

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMÁTODOS DEL
GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS AL CULTIVO DE SACHA INCHI
EN EL DEPARTAMENTO DE SAN MARTÍN”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

DANNY STEFANNY CHIRINOS HINOJOSA

LIMA - PERÚ

2024

tesis de pregrado-Stefanny Chirinos

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.lamolina.edu.pe

Fuente de Internet

2%

2

core.ac.uk

Fuente de Internet

1%

3

hdl.handle.net

Fuente de Internet

<1%

4

pingpdf.com

Fuente de Internet

<1%

5

repositorio.uap.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

6

repositorium.sdum.uminho.pt

Fuente de Internet

<1%

7

renatiqa.sunedu.gob.pe

Fuente de Internet

<1%

8

renati.sunedu.gob.pe

Fuente de Internet

<1%

9

repository.nwu.ac.za

Fuente de Internet

<1%

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMÁTODOS DEL
GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS AL CULTIVO DE SACHA INCHI
EN EL DEPARTAMENTO DE SAN MARTÍN”**

Danny Stefanny Chirinos Hinojosa

Tesis para optar el Título de:
INGENIERA AGRÓNOMA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Alberto Marcial Julca Otiniano
PRESIDENTE

Ing. Mg. Sc. Ángel Alfonso Palomo Herrera
ASESOR

Ing. Mg. Sc. Walter Eduardo Apaza Tapia
MIEMBRO

Ing. Mg. Sc. Medali Heidi Huarhua Zaquinaula
MIEMBRO

Ing. Mg. Sc. Mike Anderson Corazón Guivin
CO ASESOR

LIMA - PERÚ

2024

DEDICATORIA

A mis padres Rosa y Carlos por ser los mayores motivadores en mi vida, por enseñarme que no hay imposibles cuando uno lucha por lo que quiere de forma correcta; para ustedes son todos mis logros y reconocimientos; aun con todo eso soy consciente que nunca podré devolverles todo lo que sacrificaron por mí, el agradecimiento que tengo hacia ustedes será eterno.

A mis queridos hermanos Jorge, Sofía y Carlos por su apoyo y cariño incondicional en cada momento de mi vida; por ser los mejores compañeros de vida que me pudo dar Dios y que a pesar de la distancia nuestro lazo fraternal nunca se pierde.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su amor incondicional y guía.

A mi asesor de tesis el Mg. Sc. Ángel Alfonso Palomo Herrera, por su apoyo y disposición desde el inicio del proyecto, brindando su experiencia y conocimiento para enriquecer este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) que como ente financiador del Proyecto de Investigación desarrollado en la Universidad Nacional de San Martín (UNSM)- Tarapoto, haciendo posible la realización de la presente.

Un agradecimiento especial al Dr. Agustín Cerna Mendoza, Coordinador General del proyecto de Investigación-CONCYTEC y al Mg. Sc. Mike Corazón Guivin, Investigador Principal del Laboratorio de Biología y Genética Molecular y coasesor de mi tesis; por la confianza depositada en mi persona para desarrollar el proyecto encomendado y por todo el conocimiento brindado durante todo este tiempo.

A mis amigos por impulsarme en cada reto que se me presenta en la vida y brindarme sus consejos para superar cada dificultad, que el lazo que hemos formado en estos últimos años perdure siempre.

A mi querido compañero por impulsarme a terminar este trabajo y por el gran aporte hecho con todos sus conocimientos.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	SACHA INCHI.....	3
2.1.1.	Origen y distribución.....	3
2.1.3.	Importancia del cultivo.....	4
2.1.4.	Morfología.....	5
2.1.5.	Fenología.....	6
2.1.6.	Fisiología.....	6
2.2.	EL NEMATODO <i>Meloidogyne</i> spp.	8
2.2.2.	Ciclo de vida.....	8
2.2.3.	Parasitismo.....	9
2.2.4.	Reproducción.....	11
2.2.5.	Dimensiones.....	12
2.2.6.	Síntomas.....	12
2.2.7.	Distribución.....	13
2.2.8.	Importancia.....	13
2.3.	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN NEMÁTODOS.....	13
III.	METODOLOGÍA.....	18
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	18
3.2.	MATERIAL DE ESTUDIO.....	18
3.3.	COLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO.....	18
3.3.1.	Zonas de muestreo.....	18
3.4.	MUESTREO DE SUELO Y RAÍCES.....	19
3.5.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS RADICULARES.....	22
3.5.1.	Lavado y selección de raíces.....	22
3.5.2.	Evaluación de nivel de nodulación de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces.....	22
3.5.3.	Extracción de hembras adultas de <i>Meloidogyne</i> spp.	24
3.5.4.	Procesamiento y extracción de especímenes del segundo estadio (J ₂) de <i>Meloidogyne</i> spp. de raíces.....	25
3.6.	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE <i>Meloidogyne</i> spp.	27
3.6.1.	Montaje de hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.....	27

3.6.2. Identificación de patrones perineales	27
3.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE <i>Meloidogyne</i> spp. MEDIANTE PCR	31
3.7.1. Extracción de ADN de especímenes hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	31
3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
3.8. VARIABLES EVALUADAS	38
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. ESTUDIO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE NEMATODOS DEL GÉNERO <i>Meloidogyne</i> Y LA RELACIÓN CON EL GRADO DE DAÑO EN RAÍCES DE SACHA INCHI	40
4.1.1. Densidad poblacional (J_2) por provincia.....	40
4.1.2. Relación de la densidad poblacional (J_2) y el nivel de nodulación en raíces.....	45
4.2. EFECTO DE VARIABLES CLIMÁTICAS, EDÁFICAS, TOPOGRÁFICAS Y CARACTERÍSTICAS DE LA PARCELA PRODUCTIVA SOBRE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE NEMATÓDOS DE <i>Meloidogyne</i> spp. EN RAÍCES.....	47
4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Meloidogyne</i> SEGÚN EL PATRÓN PERINEAL DE ESPECÍMENES HEMBRA	48
4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Meloidogyne</i> PRESENTES EN RAÍCES DE SACHA INCHI	62
V. CONCLUSIONES	88
VI. RECOMENDACIONES	89
VII. BIBLIOGRAFIA	90
VIII. ANEXOS	99

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Etapas fenológicas del cultivo de sachá inchi	6
Tabla 2: Lugares de colecta de muestras raíz y suelo de parcelas de sachá inchi	20
Tabla 3: Características usadas para la identificación de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. exigua</i> basadas en el patrón perineal	29
Tabla 4: Iniciadores utilizados para la identificación de <i>Meloidogyne</i> spp.....	34
Tabla 5: Concentración final de reactivos para PCR.....	34
Tabla 6: Grupos de clasificación de las variables evaluadas a nivel de campo y laboratorio	38
Tabla 7: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia de Lamas.....	41
Tabla 8: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia El Dorado	41
Tabla 9: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Picota.....	42
Tabla 10: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Bellavista.....	42
Tabla 11: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia San Martín.....	43
Tabla 12: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Rioja.....	44
Tabla 13: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Moyobamba	44
Tabla 14: Variables representativas del modelo lineal generalizado para la variable respuesta de densidad poblacional de nematodos (J_2).....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Zonas productoras y superficie instalada de sachá inchi a nivel nacional	4
Figura 2: Planta de sachá inchi	7
Figura 3: Ciclo biológico del nematodo del nódulo producido por <i>Meloidogyne</i> spp.....	10
Figura 4: Diagrama del cistron ribosomal en <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
Figura 5: Ubicación geográfica de los lugares de colecta de muestras en parcelas de sachá inchi en siete provincias del departamento de San Martín, para la identificación de especies de <i>Meloidogyne</i> spp.	21
Figura 6: Lavado y pesado de raíces de sachá inchi obtenidas de campo.	22
Figura 7: Índice de nodulación de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi.	23
Figura 8: Extracción de especímenes hembras de <i>Meloidogyne</i> para su identificación morfológica e identificación por técnica molecular. A y B: Disección de raíz para la extracción de las hembras adultas, C: Almacenamiento de hembras adultas en tubos Eppendorf según el proceso a los que están destinados.	24
Figura 9: Método de extracción de juveniles del segundo estadio (J_2) del género <i>Meloidogyne</i> presentes en raíces de sachá inchi. A y B: Picado y licuado de raíces en solución de hipoclorito de sodio al 0.05 %, C: Método de la bandeja para obtener especímenes J_2 de <i>Meloidogyne</i> , D y E: Homogenización de solución final y conteo de nematodos J_2	26
Figura 10: Corte del patrón perineal en nematodos hembra del género <i>Meloidogyne</i> para realizar su identificación morfológica. A: Hembra adulta conservada en ácido láctico al 45 %, B y C: Ubicación del patrón perineal y corte en forma rectangular alrededor de este, D y E: Limpieza del corte perineal con una gota de ácido láctico al 45 % y posterior tinción con tinta Parker al 5 %	28
Figura 11: Visualización e identificación microscópica de especies de <i>Meloidogyne</i> según patrón perineal.....	28
Figura 12: Esquema del patrón perineal de hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	30
Figura 13: Modelos perineales de <i>Meloidogyne</i> spp. reportadas por Eisenback et. al (1981) y Eisenback y Triantaphyllou (1991). A: Patrón perineal de <i>M. incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> , C: <i>M. arenaria</i> y D: <i>M. exigua</i>	30
Figura 14: Método de extracción de ácidos nucleicos CTAB a partir de nematodos hembra del género <i>Meloidogyne</i> . A: Trituración de nematodos hembras con Mix de CTAB, B: Incorporación de Proteinasa K e incubación en baño maría a 65 °C por 4 horas, C: Incorporación de cloroformo y centrifugación (se observan dos fases), D: Incorporación de Isopropanol, incubación a – 20 °C y centrifugación, E: Lavado de pellet con etanol al 70% y centrifugación (dos veces), F: Secado de pellet a temperatura ambiente, G: Suspensión de pellet en agua miliQ y almacenamiento a – 20 °C.....	32

Figura 15: Medición de concentración y calidad de ADN. A y B: Colocación de muestra de ADN y visualización de espectro de absorbancia.	33
Figura 16: Patrones de amplificación de cuatro especies de <i>Meloidogyne</i> generados con los cebadores específicos del SCAR. A: Amplificación de primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb) específico para <i>M. incognita</i> , B: Amplificación de primer -/- (420 pb) específico para <i>M. arenaria</i> , C: Amplificación de primer Mjav / Mjav (517 pb) específico para <i>M. javanica</i> y D: Amplificación de primer exD15F/ exD15R (562 pb) específico para <i>M. exigua</i>	35
Figura 17: Condiciones para PCR para 4 primers SCAR específicos para especies del género <i>Meloidogyne</i> . A: Utilizando el primer Mi2F4-Fv / Mi1R1-Rv para <i>M. incognita</i> , B: Utilizando el primer para identificar <i>M. javanica</i> , C: Utilizando el primer Far-Fv/Rar-Rv para <i>M. arenaria</i> , D: Utilizando el primer exD15-Fv /exD15-Rv para <i>M. exigua</i>	36
Figura 18: Técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). A: Reactivos necesarios para la elaboración del Mix PCR y su distribución para cada muestra de ADN obtenido de nematodos hembra, B: Colocación de tubos Eppendorf (reactivos +ADN) en el termociclador programando las condiciones para cada primer utilizado.	37
Figura 19: Siembra de producto PCR en gel de agarosa al 1.2 % y posterior visualización de amplificación de productos PCR en el fotodocumentador.	37
Figura 20: Diagrama de cajas representando la densidad poblacional de nematodos (J_2) /10 gr de raíz de sachá inchi en las diferentes zonas de estudio del departamento de San Martín.	44
Figura 21: Diagrama de cajas representando el promedio de especímenes (J_2) /10 gr de raíz de sachá inchi, en relación a los niveles de nodulación ocasionados por <i>Meloidogyne</i> spp.	46
Figura 22: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género <i>Meloidogyne</i> identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia de Lamas.	49
Figura 23: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia Lamas, localidad Bellavista (I), Pongo de Caynarachi (II) y Pamashto (III). A: <i>Meloidogyne incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> , C: <i>M. arenaria</i>	50
Figura 24: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género <i>Meloidogyne</i> identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia El Dorado.	51
Figura 25: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia El Dorado, localidad Santa Rosa (I), Santa Cruz (II), Huaja (III) y Cashnahuasi (IV). A: <i>Meloidogyne incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> , C: <i>M. arenaria</i>	52

