la ausencia de rotación de cultivos, la estación, la densidad de población inicial y el tipo de suelo (Garcia et al., 2018; Jones et al., 2013). Los síntomas primarios se relacionan con la formación de nódulos o agallas que restringen el movimiento de agua y nutrientes, lesiones y/o ramificaciones excesivas en las raíces (Aguirre et al., 2016), sin embargo, este tipo de ataque en las raíces también induce a la pudrición por la consecuente infección secundaria microbiana de tipo fúngicas y/o bacterianas (Phani et al., 2021). Las consecuencias en los órganos aéreos no son características, sino se manifiestan a manera de retraso en el crecimiento, marchitamiento, decoloración/

amarillamiento del follaje, deformación de las raíces, aumento en el tiempo de emisión de hojas, menor producción, reducción en el peso del racimo, aumento en la duración del ciclo de cultivo y una baja calidad en sus productos (Aguirre et al., 2016; Barbary et al., 2015; Jones et al., 2013; Picca, 2022).

2.3.4. *Identificación morfométrica*

El análisis morfométrico es la técnica más usada cuando se desea determinar la identidad del nematodo (Geisen et al., 2018), utiliza las características morfológicas para realizar identificaciones taxonómicas (Treonis et al., 2018). Sin embargo, este análisis conlleva mucho tiempo y requiere de un experto con amplio conocimiento y adiestramiento visual de la taxonomía de nematodos, además de que la identificación de especies es muy limitada debido a la convergencia morfológica o bien al solapamiento de sus rangos morfométricos (Araya et al., 2016; Garcia et al., 2018).

2.3.5. *Identificación molecular*

2.3.5.1. *Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

El diagnóstico molecular es un término utilizado más específicamente para la caracterización de un organismo basada en información de su estructura de ADN o ARN, en comparación con los enfoques bioquímicos, este diagnóstico presenta varias ventajas pues no se basa en productos expresados, ni está influenciado por las condiciones ambientales o las etapas de desarrollo (huevos, juveniles, hembras y machos) (Roberts et al., 2016).

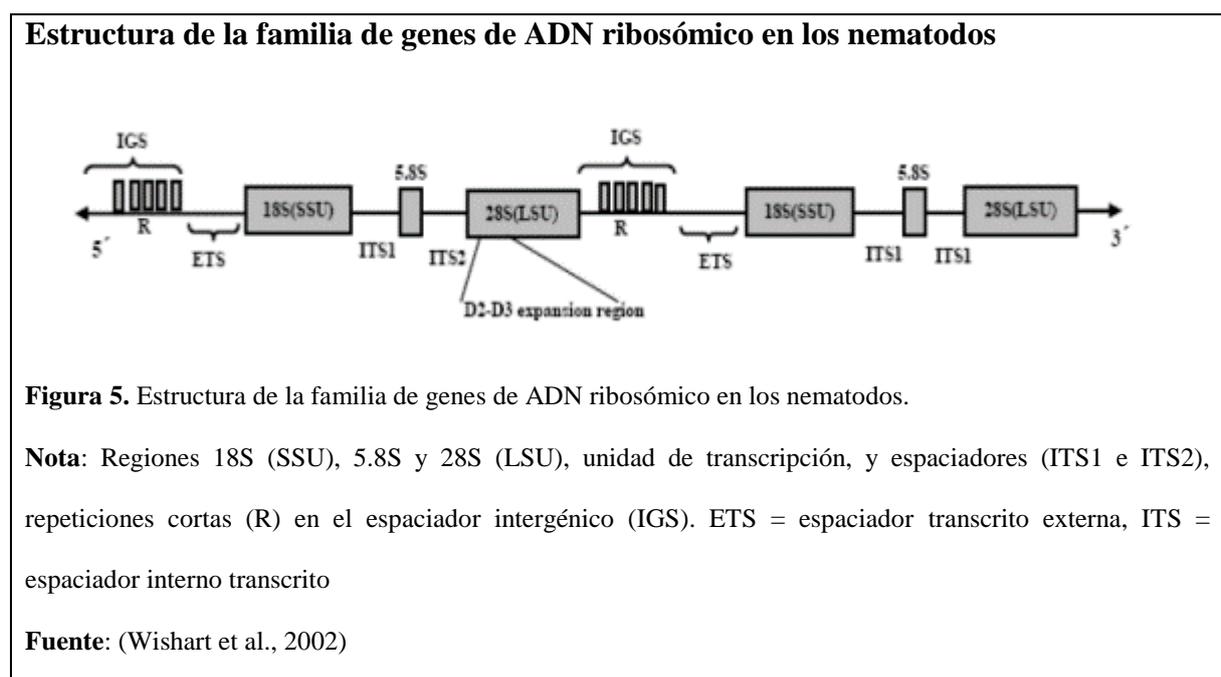
Los avances en las técnicas moleculares ofrecen la oportunidad de desarrollar diagnósticos que diferencien sólidamente las especies y que puedan ser utilizados por personas no especializadas en nematología, con un rendimiento de muestras diario, tras la extracción de nematodos del suelo (Garcia et al., 2018).

En las últimas décadas se han introducido en la nematología varias técnicas moleculares para el diagnóstico, pero la más popular es la basada en la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR). La PCR es un medio rápido, barato y sencillo de producir un número relativamente grande de copias de moléculas de ADN mediante un catalizador enzimático (Geisen et al., 2018).

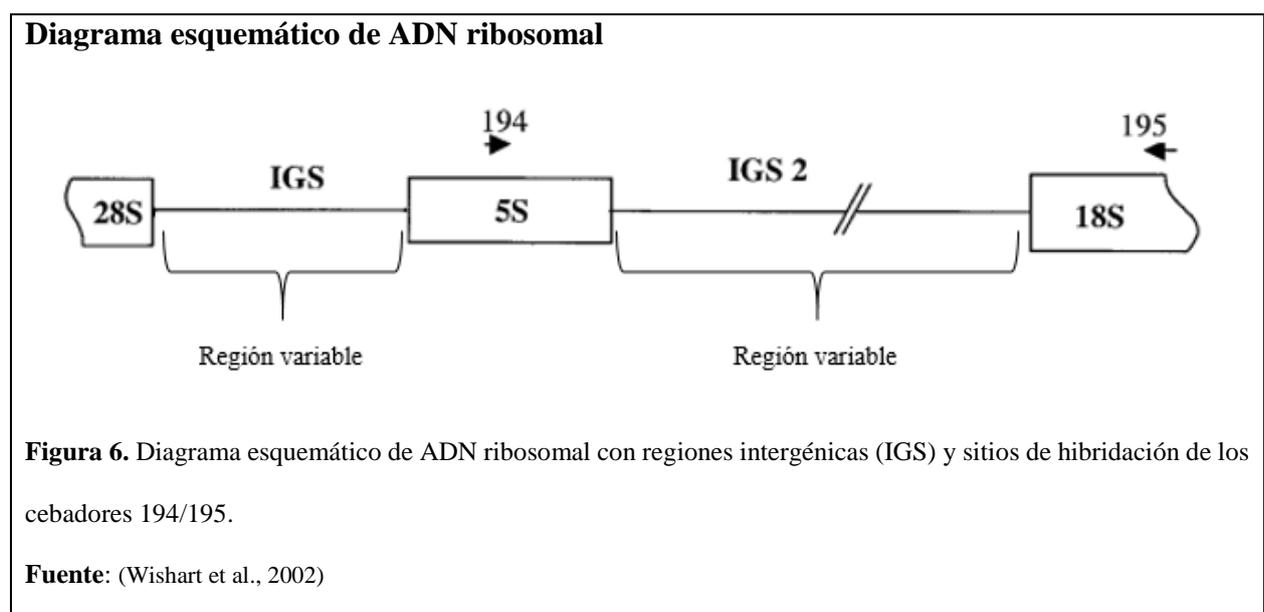
2.3.5.2. Genes utilizados para la detección molecular de *Meloidogyne* spp.

Se han desarrollado métodos basados en el ADN para la identificación y análisis filogenéticos de los nematodos fitoparásitos, debido a la variabilidad en la secuencia del ADN ribosómico, se usan los genes 18S, 28S y 5S (Artavia y Peraza, 2020; Garcia et al., 2018) o los marcadores ITS y/o COI (Vogt et al., 2014). La subunidad grande del rDNA (28S rDNA o LSU) tiene dominios conservados en amplios niveles taxonómicos, que facilitan la identificación de homologías, además de segmentos de expansión o dominios D divergentes, que proporcionan información filogenética, por ello la región de expansión D2-D3 resulta muy útil para investigaciones sobre las relaciones filogenéticas evolutivas. Igualmente, la subunidad de ADN ribosómico pequeña (18S rDNA o SSU) es útil en estudios sobre las relaciones entre géneros, debido a su baja tasa de evolución (Roberts et al., 2016). En la Figura 5 se presentan la organización esquemática del ADN ribosomal y los genes involucrados para la identificación entre especies de *Meloidogyne* spp.



Muchos protocolos moleculares de la identificación de nematodos utilizan regiones espaciadoras (ITS, ETS e IGS). La región del espaciador intergénico (IGS) de las repeticiones ribosómicas, es más variable que la región ITS, entre especies distantemente relacionadas (Blok et al., 1997). La región IGS entre los genes rDNA 5S y 18S (Figura 6), amplificada por los cebadores 194/195, puede utilizarse para distinguir, especies de nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* spp (Guanotasig, 2015).

Para el diagnóstico específicos de especie se han diseñado los cebadores SCAR (cebadores específicos de especie o de región de amplificación caracterizada por secuencia), los cuales son obtenidos de la secuenciación del fragmento polimórfico derivado de los cebadores RAPD, siendo más ventajosos que los cebadores RAPD porque suelen detectar un único locus. Se basan en el aislamiento de un amplicon particular a partir de una muestra representativa de una especie, que va a ser reproducible en diferentes individuos, esta característica se debe a que su amplificación por PCR es menos sensible a las condiciones de reacción (Katooli et al., 2021). Estos imprimadores específicos sirven para la detección de las principales especies representantes del género *Meloidogyne*: *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Adam et al., 2007; Ye et al., 2019).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del ensayo

El estudio de las muestras e identificación de las especies de *Meloidogyne* spp. mediante microscopía y técnicas moleculares se realizó en los laboratorios de Diagnóstico Vegetal de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – AGROCALIDAD, ubicada en la parroquia de Tumbaco, cantón Quito, Av. Interoceánica Km. 14 1/2, Sector La Granja.

El invernadero está ubicado a 2348 msnm, el clima generalmente cálido y templado de entre 10- 21 °C, con una humedad relativa de 75,2% y una pluviometría anual comprendida entre los 116 y 315 mm (Climate data, 2022; INAMHI, 2023).

3.2. Descripción general del experimento

3.2.1. Diseño Completamente al Azar (DCA)

El diseño experimental utilizado en la investigación corresponde a un diseño completamente al azar (DCA) con 4 tratamientos y 10 repeticiones cada uno, tal como se muestra en la Tabla 4. Las macetas del tratamiento 1 y 2 se llenaron con tierra contaminada con un promedio de 1800 nematodos por kilogramo, proporcionada por el laboratorio de nematología, procedentes de la provincia de Tungurahua con el fin obtener condiciones similares de campo, para el tratamiento 3 y 4 se usó tierra esterilizada en la autoclave (121 °C por 15 minutos) para comparar el umbral de daño. Se realizaron inóculos por cada unidad experimental.

Tabla 4

Descripción de los tratamientos

Nomenclatura del tratamiento	Descripción del tratamiento	Repeticiones	Código de identificación
T 1	Tierra contaminada + 1 Inóculo	10	Testigo
T 2	Tierra contaminada + 3 Inóculos	10	M
T 3	Tierra estéril + 1 Inóculo	10	C+
T 4	Tierra estéril	10	C-

Elaborado por: Las autoras (2023)

3.2.2. Inoculación de plantas

El día de trasplante al invernadero, se realizó la primera inoculación en las macetas de los tratamientos T1, T2 y T3. Se inoculó una suspensión de 20 ml que contenía entre 100-150 nematodos en estadios juveniles de *Meloidogyne* spp., en cuatro puntos alrededor del tallo a aproximadamente 1 cm de distancia y 2 cm de profundidad; se repitió el proceso cada 30 días de acuerdo con el tratamiento establecido; transcurridos 120 días a partir del trasplante se evaluó la presencia de nematodos mediante el método de bandejas de Whitehead descrito por Coyne y Nicol (2007).

