PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación del potencial nematicida y nematostático *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* (Agaricales: Pleurotaceae) sobre larvas J2 de *Globodera pallida* (Tylenchida: Heteroderidae)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

MARÍA BELÉN ARTEAGA PAREDES

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura de Ciencias Biológicas de la Srta. María Belén Arteaga Paredes ha sido concluida en conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente**.**

María Eugenia Ordoñez, PhD
Directora de la Disertación
Quito, 14 de febrero de 2018

DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanos por su apoyo constante

A mis amigos, únicos e incondicionales

A mi amor, Nelson

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, a mis hermanos y a mis cuñadas, por brindarme las herramientas para alcanzar mis metas. A Nelson, por ser mi apoyo y sustento durante todo este proceso.

Agradecimientos al Doctor Carlos Soria, por ser mi guía y por permitirme llevar a cabo este proyecto en su laboratorio. A la Doctora María Eugenia Ordoñez por tomar este proyecto bajo su dirección cuando yo más lo necesitaba. A mis lectores MSc Álvaro Barragán y Doctor Oscar Pérez por todo el apoyo que me han brindado. De igual manera quiero agradecer a Katerine Orbe y a Pablo Llumiquinga, integrantes del Departamento Nacional de Protección Vegetal (INIAP); a los integrantes del Laboratorio de Bioquímica 112, especialmente a David y Katherine; y a toda la gente en de la Sala de Preparaciones, por ayudarme desinteresadamente a lo largo de este proyecto.

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por su financiamiento para realizar el proyecto según fondos de investigación N13394 asignados al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 1

2. ABSTRACT 2

3. INTRODUCCIÓN 3

3.1. OBJETIVOS 8

3.1.1. OBJETIVO GENERAL 8

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8

4. MATERIALES Y MÉTODOS 9

4.1. OBTENCIÓN DE QUISTES DE *Globodera pallida* 9

4.2. OBTENCIÓN DE LARVAS FILIFORMES J2 DE *Globodera pallida* MEDIANTE SU EXPOSICIÓN A EXTRACTO DE RAÍZ DE PAPA 9

4.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE LARVAS J2 DE *Globodera pallida* 10

4.3.1 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICO DE LAS HIFAS *Pleurotus ostreatus* SOBRE LARVAS J2 DE *Globodera pallida* 10

4.3.2 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICO DEL FILTRADO DEL CALDO DE CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE LARVAS J2 DE *Globodera pallida* 11

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 13

5. RESULTADOS 14

5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICA DE HIFAS DE *Pleurotus ostreatus* 14

5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICA DE FILTRADOS DEL CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* 15

5.3 COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA NEMATOSTÁTICA DE HIFAS Y FILTRADOS DEL CALDO DE CULTIVO D*E Pleurotus ostreatus*..... 16

6. DISCUSIÓN..... 17

6.1. HIFAS DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*USADO COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Globodera pallida*..... 17

6.2. FILTRADOS DEL CALDO DE CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* USADO COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Globodera pallida*..... 19

6.3 DIFERENCIAS ENTRE LA ACTICIDAD NEMATICIDA Y NEMATOSTATICA DEL MICELIO FRENTE AL FILTRADO DE *Pleurotus ostreatus*..... 21

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 23

8. FIGURAS..... 29

9. TABLAS..... 35

10. ANEXOS..... 43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hifas especializadas de *Pleurotus ostreatus* atrapan y digieren juveniles J2 de *Globodera pallida*.. 29
Figura 2. Efecto nematicida de hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición. 30
Figura 3 Efecto nematostático de hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición.. 31
Figura 4 Efecto de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*... 32
Figura 5. Efecto nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición. 33
Figura 6. Efecto nematostático de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición..... 34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Registro de mortalidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a hifas de *Pleurotus ostreatus.* 35

Tabla 2. Registro de inmovilidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a hifas de *Pleurotus ostreatus*……..……35

Tabla 3. ANOVA de resultados de la actividad nematicida de hifas de *Pleurotus ostreatus* 36

Tabla 4. ANOVA de resultados de la actividad nematostática de hifas de *Pleurotus ostreatus*. 37

Tabla 5. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematicida de hifas de *Pleurotus ostreatus* ……..38

Tabla 6. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematostática de hifas de *Pleurotus ostreatus* 38

Tabla 7. Registro de mortalidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a diferentes tiempos y concentraciones del filtrado de caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*…….....38

Tabla 8. Registro de inmovilidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a diferentes tiempos y concentraciones del filtrado de caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*.....…..39

Tabla 9. ANOVA de resultados de la actividad nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*…….…….39

Tabla 10. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* ……..40

Tabla 11. ANOVA de resultados de la actividad nematostática de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* ……..……...40

Tabla 12. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematostática de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*……...…41

Tabla 13. Prueba de t de student entre los tratamientos 24 horas concentración 100% filtrados y 24 horas hifas de *Pleurotus ostreatus*……...42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Larva juvenil (J2) de *Globodera pallida*……...…...43
Anexo 2. Cuerpos fructíferos del hongo ostra *Pleurotus ostreatus*……..…44

1. RESUMEN

La papa es un alimento muy consumido en Ecuador, sobre todo en la sierra donde constituye la base alimentaria de la región. *Globodera pallida* es un nemátodo que genera pérdidas de hasta el 30% en el rendimiento de este cultivo. El objetivo de este estudio fue determinar el potencial nematicida y nematostático *in vitro* del micelio y el filtrado del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*, un nemátodo que genera pérdidas de hasta el 30% en el rendimiento del cultivo de papa en Ecuador. Quistes de *G. pallida* fueron expuestos a extracto de raíz de papa para liberar larvas J2. La actividad nematicida y nematostática del filtrado del caldo de cultivo de *P. ostreatus* se estudió en variables de tiempo (8, 12 y 24 h) y a cuatro diferentes concentraciones (0, 50, 75 y 100%). Se colocaron 2 ml del filtrado de *P. ostreatus* en cada una de sus concentraciones, conjuntamente con 1ml de solución con 25 nemátodos/ml, en placas de cultivo Costar de seis pocillos; se realizaron seis repeticiones. En cuanto a la actividad de las hifas, el micelio fue aislado en agar agua y una vez colonizado, se inoculó 1 ml de solución con 25 nemátodos/ml y se realizaron observaciones a las 24, 48 y 72 horas; se realizaron 6 repeticiones. El resultado del efecto del filtrado fue analizado con un diseño completamente al azar en arreglo factorial 4x3, e indicó que el porcentaje de mortalidad fue directamente proporcional a la concentración del filtrado y al tiempo de exposición, siendo más efectiva la combinación de factores de 100% -24 h, con una tasa de mortalidad del 41.6%. Para la actividad nematostática se observó que no existió relación entre el porcentaje de J2 inmóviles, el tiempo de exposición y la concentración del filtrado; sin embargo, el tratamiento 100%-8h fue el que exhibió mayor porcentaje de nemátodos inmóviles (65,2%). El resultado de las hifas fue analizado con un ANOVA de una vía y se observó un mayor porcentaje de nemátodos inmóviles (34%) a las 24 horas de exposición. En cuanto a la actividad nematicida, el tratamiento más efectivo fue el de 72 horas con una mortalidad del 80.3%. Mediante la prueba de t se determinó que hay diferencias significativas entre los tratamientos hifas y filtrados concentración 100% de *P. ostreatus* a las 24 horas de exposición; situando a este último como el tratamiento con mayor toxicidad frente a *G. pallida*, con una media de nemátodos muertos de 10.67 y un porcentaje de mortalidad del 41,6%.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus, Globodera pallida,* control biológico, nemátodos fitoparásitos

2. ABSTRACT

The potato is widely consumed in Ecuador, especially in the highlands where it is the staple food of the region. *Globodera pallida* is a nematode that generates losses of up to 30% in Ecuadorian potato crops.The aim of this study was to determine the *in vitro* nematocidal and nematostatic potential of mycelium and the culture broth filtrate of *Pleurotus ostreatus* on *Globodera pallida* J2 larvae, a nematode that cuases the loss of up to 30% of potato crops in Ecuador. Nematode cysts were exposed to potato root extract to release J2 larvae. The nematicidal and nematostatic activity of the broth culture filtrate of *P. ostreatus* was studied at different time intervals (8, 12 and 24 h) and at four different concentrations (0, 50, 75 and 100%). Two milliliters of filtrate were taken from each concentration and 1 ml of solution with 25 nematodes/ml were added together into a 6-well Costar culture plate. Six repetitions were performed. Similarly, for the hyphal activity, mycelium was isolated on water agar and observed at different time intervals (24, 48, and 72 h). Once the plate was colonized by mycelium, 1 ml solution of 25 nematodes/ml was added. Six repetitions were done. The results from the experiments were analyzed using a completely randomized design in a 4x3 factorial arrangement. For the nematicidal activity, the results showed that the percentage of mortality was directly related to the concentration of the filtrate and the time of exposure. A 100% concentration of the broth culture filtrate and 24 h of exposure was most effective, with a 41.6% mortality rate. The nematostatic activity showed no relationship between the percentage of immobile J2, the exposure time, and the concentration of the filtrate. Nonetheless, 8 h exposure of a 100% concentration showed the greatest percentage of immobile nematodes (65.2%). The hyphal activity was analyzed with one-way ANOVA and it evidenced a greater percentage of immobilized nematodes (34%) after 24 hours of exposure. The mortality rate of the nematicidal activity was 80.3% after 72 hours of exposure. A t-test determined significant differences between *P. ostreatus* hyphal treatments and 100% broth culture filtrates when exposed for 24 hours, demonstrating the latter as the most toxic against *G. pallida* with an average of 10.67 dead nematodes and a 41.6% mortality.

Key words: *Pleurotus ostreatus, Globodera pallida*, biological control, plant nematodes

3. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) afirma que la papa es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo, ocupa el cuarto lugar en la producción de alimentos, después del trigo, el maíz y el arroz (Meyhuay, 2001). Sin embargo, en comparación con estos tres alimentos, la papa tiene aproximadamente cinco veces mayor rendimiento por hectárea. La producción anual se estima cerca de 300 millones de toneladas. No obstante, si existiría una forma efectiva de controlar a los patógenos que causan enfermedades a este cultivo, la producción podría superar las 400 millones de toneladas. Datos recientes revelan que más del 10% de la producción mundial de papa se reduce cada año debido a la infestación por nemátodos fitoparásitos (Lopez Torres, 2013).

En Ecuador, la papa es un cultivo con gran importancia social, cultural y económica; especialmente en la Sierra, pues constituye la base de la alimentación de la población de esta región (MAGAP, 2013), con un consumo anual per cápita que fluctúa según las ciudades: 122 kg en Quito, 80 kg en Cuenca y 50 kg en Guayaquil (Pumisacho y Sherwood, 2002). En una encuesta realizada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2015), se estimó que el área sembrada de papa en el territorio nacional fue de 32 037 ha, lo que genera una producción de 397 521 Tm de tubérculos (Pumisacho y Sherwood, 2002). En cuanto al empleo, se considera que su producción incorpora a 88 130 productores y que más de 250 000 personas están relacionadas directa o indirectamente con su cultivo (Lopez Torres, 2013).