Figura 26: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género <i>Meloidogyne</i> identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia Picota.....	53
Figura 27: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia Picota, localidad San Antonio (I), Shamboyacu (II), Tingo de Ponasa (III) y Buenos Aires (IV). A: <i>Meloidogyne incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> , C: <i>M. arenaria</i>	54
Figura 28: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género <i>Meloidogyne</i> identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia Bellavista.....	55
Figura 29: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia Bellavista, localidad Limón (I), Santa Victoria (II) y Consuelo (III). A: <i>Meloidogyne incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> , C: <i>M. arenaria</i>	56
Figura 30: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género <i>Meloidogyne</i> identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia San Martín.....	57
Figura 31: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia San Martín, localidad Morales (I), Tununtunumba (II) y Bello Horizonte (III). A: <i>Meloidogyne incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> , C: <i>M. arenaria</i>	58
Figura 32: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género <i>Meloidogyne</i> identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia Rioja.....	59
Figura 33: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en el Distrito de Rioja localidad de Segunda Jerusalén, A: <i>Meloidogyne incognita</i> , B: <i>M. javanica</i> y C: <i>M. arenaria</i>	59
Figura 34: Patrón perineal de especímenes hembra obtenidos en el Distrito de Tarapoto localidad de Morales: <i>Meloidogyne incognita</i>	60
Figura 35: Identificación morfológica y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de sachá inchi de siete provincias del departamento San Martín.....	61
Figura 36: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne spp.</i> en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Pinto Recodo, localidad de Bellavista. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de <i>M. arenaria</i> (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de <i>M. exigua</i> usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..	64
Figura 37: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne spp.</i> en 5 plantas de sachá inchi del distrito de Lamas, localidad de Pamashto. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el	

primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 65

Figura 38: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sacha inchi del distrito de Barranquita, localidad de Pongo de Caynarachi. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 66

Figura 39: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sacha inchi del distrito de San José de Sisa, localidad de Santa Cruz. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-). 67

Figura 40: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 2 plantas de sacha inchi del distrito de San Martín, localidad de Cashnahuasi. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-). 68

Figura 41: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sacha inchi del distrito de Santa Rosa, localidad de Santa Rosa. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-). 69

Figura 42: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sacha inchi del distrito de San José de Sisa, localidad de Huaja. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control

negativo (-), D: Identificación de <i>M. exigua</i> usando el primer exD15F/ exD15R (562 +pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).....	70
Figura 43: Identificación molecular y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de sachá inchi en la provincia Lamas.....	71
Figura 44: Identificación molecular y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de sachá inchi en la provincia El Dorado.....	71
Figura 45: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne</i> spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Buenos Aires, localidad de Buenos Aires. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de <i>M. arenaria</i> (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de <i>M. exigua</i> usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).	73
Figura 46: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne</i> spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Tingo de Ponaza, localidad de Tingo de Ponaza. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de <i>M. arenaria</i> (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de <i>M. exigua</i> usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).....	74
Figura 47: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne</i> spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Picota, localidad de San Antonio. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de <i>M. arenaria</i> (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de <i>M. exigua</i> usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).....	75
Figura 48: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne</i> spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Shamboyacu, localidad de Shamboyacu. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de <i>M. arenaria</i> (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de <i>M. exigua</i> usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).....	76
Figura 49: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para <i>Meloidogyne</i> spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Bellavista, localidad de Limón. A: Identificación de <i>M. incognita</i> usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de <i>M. javanica</i> usando el	

primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 77

Figura 50: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de San Pablo, localidad de Santa Victoria. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-). 78

Figura 51: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de San Pablo, localidad de Consuelo. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 79

Figura 52: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sachá inchi en la provincia Picota 80

Figura 53: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sachá inchi en la provincia Bellavista. 80

Figura 54: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Chazuta, localidad de Tununtunumba. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-). 82

Figura 55: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Banda de Shilcayo, localidad de Bello Horizonte. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 83

Figura 56: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 10 plantas de sachá inchi del distrito de Tarapoto, localidad de Morales. A:

Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 84

Figura 57: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 2 plantas de sachá inchi del distrito de Moyobamba, localidad de Rafael Belaunde. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-)..... 85

Figura 58: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Rioja, localidad de Segunda Jerusalen. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-). 86

Figura 59: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sachá inchi en la provincia San Martín. 87

Figura 60: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sachá inchi en la provincia Moyobamba y Rioja 87

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi en la provincia de Lamas.	99
Anexo 2: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi en la provincia El Dorado.	100
Anexo 3: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi en la provincia de Picota.	101
Anexo 4: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi en la provincia Bellavista.	102
Anexo 5: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi en la provincia San Martín.	103
Anexo 6: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de <i>Meloidogyne</i> spp. en raíces de sachá inchi en la provincia Rioja y Moyobamba.	104
Anexo 7: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis del número de especímenes J_2 obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de Lamas.	104
Anexo 8: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y Analisis de Comparaciones multiples (Test de Dunnet) del número de especímenes J_2 obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia El Dorado.	104
Anexo 9: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis del número de especímenes J_2 obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de Picota.	105
Anexo 10: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y Analisis de Comparaciones multiples (Test de Dunnet) del número de especímenes J_2 obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de Bellavista.	105
Anexo 11: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y Analisis de Comparaciones multiples (Test de Dunnet) del número de especímenes J_2 obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de San Martín.	105
Anexo 12: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de la relación de la densidad poblacional de nematodos (J_2) y grado de nodulación en raíces.	106
Anexo 13: Modelo lineal Generalizado (GLM)-reducido para la determinación de las variables edáficas explicativas de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.	106
Anexo 14: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de las variables climáticas explicativas de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.	107
Anexo 15: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de las variables agronómicas explicativas de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.	108

Anexo 16: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de las variables explicativas (Edáficas, climáticas, agronómicas y topográficas) de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.	109
Anexo 17: Análisis de Caracterización de suelos de parcelas muestreadas	110
Anexo 18: Características climáticas de zonas de muestreo en el departamento de San Martín.....	112
Anexo 19: Información de la parcelas de las zonas de muestreo en el departamento de San Martín.....	113
Anexo 20: Caracterización morfológica por medio de diseños perineales de especímenes hembra obtenidas de raíces de sachá inchi.....	114

RESUMEN

El cultivo de sachá inchi es uno de los pilares en la actividad agrícola del departamento San Martín. Sin embargo, presenta una alta susceptibilidad a *Meloidogyne* spp. lo que provoca una reducción del rendimiento y muerte de la planta. Ante la necesidad de buscar una estrategia de manejo de la plaga es necesario una identificación de las especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo. En el presente estudio se trabajó con 190 muestras de raíces obtenidas de 21 parcelas productivas. A partir de las cuales se realizaron análisis de grado de nodulación, dinámica poblacional de nematodos ($J_2/10$ gr raíz) e identificación de especies de *Meloidogyne* mediante métodos morfológicos y técnicas moleculares como el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) usando ADN genómico de especímenes hembras (10 especímenes). También se obtuvieron datos edafológicos, agronómicos y topográficos de cada parcela, además de datos climáticos de la zona de estudio. Los resultados demuestran que la densidad poblacional de nematodos (J_2) está relacionados directamente con el grado de nodulación en las raíces. Además, variables como la presencia de cultivos secundarios como el cacao en la parcela, altitud y el porcentaje de materia orgánica en el suelo tienen un efecto negativo sobre los valores de nematodos J_2 , contrario al efecto de la variable edad de cultivo. La identificación de especies mediante cortes perineales muestra resultados de incidencia donde el 87 % pertenecen a *Meloidogyne incognita*, 8 % a *Meloidogyne arenaria* y 4 % a *Meloidogyne javanica*. Mientras que la identificación molecular muestra productos de amplificación para: *M. incognita* (Mi2F4/Mi1R1-300 pb) en el 96 % de muestras, *M. arenaria* (NN-420 pb) en el 39 %, *Meloidogyne exigua* (exD15F/exD15R-562 pb) en el 15 % y *M. javanica* (Mjav/Mjav-517 pb) en el 10 % de muestras evaluadas.

Palabras clave: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. exigua*, PCR, patrón perineal

ABSTRACT

The sacha inchi crop is one of the pillars of agricultural activity in the department of San Martín. However, it is highly susceptible to *Meloidogyne* spp. which causes yield reduction and plant death. In view of the need to find a pest management strategy, it is necessary to identify the *Meloidogyne* species associated with the crop. In the present study, 190 root samples obtained from 21 productive plots were used. From these samples, analyses of the degree of nodulation, nematode population dynamics (J₂/10 gr root) and identification of *Meloidogyne* species were carried out by morphological methods and molecular techniques such as PCR (Polymerase Chain Reaction) using genomic DNA from female specimens (10 specimens). Edaphological, agronomic and topographical data were also obtained for each plot, as well as climatic data for the study area. The results show that the population density of nematodes (J₂) is directly related to the degree of nodulation in the roots. In addition, variables such as the presence of secondary crops such as cocoa in the plot, altitude and the percentage of organic matter in the soil have a negative effect on J₂ nematode values, contrary to the effect of the variable crop age. Species identification by perineal sections shows incidence results where 87 % belong to *Meloidogyne incognita*, 8 % to *M. arenaria* and 4 % to *M. javanica*. While molecular identification shows amplification products for: *M. incognita* (Mi2F4/Mi1R1-300 bp) in 96 % of samples, *M. arenaria* (NN-420 bp) in 39 %, *M. exigua* (exD15F/exD15R-562 bp) in 15 % and *M. javanica* (Mjav/Mjav-517 bp) in 10 % of samples evaluated.

Keywords: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. exigua*, PCR, perineal pattern

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la región amazónica peruana ha venido adquiriendo en los últimos años un papel muy importante en el área de investigación y producción en el marco de nuestra agricultura. Sin embargo, dentro del mercado nacional e internacional, la participación de este producto solo se remonta a la última década, alcanzando altos volúmenes de ventas en los mercados de la Unión Europea y Estados Unidos (Calero, 2013).

El potencial agroindustrial de este cultivo está basado en su alto contenido de ácidos grasos esenciales como el ácido linolénico, linóleo y oleico, conocidos también como omega 3, 6 y 9 respectivamente; los cuales forman parte de la composición de las semillas en mayor proporción a las reportadas en otros cultivos oleaginosos (Castaño, 2012). Asimismo, cuenta con propiedades que permiten el control de los radicales libres presentes en el cuerpo, previniendo así ciertas enfermedades en el organismo humano (Risco et al., 2010).

El conocimiento de las virtudes y apertura de mercado de este fruto propicio el desarrollo de su cultivo en algunas zonas de nuestro país. Entre las zonas productoras de esta oleaginosa tenemos al departamento de San Martín, el cual posee el 3.9 % del área agrícola de todo el país desarrollando cultivos con un alto valor agroindustrial, concentrando el 61 % de área de producción de sacha inchi a nivel nacional (MIDAGRI, 2022). A pesar de esto, se ha detectado una disminución de su rendimiento promedio del cultivo en los últimos años, desde 4,2 tn/ha en el año 2014 hasta 1,1 tn/ha en el año 2021 (MIDAGRI, 2015 y MIDAGRI, 2022).