3.3. Material vegetal para el ensayo

Se trasplantó una plántula de tomate riñón de variedad Pietro de un mes de crecimiento compradas en un vivero, en cada maceta plástica de 25 cm de alto por 15 cm de ancho con capacidad para 2,000 cm³. (2 litros de capacidad) con su respectivo tratamiento.

3.4. Extracción de *Meloidogyne* spp. por centrifuga

Los nematodos se extrajeron de acuerdo con el procedimiento PEE/N/09, instructivo específico de ensayo para extracción de nematodos de suelo (AGROCALIDAD, 2019b). Inicialmente se pesó 100 gramos de suelo homogeneizado, evitando incluir raíces y/o piedras. Se colocó la muestra en una jarra de 4 Litros de capacidad llena con agua corriente, se agitó con una espátula durante 1 minuto y se dejó reposar alrededor de 45 segundos con el fin de separar los nematodos del suelo y que queden suspendidos en el agua. Posteriormente se decantó el líquido sobre los tamices apilados en el siguiente orden desde abajo 38 μ m y 250 μ m de apertura de poro. La operación se repitió una vez más con el suelo remanente, pero esta vez con un medio de la capacidad de agua. Cada uno de los tamices se lavó, con agua a presión evitando salpicaduras y recolectando el fluido en el tamiz anterior, de manera que se vayan concentrando los nematodos en el tamiz de 38 μ m, los residuos retenidos en esta criba se transfirieron con cuidado a tubos de centrifuga de 50 mL con la ayuda de una piseta, evitando salpicaduras. Se

procedió a centrifugar por 4 min a 3000 r.p.m. y se desechó el sobrenadante, en dirección opuesta al bisel; se añadió una solución de azucarada (484 g/L), en el tubo falcón y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 3 min. El sobrenadante que contiene los nematodos se vertió sobre un tamiz de 25 μm , y se lavó cuidadosamente con un chorro de agua a presión, evitando salpicaduras, durante 3 min para retirar el exceso de azúcar, se repitió el mismo proceso desde la adicción de la solución azucarada. Se procedió a coleccionar los nematodos del tamiz, en un nuevo tubo falcón, haciendo un lavado con la ayuda de una piseta, aforando hasta 20 mL, para obtener alícuotas más limpias y facilitar el proceso de conteo e identificación de los nematodos. Este procedimiento permitió obtener nematodos para las inoculaciones y los procesos de identificación.

3.5. Extracción de *Meloidogyne* spp. por bandeja

Los nematodos se extrajeron de acuerdo con el procedimiento PEE/N/16, instructivo específico de ensayo para extracción de nematodos de suelo (AGROCALIDAD, 2019a). Inicialmente se pesó una muestra de suelo homogeneizado de 100 g, evitando incluir raíces, piedras. Se colocó la muestra en una jarra de 4 Litros de capacidad llena con agua, se agitó con una espátula durante 1 minuto y se dejó reposar alrededor de 45 segundos. Posteriormente se decantó la solución sobre los tamices apilados en el siguiente orden desde abajo 38 μm y 250 μm . La operación se repitió una vez más con el suelo remanente, pero esta vez con un medio de la capacidad de agua. Cada uno de los tamices se lavó, con agua a presión evitando salpicaduras y recolectando el fluido en el tamiz anterior, de manera que se vayan concentrando los nematodos en el tamiz de 38 μm , los residuos retenidos se trasvasan a una bandeja que contiene un tamiz con un filtro de papel y 100 mL de agua se deja en incubación por 72 horas, donde la tierra se queda retenida por el filtro y los nematodos junto al agua bajan a la parte inferior de la bandeja para después ser recogidos en un matraz y a través de cajas contadoras realizar la cuantificación de

nematodos del género *Meloidogyne* spp. Este proceso se utilizó para determinar la cantidad de nematodos en cada unidad experimental.

3.6. Cuantificación de la población de *Meloidogyne* spp.

Se realizó primero un paso de oxigenación y homogeneización del extracto de la muestra, posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL y se contabilizó el número de nematodos. Adicionalmente se realizó dos réplicas del conteo en base al volumen total del extracto obtenido a partir de 100 gramos de submuestra inicial procesada. En algunos casos, se realizó una tercera lectura para confirmar el dato reportado, para ello se utilizará la siguiente fórmula:

$$\# \text{ Nematodos totales (100 g de muestra)} = \frac{(100 \text{ mL} * \# \text{ nematodos encontrados})}{5 \text{ ml}}$$

Ecuación 1. Población total de los nematodos

3.7. Medidas morfométricas

Luego de la extracción de nematodos por el método de flotación, las muestras fueron evaluadas en el microscopio invertido óptico (modelo IX53PIF marca Olympus) y las microfotografías digitales se tomaron con el software Cell Sens Standard 9.7., como se observa en la Figura 7 este programa permitió evaluar las medidas morfométricas tomando en cuenta parámetros del cuerpo del nematodo como: longitud, ancho estilete, esófago y cola Tabla 2. La medición se realizó a un espécimen correspondiente a cada unidad experimental, obtenidos los datos se hizo una comparación bibliográfica con las medidas referenciales se encuentran en la colección del “Commonwealth Institute of Helminthology” (Willmott et al., 1976), para determinar que son nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne* spp.

Evaluación morfométrica del nematodo filiforme de J2 *Meloidogyne* spp

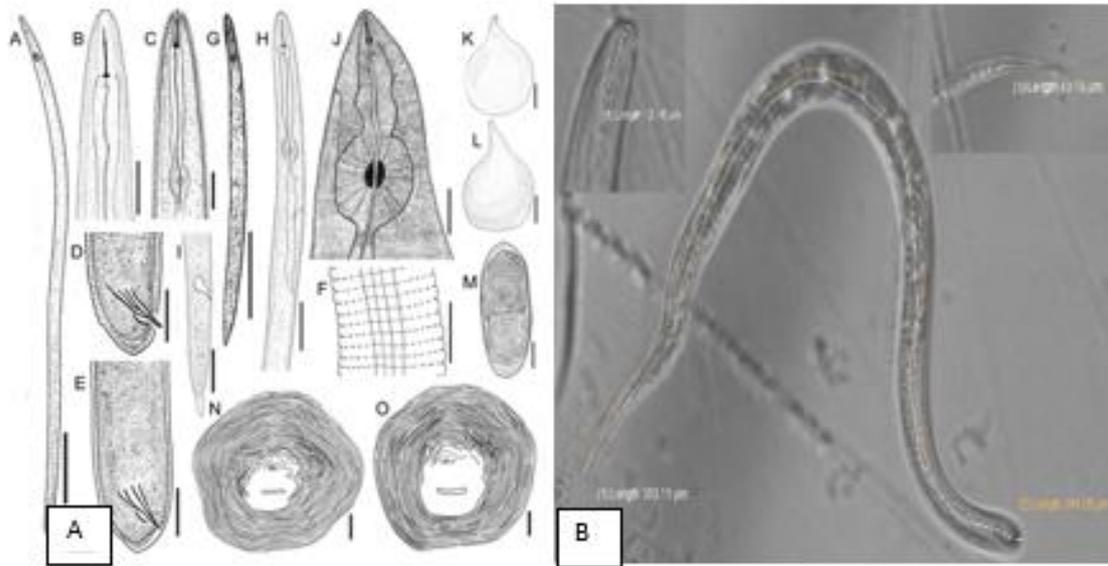


Figura 7. Medidas morfométricas del nematodo filiforme de J2 *Meloidogyne* spp.

Nota: (A) Patrones de medidas de los caracteres morfológicos de nematodos *Meloidogyne* spp. (B) Medidas de identificación en el microscopio invertido Olympus IX53 correspondientes a los parámetros de longitud total, longitud del estilete, longitud del esófago y longitud de la cola con lente objetivo 10X y 40X.

Fuente: (Perry et al., 2009; Las autoras, 2023)

3.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se llevaron a cabo de forma descriptiva e inferencial, con el uso del software Infostat. A partir de los resultados morfométricos se realizó un análisis comparativo (prueba t para una media) de los índices morfométricos indicados en la Tabla 2 utilizados para identificar nematodos. Además, se evaluó las concentraciones de cada tratamiento mediante un análisis de varianza (ADEVA) con un nivel de significancia de 0,05.

3.9. Análisis moleculares

3.9.1. Extracción de ADN a partir de nematodos

Posteriormente a la identificación de los microorganismos, se empleó el método de Enríquez (2015); en un ambiente estéril con la ayuda de un mechero, se tomó un ejemplar y se lo colocó en un portaobjetos dentro de 2 μ L de agua libre de nucleasas, con la punta de bisturí estéril se

procedió a realizar de 2 a 3 cortes en el nematodo seguidamente con la micropipeta se recogió toda la muestra y se colocó en un tubo *ependorf* de 0,2 mL estéril, el cual previamente contenía 18 μ L del *buffer* de lisis preparado ese momento (una mezcla de 10 μ L de *buffer* (5X Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffers sin $MgCl_2$, Promega) más 8 μ L de agua libre de nucleasas), durante todo este proceso se debe procurar mantener la continuidad en la cadena de frío, como siguiente paso se adicionó 2 μ L de Proteinasa K con una concentración de 20 μ g/ μ L (Promega), y se homogeneizó la muestra en el vortex, para la centrifugación se usó la centrífuga (modelo: MiniSpin® plus, marca: eppendorf) a 3,500 rpm por 15 segundos para separar los diferentes componentes celulares.

Inmediatamente se refrigeraron los tubos por 15 min a $-80^{\circ}C$ en el ultracongelador (modelo: DF3517, marca: I SHIN-BIOBASE), para posteriormente incubar las muestras por 60 min a $65^{\circ}C$ y 10 min a $95^{\circ}C$ en un termociclador (modelo: T100 Thermal Cycler, marca: Biorrad Thermocycle), finalmente, las muestras fueron centrifugadas por unos segundos y se almacenaron a $4^{\circ}C$ para su uso inmediato en PCR o para su manutención a largo plazo se congelaron a $-20^{\circ}C$.

3.9.2. Cuantificación de las muestras

La concentración de ng/ μ L del ADN extraído se realizó con el equipo NanoDrop (modelo: 8000 UV-Vis Spectrophotometer, marca: Thermo Scientific), el cual trabaja bajo principios de espectrofotometría de bajo volumen tomando en cuenta la relación de longitud de onda 260/280 y 260/230 con el fin de analizar la integridad, calidad y cantidad del ADN extraído. Se cargó 2 μ L de *buffer* de lisis como blanco y seguidamente se midió 2 μ L de cada una de las muestras de ADN.

La integridad del ADN se evaluó mediante la observación de amplificación en la electroforesis, considerando los siguientes criterios definidos con una puntuación, como se visualiza en la Tabla 5, con el fin de determinar de una manera objetiva y estandarizada, este parámetro. Este

procedimiento permitió controlar la eficiencia en la extracción (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020; Torres, 2018).

Tabla 5

Criterios de integridad del ADN

Criterios	Valoración Integridad	Puntuación
Banda definida	Alta	3
Presencia simultánea de la banda y un ligero <i>smear</i>	Adecuada	2
Ausencia de banda definida y presencia de <i>smear</i>	Parcialmente degradado	1
<i>Smear</i> concentrado en la parte inferior del gel	Totalmente degradado	0

Fuente: (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020; Torres, 2018).

3.9.3. Identificación de especies de nematodos mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El uso de técnicas moleculares para identificación de especies de nematodos garantiza una mayor precisión, por ello se realizó una serie de amplificaciones por la técnica de PCR convencional con el uso de cinco diferentes pares de *primers* (Tabla 6) con una máster mix diferente. Para la identificación inicial se utilizó los *primers* universales D2A y D3B, posteriormente se utilizó regiones más objetivas como el espaciador intergénico (IGS) para la identificación de especies de *Meloidogyne* spp (Adam et al., 2007), como paso final se realizó una discriminación más detallada entre especies a través iniciadores específico SCAR (Adam et al., 2007; Vélez y Guzmán, 2022).