Los nemátodos están entre los microrganismos multicelulares más abundantes en la Tierra y pueden alcanzar densidades de hasta 10 millones de individuos/m3 en el suelo. Los nemátodos parásitos de las plantas son uno de los problemas fitosanitarios más importantes, dado que los daños que causan a los cultivos son superiores a los de las bacterias y virus. Esto se debe a su amplia distribución y a su capacidad de atacar a una gran variedad de plantas cultivadas (Huang, Zhang, Yu, y Li, 2015). La subfamilia Heteroderinae está compuesta por 17 géneros, pero las pérdidas en el rendimiento de cultivos con importancia económica son causadas casi exclusivamente por las especies pertenecientes a los géneros *Globodera* y *Heterodera;* mejor conocidos como nemátodos

fitoparásitos formadores de quistes. Ambos géneros tienen una amplia distribución en el planeta y se diferencian por la forma que presentan sus hembras; donde las hembras de *Heterodera* tienen forma de limón y las de *Globodera* son esféricas (Weischer y Brown, 2000).

Globodera pallida causa una reducción en el desarrollo de las raíces, la producción de tubérculos y el crecimiento de las plantas (Evans y Stone, 1977). En el Ecuador genera pérdidas de hasta el 30% en el rendimiento del cultivo (Revelo, 2003). Se encuentra en la mayoría de zonas paperas, con mayor infestación en la zona central de la sierra (Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo). Los principaleshospederos reportados en Ecuador son la hierba mora (*Solanum nigrum*) y la papa (*Solanum tuberosum*), incluyendo a todas sus variedades nativas y mejoradas (Pumisacho y Sherwood, 2002). Sin embargo, existen otros hospederos de la familia Solanaceae como el tomate y la berenjena (Smith, McNamara, Scott, y Holderness, 2009). Este nemátodo es categorizado como un endoparásito sedentario y presenta un notable dimorfismo sexual. Las hembras se hinchan hasta poder atravesar la cutícula de la raíz y quedan expuestas al suelo; los machos veriformes fertilizan a las hembras y mueren. La hembra permanece cerca de la raíz aun cuando los huevos han sido fertilizados, pero luego de cuatro a seis semanas, cuando completa su maduración, muere y su membrana externa se endurece volviéndose la cobertura o quiste que protege a los huevos. Cada quiste puede contener más de 400 huevos, de los cuales, hasta el 80% eclosionan en presencia de una planta huésped. Las larvas en segundo estadio (J2) eclosionan desde el huevo, buscan una nueva raíz para invadir y comenzar de nuevo el ciclo (Smith *et al*., 2009)

El control de nemátodos en los cultivos es más complicado que el de otras plagas, dado a que éstos habitan en el suelo y atacan a las porciones subterráneas de las plantas. La aplicación de productos químicos es el método más comúnmente usado, debido a su eficacia, rápido efecto y facilidad de uso, a pesar de que estos son considerados compuestos tóxicos (Huang *et al.*, 2015). Además, se conoce que los químicos de acción sistémica no son absorbidos o transportados por un sistema radical dañado, consecuencia de la infección por nemátodos, y que estos productos solo reducen las poblaciones de manera provisional, lo que obliga al agricultor a realizar varias aplicaciones (Sierra, 2014). Es por esto que el interés científico se ha centrado en el desarrollo de alternativas más amigables con el medio ambiente y con la salud de las personas. El control biológico,

aprovechando la interacción entre organismos antagonistas de los nemátodos y sus huéspedes, representa una alternativa al uso de controles químicos (Huang *et al.*, 2015).

Existe una amplia diversidad de microorganismos antagonistas de nemátodos en el medio natural. Estos microorganismos incluyen hongos, bacterias y virus. Algunas de estas especies de hongos nematófagos son parásitos obligatorios, pero la mayoría son saprófitos (Lopez-Llorca, Maciá-Vicente, y Jansson, 2008). Bajo estrés nutritivo, los hongos, usan estrategias para consumir alimentos distintos a los que consumen en condiciones óptimas (Dighton *et al*., 2017). Esto sucede con múltiples grupos, incluyendo a Ascomycota, Zygomycota, Chytridiomycota y Basidiomycota, este último, el filo donde se encuentra el género *Pleurotus.* Estos hongos, pueden colonizar y degradar bacterias u otros microorganismos como nemátodos y copépodos para tener acceso a los nutrientes que contienen, notablemente carbón y nitrógeno (Fermor y Wood, 1981).

Los hongos nematófagos se distribuyen en todas las regiones del mundo, se los puede encontrar en suelos agrícolas, forestales y hasta en jardines (Cardoso y Nahas, 2015). Dependiendo de su mecanismo de ataque contra los nemátodos, los hongos nematófagos se dividen en cuatro grupos: hongos predatorios, endoparásitos, oportunistas y productores de toxinas. Este cuarto grupo de hongos nematófagos se caracteriza por la habilidad de producir metabolitos de bajo peso molecular, que resultan tóxicos para los nemátodos. Generalmente, estos hongos inmovilizan a los nemátodos a través de sus toxinas para que luego sus hifas penetren la cutícula. Cerca de 270 especies de hongos productores de toxinas han sido reportadas y pertenecen principalmente al filo Basidiomycota (por ejemplo, el orden *Pleurotus* y *Coprinus*) (Huang *et al*., 2015).. Una misma cepa de hongo puede tener más de un mecanismo de acción, pero con cualquiera de estos mecanismos, el nemátodo resulta digerido, suministrando al hongo nutrientes y energía para su crecimiento (Reza y Zare, 2012).

El género *Pleurotus* pertenece al phylum Basidiomycetes, orden Agaricales, familia Pleurotaceae y consta de aproximadamente 39 especies. Este género forma parte del grupo de hongos comestibles más populares y es conocido como hongo ostra en la mayoría de países. Además de ser comestibles, estos hongos son conocidos por ser potentes agentes biológicos, tener una gran cantidad de propiedades medicinales, enzimas y productos metabólicos con amplio potencial de uso en la industria (Chang y Miles,

2004). En un estudio realizado por Barron y Thorn, (1986), se encontró que *P. ostreatus* produce hifas vegetativas que generan gotas de potentes toxinas. Al hacer contacto con éstas, los nemátodos quedan inactivos rápidamente, para luego ser colonizados y digeridos por el hongo. Luego, (Kwok, Plattner, Weisleder, y Wicklow(1992) logró aislar esta toxina y la identificó como ácido trans-2-decenodioico, sin embargo, reportan que la capacidad nematicida de estas toxinas y la expresión de los síntomas en los nemátodos, varía acorde a la cepa y especie de hongo, al igual que del tiempo de exposición (Heydari, Pourjam, y Mohammadi Goltapeh, 2006).

En estos últimos años, las investigaciones sobre el posible uso de hongos para el control de nemátodos fitoparásitos se han centrado no solo en el uso de sus hifas, sino también en el estudio de los filtrados obtenidos a partir de su cultivo en caldo, dado a la gran cantidad de toxinas y potenciales fármacos que se encuentran entre los metabolitos fúngicos (Regaieg, Ciancio, Raouani, Grasso, y Rosso, 2010). Estos metabolitos, incluyen más de 200 moléculas bioactivas con actividad nematicida. Se ha reportado que 23 especies del género *Pleurotus* presentan esta actividad (Li y Zhang, 2014). Entre los metabolitos con efectos nematicidas presentes en este género están: proteasas, compuestos peptídicos, terpenos, ácidos grasos, alcaloides, (Guohong Li *et al*., 2007), taninos y carbohidratos (Ganeshpurkar, Bhadoriya, Pardhi, y Rai, 2012). Estos metabolitos han mostrados actividad particularmente contra nematodos de importancia médica (Ganeshpurkar *et al.*, 2012), agrícola y pecuaria (Aguilar Marcelino, Sánchez, y Mendoza de Gives, 2017). Como, por ejemplo, (Palizi, Goltapeh, Pourjam, y Safaie, 2009) confirmó la habilidad que tienen las especies *P. ostreatus, P. sajor-caju, P. florida, P. flabellatus, P. eryngii* e *Hypsizygus ulmarius* de infectar y depredar al nemátodo formador de quistes, *Heterodera schachtii*, evaluando tanto el efecto que tiene el micelio, como el de los filtrados del cultivo en caldo, sobre la viabilidad de esta especie hermana de *G. pallida.*

Los hongos nematófagos, incluyendo al género *Pleurotus,* pueden parasitar directamente a los nemátodos a través de sus hifas, y/o secretar metabolitos y enzimas con efectos que comprometen su viabilidad en una o más etapas. Sin embargo, debido a la gran variedad de climas y tipos del suelo, existe todavía una amplia gama de especies, tanto de hongos como de nemátodos, cuyas interacciones hasta ahora permanecen

inexploradas (Regaieg *et al.*, 2010). La búsqueda de nuevas cepas fúngicas como fuente de nematicidas biológicos es un objetivo importante para aquellos que buscan reducir el daño económico causado por nemátodos fitoparásitos (Dong *et al.*, 2004), como es *G. pallida*. Por lo tanto, dada la necesidad de contar con una estrategia de manejo integrado de plagas que sea amigable con la agricultura sostenible y con la salud humana, esta investigación propone realizar una evaluación *in vitro* de la actividad nematicida y nematostática de *P. ostreatus* sobre larvas J2 de *G. pallida.* Además, pretende incentivar la investigación en el área de la micología en el Ecuador, y promover la ejecución de experimentos sobre nuevas especies fúngicas que puedan presentar potencial en la industria, medicina y agronomía.

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial nematicida y nematostático *in vitro* de *P. ostreatus* sobre larvas J2 de *G. pallida*.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar *in vitro* el efecto nematicida y nematostático del micelio de *P. ostreatus* sobre las larvas J2 de *G. pallida*.

Evaluar *in vitro* el efecto nematicida y nematostático del filtrado del caldo de cultivo de *P. ostreatus* sobre las larvas J2 de *G. pallida*.

Establecer si existen diferencias significativas entre la actividad nematicida y nematostática del micelio frente a la del filtrado de *P. ostreatus*, sobre larvas J2 de *G. pallida*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN DE QUISTES DE *Globodera pallida*

Las muestras de suelo fueron tomadas de una parcela de plantación de papa en floración dentro de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Quito, Ecuador. Se recolectaron pedazos de raíces, en especial raíces secundarias, simultáneamente con la tierra que se hallaba a su alrededor y se colocaron en bolsas plásticas para transportarlas a las instalaciones del laboratorio de nematología, Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV).

Se obtuvieron a los nemátodos de *G. pallida* en forma de quistes, siguiendo el método de extracción con Elutriador de Fenwick descrito por Van Bezooijen (2006). Para esto, primero se secaron las muestras de tierra y se dividieron en porciones de 200 g, después se llenó el tanque del equipo con agua y se colocó la muestra sobre el tamiz del embudo superior; se procedió a lavar con la ducha de agua hasta que todo el suelo pase a través del tamiz del embudo. Una vez que los quistes empezaron a flotar en el tanque, poco a poco empezaron a desplazarse por el collar del aparato, donde fueron recolectados en un tamiz de 500 µm. Posteriormente se lavó el material colectado en este tamiz usando un chorro suave de agua y se colocó el contenido en un embudo con papel filtro. Se trasladó el contenido a un matraz volumétrico y se aforó con etanol al 96%. Los quistes flotantes fueron nuevamente colocados en papel filtro y una vez identificados, se colocaron uno por uno en una caja Petri para su almacenamiento a 4 °C.