Una de las causas de la disminución de rendimiento se debe a los problemas fitosanitarios, y entre ellos encontramos la susceptibilidad a *Meloidogyne* spp., conocida como el nematodo del nódulo radicular, que causa agallamiento y atrofia de las raíces, perjudicando la ejecución correcta de los procesos fisiológicos más importantes en la planta, como son los de la respiración y fotosíntesis, afectando también el transporte de agua y nutrientes desde el suelo hacia la planta y causando una disminución del rendimiento del cultivo (Santa Cruz, 2017).

Las especies del género *Meloidogyne* cuentan con un amplio rango de hospedantes y a su vez una sola especie de este género tiene la capacidad de infectar a un gran número de hospedantes. Por otro lado, se ha reportado también que un mismo hospedante puede albergar a más de una variante de este género, causando así un solapamiento de especies patógenas (Cossio, 2018).

En tal sentido, el conocimiento de las especies de *Meloidogyne*, así como su patrón de distribución en diferentes condiciones edáficas y climáticas, permitirán una mejor precisión del status fitopatológico de este género. Además, cabe resaltar que la labor de identificación tiene un papel muy importante para algunas áreas de estudio como la sistemática (taxonomía y filogenia), la genética de poblaciones, ecología y epidemiología, etc. De igual forma es fundamental para el desarrollo de medidas de control de patógenos: al realizar el reconocimiento de la especie que causa la infección se podría utilizar un cultivar resistente o una rotación de cultivo adecuada y en casos más estrictos la proposición de medidas cuarentenarias (Vera, 2014).

Existen diferentes métodos para la identificación de los nematodos. El método morfológico constituye el método tradicional para lo cual se consideran características como la de los patrones perineales de especímenes hembras. Sin embargo, estos criterios tienen ciertas limitaciones al no ser tan precisos y necesitan de métodos complementarios y confirmatorios. Es por eso que se viene implementando más el uso de métodos moleculares mediante PCR, los cuales nos permiten la amplificación de ADN genómico a partir de fragmentos de genes muy pequeños, caracterizándose como un proceso altamente sensible y específico.

El presente trabajo se orienta a desarrollar la caracterización de poblaciones del género *Meloidogyne* presentes en las zonas productoras de sacha inchi dentro del departamento de San Martín, para lo cual se vio necesario plantear los siguientes objetivos:

1. Cuantificar la densidad poblacional de *Meloidogyne* spp. y determinar su relación con el índice de nodulación en raíces del cultivo de sacha inchi.
2. Determinar la relación de la densidad poblacional de *Meloidogyne* spp. con las condiciones edáficas, climáticas, topográficas y características de las parcelas.
3. Caracterizar morfológicamente los diseños perineales de nematodos hembras de *Meloidogyne* spp. aisladas del cultivo de sacha inchi.
4. Identificar especies de *Meloidogyne* en poblaciones de nematodos aisladas de raíces del cultivo de sacha inchi, mediante análisis molecular usando primers específicos SCAR.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SACHA INCHI

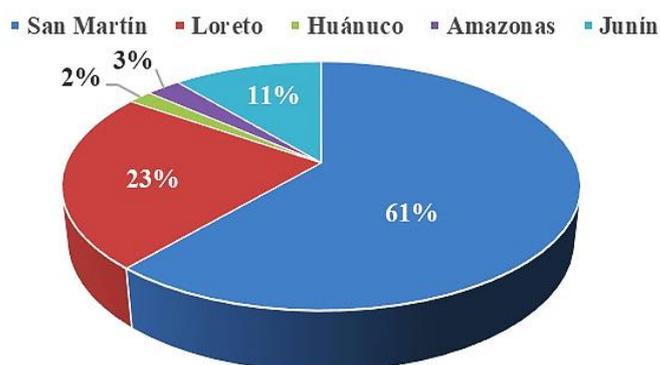
2.1.1. Origen y distribución

Se considera una posible zona de origen en la selva amazónica o atlántica de Brasil en la época del Oligoceno (28.7 millones de años), dispersándose posteriormente entre las regiones de América Central y México en todo el Mioceno (Cardinal- McTeague et al., 2019)

Posteriormente en América del Sur, se tienen registros de *Plukenetia volubilis* L. en las zonas amazónicas de países como Bolivia, Indias occidentales y Perú (Macbride, 1951; Correa y Bernal, 1992); siendo descrita por primera vez en el año 1753. También ha sido reportado en Malasia, Nueva Guinea, Borneo, México (Biblioteca Conmemorativa Orton, 1987).

El sachu inchi es una Euphorbiaceae de la que se han encontrado registros en huacos de las culturas Chimú y Mochica, dejando evidencia de su uso en culturas pre-incas nor-orientales, como lo evidencian cerámicos encontrados en tumbas de estas culturas (Pariona, 2008).

En la actualidad el cultivo de sachu inchi en nuestro país está distribuidos principalmente en los departamentos de San Martín, Amazonas y Loreto (Chirinos et al., 2009) (Figura 1), y en menor proporción en los departamentos de Piura, Huánuco, Ucayali y Junín (Brako y Zarucchi, 1993). En el departamento de San Martín se cuenta con áreas productivas distribuidas en siete de sus provincias: Lamas, Bellavista, Picota, El Dorado, San Martín, Moyobamba y Rioja.



DEPARTAMENTO	SUPERFICIE (Ha)
SAN MARTÍN	1006
LORETO	380
HUÁNUCO	29
AMAZONAS	42
JUNÍN	182

Figura 1: Zonas productoras y superficie instalada de sacha inchi a nivel nacional

Fuente: MIDAGRI (2022)

2.1.2. Taxonomía

La clasificación botánica para sacha inchi o maní del monte proporcionada por USDA (United States Department of Agriculture) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Plukenetia*

Especie: *Plukenetia volubilis* L.

2.1.3. Importancia del cultivo

El cultivo de sacha inchi en el departamento San Martín constituye uno de los productos agrícolas de exportación más promisorios en la generación de divisas, en el 2015 generó US \$ 0.1 millón de dólares, llegando a US \$ 0.5 millones de dólares solo hasta mitad de año del 2017 (MINCETUR, 2019). Mientras en el ámbito de exportaciones a nivel nacional, viene adquiriendo un rápido crecimiento desde el año 2005 hasta la actualidad, obteniendo valores de US \$ 8.9 millones de dólares en el año 2017, siendo los principales importadores países como: Corea del Sur, Estados Unidos, Japón, Francia, Canadá, etc. (SIICEX, 2018).

Su importancia comercial viene sustentada por el alto valor nutricional de sus semillas ya que cuentan con una composición elevada de sustancias vitales para el ser humano como las proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales (omegas 3, 6, y 9) y vitamina E (tocoferoles

y tocotrienoles) (Gutiérrez et al., 2011 y Chirinos et al., 2013), lo cual la diferencia de otros productos oleaginosos como son el maní, palma, soya, maíz, colza y girasol (Manco, 2006).

Estas propiedades ayudan en la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares y niveles altos de colesterol, haciendo posible que el sacha inchi cuente con altas expectativas comerciales, similares a las observadas en el mercado global de productos como el café, cacao y la madera (Chirinos et al., 2009).

Su gran acogida en el mercado internacional ha provocado un incremento exponencial en las áreas de producción a nivel nacional, según MIDAGRI (2016) en el año 2015 se contaban con 723 hectáreas de sacha inchi, incrementándose el valor en más del doble para el año 2021, alcanzando las 1639 hectáreas (MIDAGRI, 2022). Particularmente en la región San Martín, en el año 2021 se registraron 1006 hectáreas las cuales cuentan con un rendimiento promedio de 1 121 kg/ha (MIDAGRI, 2022).

Asimismo, el cultivo de sacha inchi, presenta un gran valor como cultivo alternativo frente a cultivos ilegales presentes en la zona, como lo es el cultivo de coca y también constituye una gran opción en la recuperación de zonas deforestadas.

2.1.4. Morfología

Según la descripción realizada por Manco (2006), la planta de sacha inchi es trepadora y de crecimiento indeterminado, presentando también un tallo semileñoso. Sus hojas presentan posición alterna y tienen bordes aserrulados y nervadura pinnatinervia, son de color verde oscuro y pueden alcanzar tamaños de 6-13 cm de largo y 4-10 cm de ancho, además tienen un ápice es puntiagudo y un área basal plana o semiarriñonada (Dostert et al., 2009).

Con respecto a su estructura floral, Arévalo (1999), menciona que la planta cuenta con una inflorescencia hermafrodita, conteniendo flores masculinas y pistiladas; las primeras son blanquecinas y de tamaño pequeño, dispuestas en racimos, mientras las flores femeninas están ubicadas en el área lateral de la base del racimo.

Posteriormente producto de la fecundación de las flores se obtienen los frutos los cuales son cápsulas, de 3,5 a 4,5 cm de diámetro, divididos en cuatro lóbulos (tetralobados) generalmente, conteniendo en cada uno una sola semilla (Manco, 2006). Dependiendo del ecotipo o accesión se pueden encontrar capsulas con cinco a siete lóbulos.

La semilla está contenida en cada lóbulo, la cual presenta forma ovalada, de 1.5 a 2 cm de diámetro, ligeramente abultada en el centro y aplastadas hacia los bordes, con un hilum bien diferenciado; el color es marrón oscuro; posee nervaduras notorias y su peso varía entre de 48 a 100 g. Al abrirlas encontramos los cotiledones a manera de almendras y cubiertos de una película blanquecina (Valles, 1990; Arévalo, 1999).

2.1.5. Fenología

Las etapas fenológicas del cultivo de sachá inchi presenta la siguiente distribución (Tabla 1):

Tabla 1: Etapas fenológicas del cultivo de sachá inchi

Fase	Días	Descripción
Almácigo	11 a 14 DDA	Germinación
	16 a 20 DDA	1er. par de hojas verdaderas
	45 a 59 DDA	3er. par de hojas verdaderas
Campo	20 a 41 DDT	Inicio de emisión de guía
	86 a 139 DDT	Inicio de floración
	119 a 182 DDT	Inicio de fructificación
	202 a 249 DDT	Inicio de cosecha

*DDA: días después del almacigado, DDT: días después del trasplante
Fuente: Manco (2006)

2.1.6. Fisiología

a. Crecimiento vegetativo

La planta del sachá inchi al ser una liana y presentar un crecimiento indeterminado, con la formación abundante de ramas y hojas; requiere la implementación de un sistema de soporte que facilite su manejo durante un sistema de cultivo, dicho soporte no debe presentar una altura mayor a dos metros para permitir la cosecha de frutos (Arévalo, 1999).



Figura 2: Planta de sachá inchi

b. Floración

Según Arévalo (1999), la etapa de floración se desarrolla luego de tres meses de la labor de trasplante, desarrollándose primero las flores masculinas y luego de un periodo de 7 a 19 días se observa el desarrollo de primordios florales femeninos.

c. Fructificación

La formación de frutos se desarrolla inmediatamente luego de la floración, logrando su completo desarrollo cuatro meses después; posteriormente inicia la etapa de maduración de frutos. Durante esta etapa el fruto presenta una variación de pigmentación que va desde el color verde al marrón oscuro o negro cenizo, que se observa como indicador de que el fruto está seco y listo para cosecharse.

La etapa de fructificación para el sachá inchi sucede entre los 119 y 182 días después del trasplante. Finalmente, la cosecha de frutos ocurre a los 7,5 meses después de la siembra aproximadamente, obteniendo una producción continua desde ese momento (Arévalo, 1999).

2.2. EL NEMÁTODO *Meloidogyne* spp.

2.2.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica proporcionada por ITIS (Integrated Taxonomic Information System) se muestra a continuación:

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Meloidoginidae

Subfamilia: Meloidogyninae

Género: *Meloidogyne*, Göldi 1892.