Tabla 6*Primers utilizados para la identificación de Meloidogyne spp.*

Región	Primers	Secuencia	Amplicón	Referencia Bibliográfica
Región del ribosoma 28S Filo <i>Nematoda</i>	D2A D3B	5`- ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG -3` 5`- TCGGAAGGGGAACCAGCTACT A-3`	720-940 pb	(Enríquez, 2015; Vogt et al., 2014)
Región del ribosoma 5S-18S <i>Meloidogyne spp.</i>	194 195	5`- TTAAGTTGCCAGATCGGACG-3` 5`- TCTAATGAGCCGTACGC - 3`	720 -700 pb	(Adam et al., 2007; Blok et al., 1997)
SCAR <i>Meloidogyne incognita.</i>	MI-F MI-R	5`- GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-3` 5`- ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-3`	999 pb	(Adam et al., 2007; Meng et al., 2004)
SCAR <i>Meloidogyne javanica.</i>	Fjav Rjav	5`- GGTGCGCGATTGAACTGAGC-3` 5`- CAGGCCCTTCAGTGGAAC TATAC-3`	720 pb	(Adam et al., 2007; Zijlstra et al., 2000)
SCAR <i>Meloidogyne arenaria.</i>	Far Rar	5`- TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3` 5`- TCGGCGATAGACACTACAAACT-3`	420 pb	(Adam et al., 2007; Zijlstra et al., 2000)

Elaborado por: Las autoras (2023).

La preparación del máster mix se realizó en un volumen final de 10 µL como se muestra en la Tabla 7. Las condiciones del perfil térmico, establecidas en el termociclador, se consideraron según la

Tabla 8, para cada tipo de *primer*.

Tabla 7

Concentraciones y volúmenes para PCR

Componentes de la Master mix	Co	D2A-D3B		194-195		MI-F y MI-R	
		Cf	Volumen 1x	Cf	Volumen 1x	Cf	Volumen 1x
Go Taq green master mix (Promega)	2X	1X	5 µL	1X	5 µL	1X	5 µL
<i>Primer</i> Forward	10 µM	0,6 µM	0,6 µL	0,5 µM	0,5 µL	0,8 µM	0,8 µL
<i>Primer</i> Reverse	10 µM	0,6 µM	0,6 µL	0,5 µM	0,5 µL	0,8 µM	0,8 µL
Agua libre de nucleasas	-	-	1,3 µL	-	2,75 µL	-	0,9 µL
ADN	-	-	2,5 µL	-	1,25 µL	-	2,5 µL
			10 µL		10 µL		10 µL

Elaborado por: Las autoras (2023)

Tabla 8*Perfil térmico*

Proceso	D2A-D3B			194-195			MI-F y MI-R		
	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	3:00 min	1	94	2:00 min	1	94	4:00 min	1
Desnaturalización	94	1:00 min		94	0:30 s		94	0:30 s	
Alineamiento	55	0:30 s	35	50	0:30 s	45	62	0:30 s	35
Extensión	72	2:00 min		72	1:30 min		72	2:00 min	
Extensión Final	72	7:00 min	1	72	10:00 min	1	72	10:00 min	1
Estabilización	4	∞	1	4	∞	1	4	∞	1

Elaborado por: Las autoras (2023)

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis a 100 V por 45 min. Se colocaron las muestras en un gel al 1,5% de agarosa disueltos en tampón TBE 0,5X, teñido con 5µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). En cada pocillo se depositó 4 µL del producto PCR y el marcador de peso molecular utilizado fue BenchTop de 100 pb (Invitrogen). Las bandas de ADN se observaron en el trans-iluminador de luz UV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras los 120 días las plantas inoculadas presentaron síntomas de nodulación radical, tanto en zonas apicales como en zonas intermedias, además de decoloración del follaje, enanismo, escaso desarrollo vegetativo y marchitamiento excesivo (Calixto, 2022) como se observa en el Anexo 5. Con estas observaciones se procedió a realizar el procedimiento de extracción de nematodos de suelo por el método de centrifugado.

4.1. Evaluación poblacional de los nematodos

Después de 120 días se evaluó la concentración de nematodos y se obtuvieron los datos presentes en la Tabla 9, además del promedio de nematodos por kilogramo de tierra. El análisis de varianza ADEVA con un p- valor $<0,05$ determino que se acepta la hipótesis alternativa (H_a), que afirma que al menos un tratamiento es distinto. Por consiguiente, se realizó la Prueba de Duncan p- valor < 0001 (Tabla 10).

La inoculación de nematodos en estadios juveniles fue favorecedora para establecer el banco de especímenes vivos y al mantener las plantas en una temperatura promedio de 10-21°C y una humedad relativa de 73,5% ejercieron una influencia positiva en la reproducción de los nematodos (Picca, 2022). El Tratamiento 2 tiene una mayor población de nematodos ya que se realizó tres inóculos, destacando por sobre los demás. Talavera (2004) menciona en su manual de nematología agrícola que los valores límites de tolerancia son de 1 a 50 nematodos por cada 100 gramos de suelo con relación a *Meloidogyne* spp., una vez que superan esos valores el agricultor debe iniciar con acciones de control para evitar que la población de nematodos sobrepase los niveles de daños. En efecto, el tratamiento 2 es la opción más viable para mantener el banco de especímenes vivos, pues con relación al umbral de tolerancia su media es de 75 nematodos por cada 100 gramos de suelo, alejado del tratamiento 1 con una media de 34 nematodos por cada 100 g de suelo.

Tabla 9*Conteo de nematodos del género Meloidogyne spp.*

	T1 Tierra contaminada + 1 Inóculo	T2 Tierra contaminada + 3 Inóculos	T3 Tierra estéril +1 Inóculo	T4 Tierra estéril
1	287	820	75	0
2	207	789	56	0
3	303	713	52	0
4	307	613	14	0
5	360	600	63	0
6	393	687	44	0
7	420	758	33	0
8	347	645	27	0
9	460	783	78	0
10	358	720	87	0
Promedio	344	713	53	0

Elaborado por: Las autoras (2023)**Tabla 10***Análisis de varianza ADEVA*

Tratamiento	D.E	n	
T1	34,39	10	b
T2	76,21	10	a
T3	5,69	10	c
T4	0,00	10	d

Nota: Prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$) para la variable de cuantificación**Elaborado por:** Las autoras (2023)**4.2. Identificación morfométrica de *Meloidogyne* spp.**

En el presente bioensayo se logró identificar como nematodos del género *Meloidogyne* spp. a los ejemplares de las muestras analizadas procedentes de cada unidad experimental Tabla 11, para el reconocimiento morfológico se consideraron los modos de medición descritos en la Tabla 2, basados en los datos recopilados por el C.I.H “Commonwealth Institute of Helminthology” y se comparó. Los rangos de mediciones obtenidos no difieren de las descritas

por Ramírez (2015) que realizó la identificación de *Meloidogyne* spp. En muestras de Tungurahua, Imbabura y Pichincha. Sin embargo, la identificación basada en características morfológicas se dificulta principalmente por la alta variabilidad intraespecífica que presenta este género.

Tabla 11

Medidas (μm) de los parámetros registrados para Meloidogyne spp.

Parámetro	Morfometría según C.I.H, (1976) y Ramírez (2015)	Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
		Min-Max	s.d.	Min-Max	s.d.	Min-Max	s.d.
L	271,01 - 496,68	300,50 - 402,76	44,27	300,50 - 402,76	34,64	300,5 - 423,67	32,90
a	13,12 - 15,15	13,45- 15,09	0,61	13,45 - 15,09	0,60	13,3 -15,0	0,61
Est	10,32 - 13,93	12,70 - 13,67	0,36	12,70 - 13,67	0,36	12,7 - 13,9	0,40
Lg cola	26,74 - 55,39	42,89 - 53,07	4,57	42,89 - 53,07	3,41	42,4 - 53,7	3,66
Esófago	72,06 - 108,87	85,40- 102,73	4,11	85,40 - 102,73	5,27	78,5 - 99,2	6,76
a	22,63 - 31,68	20,30 - 29,94	3,41	20,30 - 29,94	3,16	21,8 - 29,9	2,23
b	3,18 - 5,37	3,45 - 4,66	0,43	3,45 - 4,66	0,36	3,1 - 5,1	0,59
c	6,28 - 12,91	6,78 - 9,05	0,97	6,78 -9,05	0,75	7,0 - 9,3	0,74

Nota: \bar{X} : Valores promedios; s.d.: Desviación estándar; min: Valores mínimos; max: Valores máximos.

Elaborado por: Las autoras (2023)

4.3. Extracción y cuantificación de ADN

A través del método de extracción de congelación-descongelación de ADN para *Meloidogyne* spp., J2 individuales, propuesto por Adam et al. (2007) que combina un proceso de lisis y el corte manual de cada individuo, se tuvo un éxito razonable en la amplificación del ADN de un solo individuo, con un tiempo de trabajo de 1 h 30 min. En estudios previos este método de congelación-descongelación ha reportado la visualización de bandas muy claras y de alta intensidad, en la amplificación de productos PCR de ADN ribosómico y mitocondrial en la electroforesis (Mikaeili et al., 2013).

La determinación de la calidad y cantidad de ADN de los nematodos fue cuantificada con el equipo NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific®) y sus resultados se evidencian en la Tabla 12; la concentración de ADN mostró una variabilidad de entre 34,0 ng/μL a 195,5 ng/μL, según la cuantificación de pureza del ADN, en la relación A260/280 los valores oscilaron entre 0,85 a 1,09, valores lejanos al rango deseado de 1,8-2,0, lo que indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas las cuales pueden ser glicoproteínas, colágeno u otros polipéptidos de la cutícula de los nematodos (Torres, 2018). Respecto a la evaluación de la relación A260/230 se exhibió un rango de entre 0,46 a 0,54; se reafirmó la sospecha de contaminación por compuestos orgánicos (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020). Una de las posibles causas de contaminación radica en que, el método de extracción de ADN, porque no se realizó ningún paso de purificación para no comprometer la escasa cantidad de ADN que se obtiene de los nematodos y por ende los extractos de ADN se utilizaron directamente para la amplificación por PCR (Donn et al., 2008; Khare et al., 2014; Orlando et al., 2020; Tesarová et al., 2003).

Tabla 12

Cuantificación y análisis de calidad de las extracciones de ADN

Muestra	Concentración promedio (ng/ μL)	Pureza promedio	
		A260/280	A260/230
M1	105,6	0,86	0,48
M2	102,9	0,85	0,48
M3	66,6	1,09	0,52
M4	126,5	0,89	0,50
M5	34,0	1,00	0,51
M6	121,4	0,95	0,50
M7	195,5	0,86	0,49
M8	56,7	1,03	0,54
M9	103,5	0,81	0,46
M10	86,1	0,96	0,48

Elaborado por: Las autoras (2023)

4.4. Identificación de *Meloidogyne* spp. mediante PCR

4.4.1. Ensayos de detección con los primers D2A / D3B

La evaluación de la región 28S con los *primers* D2A / D3B tuvo una eficacia alta con la extracción de ADN de individuos juveniles, dando como resultado la amplificación de una única banda de 950 pb (Enríquez, 2015) en todas las muestras. Se observó un ADN íntegro con banda bien definida de puntuación 3 según los Criterios de integridad del ADN previamente establecidos, confirmando que la región D2–D3 del ADN ribosomal es uno de los marcadores más adecuados y prometedores para una identificación válida de nematodos (Vogt et al., 2014), debido a que esta región del gen 28S se caracteriza por la coexistencia de variabilidad y conservación, permitiendo estimar filogenia entre especies al mismo tiempo que se facilita la identificación de posiciones homólogas (Bae et al., 2010; Gillespie et al., 2004). En estudios previos se ha reportado resultados con un porcentaje de identidad exitoso de entre 99% a 100%, con la secuenciación de esta región, en especies como *M. enterolobii* en Estados Unidos y China (99%) (Artavia y Peraza, 2020; Jia et al., 2022; Liang y Chen, 2022); Ren et al., 2021; Zhang et al., 2020), *M. arenaria* en China (99.8%) (Wu et al., 2021), *M. naasi* (99%) (Dos Santos et al., 2020) y *M. hapla* (99%) (Enríquez, 2015); sin embargo, existen estudios que ponen en duda la fiabilidad el uso de estos *primers* por problemas en la secuenciación debido a la supuesta formación de dímeros (Bae et al., 2010; Vogt et al., 2014), por ello como alternativa algunos autores han optado por utilizar otros cebadores universales como: TW81-F y AB28Actin-R para la amplificación del gen ITS-ARNr (Shireen y Sulaiman, 2022), o los cebadores C₂F₃ y 1108, para amplificar la región entre la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el gen 16S del ADN mitocondrial (ADNmt) para identificación de *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Peraza, 2021).