4.2. OBTENCIÓN DE LARVAS FILIFORMES J2 DE *Globodera pallida* MEDIANTE SU EXPOSICIÓN A EXTRACTO DE RAÍZ DE PAPA

Para obtener el extracto de raíz de papa, se sembraron brotes de tubérculos de variedades de papa INIAP-Gabriela y Leona Negra de aproximadamente 2 cm de largo y se los dejo crecer durante una semana a 19-22 ºC, en macetas de plástico de 13 cm con tierra esterilizada a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos en autoclave. El extracto se obtuvo mediante la saturación del suelo en las macetas con agua destilada. El líquido obtenido fue recirculado tres veces para obtener una solución con mayor concentración y

luego se filtró para eliminar las partículas del suelo. Se almacenó el extracto en refrigeración a 4 °C para su futuro uso (Farrer y Phillips, 1983). Se recogió dicha solución de raíz de papa semanalmente durante cuatro semanas.

Los quistes fueron expuestos al extracto de raíz de papa obtenido anteriormente para que los huevos de nemátodos puedan eclosionar en larvas J2. Esto se consiguió siguiendo la metodología descrita por Arntzen, Visser, y Hoogendoorn, (1993) donde, inicialmente los quistes fueron colocados en microtubos de cristal de 0,6 ml llenos de agua de grifo durante una semana, posteriormente, fueron situados en pocillos cilíndricos de plástico de 1,5 cm de diámetro, los cuales poseen una red con un diámetro de poro < 0,2 mm en uno de los extremos, por donde los nemátodos juveniles puedan pasar una vez que eclosionen. Se colocaron 25 quistes por pocillo, con un total de 18 pocillos. A continuación, los pocillos cilíndricos fueron ubicados en placas de tinción de vidrio de 12 cavidades, conteniendo 1 ml de extracto de papa por cavidad. Todos los pocillos con quistes fueron mantenidos en total oscuridad en una incubadora a 20 °C. Las soluciones de extracto se renovaron tres veces por semana y se aislaron juveniles J2 de *G. pallida* con cada renovación. Los J2 fueron usados inmediatamente para realizar las evaluaciones de la actividad nematicida y nematostática o fueron preservados a 4 °C para su futuro uso (Forrest y Farrer, 1983).

4.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE LARVAS J2 DE *Globodera pallida*

4.3.1 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICO DE LAS HIFAS *Pleurotus ostreatus* SOBRE LARVAS J2 DE *Globodera pallida*

La capacidad nematicida y nematostática, química y mecánica de las hifas de *P. ostreatus* se evaluó transfiriendo un disco de 5 mm de diámetro del hongo previamente reactivado en medio con agar extracto de malta (MEA), al centro de placas de cultivo celular Costar de seis pocillos conteniendo agar agua (Palizi *et al*., 2009), el cual sirvió de sustrato para los nemátodos y para los hongos. Este medio está compuesto por seis

gramos de agar agar diluido en 300 mL de agua destilada. Las cajas se trasladaron a una incubadora a 27 ºC durante cinco días (Sierra, 2014).

Después del periodo de incubación del hongo, se observó la formación de una fina capa de micelio desde el inoculo a través del agar adyacente. Entonces, una cantidad de 25 juveniles activos (J2) de *G. pallida*, previamente esterilizados en una solución de estreptomicina al 5%, fueron colocados en 1 ml de agua destilada estéril con el propósito de realizar una suspensión acuosa (Heydari *et al*., 2006). Dichas soluciones con nemátodos fueron colocadas en las placas de agar agua, próximas a las hifas del hongo. Se realizaron observaciones después de 24, 48 y 72 horas, por medio de un estereomicroscopio. El efecto nematicida se estimó realizando el conteo del número de nemátodos inmóviles que estén rodeados por hifas del hongo, los cuales fueron considerados como nemátodos muertos. De igual forma, se evaluó el efecto nematostático del micelio del hongo, al contar el número de nemátodos que no hayan sido rodeados por hifas, pero que, al mismo tiempo, a pesar de haberlos estimulado con la punta de un pincel, no presenten movimiento propio y presenten una forma corporal sagita (Soto-Barrientos *et a*l., 2011)

Para la variable actividad nematicida, se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad de cada uno de los tratamientos (24, 42 y 72 horas) utilizando la fórmula de Abbott (1987):

$$Mortality\ (\%) = \frac{X - Y}{X}\ 100$$

Donde X= porcentaje de supervivientes en el control y Y= porcentaje de supervivientes en el grupo tratado.

4.3.2 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICO DEL FILTRADO DEL CALDO DE CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE LARVAS J2 DE *Globodera pallida*

La especie de hongo evaluada en este experimento fue una cepa obtenida de la casa comercial IntiWasi número IW7. Se activó dicha cepa desde tubos crioviales hacia

medio de cultivo MEA. Las cajas Petri con el medio fueron inoculadas y colocadas en una incubadora a 27 °C por siete días.

Para la obtención de los filtrados puros del hongo *P. ostreatus*, se utilizó caldo de cultivo Sabouraud (esterilizado en autoclave a 121° C y 15 psi de presión durante 30 min) preparado en frascos de tapa rosca de 250 ml. Se inoculó el caldo con un disco de agar MEA de 5 mm de diámetro, colonizado con micelio del hongo, y se procedió a incubarlos durante siete días a 27 ºC. Se agitó el medio constantemente con el fin de evitar la formación de agrupaciones grandes de micelio, al igual que para desplazar los metabolitos secundarios. Luego, se eliminó la biomasa del hongo utilizando papel filtro Macherey-Nagel No. 41 y seguidamente filtros de membrana TISCH de porosidad 0,22µm (Reyes, Pineda, Sanabria, y Gil, 2006). Se agregó una solución de 1% de antibiótico-antimicótico Gibco® (10,000 unidades/mL penicilina, 10,000 µg/mL estreptomicina, and 25 µg/mL de anfotericina B) al filtrado (Nayar, Crowder, y Knight, 1991), para finalmente realizar diluciones de dicho filtrado en proporciones ½, ¾ y 1/1 (v/v) (Meyer *et al*., 2004).

El ensayo se llevó a cabo en placas de cultivo celular Costar de seis pocillos, en donde se colocaron 2 ml del filtrado de *P. ostreatus* en cada una de sus concentraciones, y 1 ml de suspensión de nemátodos en agua destilada, conteniendo 25 nemátodos/ml (Reyes *et al.*, 2006) previamente esterilizados en una solución de estreptomicina al 5% (Heydari *et al*., 2006). Las placas se mantuvieron dentro de una incubadora a 19-20 °C. El efecto de los filtrados de cultivo fúngico sobre la viabilidad de los nemátodos se determinó después de ocho, 12 y 24 horas. El efecto nematicida se estimó según el número de nemátodos muertos, calculado por medio del uso del indicador químico 1% NaOH, en donde los J2 que cambien su forma corporal de recta a curva o en forma de gancho durante tres minutos de exposición, son considerados nemátodos vivos, mientras que aquellos que no respondan a la adición de la solución de NaOH se consideraron muertos. Además, se evaluó el efecto nematostático de los filtrados al contar el número de nemátodos que antes de adicionar la solución de NaOH presenten una forma corporal recta, a pesar de haberlos estimulado con la punta de un pincel (Chen, Dickson, y Mitchell, 2000). Los controles estuvieron compuestos de 2 ml de caldo de cultivo Sabouraud, junto con 25 nemátodos (J2) de *G. pallida* por repetición. Se realizaron seis repeticiones de cada ensayo.

Además, en cuanto a la actividad nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus*, se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad de cada uno de los tratamientos utilizando la fórmula de Abbott, (1987) antes mencionada.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comparó el número de nemátodos muertos (actividad nematicida) y el número de nemátodos inmóviles (actividad nematostática) de las hifas de *P. ostreatus* a través del tiempo (24, 48 y 72 h) mediante un ANOVA I (Análisis de la Varianza de una vía) con el el software IBM SPSS Statistics 23. De igual forma, para comparar los resultados del número de nemátodos muertos (actividad nematicida) y el número de nemátodos inmóviles (actividad nematostática) del filtrado del caldo de cultivo de *P. ostreatus* a través del tiempo (8, 12 y 24 h) en cuatro diferentes concentraciones (0, 50, 75 y 100%), se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial 4x3. Finalmente, la comparación del número de nemátodos muertos entre el tratamiento 24 horas hifas y el tratamiento 24 horas concentración 100% filtrado, se realizó utilizando una prueba de t.

Se realizó una prueba de significación (Post Hoc) HSD Tukey cuando se encontró significación estadística. Esta prueba se realizó a niveles de significación de α=0.05 y α=0.01. Se calculó el coeficiente de variación con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sqrt{CMe}}{Y} \times 100$$

CV: Coeficiente de variación

CMe: Cuadrados medios del Error Experimental

Y: Media Global

5. RESULTADOS

5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICA DE HIFAS DE *Pleurotus ostreatus*

Se observó un crecimiento direccionado de las hifas de *P. ostreatus* a las 24 horas de exposición hacia donde se encontraban los nemátodos, y la posterior penetración por sus orificios corporales (Fig. 1A-C). Se observó la presencia de secreciones en forma de gotas en los extremos de las hifas de *P. ostreatus*, aunque con menor frecuencia en las hifas jóvenes (Fig. 1B- Flecha blanca). Los nemátodos que se encontraban en la periferia donde solo existían hifas jóvenes no sufrieron afecciones, mientras que los nemátodos que se encontraban en el centro de la caja Petri, donde las hifas eran más viejas, quedaron paralizados minutos después de entrar en contacto con las gotas de secresiones anteriormente mencionadas. La mayoría de nemátodos fueron inmovilizados a las 24 horas de exposición. A partir de las 48 horas, existía una gran cantidad de larvas (53,7%) que ya estaban colonizadas por el hongo, y habían sido penetradas especialmente por los orificios anterior y posterior. Finalmente, a las 72 horas la gran mayoría de larvas (80,3%) se encontraban totalmente cubiertas por micelio y algunas veces solo se pudieron observar los restos de sus cuerpos, ya que habían sido digeridas por el hongo.

Los resultados de los bioensayos utilizando hifas de *P. ostreatus* se presentan en las tablas 1 y 2. La tabla 1 muestra la media y los porcentajes de mortalidad de los tratamientos de la variable actividad nematicida, donde el tratamiento 72 horas es el que presenta el mayor porcentaje de mortalidad (80,3%) (Fig. 2). La tabla 2 muestra la media y los porcentajes de larvas J2 inmóviles para los tratamientos de la variable actividad nematostática, donde el tratamiento 24 horas es el que presenta el mayor porcentaje de nemátodos inmóviles (34%) (Fig. 3). El ANOVA (tabla 3 y 4) indica que existen diferencias altamente significativas, para ambas variables, entre los tratamientos 24, 48, 72 horas y control. Debido a esta significancia estadística, se realizó un análisis post hoc de Tukey (tabla 5 y 6) para ambas variables. Para la variable actividad nematostática se encontró una diferencia significativa entre el tratamiento 24 horas y el resto de los tratamientos; de igual manera, para la variable actividad nematicida existe diferencia significativa entre el tratamiento 72 horas y el resto de tratamientos.

5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y NEMATOSTÁTICA DE FILTRADOS DEL CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus*

Se observó que los filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus*, en todas sus concentraciones, exhibieron un efecto nematicida y nematostático en las larvas J2 de *G. pallida*. Se encontró que al adicionar 1% NaOH al medio, los nemátodos que se encontraban paralizados (Fig. 4A) retomaban la movilidad, mientras que los nemátodos muertos continuaban teniendo una forma corporal recta (Fig. 4B-C). Además, el porcentaje de mortalidad fue directamente proporcional a la concentración del filtrado y al tiempo de exposición, siendo el tratamiento 100%-24h el que presentó mayor toxicidad (41,6%) (tabla 7) (Fig. 5). En cuanto a la actividad nematostática, se observó que no existe relación entre el porcentaje de J2 inmóviles, el tiempo de exposición y la concentración del filtrado; sin embargo, el tratamiento 100%-8h fue el que exhibió mayor porcentaje de nemátodos inmóviles (65,2%) (tabla 8) (Fig. 6).