2.2.2. Ciclo de vida

Los nematodos del género *Meloidogyne* son considerados como patógenos endoparásitos sedentarios, los cuales tienen la capacidad de movilidad e infección solo durante sus primeros estadios, parasitando generalmente plantas vasculares.

Su ciclo de vida empieza con la ovoposición de la hembra adulta, en esta etapa el nematodo almacena los huevos dentro de una membrana o masa gelatinosa, la cual es secretada por las glándulas rectales de la hembra. Esta masa compuesta por glicoproteínas tiene la función de preservación y protección de los huevos en condiciones ambientales extremas o depredación por otros organismos (Moens et al., 2009).

Luego de la ovoposición empieza el desarrollo de los huevos con la multiplicación de células hasta poder observar los diversos estados J₂ (juvenil). Es así donde el primer estado juvenil que se presenta de forma enrollada dentro del huevo, muestra movimiento limitado y cuenta con un estilete. Al final este estado se produce la primera muda del nematodo, la cual ocurre dentro del huevo. Luego de este proceso surge el juvenil del segundo estadio (J₂) el cual rompe la membrana de huevo mediante pinchazos que realiza con su estilete (Taylor y Sasser, 1983; Karssen y Moens, 2006).

La invasión del segundo estadio juvenil en la raíz generalmente se encuentra en la región de elongación, cerca de la zona meristemática. La migración hacia adelante siempre es intercelular, el cambio de la invasión intracelular inicial a la migración intercelular se logra

mediante movimientos concentrados del estilete y la cabeza en las uniones celulares. Esta actividad finalmente da como resultado la separación de las células y permite que el nematodo J2 ingrese a la lámina media (Wyss et al.,1992).

Como resultado de la infección, el nematodo juvenil (J₂) de la segunda etapa induce la formación de células de alimentación en la planta huésped a través de señales inductivas, como las proteínas secretadas por las células de la glándula esofágica (Vovlas et al.,2005; Rutter et al.,2014).

En condiciones favorables, la etapa J₂ se traslada al juvenil de tercera etapa (J₃) después de aproximadamente 14 días, luego al juvenil de cuarta etapa (J₄) y finalmente a la etapa de adulto. El tiempo combinado para las etapas J₃ y J₄ es mucho más corto que para el J₂ o el adulto, generalmente de 4 a 6 días. Además, los estadios J₃ y J₄ carecen de un estilete funcional y no se alimentan (Moens et al., 2009).

Después del establecimiento de sitios de alimentación permanentes y que el nematodo experimenta varias mudas, este se vuelve sedentario, a excepción del nematodo macho adulto que es móvil, tiene forma vermiforme y migra fuera de la planta, mientras que una hembra adulta es globosa, tiene forma de pera con un pequeño pico, que ayuda a la ingestión de alimentos (Wyss et al., 1992).

2.2.3. Parasitismo

El nematodo del género *Meloidogyne* cuenta con la capacidad para sobrevivir a condiciones desfavorables durante sus primeros estadios, debido a que cuenta con varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, que incluyen embriogénesis tardía, quiescencia, diapausa y reservas de lípidos; estas características permiten asegurar la viabilidad hasta que se produzca la infección del huésped (Evans y Perry, 2009).

Luego de haber alcanzado el segundo estadio (J₂), la infección de los nematodos puede provocar una fuga de metabolitos en el huésped y una mayor susceptibilidad al ataque de otros patógenos que dan como resultado plantas débiles y de bajo rendimiento (Bird y Kaloshian, 2003).

Después de la penetración, los juveniles de la segunda etapa migran intercelularmente en la corteza a la región de diferenciación celular donde se asientan y comienzan a alimentarse. Los sitios de alimentación preferidos son el floema primario o las células similares a parénquima no diferenciadas adyacentes del periciclo (Eisenback y Triantaphyllou, 1991)

Según Shukla et al. (2016), a pesar que los nematodos J₂ logren penetrar la raíz con ayuda de su estilete, estos dependen de moléculas efectoras para parasitar con éxito a su huésped. Estas moléculas efectoras secretadas por las glándulas esofágicas del nematodo en la célula infectada, modulan la respuesta del huésped en su propio beneficio para que puedan vivir dentro del tejido del huésped. Las diversas funciones atribuidas a las moléculas efectoras de nematodos incluyen:

- La modificación de las paredes celulares de la planta, la supresión de las respuestas de defensa de la planta.
- La alteración de la señalización de la auxina y la poliamina.
- La imitación de las moléculas de la planta para evitar las respuestas de defensa y la regulación de la señalización de estrés.

En la Figura 4, se puede observar el ciclo biológico completo del nematodo del género *Meloidogyne*.

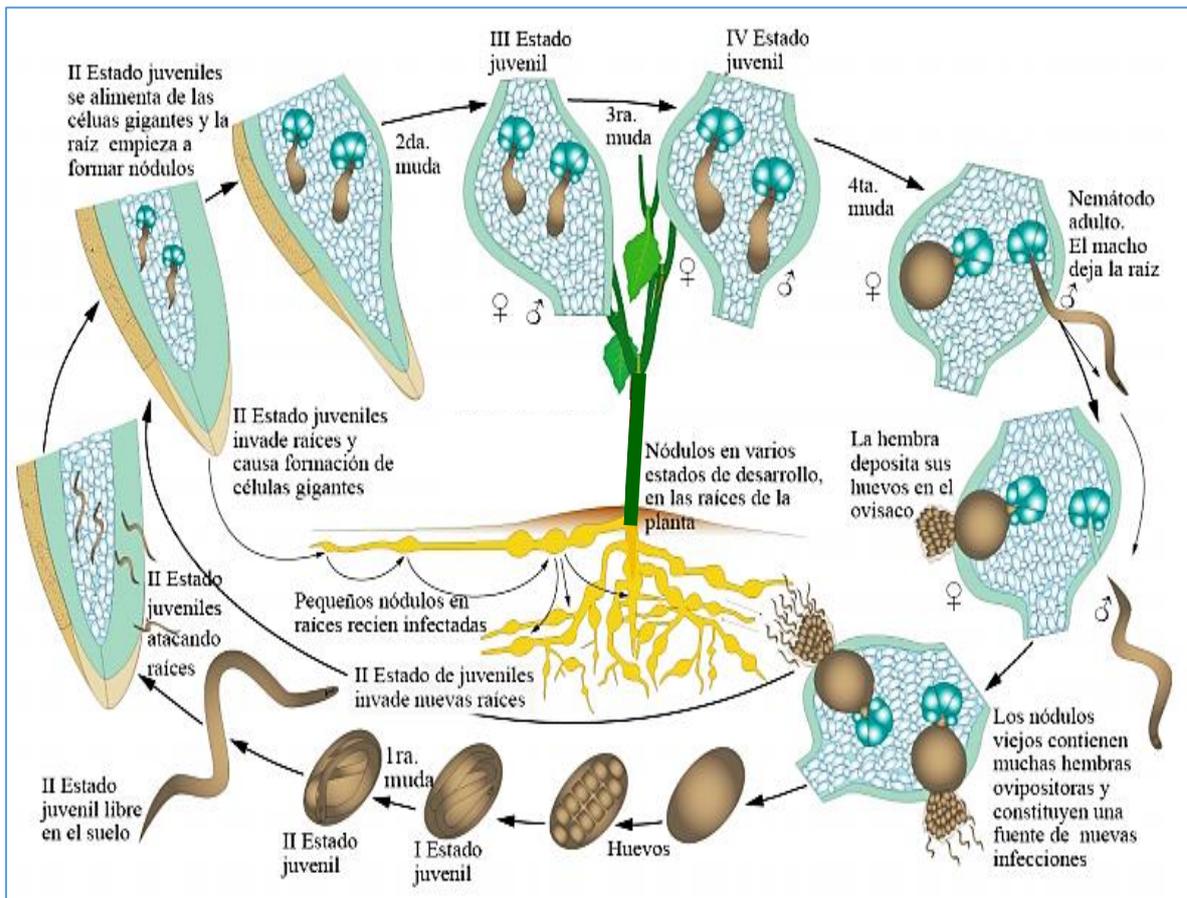


Figura 3: Ciclo biológico del nematodo del nódulo producido por *Meloidogyne* spp.

Fuente: Agrios, 2005

2.2.4. Reproducción

Diferentes estudios han demostrado que los nematodos de los nudos de las raíces han experimentado una amplia diversificación citogenética, probablemente sin paralelo a la de cualquier otro grupo animal (Triantaphyllou, 1985). Sin embargo, como la mayoría de nematodos del suelo, muchas especies de *Meloidogyne* son partenogenéticos. Algunos son partenógenos meióticos facultativos, y varias de las especies más extendidas y económicamente importantes son los partenógenos mitóticos obligados. Es así que podemos encontrar poblaciones de la misma especie de este género que puede desarrollar diferentes formas de reproducción. Es por esto que se pueden diferenciar tres tipos de reproducción dentro del género: (Chitwood et al., 2009)

- La anfimixis, en la cual los espermatozoides de los nematodos machos fertilizan los ovocitos en las hembras ocurriendo luego la meiosis.
- La partenogénesis meiótica facultativa, en la cual puede desarrollarse la anfimixis o en el caso de no estar presentes los machos.
- La partenogénesis mitótica obligada, donde no hay participación de los machos (apomixis o amixis), además solo uno de núcleos generados por mitosis se convierte en embrión.

Las especies como *M. hapla* se reproducen por partenogénesis facultativa u obligatoria. Mientras que la tendencia de la reproducción anfimíctica a la apomixis se asocia generalmente con ciclos de vida más cortos, tasas reproductivas más altas y mayor importancia como patógenos de cultivos. Solo una pequeña cantidad de especies se reproducen por anfimixis (por ejemplo, *M. carolinensis*, *M. microtyla*, *M. pini*). Siendo la reproducción apomíctica la correspondiente en las especies que presentan la mayor distribución geográfica y de mayor impacto agronómico. (Moens et al., 2009)

La fertilización cruzada obligatoria también ocurre en algunas formas diploides y poliploides (por ejemplo, *M. kikuyensis* y *M. megatyla*), mientras que la meiótica facultativa (automixis) (por ejemplo, *M. exigua*, *M. chitwoodi* y *M. graminicola*) y la partenogénesis mitótica obligatoria (apomixis) (por ejemplo, *M. incognita*, *M. enterolobii* y *M. oryzae*) prevalecen en la mayoría de las formas poliploides y aneuploides (Triantaphyllou, 1985)

Dentro de los géneros de *Meloidogyne*, como en *Globodera* y *Heterodera* no se presentan cromosomas sexuales, por lo cual la proporción de especímenes hembras o machos están relacionadas directamente con factores ambientales. Por otro lado, situaciones adversas

como escasez de alimento temperaturas extremas u otros factores ambientales pueden ocasionar la inversión sexual para la formación de nematodos macho. Sin embargo, estos nematodos no logran fecundar al ovocito, generándose finalmente una embriogénesis sin fusión. (Chitwood et al., 2009).

2.2.5. Dimensiones

La caracterización morfométrica para los especímenes macho especifica que cuenta con una longitud de 1,2 a 1,5 milímetros y un diámetro de 30 a 36 milímetros, mientras que las hembras adultas presentan con una longitud de 0,40 a 1,30 milímetros y 0,27 a 0,75 milímetros de diámetro (Agrios, 2005).

2.2.6. Síntomas

Las plantas hospedantes de *Meloidogyne* spp., muestran daño radicular propiciando un desarrollo deficiente, lo cual influye también en la producción de hojas, floración y frutos. Conllevando a una reducción en la producción del cultivo. (Agrios, 2005 y Talavera, 2003).