La caracterización molecular de los nematodos a partir de los genes 28S (Figura 8) es ampliamente utilizada para inferir relaciones filogenéticas entre linajes taxonómicos

estrechamente relacionados y distantes (Bae et al., 2010; Cagnolo et al., 2016). Sin embargo, los resultados de esta evaluación no son concluyentes para especies, porque no se puede suponer la homología de los segmentos de expansión entre especies muy relacionadas (Raupach et al., 2010; Vogt et al., 2014). Por lo cual se procedió a realizar posteriores análisis con *primers* más específicos.

Visualización en gel de agarosa de las amplificaciones con los *primers* D2A y D3B

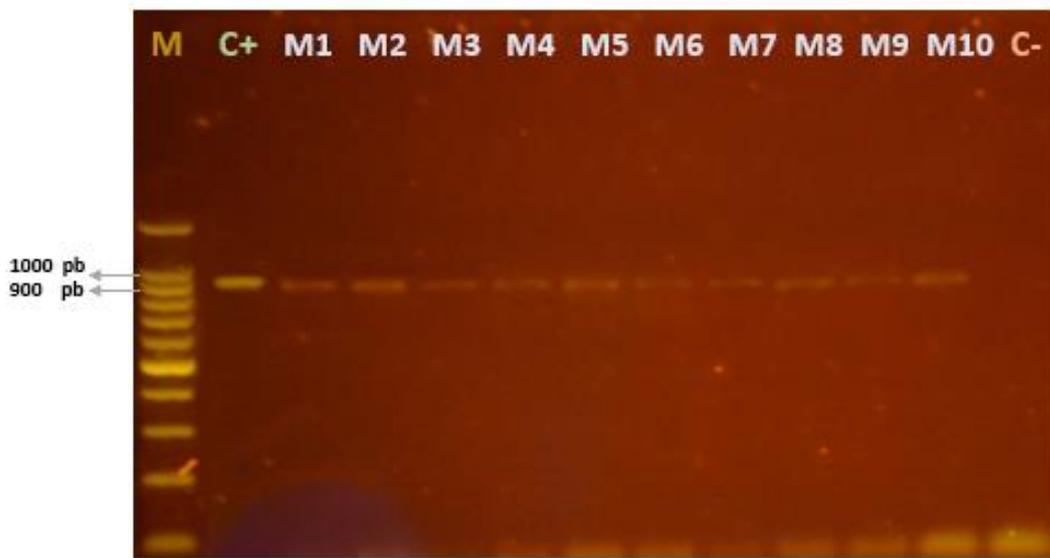


Figura 8. Resultado de PCR con los *primers* D2A y D3B

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR de la región 28S de ADNr de nematodos. Donde M: Marcador molecular de peso (100bp DNA Ladder, Invitrogen®); M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 (muestras), C(+): control positivo; C(-): control negativo.

Elaborado por: Las autoras (2023)

4.4.2. Ensayos de detección con los *primers* 194 / 195.

Los cebadores 194/195, produjeron productos de PCR de un ADN íntegro con bandas bien definidas de puntuación 3 (Tabla 5), con tamaños muy similares entre 700 pb y 720 pb (Figura 9), puesto que los taxones estrechamente relacionados, generalmente tienen longitudes promedio de IGS similares (Tsai et al., 2020). Según Adam et al. (2007) la amplificación con los *primer* 194 y 195, presenta los siguientes tamaños de *amplificación* para las siguientes

poblaciones de especies tropicales: *M. javanica*, *M. incognita* y *M. arenaria* (720 pb), *M. hapla* (700 pb), *M. mayaguensis* (780 pb), y de *M. chitwoodi* y *M. fallax* (1700 pb); estos cebadores han sido ampliamente utilizados para la identificación y diagnóstico molecular de especies de *Meloidogyne* spp. (Gamboa, 2019; Niu et al., 2012), se ha reportado que el uso de este cebador ha mostrado una identidad del 99% para especies como *M. incognita* (Tsai et al., 2020) y del 100% para *M. arenaria* y *M. thailandica* (Qin et al., 2022). Los primer 194 y 195 amplifican la región espaciadora no transcrita (IGS) entre el 5S y el 18S, una zona con gran variabilidad frente a otros espaciadores y/o genes ribosómicos debido a polimorfismos de un solo nucleótido e inserciones/deleciones (Madani et al., 2019; Sagastume de Andrés, 2015).

En este estudio dos de las diez muestras analizadas (M1 y M2) no amplificaron, obteniéndose un rendimiento del 80% debido a la ausencia de bandas en estos dos carriles Figura 9; como se pudo observar en la Tabla 12, la calidad de ADN obtenido fue baja debido a la gran cantidad de proteína residual, este factor tiene el potencial para afectar la sensibilidad del ensayo molecular porque inhibe la amplificación por PCR y por ende el rendimiento del análisis (Orlando et al., 2020; Torres, 2018) se considera que la cutícula es la principal barrera física para poder liberar al ADN, porque es la estructura externa del nematodo, que está conformada por una abundante cantidad de proteínas y carbohidratos (Torres, 2018).

Cabe mencionar que los nematodos evaluados estuvieron en estadios juveniles ya que son los más frecuentes en el ambiente; sin embargo, su identificación resulta difícil sin el adiestramiento adecuado, puesto que los rasgos morfológicos no son claramente distinguibles en esta etapa y son muy similares entre especies (Bhat et al., 2022; Braun y Kiewnick, 2018; Peraza, 2021), por lo que puede darse una confusión al momento de la identificación, muchos autores coinciden en que la medición de los parámetros morfométricos requiere de taxónomos capacitados, siendo esta una desventaja para los investigadores o personal que no dominan la

habilidad de identificar y caracterizar una especie de nematodo, en particular con el análisis de estos parámetros (Bhat et al., 2022; Peraza, 2021).

Visualización en gel de agarosa de las amplificaciones con los *primers* 194 y 195

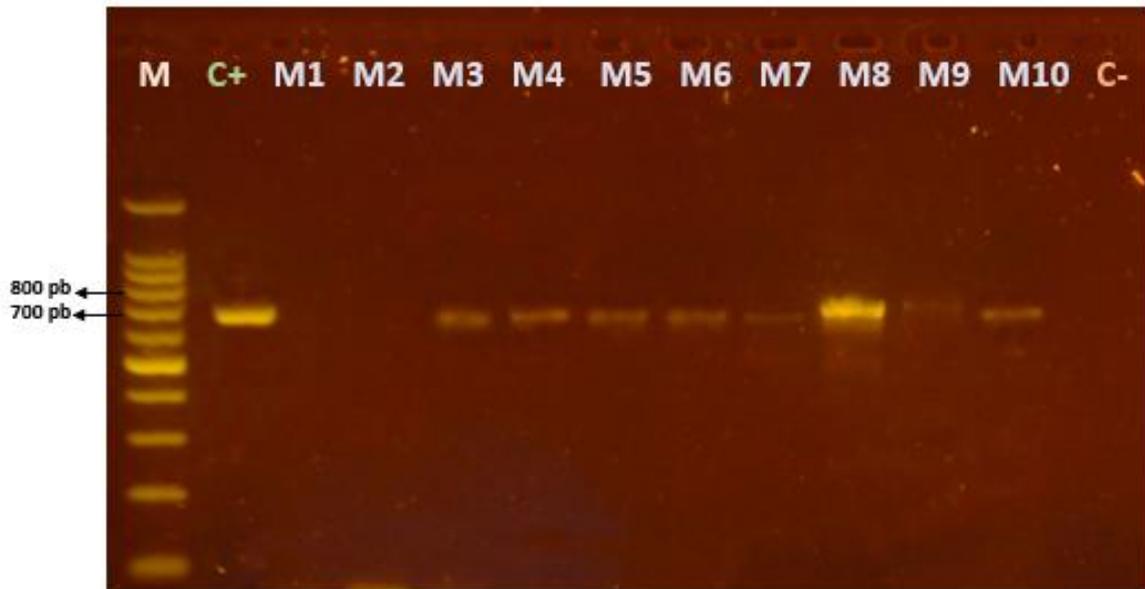


Figura 9. Resultado de PCR con los primers 194- 195

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR de la región IGS entre el 5S y el 18S. Donde M: Marcador molecular de peso (100bp DNA Ladder, Invitrogen®); M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 (muestras), C(+): control positivo; C(-): control negativo.

Elaborado por: Las autoras (2023)

4.4.3. Ensayos de detección con los primers SCAR.

El primer MI-F y MI-R es específico para *Meloidogyne incognita*, y amplificó tan solo para las muestras: M3, M5 y M8 con un *amplicón* de 999 pb (Figura 10), según el estudio de Oliveira et al. (2021) también se reportó resultados negativos con el uso de estos cebadores en poblaciones previamente identificadas como *M. incognita* por fenotipos de esterasa y patrones perineales, lo que sugiere la optimización de la PCR para la detección molecular de esta especie (Torres, 2018). El diagnóstico molecular basado en polimorfismos a través de marcadores SCAR, se usa para identificar especies comunes y económicamente importantes de *Meloidogyne*

spp. (García y Sánchez, 2012), debido a que estos marcadores amplifican fragmentos de ADN pertenecientes a una sola especie (El-Qurashi et al., 2017).

Se utilizó también los cebadores específicos para *M. arenaria* (Far/Rar) y *M. javanica* (Fjav/Rjav), pero no se amplificó ningún fragmento, según estudios previos una de las desventajas en los ensayos con las regiones SCAR es que carecen de sensibilidad para detectar cantidades bajas de ADN diana (Bhat et al., 2022; Braun y Kiewnick, 2018). En el caso de las muestras M3, M5 y M8, la ausencia de bandas corrobora la identificación de estas muestras como *Meloidogyne incognita*.

Visualización en gel de agarosa de la amplificación con los *primers* MI-F y MI-R

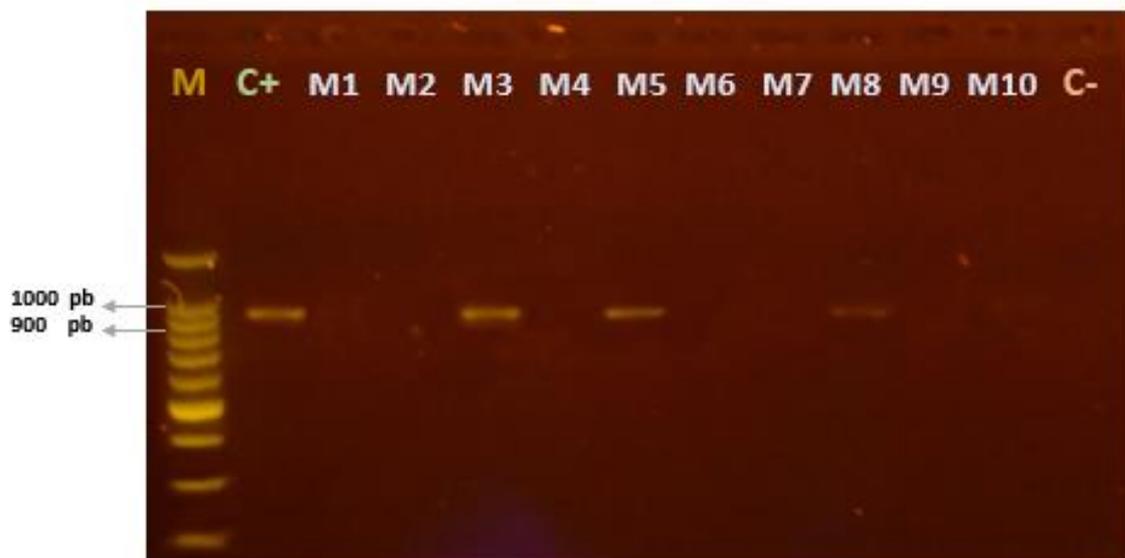


Figura 10. Resultado de PCR con los *primers* MI-R y MI-F

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR del marcador MI-F y MI-R. Donde M: Marcador molecular de peso (100bp DNA Ladder, Invitrogen®); M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 (muestras), C(+): control positivo; C(-): control negativo.