Al comparar la actividad nematicida de los filtrados de *P. ostreatus* en sus cuatro diferentes concentraciones a tres diferentes tiempos por medio del ANOVA (tabla 9), se encontraron diferencias altamente significativas en el número de nemátodos muertos. Sin embargo, la prueba post hoc de Tukey (tabla 10) muestra que no existen diferencias entre la concentración 75% y 100%, al igual que en el tiempo de exposición 12 y 24h. Por otro lado, para la variable actividad nematostática, se encontraron diferencias altamente significativas en el número de nemátodos inmóviles, a excepción del tiempo de exposición (tabla 11), por lo que la prueba post hoc de Tukey muestra que no existen diferencias entre los tres tiempos de exposición estudiados (tabla 12). De igual forma, a pesar de que el ANOVA muestra diferencias significativas entre concentraciones y entre la agrupación concentración – tiempo (tabla 11), la prueba post hoc de Tukey muestra que no existen diferencias entre la concentración 50 y 100% (tabla 12).

No se consiguió determinar la Concentración Letal Media (CL50) de los filtrados de *P. ostreatus*, debido a que ninguna de las concentraciones estudiadas logró alcanzar una mortalidad mayor al 50% de larvas J2 de *G. pallida*.

5.3 COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA NEMATOSTÁTICA DE HIFAS Y FILTRADOS DEL CALDO DE CULTIVO D*E Pleurotus ostreatus*

Por medio de la prueba de t realizada entre el tratamiento 24 horas hifas de *P. ostreatus* y el tratamiento 24 horas concentración 100% filtrado del caldo de cultivo de *P. ostreatus*, se determinó que existe una diferencia significativa entre la media de ambos tratamientos, dado que P = 0,001 y por tanto < 0,05; siendo el tratamiento 24 horas concentración 100% filtrado (media 10,67) el que presenta una mayor toxicidad contra *G. pallida* (tabla 13).

En todos los casos, el CV fue menor al 30%, por lo que todas las pruebas realizadas fueron consideradas válidas.

6. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en esta investigación soportan la hipótesis de que *P. ostreatus*, tanto hifas como filtrados del caldo de cultivo, presentan actividad nematicida y nematostática contra juveniles J2 de *G. pallida* obtenidos de campos de papa encontrados en la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP).

Contrario a lo que se creía anteriormente, los hongos cultivados en medio liquido presentan metabolitos con actividad no solo nematostática, sino también nematicida. Se cree que exotoxinas secretadas hacia el medio son responsables de este efecto, por lo que se considera que se necesitan realizar más estudios sobre los filtrados de caldos de cultivo con el fin de aislar sus componentes nematicidas.

6.1. HIFAS DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* USADO COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Globodera pallida*

En este estudio, desde la primera observación (24 horas), se identificó la presencia de pequeñas gotas en los extremos de las hifas de *P. ostreatus*. Se notó que estas secreciones fueron más frecuentes en los extremos de hifas encontradas en las porciones más antiguas del micelio; Barron y Thorn (1986) también observaron la presencia de gotas, las cuales las identificaron como toxinas, que fueron secretadas por *P. ostreatus* en presencia de nemátodos de la familia Rhabditidae. Llamaron a esta toxina ostreatin y se mantuvo con este nombre hasta que algunos años después Kwok *et al*. (1992) lograron aislar esta toxina y se la identificó como ácido trans-2-decenodioico. Dado que en el presente estudio se observó la presencia de estas secreciones por las hifas de *P. ostreatus* en presencia de *G. pallida*, y se dió la muerta de las larvas, se corrobora su acción nematicida.

Las observaciones indicaron que hubo crecimiento de las hifas de *P. ostreatus* hacia las larvas de nemátodos. Barron y Thorn (1986) confirman en su estudio el crecimiento direccional de las hifas hacia donde los nemátodos se encontraban ubicados, y Kwok *et al*. (1992) explican que esto sucede debido a que la infestación de los nemátodos inicia por un proceso llamado quimiotaxis. Los autores mostraron que cuando los nemátodos estuvieron en contacto con la toxina, sufrieron parálisis y consecuentemente la lisis de su cutícula. En ese momento los nemátodos continuaban vivos, aunque se mantuvieron paralizados y los

contenidos intracelulares expuestos en el exterior estimularon el crecimiento de hifas en dirección a ellos, con mayor frecuencia hacia la boca del nemátodo. Se cree que las hifas pueden penetrar la cutícula del gusano mediante la secreción de enzimas proteolíticas (Lopez-Llorca *et al*., 2008).

Para la variable actividad nematicida de las hifas, se encontró una relación directa entre el tiempo de exposición con el hongo y el porcentaje de mortalidad de *Globodera*, es decir, a mayor tiempo de exposición aumenta el número de nemátodos muertos. El tratamiento 72 horas presenta un porcentaje de mortalidad del 80,3%, mientras que el tratamiento 24 horas presenta un 14,2% de mortalidad, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Barron y Thorn (1986), Heydari *et al.* (2006), y Palizi *et al.* (2009). Sin embargo, estos autores obtuvieron mayores porcentajes de mortalidad a los descritos en este estudio, con un menor tiempo de exposición. Esto pudo haber ocurrido debido a que existen variaciones en la producción de toxinas entre diferentes cepas de hongo (Heydari *et al.*, 2006). Por ejemplo, Palizi *et al.* (2009) reportaron un 96% de mortalidad en larvas de *Heterodera schanchtii* a las 24 horas de exposición con hifas de *P. ostreatus.* Además, en este estudio se evaluó una especie diferente de nemátodo fitoparásito, por lo que es posible que la susceptibilidad que este tiene a la toxina de *P. ostreatus* sea distinta. De modo similar, Khan Kim (2007), encontraron que el extracto del crudo de *P. ostreatus* fue más efectivo a la mayor concentración (400 ppm), alcanzando mortalidad en el 77% de nemátodos.

En cuanto a la variable actividad nematostática, se encontró una relación inversa entre el tiempo de exposición y el número de nemátodos inmóviles (Fig. 3). El tratamiento con mayor número de nemátodos inmóviles fue el de 24h, por lo que se cree que la mayoría de nemátodos fueron inmovilizados hasta las 24 horas de exposición (34%), y luego este porcentaje se fue reduciendo debido a que las hifas iniciaron el proceso de colonización y digestión. Algunos autores afirman que la inmovilización de los nemátodos ocurre minutos después de su exposición con las toxinas de las hifas de *P. ostreatus* (Thorn y Barron, 1984; Barron y Thorn, 1986; Palizi *et al.* 2009), sin embargo, la producción de toxinas por parte de las hifas del hongo no ocurre inmediatamente después de tener contacto con los nemátodos. El proceso de paralización puede durar aproximadamente 6 horas (Satou, Kaneko, Li, y Koike, 2008) y el de infección ocurre entre las 24 a 48 horas de exposición (Heydari *et al*., 2006). Además, el tiempo necesario para iniciar la colonización del

nemátodo depende de la distancia que las hifas tuvieron que crecer para llegar a su huésped (Barron y Thorn, 1986).

6.2. FILTRADOS DEL CALDO DE CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* USADO COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Globodera pallida*

En la presente investigación el mejor tratamiento para la actividad nematicida fue la concentración del filtrado de 100% - 24 horas, con una tasa de mortalidad del 41,6%. Se considera que esta actividad es baja, ya que pesar de haber utilizado el filtrado del caldo de cultivo puro, no se logró fulminar ni a la mitad de los nemátodos expuestos, por lo que no fue posible calcular una concentración letal media. Se recomienda que en futuras investigaciones se prolongue el tiempo de exposición.

Investigaciones que examinan la actividad nematicida de los filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus*, como la realizada porHeydari *et al.* (2006), y Palizi *et al.* (2009), mostraron tasas de mortalidad en larvas (J2) de *Meloidogyne javanica* y *H. schanchtii*, del 100% y el 97% respectivamente, a las 24 horas de exposición. Estos porcentajes son mucho mayores a los encontrados en esta investigación; pero dado que en los estudios realizados por los autores antes mencionados, la determinación de la viabilidad de las larvas se daba por medio de su motilidad, es decir, aquellos juveniles que no se movían después de haberlos estimulado con una aguja eran considerados muertos, es posible que algunos nemátodos que solamente estaban paralizados pudieron haber sido considerados como muertos. Por esta razón, en la presente investigación se utilizó NaOH como método de determinación de la viabilidad de larvas J2 de *G. pallida.* Se considera que esta es una técnica fácil y rápida para determinar con mayor certeza los efectos de los filtrados de caldo de cultivo sobre la viabilidad de los nemátodos. Se observó que los nemátodos que estaban inmovilizados, reaccionaban al cambio en el pH del medio alterando su forma corporal de recta a curva o en forma de gancho. Chen *et al.* (2000) observaron que solo individuos vivos de juveniles J2 de *H. glycines*, una vez en contacto con NaOH, cambian su forma corporal de recta a curva en un máximo de tres minutos. Estos resultados concuerdan con los observados en nuestra investigación, donde solo los nemátodos que continuaron presentando una forma corporal recta después de adicionar NaOH, fueron considerados muertos. Xiang y Lawrence (2016) explican que esta reacción se genera debido al aumento en el pH por el número de hidrógenos que se produce al agregar una base al medio. Esto desencadena la activación de

bombas de transporte activo encontradas en los órganos quimiorreceptores de nemátodos fitoparásitos como *M. incognita* y *H. glycines.*

Como se mencionó anteriormente, se observó que *P. ostreatus* tiene la capacidad de secretar toxinas en forma de gotas que inmovilizan larvas del nemátodo *G. pallida*. Esta toxina, que se asume es el ácido trans-2-decenodioico, es reconocida como la principal sustancia secretada por esta especie (Lopez-Llorca *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados de esta investigación nos dan indicios de que posiblemente no es la única, ya que esta toxina tiene la capacidad de inmovilizar a las larvas, pero la muerte ocurre una vez que las hifas invaden el interior del nemátodo (Kwok *et al*., 1992); nuestros filtrados del caldo de cultivo que demostraron una clara actividad nematicida no contenían hifas.

Genier *et al*. (2015) mostraron la presencia de otro tipo de enzimas extracelulares secretadas por el micelio de *P. ostreatus*. Por medio de un zigmograma, los autores probaron la presencia de varios tipos de proteasas en los filtrados del caldo de cultivo de este hongo, y comprobaron la actividad nematicida sometiendo a larvas (J2) de *Panagrellus sp*. a dichas sustancias. Por medio de esta técnica lograron obtener un porcentaje de mortalidad del 42% en 24 horas de exposición. Dado que en nuestro estudio se documentó una tasa de mortalidad del 41,6% en el tratamiento concentración 100%-24 horas, se considera que estas mismas proteasas pudieron ser las responsables de la muerte de las larvas (J2) de *G. pallida* evaluadas. Aunque estas proteasas no han sido descritas hasta la actualidad, existen otros estudios que documentan la presencia de metabolitos secundarios de especies del género *Pleurotus* con actividad nematicida. Como por ejemplo el ácido graso ácido S-cariolico, que fue aislado de un extracto de *P. pulmonarius* y probó tener actividad nematicida contra *Caenorhabditis elegans* (Koitabashi, Kajitani, y Hirashima, 2004). En una publicación más reciente, *P. ferulae* mostró actividad sobre el fitoparásito de la madera de pino *Bursaphelenchus xylophilus* y dos compuestos nematicidas, cheimonofilon y 5- hidroximetil - furan arbaldehido, fueron descritos (Guohong Li *et al*., 2007).