El síntoma característico causado en las raíces se observa en forma de agallamiento o engrosamiento de la raíz, las cuales pueden variar en tamaño dependiendo de la cantidad de hembras que albergue dicha estructura (Talavera, 2003). Por otro lado, el momento de infección de este patógeno a la planta es determinante para el efecto que cause, por lo que las plántulas infectadas pueden presentar daños considerables y puede llegar a ocasionar la destrucción total del cultivo, mientras que si la infección sucede en planta adultas solo puede presentarse efectos leves o en algún caso puede llegar a ocasionar una disminución en la producción (Agrios, 2005).

El daño ocasionado por los estiletos de los juveniles al momento del ingreso a la raíz suele tener un efecto leve, lo cual puede cambiar cuando ocurre una penetración de un gran número de especímenes en un mismo espacio (invasión masiva). Siendo el mayor efecto post infección del nematodo con la secreción inyectada a través del estilete durante su alimentación, ocasionando un crecimiento desmedido de las célula y deformación de la raíz. (Saboya, 2015).

2.2.7. Distribución

El género *Meloidogyne* cuenta con una amplia distribución debido a que cuenta con la capacidad de adaptación a condiciones adversas, alto índice reproductivo, y capacidad de conservación en material vegetativo, implementos o maquinarias para su infección en nuevas áreas (Cepeda, 1996).

Al tratarse de un género polífago con capacidad de infección en muchos cultivos y también malezas, se le considera el principal nematodo en nuestro país.

2.2.8. Importancia

El género *Meloidogyne* es considerado el nematodo de mayor importancia para el sector agrícola en todo el mundo ya que puede llegar a ocasionar graves daños en el sistema radicular de una gran diversidad de cultivos entre frutales, hortalizas, leguminosas, etc. (Torres, 2003).

Su difícil erradicación puede llegar a causar pérdidas económicas de hasta un 20% en una amplia gama de cultivos (Padgham et al., 2004).

2.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN NEMÁTODOS

Los nematodos fitoparásitos son un grupo poco estudiado por lo que en la actualidad solo se encuentra una descripción del 3 % de la nematofauna (Barker et al., 1994). Aunque ya se cuenta con una gran cantidad de especies descritas, las últimas investigaciones le dan relevancia a menos de una docena de especies fitoparásitas de las principales especies agrícolas (Powers y Harris, 1993).

Normalmente los estudios utilizados para la determinación de la diversidad biológica de nematodos están basados en características morfológicas o morfométricas de individuos o poblaciones de interés.

Tal es así que, dentro de la identificación morfológica se considera a los patrones perineales de especímenes adultos hembras como el carácter más útil para la identificación de especies. Por otro lado, el uso de las características morfométricas como la forma o tamaño de la región labial, estilete o la cola de especímenes machos o J₂ ayudan con el diagnóstico de estos individuos (Hunt y Handoo, 2009).

Sin embargo, este proceso de identificación de especies en el género *Meloidogyne* puede llegar a ser difícil, debido a la amplia variación de estas en relación a su morfometría o morfología. Este hecho puede ser ocasionada por efectos del hospedero o la existencia de una amplia gama de especies crípticas o nuevas que no cuentan con una descripción (Torres, 2018).

Ante esta dificultad, diversas investigaciones empezaron a desarrollar metodologías bioquímicas y moleculares. Para ello se ha optado por el uso de isoenzimas o anticuerpos como métodos bioquímicos. Sin embargo, existen limitantes en el desarrollo de estos procesos, ya sea por una gran variación intraespecífica para lo cual se requiere el uso de más de un sistema de enzimas o en el caso del uso de anticuerpos limitándolos a un pequeño número de especies (Blok y Powers, 2009).

Mientras que los métodos moleculares basados en el estudio de ácidos nucleicos tienen la ventaja de poder realizar la identificación de especies de todos los estadios de vida del nematodo. Además de esto, es posible almacenar la solución de ADN utilizada para futuros análisis, como también realizar el análisis de ADN de poblaciones mixtas (Powers, 2004). Motivos por los cuales este método ha sido ampliamente utilizado en sistemática de nematodos (Karajeh et al., 2010).

Asimismo, dentro de las técnicas moleculares par la identificación de especies del género *Meloidogyne* se está optando por el uso de iniciadores o primers específicos o el desarrollo de secuanciamiento de genes (Vera, 2014; Murga-Gutierrez et al., 2012).

La gran diversidad de especies y la similitud que puede existir entre estas hace necesario el uso de diferentes técnicas de identificación para una mejor obtención de información en el estudio de especies o poblaciones. Combinando técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares (Hunt y Handoo, 2009).

2.3.1. Identificación morfológica

Antiguamente se consideraban a los caracteres morfológicos o morfométricos para la identificación de las especies del género *Meloidogyne*. Siendo la caracterización morfológica el método más usado por ser un proceso rápido y práctico.

Inicialmente, el patrón perineal de la hembra adulta se convirtió en la característica morfológica más importante utilizada para la identificación de especies de este género (Eisenback et. al, 1983). Debido a que las hembras adultas son más numerosas que los

machos y más fáciles de encontrar en los tejidos infectados. La región perineal comprende el extremo de la cola, los fásmidos, las líneas laterales, el ano y la vulva rodeados de estrías o pliegues cuticulares, siendo este el rasgo más característico de las hembras (Eisenback y Triantaphyllou, 1991).

Chitwood (1949), determinó que existen variaciones en las características morfológicas (patrones perineales) en poblaciones de *M. incognita* y *M. javanica* bajo la influencia del hospedante infectado. En tal sentido, se vio necesario considerar también las características morfológicas de la región cefálica y estilete de la hembra, macho y segundo estado juvenil; así como la forma y tamaño de la cola del segundo estado juvenil. (Hirschmann, 1985; Eisenback, 1985 y Eisenback y Triantaphyllou, 1991)

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la identificación de especies basada en medidas o formas no es determinante ya que estas pueden ser variables e incluso pueden coincidir entre especies (Eisenback et al., 1983). Considerando que existe un grado de variabilidad de una población o especie en particular por lo que muchas identificaciones no son concluyentes. Por ello, es necesario considerar otros métodos de identificación complementarios a las metodologías tradicionales y se realice una caracterización rápida y precisa (Peraza et al., 2013).

2.3.2. Identificación molecular

Los últimos trabajos realizados en el diagnóstico molecular de nematodos, nos permiten definirlos como métodos específicos, sensibles y muy fiables en la identificación de diversas especies del género *Meloidogyne* a comparación de los métodos tradicionales (morfológicos y bioquímicos) que se han venido utilizando anteriormente (Onkendi et al., 2014).

La base de las técnicas moleculares es la amplificación de ADN para su posterior análisis, ya sea mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por la amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP). Estas técnicas utilizan diferentes marcadores moleculares encontrados dentro del ADN nuclear ribosomal (ADNr) (Figura 4), estos marcadores incluyen a las sub unidades 18S y 28S, y las altamente variables regiones espaciador transcrito interno (ITS) y espaciador inter génico (IGS), las cuales son las más empleadas en la sistemática del género *Meloidogyne*.

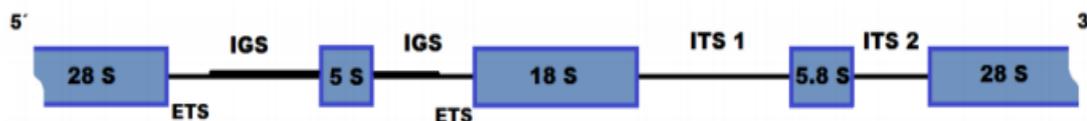


Figura 4: Diagrama del cistron ribosomal en *Meloidogyne* spp.

Fuente: Vera (2014)

A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este método permite la multiplicación exponencial de un fragmento mínimo de ADN para de ese modo obtener cantidades detectables para la identificación de la secuencia. Para el desarrollo de este proceso se requieren componentes como: un molde de ADN (material de partida), iniciadores o cebadores que delimitan la región de ADN que se quiere amplificar, el ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) y cuatro trifosfatos desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), los cuales intervienen en la síntesis de las cadenas complementarias, cofactores como el Mg²⁺ y un amortiguador (García, 2006).

Según Subbotin y Moens (2006), un iniciador o primer está conformado por una pequeña secuencia de oligonucleótidos (15-30 nucleótidos), la cual se intercepta y complementa en una de las bandas molde para iniciar la extensión o elongación de la molécula de ADN con la participación de la Taq polimerasa. Estos primers pueden ser específicos a una secuencia de ADN o pueden ser universales.

Según el procedimiento ejecutado en laboratorio se consideran tres fases en las condiciones de temperatura para el proceso:

- (a) desnaturalización (94-96 °C durante 3-4 min.)
- (b) alineamiento o unión del iniciador (55-60 °C durante 1-2 min.)
- (c) extensión o elongación de la cadena de ADN (70-72 °C durante 1-2 min.)

Pudiendo ejecutarse durante 30-40 ciclos, dando como resultado una molécula de ADN se amplificada en más de un billón de copias.

Finalmente, este producto amplificado resultantes se puede visualizar mediante el proceso de electroforesis, según su tamaño en geles de poliacrilamida o agarosa. Para que mediante la interacción con un agente colorante como el TAE o bromuro de etidio pueda producir fluorescencia bajo rayos ultravioleta (Subbotin y Moens, 2006).

Este proceso es bastante utilizado en la identificación de especies del género *Meloidogyne*, por ello lo encontramos en la ejecución de métodos como: amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), iniciadores específicos de secuencias caracterizadas de la región amplificada (SCAR), análisis de alta resolución de fusión (HRM) y PCR en tiempo real. El PCR en tiempo real presenta una mayor sensibilidad y especificidad de la identificación, además de permitir una identificación simultánea de varias especies en menor tiempo (Onkendi et al., 2014).

i. Uso de primers específicos para la identificación de especies de *Meloidogyne*

Dentro de los métodos moleculares utilizados para la identificación de especies del género *Meloidogyne* se menciona el uso de iniciadores específicos SCAR (secuencias caracterizadas de la región amplificada) (Randing et al., 2002). Zijlstra et al., (2000) utilizaron estos iniciadores, los cuales fueron diseñados a partir de la identificación y secuenciación de fragmentos RAPD de *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*.

Dicho marcador molecular es obtenido de la conversión del producto de ADN polimórfico amplificado de forma aleatoria en un sitio de secuencia fijada. Estos iniciadores específicos han sido desarrollados por diferentes investigadores para su uso en la identificación molecular de las principales especies del género *Meloidogyne* (Randing et al., 2002; Dong et al., 2001; Meng et al., 2004).

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología y Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional San Martín (UNSM)-Tarapoto, donde se caracterizaron las poblaciones de *Meloidogyne* spp. obtenidas de parcelas productivas de sacha inchi, mediante una identificación morfológica por medio de cortes perineales y una identificación por técnicas moleculares.

3.2. MATERIAL DE ESTUDIO

La especie *Plukenetia volubilis* cuenta con 72 ecotipos o accesiones, debido a la alta variabilidad genética de este material, se seleccionaron los ecotipos: Pinto Recodo, Tambo Yaguas, Muyuy y Río Putumayo, que alcanzaron los más altos rendimientos de semilla en el primer año de evaluación, según trabajos realizados por la Estación Experimental El Porvenir-Tarapoto.

Debido a que el cultivo de sacha inchi se desarrolla de forma rústica dentro de la región, no hay un control en la pureza de la semilla utilizada para la instalación de nuevas áreas de cultivo. Por lo cual es difícil identificar los ecotipos de sacha inchi presentes en cada área de estudio del presente trabajo.

3.3. COLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO

3.3.1. Zonas de muestreo

La colecta de muestras se realizó en las diferentes áreas de producción del cultivo de sacha inchi (siete provincias) en el departamento de San Martín. Estas muestras consistieron en raíces y suelo. En el Tabla 2 y Figura 5, se muestra los lugares donde se realizó la colecta de las muestras.