Elaborado por: Las autoras (2023)

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La presente investigación permitió cuantificar e identificar nematodos del género *Meloidogyne* spp. mediante morfometría y la técnica de PCR. En relación a los resultados se presentan las siguientes conclusiones:

- Los datos obtenidos sobre las características de longitud del cuerpo, longitud del esófago, longitud de la cola, longitud del estilete y ancho del cuerpo, permitieron confirmar que los índices a, b, c están dentro de los rangos del género *Meloidogyne* spp reportados por *Commonwealth Institute of Helminthology*.
- El tratamiento 2 presentó la mayor concentración de nematodos del género *Meloidogyne* spp. por Kg de tierra, con una media de 713 nematodos, datos que evidencian que las inoculaciones periódicas favorecen la infección y establecimiento de un banco de especímenes vivos.
- Se realizó la amplificación por PCR con *primers* universales D2A/D3B visualizando fragmentos de 950 pb para el filo Nematodo; con *primers* específicos de género 194/195 visualizando fragmentos de 700-720 pb para identificación del género y con *primers* SCAR MI-F y MI-R específico para *M. incognita* visualizando fragmentos de 999 pb.

5.2. Recomendaciones

- El enfoque morfológico y molecular deben ser utilizados en conjunto para conocer mejor la diversidad y relaciones existentes entre *Meloidogyne* spp.
- Asegurar que el inóculo presente una alta concentración de *Meloidogyne* spp. en relación con otros nematodos.
- Establecer las plantas indicadoras dentro de un invernadero para garantizar las condiciones de temperatura y humedad adecuada para la reproducción de los nematodos.
- En el proceso de extracción, se aconseja realizar un paso de purificación de ADN para eliminar las proteínas de la estructura propia de nematodo.
- Se sugiere optimizar la PCR para su amplificación con *primers* específicos correspondientes a otras especies *Meloidogyne* spp., para evitar el riesgo de falsos positivos por el uso del cebador universal, y complementar con la secuenciación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, M., Phillips, M., y Blok, V. (2007). Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56(1), 190–197. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2006.01455.X>
- Admasu-Hailu, F., y Admasu-Hailu, Y. (2019). Agro-Ecological Importance of Nematodes (Round Worms). *Acta Scientific Agriculture*, 4(1), 156–162. <https://doi.org/10.31080/ASAG.2020.04.AGRO-ECOLOGICAL-IMPORTANCE-OF-NEMATODES-ROUND-WORMS>
- Agro Bayer Ecuador. (2020, septiembre 15). *Cultivo de Tomate | Agro Bayer Ecuador*. <https://agro.bayer.ec/cultivos/tomate>
- Agro Krebs. (2020, octubre 1). *Taxonomía y morfología*. <http://bitly.ws/yUwx>
- AGROCALIDAD. (2019a). *Procedimiento específico de ensayo para extracción de nematodos de suelo por el método de método de incubación de bandejas de Whitehead*.
- AGROCALIDAD. (2019b). *Procedimientos específico de ensayo para extracción de nematodos de suelo por el método de centrifuga-flotación*.
- Aguirre, O., Chávez, C., Giraud, A., y Araya, M. (2016). Frequencies and population densities of plant-parasitic nematodes on banana (*Musa AAA*) plantations in Ecuador from 2008 to 2014. *Agronomía Colombiana*, 34(1), 61–73. <https://doi.org/10.15446/AGRON.COLOMB.V34N1.53915>
- Araya, T., Padilla, W., Archidona, A., Cantalapiedra, C., Liébanas, G., Palomares, J., y Castillo, P. (2016). Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezii* and *P. panamaensis* topotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 973–998. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0884-z>

- Artavia, R., y Peraza, W. (2020). Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne exigua* Morphological, morphometric and molecular identification of *Meloidogyne exigua* (Göeldi 1887) in coffee (*Coffea arabica*). *Agronomía Mesoamericana*, 31(3), 531–545. <https://doi.org/10.15517/am.v31i3.38733>
- Bae, C., Robbins, R., y Szalanski, A. (2010). Secondary structure models of D2-D3 expansion segments of 28S rRNA for Hoplolaiminae species. *Journal of Nematology*, 42(3), 218. <http://bitly.ws/yUw6>
- Barbary, A., Djian, C., Palloix, A., y Castagnone, P. (2015). Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in Solanaceae: From genes to the field. *Pest Management Science*, 71(12), 1591–1598. <https://doi.org/10.1002/ps.4091>
- Bardales, A. (2021). *Presencia del nematodo lesionador de raíces (Hirschmanniella oryzae) en el cultivo de arroz de regadío en el Ecuador* [Universidad Técnica De Babahoyo]. <http://bitly.ws/zoI9>
- Bertin, N., y Génard, M. (2018). Tomato quality as influenced by preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 264–276. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2018.01.056>
- Bhat, K., Mir, R., Farooq, A., Manzoor, M., Hami, A., Allie, K. W., Khan, M. N., Sayyed, R. Z., Poczai, P., Almalki, W., Zargar, S., y Shah, A. (2022). Advances in Nematode Identification: A Journey from Fundamentals to Evolutionary Aspects. *Diversity 2022*, Vol. 14, Page 536, 14(7), 536. <https://doi.org/10.3390/D14070536>
- Blok, V., Phillips, M., y Fargette, M. (1997). Comparison of Sequences from the Ribosomal DNA Intergenic Region of *Meloidogyne mayaguensis* and Other Major Tropical Root-knot Nematodes. En *Journal of Nematology* (Vol. 29, Número 1).
- Braun, A., y Kiewnick, S. (2018). Real-time PCR, a great tool for fast identification, sensitive detection and quantification of important plant-parasitic nematodes. *European Journal of*

Plant Pathology, 152(2), 271–283. <https://doi.org/10.1007/S10658-018-1487-7>/METRICS

Cagnolo, S., Carranza, F., Trimarchi, L., y Bertolotti, M. (2016). New findings of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum* (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in Córdoba, Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 18(2), 191–199. <http://bitly.ws/yUvP>

Calderón, M. (2021). *Estudio bibliográfico sobre la presencia de metales pesados plomo (Pb) y cadmio (Cd) en Solanum lycopersicum* [Universidad Central del Ecuador]. <http://bitly.ws/zoIH>

Calixto, M. (2022). *Principales nematodos fitoparásitos en el cultivo de pitahaya (Hylocereus spp.)* [Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://bitly.ws/yvmJ>

Camues, I. (2019). *Identificación de los síntomas causados por Meloidogyne sp. en el cultivo de tomate riñón (Lycopersicon esculentum Mill.) bajo invernadero y sus métodos de control en el Sector de Chaltura* [Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://bitly.ws/zoIN>

CGSIN. (2018, abril 20). *Tomate riñon*. Boletín Situacional. <https://fliphtml5.com/ijia/ipvs/basic>

Chidozie, M., Chime, A., Osas, R., y Emere, A. O. (2019). Journal of Science and Technology Effects of storage methods and duration on the microbial composition and load of tomato (*Solanum lycopersicum* [L.], Solanaceae) fruits A R T I C L E I N F O. *BITLIS EREN UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 9(1), 1–7. www.dergipark.ulakbim.gov.tr/beuscitech/

Chime, A., Aiwansoba, R., Eze, C., Osawaru, M., y Ogwu, M. (2017, septiembre). *Phenotypic characterization of tomato Solanum lycopersicum L. cultivars from Southern Nigeria using morphology*. *Malaya Journal of Biosciences*.

- Climate data. (2022). *Clima Tumbaco: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Tumbaco*. <http://bitly.ws/zoJW>
- Coyne, D., y Nicol, J. (2007). *Nematología practica: una guía de campo y laboratorio - Google Libros*. <http://bitly.ws/znTe>
- Cristina, V. (2015, noviembre). *NEMATÓIDES*. LABFITOP. <http://bitly.ws/yUuQ>
- Crozzoli, R. (2014). *La nematología agrícola en Venezuela*.
- Curay, S., Pérez, M., Vásquez, C., Mangui, C., y Telenchana, N. (2021). Biofumigación y solarización como estrategias de manejo de nematodos en tomate (*Solanum lycopersicum*). *ALFA*. <http://bitly.ws/zoKf>
- Dascón, A. (2018). *Evaluación de cinco variedades de tomate (Solanum lycopersicum L.) obtenidas usando germoplasma nativo ecuatoriano frente a dos tratamientos de control de plagas, en la provincia de Loja [Universidad del Azuay]*. <http://bitly.ws/yUuH>
- Délices, G., Leyva, O., Mota, C., Núñez, R., Gámez, R., Meza, P., y Serna, R. (2019). Biogeography of tomato *Solanum lycopersicum* var. cerasiform (*Solanaceae*) in its center of origin (South America) and domestication (Mexico). *Revista de Biología Tropical*, 67(4), 1023–1036. <https://doi.org/10.15517/RBT.V67I4.33754>
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III*.
- De-Souza, F., y Gonzaga, C. (2020). Impacto da temperatura na infectividade de *Meloidogyne incognita* em *Solanum lycopersicum* L. *Rev. PAP* , 25(1).
- Donn, S., Griffiths, B., Neilson, R., y Daniell, T. (2008). DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies. *Applied Soil Ecology*, 38(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2007.08.006>

- dos Santos, M., Almeida, M., y Costa, S. (2020). First report of *Meloidogyne naasi* parasitizing turfgrass in Portugal. *Journal of Nematology*, 52, 1–4. <https://doi.org/10.21307/JOFNEM-2020-088>
- El-Qurashi, M., El-Zawahry, A., y Abd-El-Moneem, K. (2017). *View of Morphological and molecular identification of root-knot nematodes infecting pomegranate in Assiut Governorate, Egypt*. *Revista de Fitopatología y Manejo de Plagas*. <http://bitly.ws/yQHk>
- Enríquez, W. (2015). *Identificación de nematodos fitopatógenos relacionados al cultivo de pimiento (Capsicum annuum L.) en la provincia de Imbabura– Ecuador mediante microscopía y PCR* [Universidad de las fuerzas armadas]. <http://bitly.ws/yUqf>
- Florez, A. (2021). *Control Biológico de Nemátodos Fitoparásitos en cultivos de Tomate (Solanum Lycopersicum) con Micelio de Hongos del Género Pleurotus y Hongos Micorrízicos* [Universidad El Bosque]. <http://bitly.ws/yUpX>
- Frías, G. (2021). *Empleo de microorganismos eficaces aplicados al cultivo de tomate (Solanum lycopersicum) en huertos urbanos*. [Universidad católica de Santiago de Guayaquil]. <http://bitly.ws/yUpT>
- Gamboa, E. (2019). *Identificación taxonómica y molecular de especies del nematodo lesionado de la raíz Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae) asociado a cuatro cultivos de Costa Rica* [Universidad nacional de Costa Rica]. <http://bitly.ws/yKyU>
- García, E., Pando, L., Reyes, W., Triviño, C., Hasang, E., Duran, P., y Hufana, D. (2021). Densidad de población de *Meloidogyne graminicola* en plantaciones comerciales de arroz y comportamiento de líneas avanzadas en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Rev. de la Sociedad Científica del Paraguay*, 26(1), 64–81. <https://doi.org/10.32480/RSCP.2021.26.1.64>