El análisis estadístico de la actividad nematostática de filtrados de *P. ostreatus* no mostró una relación significativa entre el porcentaje de J2 inmóviles y el tiempo de exposición; sin embargo, el tratamiento 100%-8h fue el que mostró mayor actividad, ya que exhibió un porcentaje de nemátodos inmóviles del 65,2%. Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad nematicida de hifas, también mostraron el mayor porcentaje de

nemátodos inmóviles (34%) en la primera observación (24 horas). Esto sugiere entonces, que el efecto nematostático de los metabolitos secundarios de *P. ostreatus* tienen un pico de exposición a las 8 horas y se mantiene durante las primeras 24 horas de exposición. De igual forma, es posible que haya existido variación en el efecto nematicida y nematostático de este hongo debido a que la producción de toxinas por parte de los hongos en medio líquido está influenciada por un número de factores como el tipo de medio de cultivo, la cantidad de oxígeno que entra al medio y el pH (Regaieg *et al.*, 2010).

6.3 DIFERENCIAS ENTRE LA ACTICIDAD NEMATICIDA Y NEMATOSTATICA DEL MICELIO FRENTE AL FILTRADO DE *Pleurotus ostreatus*

Al comparar la actividad nematicida y nematostática del micelio y del filtrado del cultivo de *P. ostreatus* en un mismo tiempo de exposición a larvas J2 de *G. pallida*, es evidente que el tratamiento filtrado del caldo de cultivo concentración 100%-24 horas fue el más efectivo. Esto fue corroborado por los análisis estadísticos y por la comparación de los porcentajes de mortalidad de ambos tratamientos, en donde el tratamiento filtrados 100%-24h obtuvo un porcentaje de 41,6% mientras que el tratamiento hifas obtuvo un porcentaje 14,2%. De igual forma, la concentración más baja utilizada en esta investigación 50%, también obtuvo un porcentaje de mortalidad mayor al de hifas (26,5%).

El desarrollo práctico de métodos de control biológico para nemátodos fitoparásitos ha dependido del uso de agentes microbianos . Durante varios años, se han considerado a los hongos como potenciales agentes de control, pero su importancia en la agricultura aún no está clara (Khan y Kim, 2007). Sin embargo, investigaciones como la realizada por Palizi *et al.* (2009) , muestra que el subproducto del cultivo de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*, utilizado en una proporción de 200 g de subproducto por cada 3 kg de tierra, puede reducir significativamente el número de quistes de *H. schachtii* en plantas de remolacha. Además, observaron que el número promedio de huevos por quiste en las plantas tratadas (1000) fue menor que el de las plantas control (21750). Al ser *G. pallida* y *H. schachtii* fitoparásitos formadores de quistes, es posible que el uso del subproducto del cultivo de *P. ostreatus*, también genere una reducción en el numero de quistes por gramo de suelo de *G pallida* en plantas de papa. No obstante, se conoce que los efectos que ocasiona el hongo en los nemátodos dependen también del medio de crecimiento del hongo. En medios pobres como

el agar agua, los nemátodos son parasitados rápidamente, pero en medios ricos como el PDA son paralizados en menor porcentaje y no son invadidos por sus hifas. Esto sugiere que cuando hay suficientes nutrientes disponibles para el hongo, no hay cambios ni en su estrategia nutricional ni en su metabolismo (Truong *et al.*, 2007; Balaes y Tanase, 2016).

Es por esto que, el uso del filtrado del caldo de cultivo de *P. ostraetus* también se considera un método efectivo de control, ya que en la presente investigación se logró comprobar la existencia de enzimas, producto del metabolismo de *P. ostreatus*, que no solo tienen propiedades nematostáticas, sino también nematicidas frente a *G. pallida*. Sin embargo, autores como (Whipps, 1987) consideran que se debe tener cuidado al aplicar los resultados de las investigaciones *in vitro* al campo, debido a que el efecto de los metabolitos puede cambiar una vez que estos interactúen con otras moléculas encontradas en el suelo. Por tanto, dado a que estos resultados obtenidos *in vitro*, pueden ser diferentes cuando se los aplica al cultivo, se sugiere que se realicen pruebas de control con micelio y con filtrados de caldo de cultivo en invernadero antes de utilizar este método de control en el campo.

Finalmente, a pesar de que se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no se logró encontrar un estudio en el que se utilicen hifas y filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus* en el control de larvas J2 de *G. pallida*, por lo que se considera a este, como el primer reporte.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, W. (1987). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 302–303. https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a.

Aguilar Marcelino, L., Sánchez, J., y Mendoza de Gives, P. (2017). Uso biotecnológico de productos obtenidos a partir de Pleurotus spp. en el control de nemátodos parásitos de importancia pecuaria. In *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp* (pp. 297–309).

Arntzen, F. K., Visser, J. H. M., y Hoogendoorn, J. (1993). Hatching of Globodera pallida juveniles by diffusate of potato genotypes, differing in tolerance to G. pallida. *Annals of Applied Biology*, *123*(1), 83–91. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04075.x

Balaes, T., y Tanase, C. (2016). Basidiomycetes as Potential Biocontrol Agents against Nematodes. *Romanian Biotechnological*, *21*(1), 11185–11193.

Barron, G. L., y Thorn, R. G. (1986). Destruction of nematodes by species of Pleurotus. *Canadian Journal of Botany*, (January), 774–778. https://doi.org/10.1139/b87-103

Cardoso, E. R., y Nahas, E. (2015). Predatory activity of nematophagous fungi against Panagrellus redivivus in the soil under different plant species. *Biological Agriculture y Horticulture*, *31*(4), 1–9. https://doi.org/10.1080/01448765.2015.1011232

Chang, S. T., y Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (Second). New York: CRC Press.

Chen, S. Y., Dickson, D. W., y Mitchell, D. J. (2000). Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. *Journal of Nematology*, *32*(2), 190–197.

Dighton, J., Oudemans, P. y White, J. F. (2017). The fungal community: its organization and role in the ecosystem. CRC Press. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=Qt1TjtB1hXgC

Dong, J. Y., Zhao, Z. X., Cai, L., Liu, S. Q., Zhang, H. R., y Duan, M. (2004). Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode , Bursaphelenchus xylophilus. *Fungal Diversity*, *15*(February), 125–135.

Evans, K., y Stone, A. R. (1977). A Review of the Distribution and Biology of the Potato Cyst-Nematodes Globodera rostochiensis. *PANS*, *23*(2), 178–189. https://doi.org/10.1080/09670877709412426

Farrer, L. A., y Phillips, M. S. (1983). In vitro hatching of Globodera pallida in response to Solanum vernei and S. tuberosum × S. vernei hybrids. *Revue de Nématologie*, *6*(2), 165–169.

Fermor, T. R., y Wood, D. A. (1981). Degradation of Bacteria by Agaricus bisporus and Other Fungi. *Microbiology*, *126*(2), 377–387.

Forrest, B. Y. J. M. S.,y Farrer, L. A. (1983). The response of eggs of the white potato cyst nematode Globodera pallida to diffusate from potato and mustard roots. *Annals of Applied Biology*, *103*(2), 283–289.

Ganeshpurkar, A., Bhadoriya, S. S., Pardhi, P., y Rai, G. (2012). Investigation of anthelmintic potential of oyster mushroom Pleurotus florida. *Indian Journal of Pharmacology*, *44*(4), 539–541. https://doi.org/10.4103/0253-7613.99349

Genier, H. A., De Freitas Soares, E. F., De Queiroz, J. H., De Souza Gouveia, A., Araújo, J. V., Braga, F. R., … Kasuya, M. C. M. (2015). Activity of the fungus Pleurotus ostreatus and of its proteases on Panagrellus sp. larvae. *African Journal of Biotechnology*, *14*(17), 1496–1503. https://doi.org/10.5897/AJB2015.14447

Heydari, R., Pourjam, E., y Mohammadi Goltapeh, E. (2006). Antagonistic effect of some species of Pleurotus on the root-knot Nematode, Meloidogyne javanica in vitro. *Plant Pathology Journal*, *5*(2), 173–177.

Huang, X., Zhang, K., Yu, Z., y Li, G. (2015). Microbial Control of Phytopathogenic Nematodes. In B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 155–164). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INEC. (2015). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua, Papa (tubérculo fresco). Quito.

Khan, Z., y Kim, Y. H. (2007). A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*, *35*(2), 370–379. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.07.007

Koitabashi, M., Kajitani, Y., y Hirashima, K. (2004). Antifungal substances produced by fungal strain Kyu-W63 from wheat leaf and its taxonomic position. *Journal of General Plant Pathology*, *70*(2), 124–130. https://doi.org/10.1007/s10327-003-0095-2

Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D., y Wicklow, D. T. (1992). A nematicidal toxin from Pleurotus ostreatus NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, *18*(2), 127–136. https://doi.org/10.1007/BF00993748

Li, G., Wang, X., Zheng, L., Li, L., Huang, R., y Zhang, K. (2007). Nematicidal metabolites from the fungus Pleurotus ferulae Lenzi. *Annals of Microbiology*, *57*(4), 527–529. https://doi.org/10.1007/BF03175350

Li, G., y Zhang, K. (2014). Nematode-Toxic Fungi and their Nematicidal Metabolites. In *Nematode-Trapping Fungi* (p. 313−375). Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8730-7

Lopez-Llorca, L. V., Maciá-Vicente, J. G., y Jansson, H. B. (2008). Mode of Action and Interactions of Nematophagous Fungi. In *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes* (Vol. 6, pp. 51–52). Dordrecht: Springer.

Lopez Torres, M. E. (2013). *Evaluación de genes de resistencia a Virus y Nemátodos mediante marcadores moleculares en Solanum tuberosum ssp. tuberosum del Banco de Germoplasma de Papas de la Univesidad Austral de Chile*. Universidad Austral de Chile.

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca MAGAP. (2013). El cultivo de papa en Ecuador y planes de mejora. Quito.

Meyer, S. L. F., Huettel, R. N., Liu, X. Z., Humber, R. A., Juba, J., y Nitao, J. K. (2004). Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology*, *6*(1), 23–32. https://doi.org/10.1163/156854104323072883

Meyhuay, M. (2001). *Potato Post-harvest operations.* Report Food and agriculture Organization of the United Nations. 1-56

Nayar, J. K., Crowder, C. G., y Knight, J. W. (1991). In vitro development of Brugia pahangi and Brugia malayi in cultured mosquito thoraces. *Acta Tropica*, *48*(3), 173–184. https://doi.org/10.1016/0001-706X(91)90045-L

Palizi, P., Goltapeh, E. M., Pourjam, E., y Safaie, N. (2009). Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (Heterodera schachtii). *Journal of Plant Protection Research*, *49*(1), 27–33. https://doi.org/10.2478/v10045-009-0004-6

Pumisacho, M., y Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en Ecuador* (Primera ed).

Regaieg, H., Ciancio, A., Raouani, N. H., Grasso, G., y Rosso, L. (2010). Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus Verticillium leptobactrum on viability of the root-knot nematode Meloidogyne incognita. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(12), 2285–2289. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0397-4

Revelo, J. (2003). *Memorias del curso : "Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades del cultivo de papa " Enfermedades de la papa*. Guayaquil.