3.4. MUESTREO DE SUELO Y RAÍCES

La toma de muestras se realizó utilizando la siguiente metodología:

- Se seleccionaron al azar diez plantas de sachá inchi en cada parcela muestreada, se eliminaron las malezas alrededor de cada planta retirando la capa superficial del suelo.
- De cada planta se tomaron dos sub-muestras de raíces y suelo en extremos opuestos de cada planta, las cuales fueron obtenidas a 50 centímetros del tallo y a una profundidad de 30 centímetros.
- Se generó en total 10 muestras individuales de raíz y una muestra compleja de suelo de un kilogramo de toda la parcela, las muestras fueron debidamente codificadas y almacenadas; las raíces fueron colocadas dentro de un cooler que contenían bolsas de hielo (gel pack) para mantener la muestra hidratada y fresca.
- Asimismo, se realizó el registro de las coordenadas geográficas mediante una unidad portátil de posicionamiento global, y se tomó la información de campo respectiva.
- Finalmente, las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional San Martín, para su análisis, identificación y cuantificación poblacional de nematodos.

Tabla 2: Lugares de colecta de muestras raíz y suelo de parcelas de sachá inchi

N°	Provincia	Distrito	Localidad	Coordenadas	
				X	Y
1	Lamas	Pinto Recodo	Bellavista	326744	9298924
2	Lamas	Lamas	Pamashto	364263	9304792
3	Lamas	Caynarachi	Pongo de Caynarachi	364246	9304793
4	El Dorado	Santa Rosa	Santa Rosa	320043	9255682
5	El Dorado	San José de Sisa	Santa Cruz	308036	9266833
6	El Dorado	San Martín de Alao	Cashnahuasi	294275	9288349
7	El Dorado	San José de Sisa	Huaja	311348	9267909
8	Picota	Shamboyacu	Shamboyacu	375777	9225363
9	Picota	Tingo de Ponasa	Tingo de Ponasa	360507	9228421
10	Picota	Buenos Aires	Buenos Aires	353132	9249259
11	Picota	Picota	San Antonio	366525	9226748
12	Bellavista	Bellavista	Limón	329589	9219564
13	Bellavista	San Pablo	Consuelo	326533	9246512
14	Bellavista	San Pablo	Santa Victoria	3211471	9249779
15	San Martín	Chazuta	Tununtunumba	377177	9274187
16	San Martín	Banda de Shilcayo	Bello Horizonte	349403	9281229
17	San Martín	Morales	Morales	347524	9282591
18	Rioja	Elías Soplín Vargas	Segunda Jerusalén	249116	9337612
19	Moyobamba	Moyobamba	Rafael Belaunde	252022	9361071

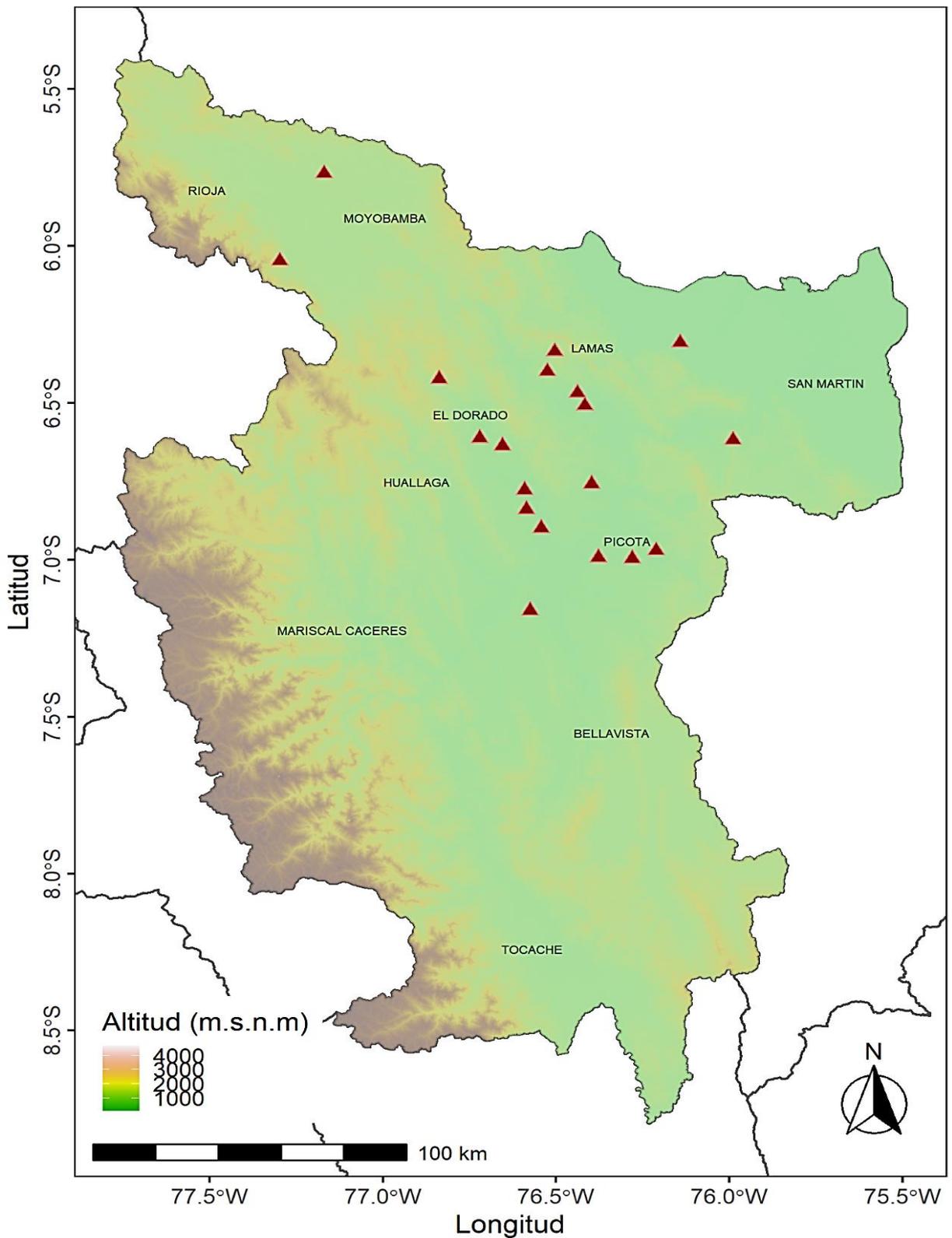


Figura 5: Ubicación geográfica de los lugares de colecta de muestras en parcelas de sachá inchi en siete provincias del departamento de San Martín, para la identificación de especies de *Meloidogyne* spp.

3.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS RADICULARES

3.5.1. Lavado y selección de raíces

Se realizó el lavado de raíces para eliminar los restos de tierra impregnados, evitando el desprendimiento de las masas de huevos. Posteriormente se descartaron las raíces pertenecientes a malezas u otros cultivos de la zona y finalmente se pesaron 10 gramos (Figura 6) y se almacenaron en envases de plástico cubiertas de papel toalla húmeda a temperatura ambiente, para luego proceder con los siguientes procedimientos.



Figura 6: Lavado y pesado de raíces de sachá inchi obtenidas de campo.

3.5.2. Evaluación de nivel de nodulación de *Meloidogyne* spp. en raíces

Coyne et al. (2007) detalla que es posible hacer estimaciones visuales de daños por nematodos en raíces obtenidas en muestreos de campo, usando un procedimiento de categorización visual. Para lo cual es necesario desarrollar una escala de nodulación en raíces para el cultivo en específico.

Es por ello, que para el presente trabajo y con el objetivo de determinar el nivel de daño en las raíces muestreadas, se desarrolló un índice porcentual de raíces con nodulación ocasionado por *Meloidogyne* spp. en sachá inchi (Figura 7). Con la escala propuesta se pudo evaluar 10 raíces de cada muestra con una longitud de 10 centímetros las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente.

Finalmente se obtuvieron datos categóricos del nivel de nodulación por cada planta muestreadas en campo.

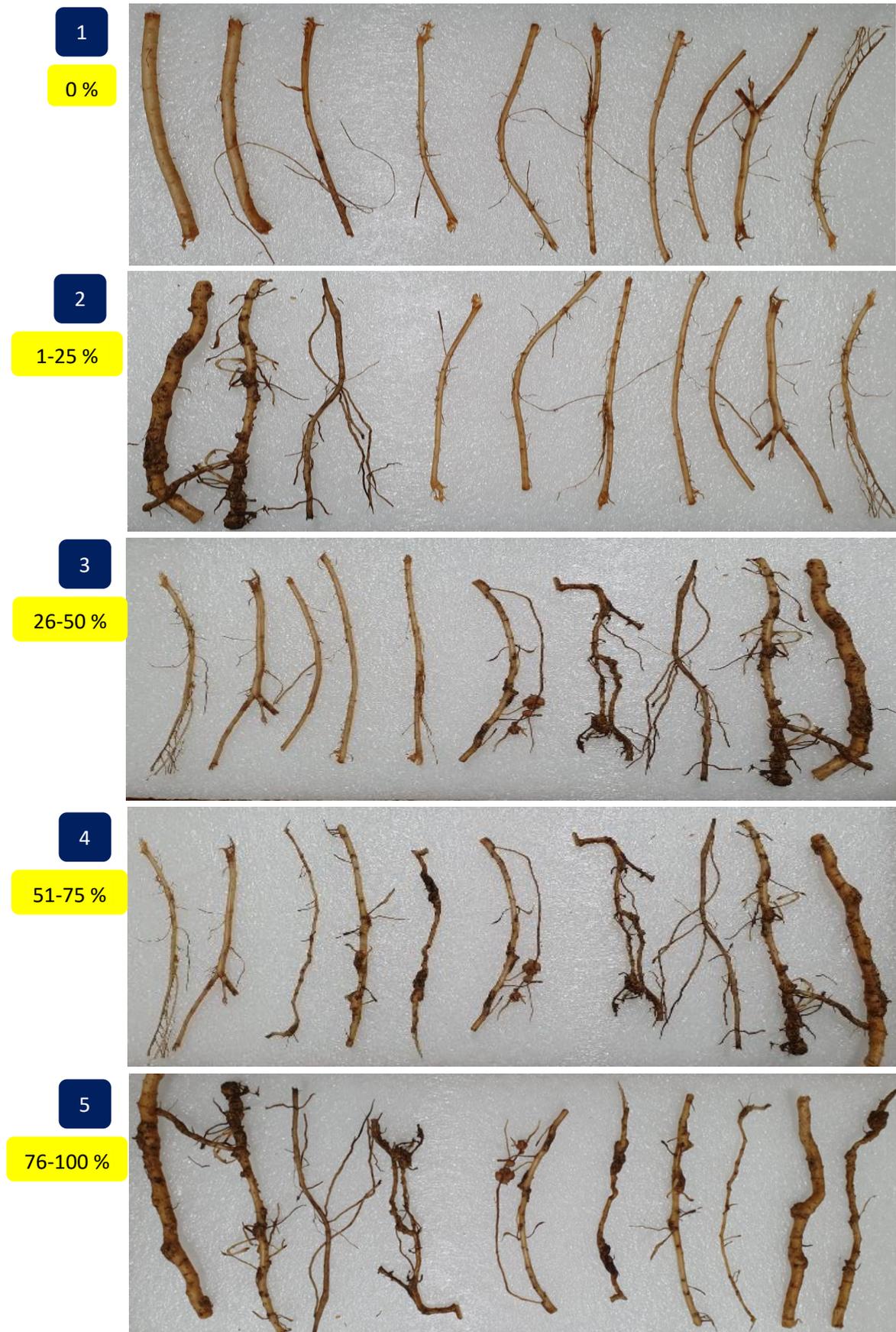


Figura 7: Escala de nivel nodulación de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi.