- García, y Sánchez, M. (2012). Characterization of a Root-Knot Nematode Population of *Meloidogyne arenaria* from Tupungato (Mendoza, Argentina). *Journal of Nematology*, 44(3), 291. <http://bitly.ws/yQEep>
- García, T., Visôto, L. E., Lopes, E. A., Oliveira, C. M. G., y God, P. I. V. G. (2018). Diagnostic methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciência Rural*, 48(2), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170449>
- Geisen, S., Snoek, L. B., ten Hooven, F. C., Duyts, H., Kostenko, O., Bloem, J., Martens, H., Quist, C. W., Helder, J. A., y van der Putten, W. H. (2018). Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6), 1366–1378. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12999>
- Gelambi, M. (2019, julio 21). *Pseudocelomados: características, reproducción y nutrición*. Lifeder. <http://bitly.ws/yUsn>
- Gillespie, J., Cannone, J., Gutell, R., y Cognato, A. (2004). A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 from rootworms and related leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae). *Insect Molecular Biology*, 13(5), 495–518. <https://doi.org/10.1111/J.0962-1075.2004.00509.X>
- Gómez, M. (2020, abril 19). *Los diferentes organismos modelo. Cap.6. Ecotoxsan*. <http://bitly.ws/yUn9>
- Guanotasig, C. (2015). *Identificación de los principales Nematodos Fitoparásitos que se encuentran presentes en cultivos de Tomate Riñón (Solanum Lycopersicum) en la provincia de Imbabura mediante microscopia y Reacción en Cadena De la polimerasa (PCR)*. Universidad de las fuerzas Armadas .
- INAMHI. (2023). *Red de estaciones meteorológicas e hidrológicas*. <http://bitly.ws/yVK6>

- INEC. (2014). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*, 23.
- INEC. (2017). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2017 Contenidos. *Inec*, 61. <http://bitly.ws/zo2C>
- Infoagro. (2018). *El cultivo del tomate*. <http://bitly.ws/yUVZ>
- Janssen, T., Karssen, G., Orlando, V., Subbotin, S. A., y Bert, W. (2017). Molecular characterization and species delimiting of plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from the penetrans group (Nematoda: Pratylenchidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117(April), 30–48. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.027>
- Jia, L., Wang, Y., Gao, F., Chen, Q., Yang, S., y Wu, H. (2022). First Report of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* infecting *Acalypha australis* in China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1063-PDN>
- Jima, J. (2012). *Prospección e identificación de nemátodos fitoparásitos de uva (Vitis vinifera) en zonas productoras del cultivo en Ecuador*.
- Jiménez, E., y Balladares, J. (2019). Aplicaciones alternas de insecticidas químicos y botánicos para el manejo de mosca blanca (*Bemisia tabaci*, Gennadius) y Geminivirus en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Tisma, Nicaragua. *Revista Científica La Calera*, 19(32), 33–40. <http://bitly.ws/zoPn>
- Jones, J., Haegeman, A., Danchin, E., y Al., E. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961.
- Katooli, N., Moghadam, E., y Aghnum, R. (2021). Identification and distribution of root-knot nematode species in pomegranate orchards of eastern Iran. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 33(2), 293–297. <https://doi.org/10.33866/phytopathol.033.02.0691>

- Khan, I. (2017). Manejo Sostenible de Plagas de Artrópodos del Tomate. *Academic Press, ISBN 97801*(doi:10.1016/b978-0-12-802441-6.06001-0).
- Khare, P., Raj, V., Chandra, S., y Agarwal, S. (2014). Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 6(2), 81. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>
- Knapp, S., y Peralta, I. (2016). The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. *Springer*, 7–21. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2
- Laboratorios Ferlabs. (2021, marzo 25). *Enfermedades y daños que pueden causar los nematodos a las plantas y campos de cultivo* . <http://bitly.ws/yUkg>
- Leiva, M. (2022). *Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de Solanum lycopersicum L. en la provincia de Tungurahua*. Universidad Técnica de Ambato .
- Lezaun, J. (2016, abril). *Nematodos Fitoparásitos* . CropLife . <https://acortar.link/RnBzeJ>
- Liang, C., y Chen, P. (2022). First Report of Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* on Poinsettia ‘Luv U Pink’ in Taiwan. *Plant Disease*, 106(6), 1764. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1899-PDN>
- López, L. (2017). Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). *INTA*, 126. <http://bitly.ws/yUjT>
- Madani, M., Ward, L., Vierstraete, A., de Boer, S., y Moens, M. (2019). The ribosomal intergenic spacer (IGS) in the potato and tobacco cyst nematodes, *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* and *G. tabacum*. *Molecular and cellular probes*, 48. <https://doi.org/10.1016/J.MCP.2019.101441>
- Marin, J. (2019). *Aislamiento e identificación molecular de hongos con potencial antagonista de huevos de nematodos patógenos de ganado ovino [Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]* . <http://bitly.ws/yUxm>

- Mendoza, D., Rodríguez, F., Cuenca, E., Rivera, R., Navarrete, B., y Cañarte, E. (2019, marzo 12). *Efecto de cuatro láminas de riego y Meloidogyne spp. sobre características agronómicas y de rendimiento de tomate de mesa Solanum lycopersicum L.* Universidad de Zulia . <http://bitly.ws/yUi7>
- Meng, Q., Long, H., y Xu, J. (2004). PCR Assays for Rapid and Sensitive Identification of Three Major Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *PHYTOPATHOLÓGICA SINICA*, 34(3), 204–210.
- Migunova, V., y Sasanelli, N. (2021). Bacteria as Biocontrol Tool against Phytoparasitic Nematodes. *Plants* , 10(2), 389. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10020389>
- Mikaeili, F., Kia, E., Sharbatkhori, M., Sharifdini, M., Jalalizand, N., Heidari, Z., Zarei, Z., Stensvold, C., y Mirhendi, H. (2013). Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from *Toxocara* and *Toxascaris* nematodes. *Experimental Parasitology*, 134(2), 155–159. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2013.02.008>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019, septiembre 9). *Agricultura, la base de la economía y la alimentación – Ministerio de Agricultura y Ganadería.* <https://www.agricultura.gob.ec/agricultura-la-base-de-la-economia-y-la-alimentacion/>
- Morales, M. (2019, agosto 15). *Nemátodos en cultivo de tomate* . Agroinsumos El Field. <http://bitly.ws/yUgc>
- Navone, G. T., Achinelly, M. F., Notarnicola, J., Zonta, M. L., y Drago, F. B. (2017). Phylum Nematoda. *Facultad de Ciencias Naturales y Museo niversidad de la Plata*, 187. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/73987>
- NEVAL. (2017, septiembre 21). *Nemátodos fitoparásitos. Endoparásitos y Ectoparásitos.* <https://acortar.link/83uCq9>

- Niu, J., Jian, H., Guo, Q., Chen, C., Wang, X., Liu, Q., y Guo, Y. (2012). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology*, 61(4), 809–819. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2011.02562.X>
- Oliveira, C., Lopes, E., Cunha, T., Visôto, L., Pinheiro, L., God, P., y Osório, J. (2021). Distribution of *Meloidogyne* species in carrot in Brazil. *Ciência Rural*, 51(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20200552>
- Orlando, V., Edwards, S., Neilson, R., Prior, T., Roberts, D., y Back, M. (2020). Comparing the efficiency of six common methods for DNA extraction from root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.). *Nematology*, 1–9. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10049>
- Peraza, W. (2021). Identificación morfológica y molecular de *Meloidogyne javanica* en una plantación de papaya (*Carica papaya* L.) en Pococí, Limón, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 45(2), 41–55. <https://doi.org/10.15517/rac.v45i2.47766>
- Perry, R., Moens, M., y Starr, J. (2009). Especies de *Meloidogyne*: un grupo diverso de parásitos vegetales nuevos e importantes. En R. Perry, M. Moens, y J. Starr (Eds.), *Cabi*. CABI. <http://bitly.ws/zoUa>
- Phani, V., Khan, M. R., y Dutta, T. K. (2021). Plant-parasitic nematodes as a potential threat to protected agriculture: Current status and management options. *Crop Protection*, 144, 105573. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2021.105573>
- Picca, C. (2022). *Fichas técnicas de plagas y enfermedades de cultivos intensivos: frutales de carozo, vid y nogal*. <http://bitly.ws/xvma>
- Pincay, D., Cedeño, J., y Espinosa, K. (2021, septiembre). Efecto del quitosano sobre el crecimiento y la productividad de *Solanum lycopersicum*. *Centro de Investigaciones Agropecuarias Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas*, 48(3), 25–31. <http://cagricola.uclv.edu.cu>

- Pineda, J. (2022). *Tomatera tipos, Planta Solanum lycopersicum características, Cultivo*. Encolombia. <http://bitly.ws/yUau>
- Pinela, J., Montoya, C., Carvalho, A. M., Martins, V., Rocha, F., Barata, A. M., Barros, L., y Ferreira, I. C. F. R. (2019). Phenolic composition and antioxidant properties of ex-situ conserved tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm. *Food Research International*, 125, 108545. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108545>
- Qin, R., Li, C., Guo, W., Huang, M., Jiang, Y., Zhu, L., Yu, Y., y Wang, C. (2022). First Report of *Meloidogyne arenaria* on *Cynanchum versicolor* Bunge in China . *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0872-PDN>
- Ramírez, F. (2015). *Caracterización taxonómica de nemátodos fitopatógenos de tomate de árbol (Solanum Betaceum C.) en las principales zonas de producción del Ecuador*. Universidad de las fuerzas armadas .
- Raupach, M., Astrin, J., Hannig, K., Peters, M., Stoeckle, M., y Wägele, J. (2010). Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Frontiers in zoology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-26>
- Ren, Z., Chen, X., Luan, M., Guo, B., y Song, Z. (2021). First report of *Meloidogyne enterolobii* on industrial hemp (*Cannabis sativa*) in China. *Plant Disease*, 105(1), 230. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1451-PDN>
- Revelo, J, et al. (2007). “Nematodo del rosario de la raíz” (*Nacobbus aberrans*) y “nematodo del nudo de la raíz” (*Meloidogyne incognita*): epidemiología, importancia y pertinencia de desarrollar un sistema de manejo integrado para optimizar su control en tomate de mesa en el valle. *Boletín Técnico No. 129.*, . *Proyecto*(129p.).