Reyes, J., Pineda, J., Sanabria, M. E., y Gil, E. (2006). Efectividad in vitro de filtrados de hongos aislados de frutos de maíz contra Aspergillus flavus. *VII Congreso SEAE*, (2000), 381–390.

Reza, M., y Zare, R. (2012). *Fungi as Biological Control Agents of Plant- Parasitic Nematodes*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0

Satou, T., Kaneko, K., Li, W., y Koike, K. (2008). The toxin produced by pleurotus ostreatus reduces the head size of nematodes. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*, *31*(4), 574–576. https://doi.org/10.1248/bpb.31.574

Sierra, J. A. (2014). *Evaluación de la acción nematicida in vitro e in vivo de especies de Pleurotus spp., sobre los nematodos Meloidogyne spp. y Radopholus spp. asociados a los cultivos de tomate y plátano. Universidad Nacional de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.

Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., y Holderness, M. V. (2009). Globodera rostochiensis and Globodera pallida data sheets on quarantine pests. *EPPO Bulletin*, *39*(3), 354–368. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2009.02323.x

Soto-Barrientos, N., de Oliveira, J., Vega-Obando, R., Montero-Caballero, D., Vargas, B., Hernández-Gamboa, J.,y Orozco-Solano, C. (2011). In-vitro predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Revista de Biologia Tropical*, *59*(1), 37–52.

Thorn, R. G., y Barron, G. L. (1984). Carnivorous Mushrooms. *Science*, *224*(4644), 76–78.

Truong, B. N., Okazaki, K., Fukiharu, T., Takeuchi, Y., Futai, K., y Suzuki, A. (2007). Characterization of the nematocidal toxocyst in Pleurotus subgen . Coremiopleurotus. *Mycoscience*, *48*(4), 222–230. https://doi.org/10.1007/s10267-007-0358-4

Van Bezooijen, J. (2006). Methods and Techniques for Nematology. *Wageningen*, 1–118.

Weischer, B., y Brown, D. J. (2000). An Introduction to Nematodes: General Nematology: a Student's Textbook . Pensoft Publishers.

Whipps, B. Y. J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil- borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, *107*(1), 127–142.

Xiang, N., y Lawrence, K. S. (2016). Optimization of In Vitro Techniques for Distinguishing between Live and Dead Second Stage Juveniles of Heterodera glycines and Meloidogyne incognita. *PloS One*, *11*(5), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154818

8. FIGURAS

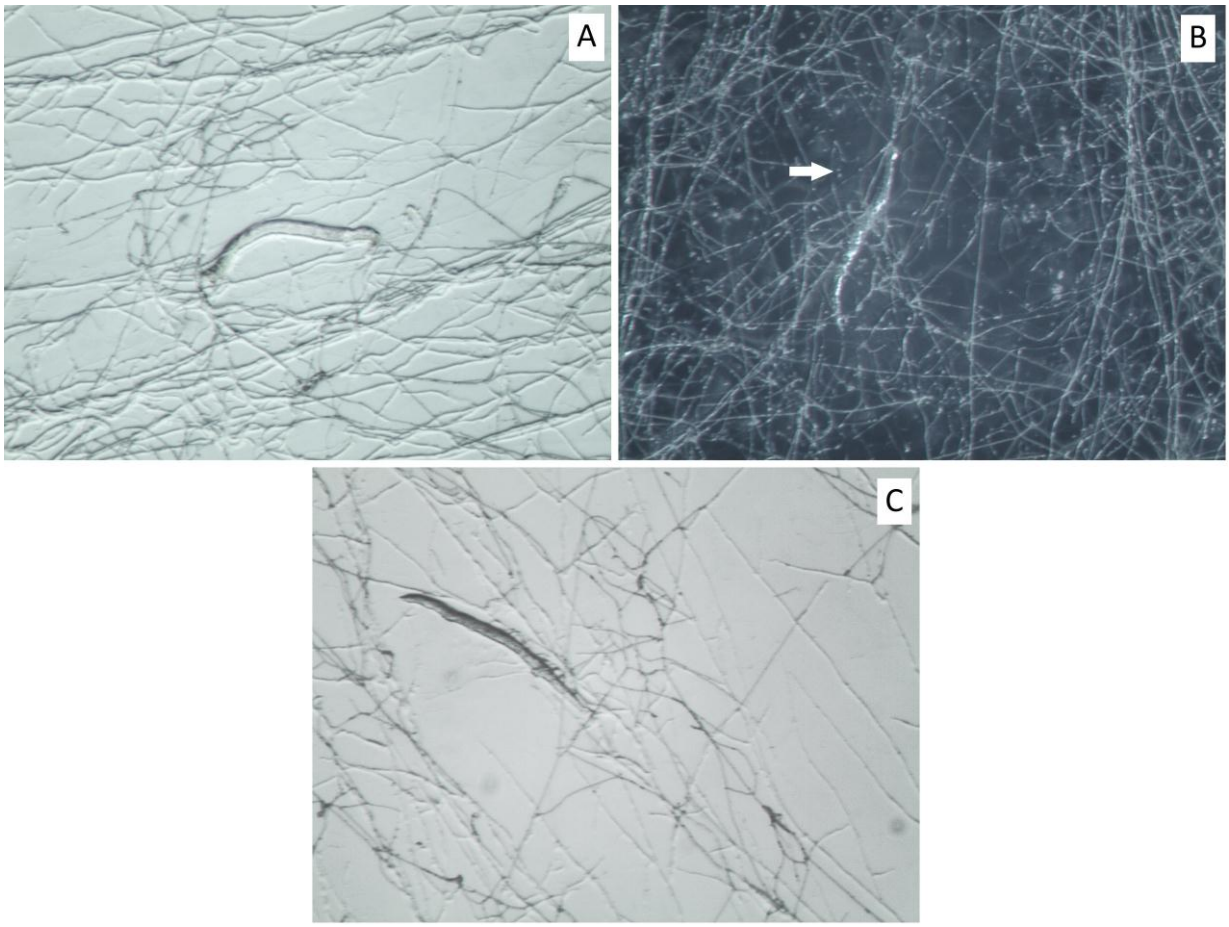


Figura 1. Hifas especializadas de *Pleurotus ostreatus* atrapan y digieren juveniles J2 de *Globodera pallida*. A. Hifas de *P. ostreatus* penetrando el orificio anterior y el posterior de una larva J2 de *G. pallida*. B. Observación de gotas secretadas por hifas aéreas de *P. ostreatus* (flecha) en presencia de una larva J2. C. Larva de *G. pallida* J2 siendo colonizada por hifas de *P. ostreatus.*

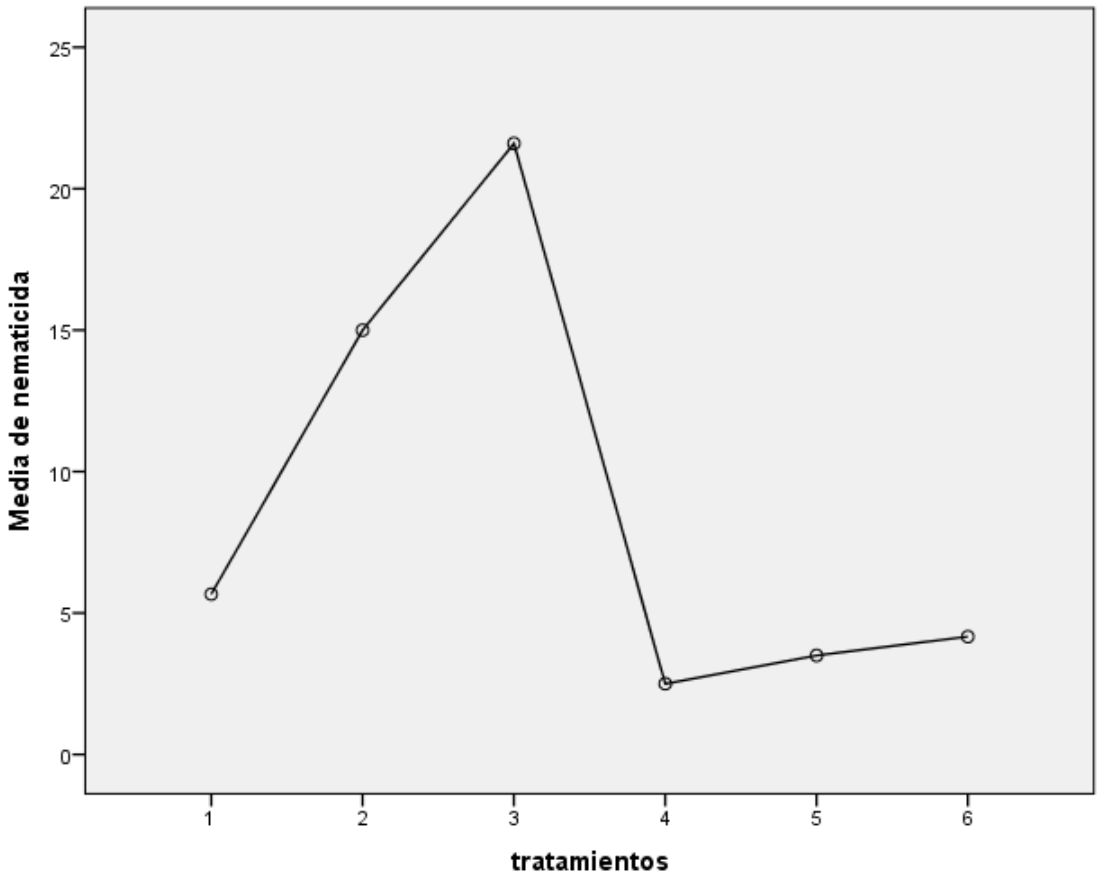


Figura 2. **Efecto nematicida de hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición**. **Media de nematicida (promedio de nematodos muertos / tiempo).** Tratamiento 1 – 24 horas, Tratamiento 2 – 48 horas, Tratamiento 3 – 72 horas, Control 4 – 24 horas, Control 5 – 48 horas, Control 6 – 72 horas