3.5.3. Extracción de hembras adultas de *Meloidogyne spp.*

La extracción de hembras adultas de las raíces noduladas se realizó para desarrollar la identificación morfológica e identificación molecular de las diferentes especies de *Meloidogyne* que podrían estar presentes en las muestras obtenidas de campo.

Para ello se requirió el uso de un microscopio estereoscópico y agujas de disección, los cuales permitieron la ruptura del tejido afectado y la extracción intacta de los nematodos hembra para su posterior almacenamiento (Figura 8A).

En el caso de la identificación morfológica por medio de cortes perineales, se requirió 10 nematodos hembra de cada muestra obtenida de campo los cuales fueron almacenados a temperatura ambiente en tubos Eppendorf de 0.5 ml con ácido láctico al 45 %, donde permanecieron por al menos 24 horas (Figura 8B).

Mientras que para la identificación molecular por técnica de PCR se requirió 10 nematodos hembra de cada muestra los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf de 0.5 ml con 5 ul de agua ultrapura estéril, dichos tubos fueron almacenados inmediatamente en el ultracongelador a -80 °C hasta su posterior uso (Figura 8C).

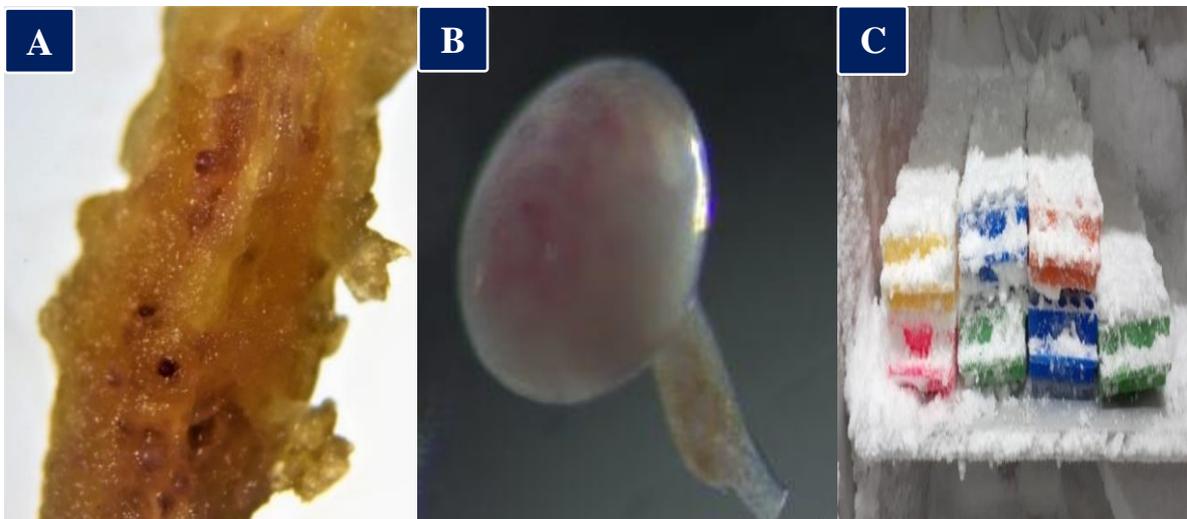


Figura 8: Extracción de especímenes hembras de *Meloidogyne* para su identificación morfológica e identificación por técnica molecular. A y B: Disección de raíz para la extracción de las hembras adultas, C: Almacenamiento de hembras adultas en tubos Eppendorf según el proceso a los que están destinados.

3.5.4. Procesamiento y extracción de especímenes del segundo estadio (J₂) de *Meloidogyne* spp. de raíces

Se evaluó la población de nematodos J₂ de cada muestra de raíz (10 gramos), para esto se desarrolló la combinación de dos métodos de extracción de nematodos: Método de Hipoclorito de sodio al 0.5 por ciento (Coolen, 1979; Stetina et. al, 1997; Rojas y Salazar, 2013) seguido por el método de bandeja o método del embudo de Baerman modificado (Hooper, 1990) los cuales se desarrollaron con los siguientes pasos (Figura 9):

1. Se procedió a picar finamente las raíces en trozos pequeños aproximadamente de 2 cm de longitud.
2. Seguidamente estos tejidos fueron colocados en una solución de 100 ml de hipoclorito de sodio al 0.5 % y licuados durante tres repeticiones de 15 segundos cada una.
3. Luego se colocó la solución generada en un tamiz de malla de 250 micras, recibiendo la suspensión de huevos en un tamiz de malla de 38 micras; los especímenes retenidos en el tamiz se juntaron y se vaciaron a un vaso Beaker.
4. La solución obtenida fue colocada sobre un filtro de malla y papel toalla sostenidos por una placa Petri; se mantuvo este sistema durante 2 días, periodo en que demora la eclosión de huevos para obtener juveniles del estadio 2 (J₂).
5. Luego con ayuda de un estereoscopio se cuantifico la concentración de J₂, para lo cual se completó la solución con agua hasta alcanzar 100 ml y se homogenizo usando un agitador magnético para después tomar tres alícuotas de 3 ml cada una, transfiriéndolas a placas de conteo.
6. Los datos obtenidos de las tres lecturas se promediaron y se determinó finalmente la cantidad de juveniles (J₂) en la solución total (100 ml).



Figura 9: Método de extracción de juveniles del segundo estadio (J₂) del género *Meloidogyne* presentes en raíces de sachá inchi. A y B: Picado y licuado de raíces en solución de hipoclorito de sodio al 0.05 %, C: Método de la bandeja para obtener especímenes J₂ de *Meloidogyne*, D y E: Homogenización de solución final y conteo de nematodos J₂.

3.6. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE *Meloidogyne* spp.

3.6.1. Montaje de hembras de *Meloidogyne* spp.

La identificación morfológica de los nematodos presentes en las raíces noduladas se desarrolló mediante el método basado en la morfología de patrones perineales de las hembras adultas.

Se realizaron los cortes de los patrones perineales (Figura 10) siguiendo la metodología propuesta por Sasser y Carter (1985) con algunas modificaciones como se detalla a continuación:

1. Con la ayuda del microscopio se ubicó el diseño perineal en la hembra madura y se procedió a cortarlo en forma rectangular hasta donde sea posible.
2. Se realizó la limpieza del corte obtenido con ácido láctico al 45 % para eliminar completamente los restos viscerales.
3. Luego se utilizó tinta Parker al 5 % para lograr la tinción de los cortes.
4. Finalmente, los cortes perineales se colocaron en un portaobjetos conteniendo una pequeña gota de PVLG (alcohol polivinílico lactoglicerol), orientando la parte interna hacia abajo dejando la vulva del diseño en contacto con el cubreobjetos para luego codificar la muestra.

3.6.2. Identificación de patrones perineales

Para la evaluación de cada corte perineal (Figura 11) montado se usó un microscopio trilocular. La interpretación de estas observaciones se realizó según las características e ilustraciones descritas por varios autores (Taylor y Sasser, 1983; Eisenback, 1985; Hunt y Handoo, 2009).

Los caracteres morfológicos del patrón perineal usados en la identificación fueron: arco dorsal (alto, bajo redondeado, aplanado), líneas laterales (presentes o ausentes), forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag) y región perivulvar. Estos caracteres particulares que permitieron llegar a una identificación de especies se mencionan en el Tabla 3 y Figura 12. Asimismo, se puede observar el modelo de patrón perineal de las especies en estudio en la Figura 13.

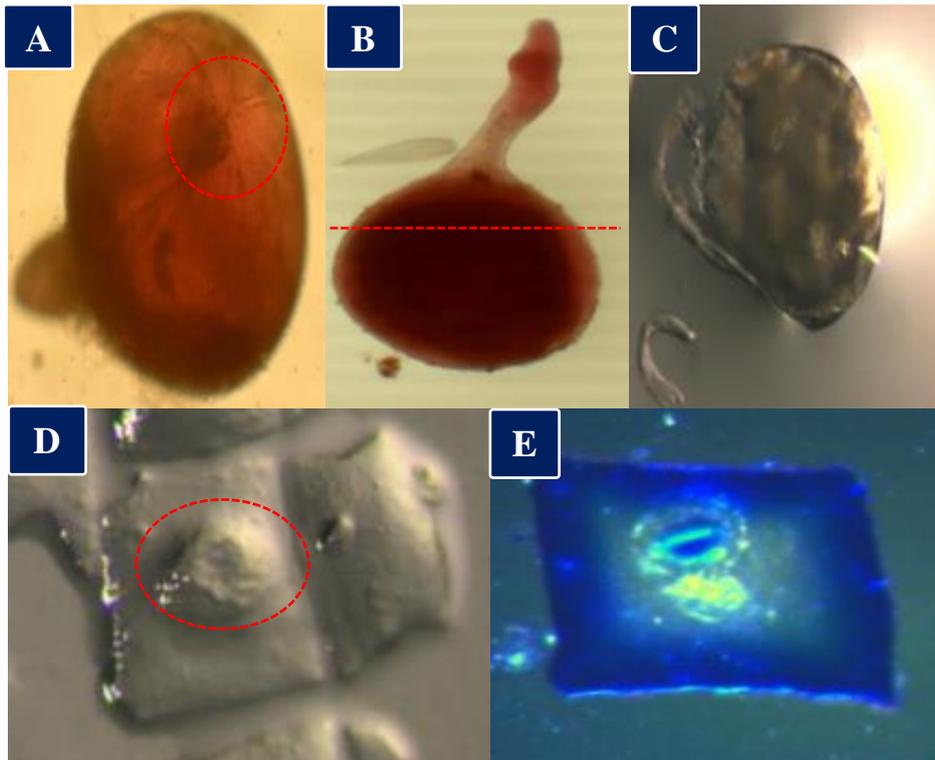


Figura 10: Corte del patrón perineal en nematodos hembra del género *Meloidogyne* para realizar su identificación morfológica. A: Hembra adulta conservada en ácido láctico al 45 %, B y C: Ubicación del patrón perineal y corte en forma rectangular alrededor de este, D y E: Limpieza del corte perineal con una gota de ácido láctico al 45 % y posterior tinción con tinta Parker al 5 %

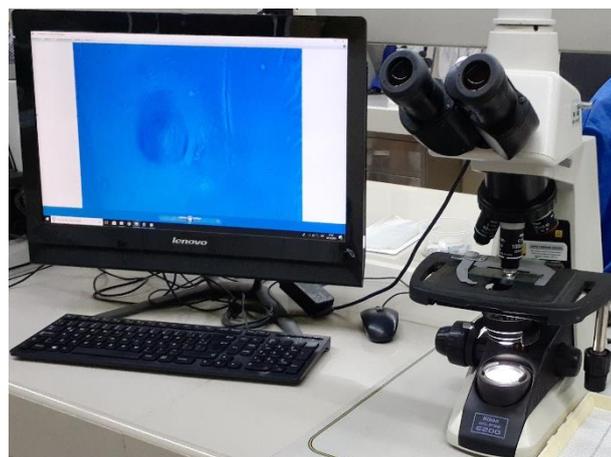


Figura 11: Visualización e identificación microscópica de especies de *Meloidogyne* según patrón perineal.