- Roberts, D., Oliveira, C., Neilson, R., y Blok, V. (2016). *Diagnose molecular de nematoides parasitos de plantas / Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes*. August, 277–320.
- Sagastume de Andrés, S. (2015). *Dinamismo evolutivo en genomas reducidos: análisis genético molecular del microsporidio “Nosema ceranae”* [Universida Complutense de Madrid]. <http://bitly.ws/yNjq>
- Saucet, S., van Ghelder, C., Abad, P., Duval, H., y Esmenjaud, D. (2016). Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. *New Phytologist*, 211(1), 41–56. <https://doi.org/10.1111/nph.13933>
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O’Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., y Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2020. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>
- Shireen, A., y Sulaiman, N. (2022, octubre 27). Diagnóstico molecular y variabilidad genética de nuevos aislados de nematodos del nudo de raíz *Meloidogyne* spp.en plantas de pepino. *Universidad de Duhok*, 238–246. <https://journal.uod.ac/index.php/uodjournal/article/view/2000/1140>
- Siddiqui, S. et al. (2018). *Siddiqui, 2018_ Tipos de alimentacion.pdf*.
- Singh, S. (2013). Integrated approach for the management of the root-knot nematode, *meloidogyne incognita*, on eggplant under field conditions. *Nematology*, 15(6), 747–757. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002715>
- Syngenta. (2020). *Principales enfermedades en tomate - Syngenta*. <http://bitly.ws/yTD5>

- Taipe, J. (2018). *Caracterización Morfológica De Las Especies De Nematodos Fitoparásitos Asociadas En El Cultivo De Tomate Riñón (Lycopersicum Esculentum Mill.) En La Provincia De Cotopaxi Cantón Salcedo*. <http://bitly.ws/yTCf>
- Talavera, M. (2004). *Manual de Nematología: Vol. I* (Consellereria). Conselleria d'Agricultura i Pesca .
https://www.researchgate.net/publication/233932604_Manual_de_Nematologia
- Tesarová, B., Zouhar, M., y Rysánek, P. (2003). *Development of PCR for specific determination of root-knot nematode Meloidogyne incognita* - *ProQuest*. Plant Protection Science.
<http://bitly.ws/yIx2>
- Torres, C. (2018). *Extracción de ADN de Meloidogyne incognita a partir de muestras de suelo para detección molecular* [Universidad nacional agraria la Molina]. <http://bitly.ws/yNpV>
- Treonis, A., Unangst, S., Kepler, R., Buyer, J., Cavigelli, M., Mirsky, S., y Maul, J. (2018). Characterization of soil nematode communities in three cropping systems through morphological and DNA metabarcoding approaches. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20366-5>
- Tsai, Y., Hsieh, W., Lu, P., Chuang, T., y Yen, J. (2020). First Report of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* Infecting *Salvia miltiorrhiza* in Taiwan. *APS*, 104(4).
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0482-PDN>
- Vásquez, S. (2021). *Alternativas Bioecológicas para el Control de Nemátodos Fitopatógenos en Tomate Rojo (Solanum Lycopersicum L.) Cultivado en Invernadero* [IPN].
<http://bitly.ws/xvLh>
- Velasco, M., Lobato, R., García, J., Castro, R., Cruz, S., y Corona, T. (2019). Injertos Interspecíficos Entre *Solanum Lycopersicum L.* y *S. Habrochaites Knapp & Spooner* Como Alternativa Para Incrementar El Rendimiento De Fruto. *Agrociencia* , 53, 1029–1042. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1861/1858>

- Vélez, S., y Guzmán, A. (2022). Identification methods for root-knot nematode *Meloidogyne*. *Manglar*, 19(2), 209–215. <https://doi.org/10.17268/manglar.2022.026>
- Vieira, P., y Gleason, C. (2019). Plant-parasitic nematode effectors insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>
- Vogt, P., Miljutina, M., y Raupach, M. (2014). The application of DNA sequence data for the identification of benthic nematodes from the North Sea. *Helgoland Marine Research*, 68(4), 549–558. <https://doi.org/10.1007/S10152-014-0411-6/FIGURES/2>
- Willmott, S., Gooch, P., Siddiqi, M., y Franklin, M. (1976). CIH descripciones de nematodos parásitos de plantas. *Commonwealth Agricultural Bureaux*, 46.
- Wishart, J., Phillips, M. S., y Blok, V. C. (2002). Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*, 92(8), 884–892. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.8.884>
- Wu, W., Ye, K., Zhou, S., Wang, Z., Guo, L. W., Zhu, S., Zhu, Y., Wang, Y., y He, X. (2021). First Report of *Meloidogyne arenaria* Infecting Maidong (*Ophiopogon japonicus*) in China. *Plant Disease*, 105(12), 847. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0584-PDN/SUPPL_FILE/PDIS-03-21-0584-PDN_SF1.PDF
- Ye, W., Robbins, R. T., y Kirkpatrick, T. (2019). Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Arkansas, USA. *Scientific Reports*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52118-4>
- Zhang, P., Shao, H., You, C., Feng, Y., y Xie, Z. (2020). Characterization of root-knot nematodes infecting mulberry in Southern China. *Journal of Nematology*, 52(1). <https://doi.org/10.21307/JOFNEM-2020-004>

Zijlstra, C., Donkers, D., y Fargette, M. (2000). Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. Javanica* and *M. Arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2(8), 847–853. <https://doi.org/10.1163/156854100750112798>

7. ANEXOS

Anexo 1

Carta compromiso



GUILLERMO LASSO
PRESIDENTE



Nro. 003

CARTA COMPROMISO PARA LA REALIZACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN ENTRE LA "UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA" Y LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO.

Concurren a la celebración del presente Carta Compromiso, por una parte, AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO - AGROCALIDAD., representada legalmente por Ing. Patricio Almeida Granja, a quien en adelante se le denominará "LA AGENCIA" y, por otra parte, la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, representada por María Sol Villagómez, PhD. en su calidad de Vicerrectora de la Sede Quito y la Dra. Ana Reino Molina, en calidad de Procuradora, quienes en adelante se le denominará LA UNIVERSIDAD. Las partes libre y voluntariamente convienen en celebrar el presente Carta Compromiso interinstitucional con sujeción a las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES. -

1. El artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior determina que: Todas las instituciones de educación superior estarán obligadas a entregar los trabajos de titulación que se elaboren para la obtención de títulos académicos de grado y posgrado en formato digital para ser integradas al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. El artículo 6 de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, publicada en el Registro Oficial Suplemento 27 de 3 de julio de 2017, establece: *"La Autoridad Agraria Nacional ejerce las competencias en materia de sanidad agropecuaria y es la responsable de prevenir, preservar, mejorar y fortalecer el estatus fito y zoonosanitario de los vegetales, animales y productos agropecuarios en el territorio nacional. Tendrá a su cargo la formulación, implementación y ejecución de las políticas nacionales de sanidad agropecuaria y ejercerá las competencias establecidas en esta Ley."*
3. El artículo 12 de la Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, publicada en el Registro Oficial Suplemento 27 de 3 de julio de 2017, establece: *"Créase la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario entidad técnica de derecho público, con personería jurídica, autonomía administrativa y financiera, desconcentrada, con sede en la ciudad de Quito y competencia nacional, adscrita a la Autoridad Agraria Nacional."*

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



Continúa

A esta Agencia le corresponde la regulación y control de la sanidad y bienestar animal, sanidad vegetal y la inocuidad de los alimentos en la producción primaria, con la finalidad de mantener y mejorar el estatus fito y zoonosanitario de la producción agropecuaria (...);

4. El numeral 2.4. del Estatuto Orgánico de Gestión Organizacional por Procesos de Agrocalidad establece como misión de la Gestión General de Laboratorios: *“Gestionar estratégicamente el proceso de análisis y diagnóstico de muestras, para la detección oportuna de enfermedades veterinarias, plagas, contaminantes en productos agropecuarios; y, verificar la calidad de sus insumos.”*
5. La Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador creada mediante Ley N° 63, publicada en el Registro Oficial N° 499 de 5 de agosto del 1994, es una Institución de Educación Superior particular, católica. Es una persona jurídica de derecho privado, con finalidad social, sin fines de lucro.

Su Sede Matriz y domicilio principal se halla en la ciudad de Cuenca, con sedes en las ciudades de Quito y Guayaquil, y con una extensión en el cantón Cayambe dependiente académico y administrativamente, de la Sede Quito.

Entre otros, su fin es formar personas con madurez humana que sepan hacer coherentemente la síntesis de ética, vida y cultura, para que actúen en la historia en la línea de la justicia, solidaridad y fraternidad, testimoniando los valores éticos más altos del ser humano.

6. Con la resolución No. 161-SE-33-CACES-2020 el CACES acreditó a la UPS por el período de cinco años y de esta forma se ratifica el compromiso con la comunidad universitaria a nivel nacional y dentro de las redes académicas a nivel internacional.
7. Mediante Directorio de la Agencia de Regulación de Control Fito y Zoonosanitario, en sesión extraordinaria llevada a efecto el 16 de mayo de 2022; se resolvió designar al señor Mgs. Wilson Patricio Almeida Granja como Director Ejecutivo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario.
8. El artículo 1 de la Resolución Nro. S-Ext-010-16-05-22 de 16 de mayo de 2022, se resolvió: “Designar al señor Mgs. Wilson Patricio Almeida Granja, como Director Ejecutivo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario.”

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

SEGUNDA. OBJETO. –

La presente carta compromiso, que tiene por objeto establecer mecanismos necesarios, oportunos y ágiles para que las estudiantes Sara Madeline Ayala Hidalgo con C.I 1720915766, y Melany Dayanara Hernández Morán con C.I 0401908306 previo a la obtención de su título de Ingenieras en Biotecnología, desarrollen su trabajo de titulación científica: Cuantificación e Identificación morfológica y molecular de nemátodos del género *Meloidogyne spp.* en plantas de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) cuyo tutor es MSc. Ramiro Daniel Acurio Vasconez, previo a la obtención de su título de grado, con el fin de fortalecer el aprendizaje de las estudiantes, aportar resultados, conclusiones y recomendaciones que constituyan un aporte.

TERCERA. RESPONSABILIDADES. -

3.1. Responsabilidades de la Agencia:

- 3.1.1.** Brindar las facilidades necesarias durante la ejecución de la investigación conforme a un cronograma de actividades.
- 3.1.2.** Designar un Tutor de la Investigación con quien el Tutor o docente guía, designado por la Universidad, coordinará el monitoreo y avances de la misma.
- 3.1.3.** Proporcionar a las estudiantes la guía, asesoramiento e información que necesite para llevar a cabo las actividades de la investigación.
- 3.1.4.** Poner a disposición de las estudiantes bajo la dirección del tutor guía con respecto a equipos y materiales que se necesiten para llevar a cabo las actividades de la investigación.
- 3.1.5.** Proveer (de ser el caso) de equipo y prendas de seguridad a las estudiantes.
- 3.1.6.** Asignar (de ser el caso) un técnico o responsable de departamento que guíe y oriente las actividades de las estudiantes.

3.2. Responsabilidad de la Universidad Politécnica Salesiana:

- 3.2.1.** Autorizar y asignar a las estudiantes Sara Madeline Ayala Hidalgo y Melany Dayanara Hernández Morán realicen su investigación en la Agencia, a quienes brindarán las facilidades para la realización de la misma.
- 3.2.2.** Reconocer como Cotutor del trabajo de investigación al técnico responsable en la AGENCIA quien monitoreará y evaluará los avances de la investigación de las estudiantes, en conjunto o coordinación con la contraparte docente de la Universidad Politécnica Salesiana.

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

- 3.2.3. La U.P.S. se compromete, conforme a su propio reglamento de proyectos de titulación, a hacer un seguimiento de cada uno de los estudiantes.
- 3.2.4. Para la realización de cada proyecto se establecerá una propuesta del proyecto bajo el formato SENPLADES avalado y aprobado por el tutor asignado y por el Consejo de Carrera por cada alumno, en el cual se regularán las relaciones entre la Agencia y el alumno, de conformidad a los requerimientos institucionales.
- 3.2.5. Al finalizar el plazo del presente documento, el administrador del Carta Compromiso deberá entregar un informe de las actividades realizadas con la institución contra parte.
- 3.2.6. Todos los proyectos de grado enmarcados bajo este Carta Compromiso deberán determinar los derechos de autor establecidos en la Ley de Propiedad Intelectual, según se registra en el anexo A, adjunto a este Carta Compromiso.

CUARTA. PLAZO. -

La presente Carta de Compromiso tendrá vigencia por el lapso de doce meses, desde la firma de esta carta de compromiso por los representantes de las entidades.

QUINTA. COORDINACIÓN DE LA CARTA COMPROMISO. -

LA AGENCIA designará un Coordinador del convenio, funcionario que tendrá la obligación de velar por el cabal y oportuno cumplimiento de todas y cada una de las obligaciones derivadas del mismo. El coordinador de la Carta Compromiso deberá realizar el seguimiento, control y supervisión del mismo, para tales efectos la Agencia cruzará el debido oficio comunicando el responsable encargado de la coordinación.

La Universidad Politécnica Salesiana a través de la carrera de BIOTECNOLOGÍA designará al responsable de la Carta Compromiso, persona con quien LA AGENCIA mantendrá contacto para ejecutar adecuadamente la Carta Compromiso, para tales efectos el coordinador designado será el Msc Ramiro Daniel Acurio Vásquez

SEXTA: FINANCIAMIENTO. -

La presente Carta Compromiso de carácter general no implica, por sí solo, compromisos presupuestarios para ninguna de las partes.



Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



República
del Ecuador



SÉPTIMA: TERMINACIÓN. -

La Carta de Compromiso termina por:

- 7.1. En incumplimiento del objeto y plazo establecida para la realización del trabajo de titulación.
- 7.2. Por mutuo acuerdo de las partes
- 7.3. Decisión unilateral de LA AGENCIA previo informe de la causa motivadora, en los casos que el estudiante incurra en faltas repetidas de asistencia y/o impuntualidad no justificadas o falta de cumplimiento de las actividades planificadas.
- 7.4. Decisión unilateral de la Universidad Politécnica Salesiana, para el caso de incumplimiento por parte de la institución, respecto de las cláusulas de la presente Carta de Compromiso o del plan de actividades del estudiante planificadas para realizar la investigación.

OCTAVA. PROPIEDAD INTELECTUAL Y CONFIDENCIALIDAD. -

Los derechos de propiedad intelectual (DPI) de los resultados de la investigación, informes u otros documentos relativos a la misma serán atribuidos a LA AGENCIA y la Universidad. LA AGENCIA y/o la Universidad podrán publicar, difundir, reproducir y distribuir dichos resultados e informes solo después de la aprobación de cada una de las partes y con el apropiado reconocimiento a las contribuciones de LA AGENCIA y la Universidad.

La Información Confidencial, así como los materiales de investigaciones utilizados, no podrán bajo ninguna circunstancia ser relevada a terceros, excepto que existiere autorización expresa y por escrito de la parte propietaria de la Información Confidencial, ni podrán realizar las Partes, actos de disposición sobre la misma, sea con fines comerciales o científicos, con la excepción de las autorizaciones expresamente previstas en el presente artículo.

Las Partes se obligan a sí mismos a comprometer al personal que tuviera acceso a la Información Confidencial, a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial, asumiendo en forma personal quien así obrare, la responsabilidad civil y/o penal que le fuera aplicable. A fin de dar cumplimiento a lo anterior, los profesionales y/o el personal técnico y/o asistentes que deban intervenir total o parcialmente de las tareas relacionadas con la investigación objeto del presente, deberán suscribir Acuerdos de Confidencialidad.

NOVENA. DOMICILIO. -

Para todos los efectos previstos en esta carta compromiso, las comunicaciones serán dirigidas por escrito, bastando en cada caso, que el remitente tenga la correspondiente constancia de que su comunicación ha sido recibida en las direcciones de la otra parte. Para estos efectos, las partes fijan las siguientes direcciones:

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



GUILLERMO LASSO
PRESIDENTE



LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO:

Provincia: Pichincha
Ciudad: Quito;
Dirección: Av. Eloy Alfaro y Amazonas, Edif. MAG, Piso 7 y/o Av. Interoceánica Km 141/2 y Eloy Alfaro. Sector la Granja – Tumbaco
Teléfono: (02) 3828860
Correo Electrónico: direccion@agrocalidad.gob.ec

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA:

MSc. Ramiro Daniel Acurio Vásconez
Docente de la Carrera de Biotecnología
Domicilio: UPS Quito
Dirección: Av. 12 de octubre 2422 y presidente Wilson
Teléfono: 0995949522
Correo electrónico: racurio@ups.edu.ec

Cualquier cambio de dirección deberá ser notificado por escrito a las otras Partes para que surta sus efectos legales; de lo contrario tendrán validez los avisos efectuados a las direcciones antes indicadas.

DÉCIMA. CONTROVERSIAS. -

En caso de controversias entre las partes contratantes, derivadas de la aplicación o interpretación del presente Convenio, se intentará lograr un acuerdo directo entre las mismas y será resuelto por sus representantes legales o a quienes ellos deleguen para el efecto, acuerdo que deberá constar por escrito.

De no ser posible llegar a un acuerdo directo entre las partes suscriptoras del Convenio se someterán a acudir al Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado, con la particularidad que su proceso estará sujeto a la Ley de Arbitraje y Mediación y al Reglamento de Funcionamiento del Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado.

DÉCIMA PRIMERA. DOCUMENTOS HABILITANTES. -

Se adjuntan los documentos habilitantes que acreditan la calidad de los comparecientes y su capacidad para celebrar el convenio.

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



República
del Ecuador

DÉCIMA SEGUNDA. ACEPTACIÓN Y RATIFICACIÓN. -

Las partes suscriptoras de la presente Carta Compromiso, aceptan y ratifican las cláusulas que anteceden y para constancia de lo estipulado firman el presente instrumento en cuatro ejemplares de igual tenor y valor, en la ciudad de Quito, 27 de septiembre del 2022.

POR: LA AGENCIA

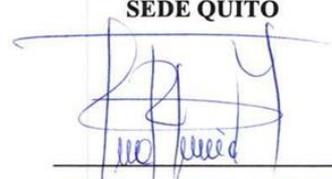


Ing. Patricio Almeida Granja
DIRECTOR EJECUTIVO
AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL FITO Y
ZOOSANITARIO

POR: LA UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA SALESIANA



María Sol Villagómez Ph.D.
VICERRECTORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA
SEDE QUITO



Dra. Ana Reino Molina
PROCURADORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA

Gestionado por:	Dr. Paco Noriega	26-07-2022
Realizado por:	Psic. Cristina Gaibor	06-09-2022
Revisado por:	Mgr. Nancy Bastidas	06-09-2022

Aprobación de Sede:	María Sol Villagómez R. Ph.D.	06-09-2022
Revisión Legal:	Procuraduría	06-09-2022

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



(Handwritten mark)

ANEXO A

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras Sara Madeline Ayala Hidalgo con C.I 1720915766 y Melany Dayanara Hernández Morán con C.I 0401908306 por medio del presente documento manifiesto y expreso mi voluntad de ceder a la Universidad Politécnica Salesiana, los derechos consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, especialmente los contenidos en los artículos 4, 5 y 6, 20, ello en virtud de que soy autor del trabajo de grado denominado: “Cuantificación e Identificación morfométrica y molecular de nemátodos del género *Meloidogyne spp.* en plantas de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*)”, que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Universidad Politécnica Salesiana.

Dado en Quito, al 27 de septiembre de 2022



.....

Nombre: Sara Madeline Ayala Hidalgo
Cédula: 1720915766
Fecha: 27/09/2022



.....

Nombre: Melany Dayanara Hernández Morán
Cédula: 0401908306
Fecha: 27/09/2022

FIN DEL ANEXO

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170518 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec



República
del Ecuador



Anexo 2

Medidas (μm) de los distintos parámetros registrados de Tratamiento 1 (tierra contaminada + *I* inóculo) sobre *Meloidogyne spp.*

Juvenil <i>Meloidogyne spp.</i>								
Medidas de referencia Morfometría bibliográfica para <i>Meloidogyne spp.</i> según C.I.H y Enríquez, 2015								
	Longitud total cuerpo (um) (L)	Ancho del cuerpo (um)	Largo estilete (um)	Longitud cola (um)	Esófago (um)	a (longitud del cuerpo/diámetro mayor del cuerpo)(um)	b (longitud del cuerpo/longitud del esófago) (um)	c(longitud del cuerpo/longitud de la cola)(um)
	271,01 - 496,68	13,12 - 15,15	10,32 - 13,93	26,74 - 55,39	72,06 - 108,87	22.63 - 31,68	3,18 - 5,37	6,28 - 12,91
Testigo 1	300,58	14,9	12,98	40,1	84,36	20,17	3,56	7,50
Testigo 2	279,54	13,64	13,24	41,35	85,67	20,49	3,26	6,76
Testigo 3	325,81	14,23	13,78	45,67	92,6	22,90	3,52	7,13
Testigo 4	345,63	14,68	13,57	53,08	93,1	23,54	3,71	6,51
Testigo 5	403,72	13,23	13,28	44,81	89,03	30,52	4,53	9,01
Testigo 6	364,24	14,98	12,89	40,78	84,35	24,32	4,32	8,93
Testigo 7	386,45	15,05	13,45	49,27	89,08	25,68	4,34	7,84
Testigo 8	390,05	14,24	12,93	51,2	92,45	27,39	4,22	7,62
Testigo 9	410,06	14,34	13,66	46,36	96,34	28,60	4,26	8,85
Testigo 10	375,83	13,87	13,91	41,79	92,31	27,10	4,07	8,99

Fuente: Las autoras (2023)

Anexo 3

Medidas (μm) de los distintos parámetros registrados del Tratamiento 2 (Tierra contaminada + 3 inóculos) sobre *Meloidogyne* spp.

Juvenil <i>Meloidogyne</i> spp.								
Medidas de referencia Morfometría bibliográfica para <i>Meloidogyne</i> spp. según C.I.H, 1976 y Enríquez, 2015								
	Longitud total cuerpo (um) (L)	Ancho del cuerpo (um)	Largo estilete (um)	Longitud cola (um)	Esófago (um)	a (longitud del cuerpo/diámetro mayor del cuerpo)(um)	b (longitud del cuerpo/longitud de la faringe) (um)	c(longitud del cuerpo/longitud de la cola)(um)
	271,01 - 496,68	13,12 - 15,15	10,32 - 13,93	26,74 - 55,39	72,06 - 108,87	22.63 - 31,68	3,18 - 5,37	6,28 - 12,91
M1	300,5	14,8	12,7	44,3	85,4	20,30	3,52	6,78
M2	387,98	13,55	13,23	42,89	96,75	28,63	4,01	9,05
M3	397,64	14,51	13,67	45,78	97,32	27,40	4,09	8,69
M4	389,51	13,89	12,86	52,45	102,73	28,04	3,79	7,43
M5	402,76	13,45	13,53	50,35	86,34	29,94	4,66	8,00
M6	376,8	15,09	13,29	45,89	89,65	24,97	4,20	8,21
M7	324,76	15,06	13,67	47,27	94,22	21,56	3,45	6,87
M8	346,71	14,04	13,47	48,11	93,1	24,69	3,72	7,21
M9	380,22	14,42	13,42	50,04	96,04	26,37	3,96	7,60
M10	396,29	13,89	12,77	53,07	94,31	28,53	4,20	7,47

Fuente: Las autoras (2023)

Anexo 4

Medidas (μm) de los distintos parámetros registrados del Tratamiento 3 (Tierra estéril +1 Inóculo) sobre *Meloidogyne* spp.

Juvenil <i>Meloidogyne</i> spp.								
Medidas de referencia Morfometría bibliográfica para <i>Meloidogyne</i> spp. según C.I.H,1976 y Enríquez, 2015								
	Longitud total cuerpo (um) (L)	Ancho del cuerpo (um)	Largo estilete (um)	Longitud cola (um)	Esófago (um)	a (longitud del cuerpo/diámetro mayor del cuerpo)(um)	b (longitud del cuerpo/longitud de la faringe) (um)	c(longitud del cuerpo/longitud de la cola)(um)
	271,01 - 496,68	13,12 - 15,15	10,32 - 13,93	26,74 - 55,39	72,06 - 108,87	22.63 - 31,68	3,18 - 5,37	6,28 - 12,91
C+ 1	300,5	13,76	12,7	43,08	95,4	21,84	3,15	6,98
C+ 2	423,67	15,03	13,56	46,57	84,23	28,19	5,03	9,10
C+ 3	397,11	14,63	13,48	49,41	78,51	27,14	5,06	8,04
C+ 4	396,45	13,27	13,86	53,67	89,45	29,88	4,43	7,39
C+ 5	386,87	13,59	13,5	47,25	99,24	28,47	3,90	8,19
C+ 6	394,53	14,67	13,87	52,84	85,44	26,89	4,62	7,47
C+ 7	410,23	14,32	13,24	47,83	84,9	28,65	4,83	8,58
C+ 8	378,92	14,8	12,88	45,73	82,46	25,60	4,60	8,29
C+ 9	385,06	14,96	13,06	46,67	96,34	25,74	4,00	8,25
C+ 10	394,78	14,45	13,7	42,4	91,64	27,32	4,31	9,31

Fuente: Las autoras (2023)

Anexo 5

Raíces de Solanum lycopersicum después de 120 días



Notas: raíces que presentan agallas

Fuente: Las autoras (2023)