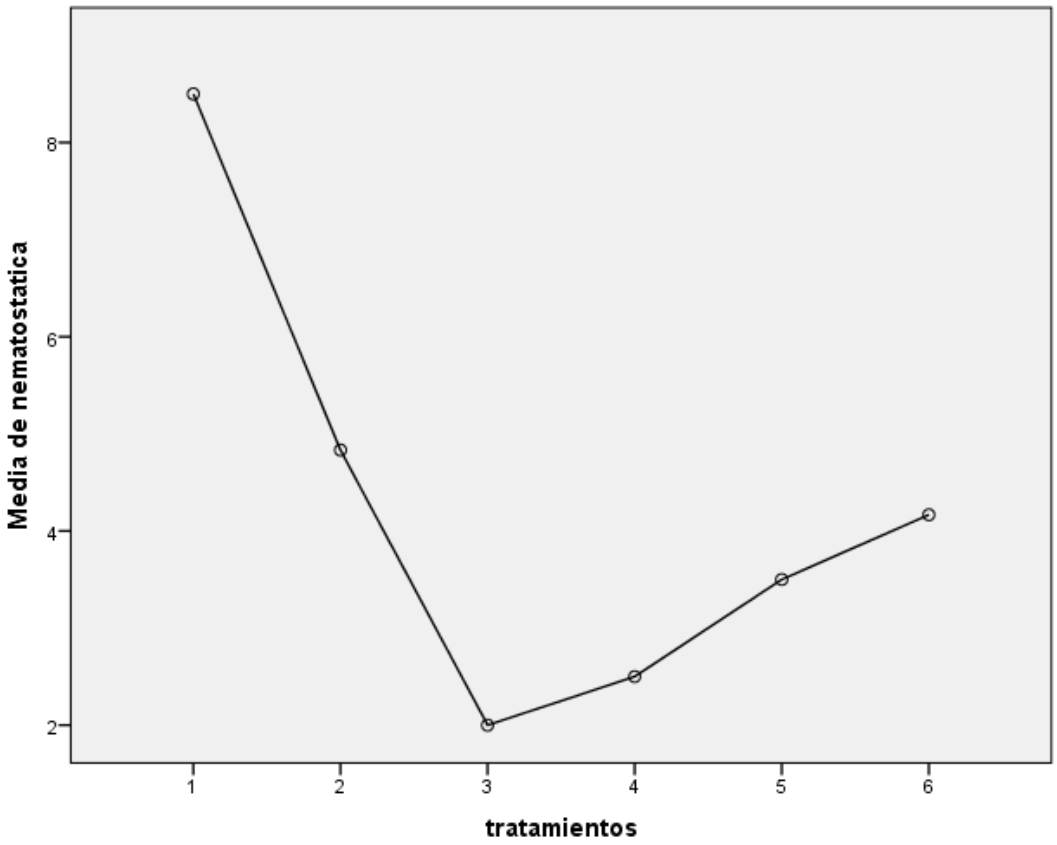


Figura 3. **Efecto nematostático de hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición. Media de nematostática (promedio de nematodos inmóviles / tiempo).** Tratamiento 1 – 24 horas, Tratamiento 2 – 48 horas, Tratamiento 3 – 72 horas, Control 4 – 24 horas, Control 5 – 48 horas, Control 6 – 72 horas

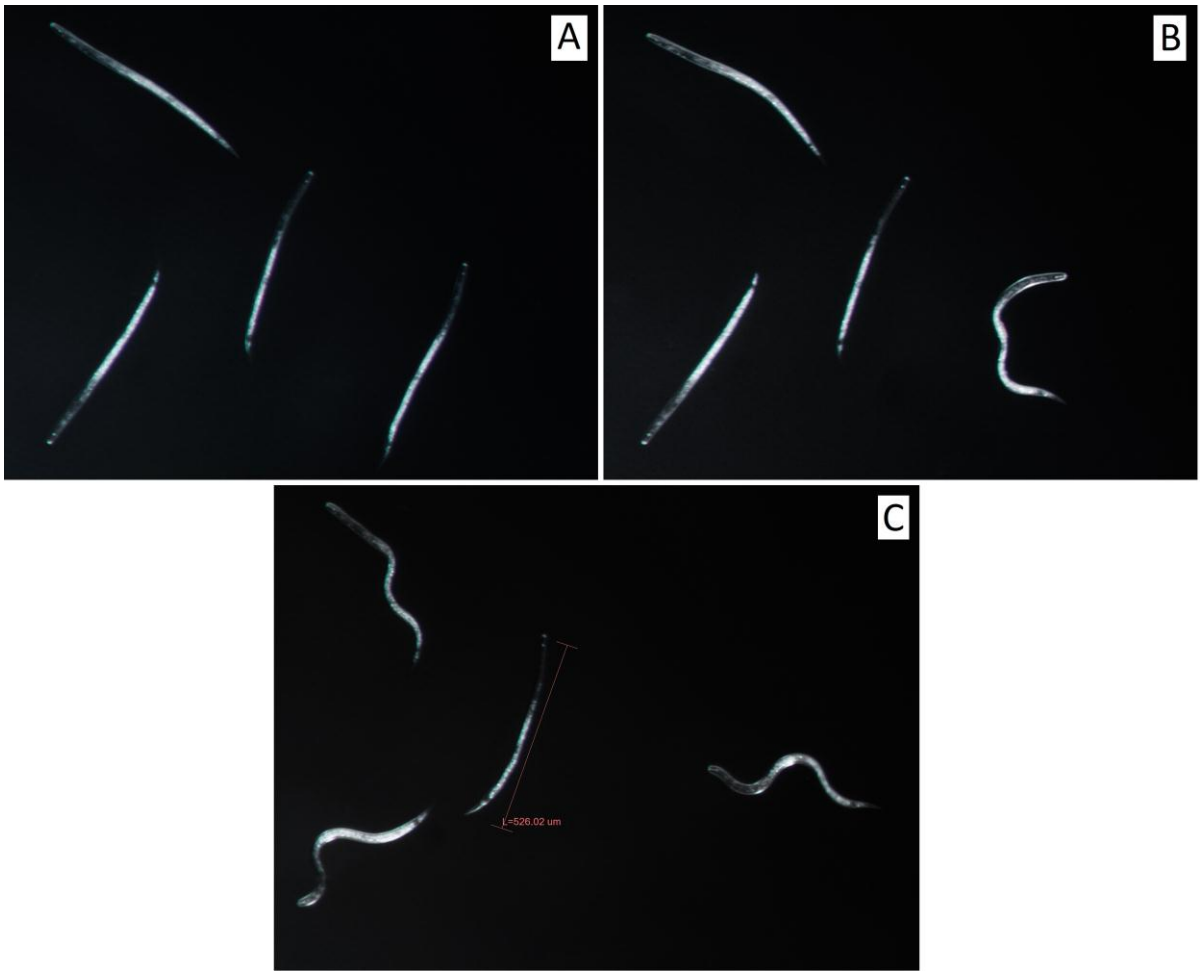


Figura 4. Efecto de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*. A. Forma corporal recta de nemátodos inmovilizados por los filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus* expuestos durante 10 segundos a una solución 1% NaOH. B. Imagen del mismo campo óptico de nemátodos inmóviles expuestos durante 1 minuto a una solución 1% NaOH. C. Imagen del mismo campo óptico de nemátodos inmóviles expuestos durante tres minutos a una solución 1% NaOH, se observa como retoman su movimiento a medida que aumenta el tiempo de exposición a 1% NaOH.

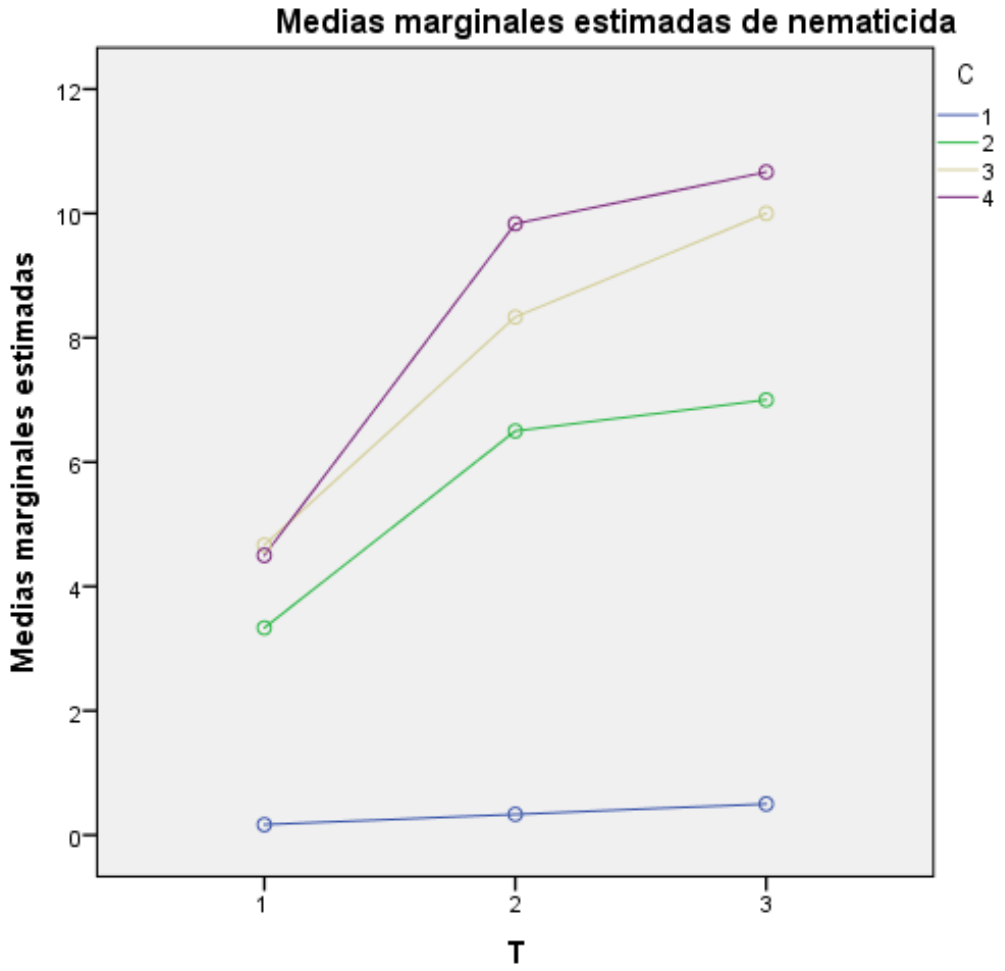


Figura 5. Efecto nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición. Medias marginales estimadas (promedio de nematodos muertos / tiempo). T1 - 8 horas, T2 - 12 horas, T3 - 24 horas, C1- control medio saburou 0%, C2 – filtrado concentración 50%, C3 – filtrado concentración 75%, C4 – concentración 100%.

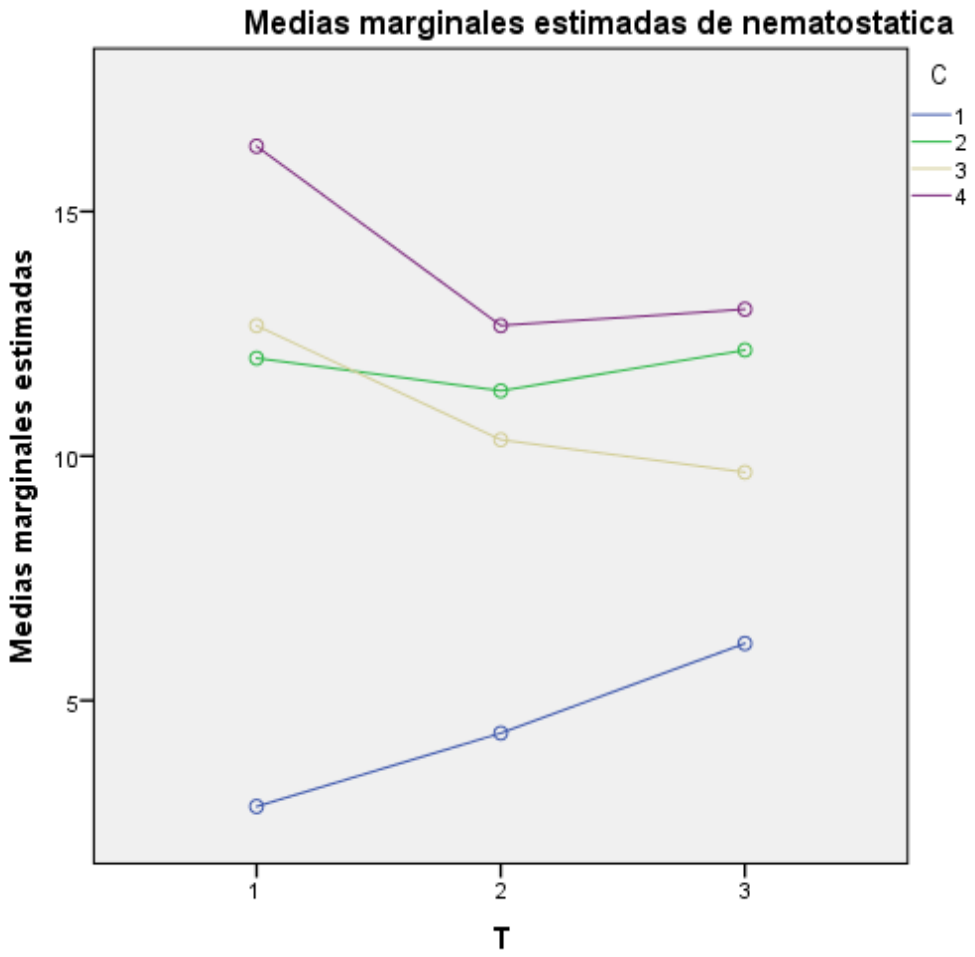


Figura 6. **Efecto nematostático de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre las larvas J2 de *Globodera pallida* luego de 24, 48 y 72 horas de exposición. Medias marginales estimadas (promedio de nematodos inmóviles / tiempo).** T1 - 8 horas, T2 - 12 horas, T3 - 24 horas, C1- control medio saburou 0%, C2 – filtrado concentración 50%, C3 – filtrado concentración 75%, C4 – concentración 100%.

9. TABLAS

Tabla 1. Registro de mortalidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a hifas de *Pleurotus ostreatus.*

Réplica	No. de larvas muertas					
	Tratamientos			Control		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	7	14		4	5	5
2	4	13	22	3	3	4
3	5	15	21	4	6	6
4	5	17	22	1	2	4
5	8	17	23	2	3	4
6	5	14	20	1	2	2
Media	5,7	15	21,6	2,5	3,5	4,2
% Mortalidad	14,2	53,7	80,3		-	
CV (%)			17,52			

CV, coeficiente de variación

Tabla 2. Registro de inmovilidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a hifas de *Pleurotus ostreatus*.

Réplica	No. de larvas inmóviles					
	Tratamientos			Control		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	8	5		4	5	5
2	10	4	3	3	3	4
3	9	4	1	4	6	6
4	8	6	2	1	2	4
5	7	4	2	2	3	4
6	9	6	2	1	2	2
Media	8,5	4,83	2	2,5	3,5	4,16
% J2 inmóviles	34	19,2	8,8	10	14	16,8
CV (%)						28,63

CV, coeficiente de variación

Tabla 3. ANOVA de resultados de la actividad nematicida de hifas de *Pleurotus ostreatus.*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1637,805	5	327,561	152,313	,000
Dentro de grupos	62,367	29	2,151		
Total	1700,171	34			

Tabla 4. ANOVA de resultados de la actividad nematostática de hifas de *Pleurotus ostreatus.*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	157,376	5	31,475	20,667	,000
Dentro de grupos	44,167	29	1,523		
Total	201,543	34			

Tabla 5. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematicida de hifas de *Pleurotus ostreatus.*

Tratamientos	**N**	**Subconjunto para alfa = 0.05**			
		1	2	3	4
24h control	6	2,50			
48h control	6	3,50	3,50		
72h control	6	4,17	4,17		
24h	6		5,67		
48h	6			15,00	
72h	5				21,60
Sig.		,402	,152	1,000	1,000

Tabla 6. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematostática de hifas de *Pleurotus ostreatus.*

Tratamientos	**N**	**Subconjunto para alfa = 0.05**		
		1	2	3
24h control	5	2,00		
48h control	6	2,50		
72h control	6	3,50	3,50	
72h	6	4,17	4,17	
48h	6		4,83	
24h	6			8,50
Sig.		,057	,457	1,000

Tabla 7. Registro de mortalidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a diferentes tiempos y concentraciones del filtrado de caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus.*

Réplica	**No. de larvas muertas**			
	Tratamiento 8 h			Control
	50% v/v	75% v/v	100% v/v	Medio Saburou
1	2	6	4	0
2	4	4	2	0
3	2	4	5	1
4	5		4	0
5	4		5	0
6	3		7	0
Media	3,3	4,7	4,5	0,2
% Mortalidad	12,1	18,2	17,3	
Réplica	Tratamiento 12 h			Control
	50% v/v	75% v/v	100% v/v	Medio Saburou
1	5	8	11	0
2	6	10	10	1
3	7	7	8	1
4	5		7	0
5	9		12	0
6	7		11	0
Media	6,5	8,3	9,8	0,3
% Mortalidad	24,8	32,5	38,2	
Réplica	Tratamiento 24 h			Control
	50% v/v	75% v/v	100% v/v	Medio Saburou
1	6	11	11	0
2	7	11	13	1
3	7	8	9	1
4	6		7	0
5	9		13	1
6	7		11	0
Media	7	10	10,7	0,5
% Mortalidad	26,5	38,8	41,6	
CV (%)		25,71		

CV, coeficiente de variación.

Tabla 8. Registro de inmovilidad de larvas de *Globodera pallida* expuestas a diferentes tiempos y concentraciones del filtrado de caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus.*

Réplica	**No. de larvas inmóviles**			
	Tratamiento 8 h			Control
	50% v/v	75% v/v	100% v/v	Medio Saburou
1	13	13	17	3
2	11	12	20	2
3	13	13	15	3
4	14		18	3
5	10		14	4
6	11		14	2
Media	12	12,7	16,3	2,8
% J2 inmóviles	48	50,8	65,2	11,2
Réplica	Tratamiento 12 h			Control
	50% v/v	75% v/v	100% v/v	Medio Saburou
1	11	13	14	5
2	13	8	13	5
3	10	10	12	3
4	13		16	5
5	11		9	6
6	9		12	2
Media	11,2	10,3	12,7	4,3
% J2 inmóviles	44,8	41,3	50,8	17,2
Réplica	Tratamiento 24 h			Control
	50% v/v	75% v/v	100% v/v	Medio Saburou
1	12	12	15	8
2	14	8	13	6
3	11	9	12	5
4	13		16	5
5	11		9	8
6	12		13	5
Media	12,2	9,6	13	6,2
% J2 inmóviles	48,8	38,4	52	24,8
CV (%)		17,3		

CV, coeficiente de variación.

Tabla 9. ANOVA de resultados de la actividad nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus.*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	2574,500[a]	12	214,542	107,799	,000
C	660,802	3	220,267	110,676	,000
T	160,956	2	80,478	40,437	,000
C * T	66,556	6	11,093	5,574	,000
Error	101,500	51	1,990		
Total	2676,000	63			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,953)

Tabla 10. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematicida de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus.*

			Subconjunto		
	Tratamiento	**N**	**1**	**2**	**3**
Concentración	0%	18	0,33		
	50%	18		5,61	
	75%	9			7,67
	100%	18			8,33
	Sig.		1	1	0,587
Tiempo	8h	21	2,95		
	12h	21		5,95	
	24h	21		6,62	
	Sig.		1,000	,285	

Tabla 11. ANOVA de resultados de la actividad nematostática de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus.*

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	7571,167[a]	12	630,931	189,465	,000
C	908,484	3	302,828	90,938	,000
T	16,067	2	8,033	2,412	,100
C * T	85,778	6	14,296	4,293	,001
Error	169,833	51	3,330		
Total	7741,000	63			

a. R al cuadrado = ,978 (R al cuadrado ajustada = ,973)

Tabla 12. Prueba de Tukey comparando los resultados de la actividad nematostática de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus.*

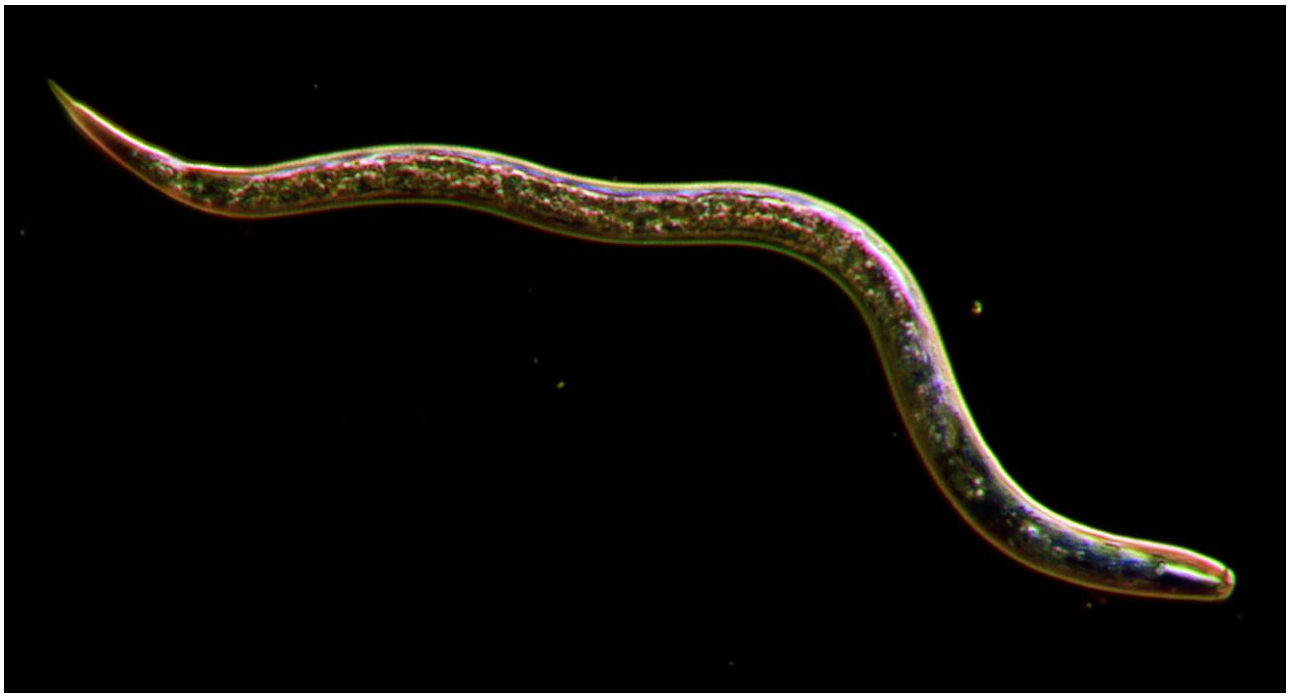
			Subconjunto		
	Tratamiento	**N**	**1**	**2**	**3**
Concentración	0%	18	4,44		
	75%	9		10,89	
	50%	18		11,83	
	100%	18			14,00
	Sig.		1,000	,512	1,000
Tiempo	12h	21	9,57		
	24h	21	10,33		
	8h	21	10,71		
	Sig.		,115		

Tabla 13. Prueba de t de student entre los tratamientos 24 horas concentración 100% filtrados y 24 horas hifas de *Pleurotus ostreatus.*

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		**Prueba t para la igualdad de medias**						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
J2 muertos	Se asumen varianzas iguales	0,862	0,38	4,404	10	0,001	-5	1,135	-7,53	-2,47
	No se asumen varianzas iguales			4,404	8,538	0,002	-5	1,135	-7,59	-2,41

10. ANEXOS

Anexo 1: Larva juvenil (J2) de *Globodera pallida*



Fuente: autor

Anexo 2: Cuerpos fructíferos del hongo ostra *Pleurotus ostreatus*



Fuente: autor

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Belén Arteaga Paredes, con CC. 1718833039, autor del trabajo de graduación intitulado "Determinación del potencial nematicida y nematostático in vitro de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*", previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 14 de Febrero del 2018.
María Belén Arteaga Paredes
CC: 1718833039

_____