Tabla 3: Características usadas para la identificación de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. exigua* basadas en el patrón perineal

Especie	Arco dorsal	Campo lateral	Estrías	Región perivulvar
<i>M. incognita</i>	Alto y cuadrado	Las líneas laterales no están claramente visibles pero el campo lateral puede estar marcado por roturas y horquillas en las estrías	Son gruesas y ampliamente espaciadas, a veces en zigzag.	A menudo, algunas estrías se doblan hacia los bordes de la vulva.
<i>M. javanica</i>	Bajo y estrecho	Contienen crestas o líneas laterales que dividen las estrías dorsales y ventrales	Son lisas a ligeramente onduladas, moderadamente finas	Algunas estrías pueden doblarse hacia los bordes de la vulva.
<i>M. arenaria</i>	Bajo y aplanado	Cresta lateral ausente. Las estrías dorsal y ventral a menudo se encuentran en ángulo en las líneas laterales	Son gruesas y lisas a onduladas. Las estrías dorsales con ondulaciones pronunciadas, formando una “hombreira” en el arco.	Algunas estrías pueden inclinarse hacia la vulva.
<i>M. exigua</i>	Bajo y redondeado o	Son generalmente discretos y solo se bifurcan indistintamente. Las regiones de la línea lateral interna pueden tener estrías gruesas, elevadas, en bucle y plegadas.	Son gruesas y ampliamente espaciadas, lisas, rotas y plegadas en regiones laterales.	Algunas estrías pueden doblarse hacia los bordes de la vulva.

Fuente: Descripción realizada por Eisenback et. al, 1981; Eisenback et. al, 1985; Eisenback y Triantaphyllou, 1991; Hunt y Handoo, 2009.

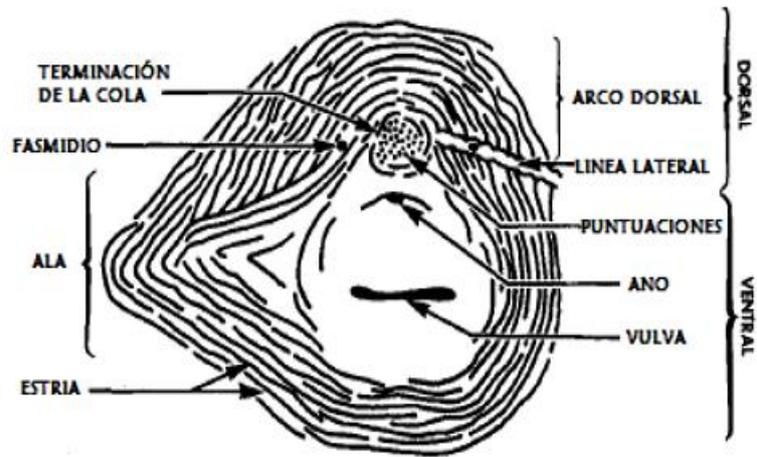


Figura 12: Esquema del patrón perineal de hembras de *Meloidogyne* spp.
Fuente: Eisenback et al. (1981)

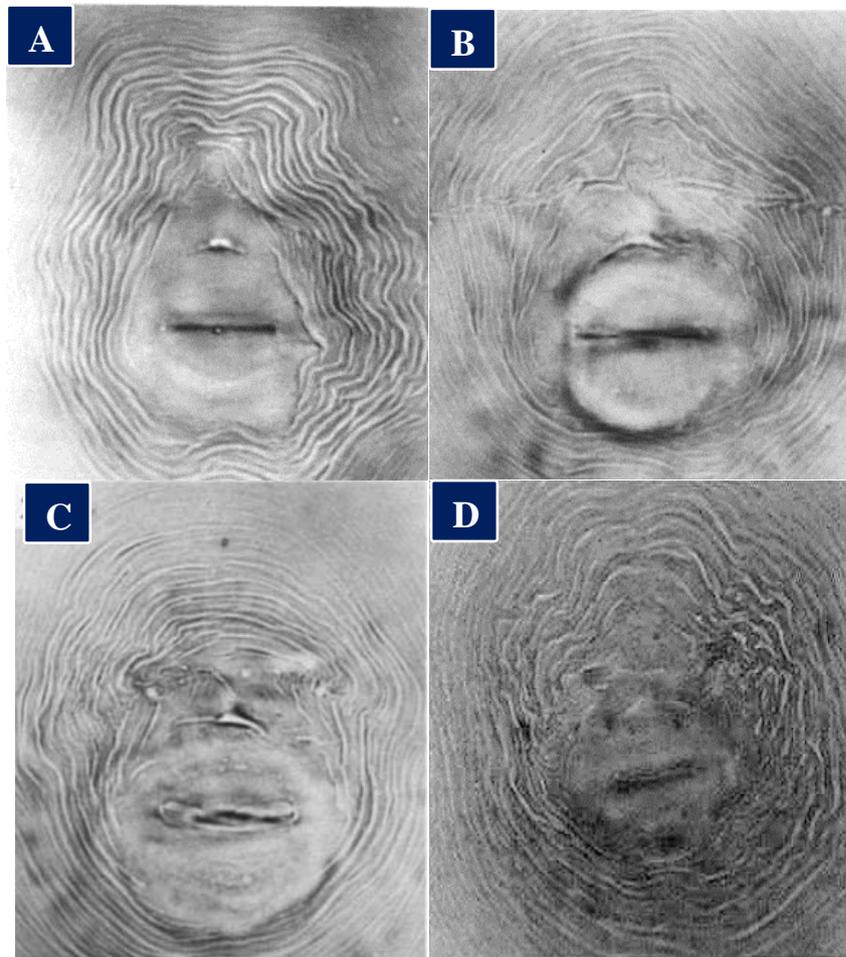


Figura 13: Modelos perineales de *Meloidogyne* spp. reportadas por Eisenback et al. (1981) y Eisenback y Triantaphyllou (1991). A: Patrón perineal de *M. incognita*, B: *M. javanica*, C: *M. arenaria* y D: *M. exigua*.

3.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Meloidogyne* spp. MEDIANTE PCR

3.7.1. Extracción de ADN de especímenes hembras de *Meloidogyne* spp.

El procedimiento de extracción de ADN genómico de especímenes hembras del género *Meloidogyne* (Figura 14) fue desarrollado con el Método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) propuesto por Doyle y Doyle (1987) modificando las cantidades de los reactivos. A continuación, se detalla la metodología utilizada:

- * Se trituraron los 10 nematodos hembras en una solución del Mix CTAB en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, hasta conseguir una solución rojiza uniforme.
- * Se agregó proteinasa K (-20 °C) para luego vortecear la muestra e incubarlo en baño María a 60°C durante 4 horas.
- * Se agregó cloroformo, se mezcló suavemente por inversión durante 5 minutos y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos.
- * Se tomó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 0.5 ml.
- * Se agregó isopropanol (-20 °C), se mezcló suavemente por inversión durante 2 minutos. Congelar durante 8 horas a -20 °C.
- * Se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el líquido sin perder el pellet (ADN).
- * Se agregó etanol al 70 % (-20 °C) y se centrifugo a 13 000 rpm durante 15 minutos. Se desechó la solución y se repitió una vez más.
- * Se secó el pellet a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.
- * Finalmente, se re-suspendió el pellet en agua miliQ para almacenarlos a 4 °C durante 2 horas. Luego se almaceno definitivamente a -80 °C hasta su posterior uso.

3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

a. Controles positivos

Los controles positivos que fueron necesarios para la identificación de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. exigua* fueron obtenidos a partir de la extracción de ADN de nematodos hembras provenientes de cultivos puros instalados en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional San Martín. Dichos cultivos puros se obtuvieron fruto a anteriores trabajos de investigación desarrollados en el cultivo de sachá inchi y café.

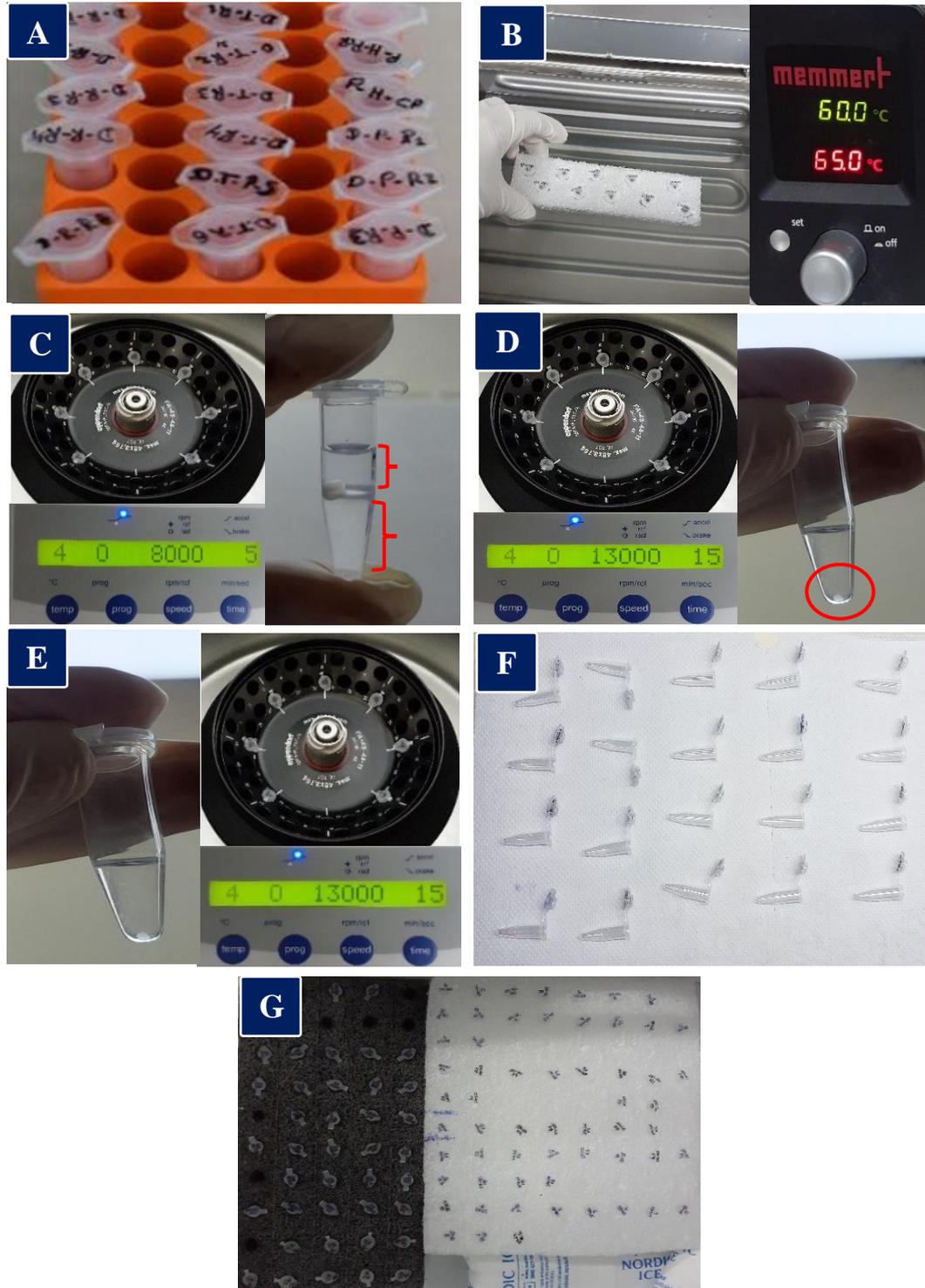


Figura 14: Método de extracción de ácidos nucleicos CTAB a partir de nematodos hembra del género *Meloidogyne*. **A:** Trituración de nematodos hembras con Mix de CTAB, **B:** Incorporación de Proteinasa K e incubación en baño maría a 65 °C por 4 horas, **C:** Incorporación de cloroformo y centrifugación (se observan dos fases), **D:** Incorporación de Isopropanol, incubación a – 20 °C y centrifugación, **E:** Lavado de pellet con etanol al 70% y centrifugación (dos veces), **F:** Secado de pellet a temperatura ambiente, **G:** Suspensión de pellet en agua miliQ y almacenamiento a -20 °C.

b. Cuantificación y dilución de ADN

Se evaluó la concentración y calidad de ADN genómico (Figura 15) obtenido de las muestras para determinar la posibilidad de uso y dilución necesaria de cada muestra para generar una homogenización en las concentraciones. Para esta labor se hizo uso de un NanoDrop One^C.

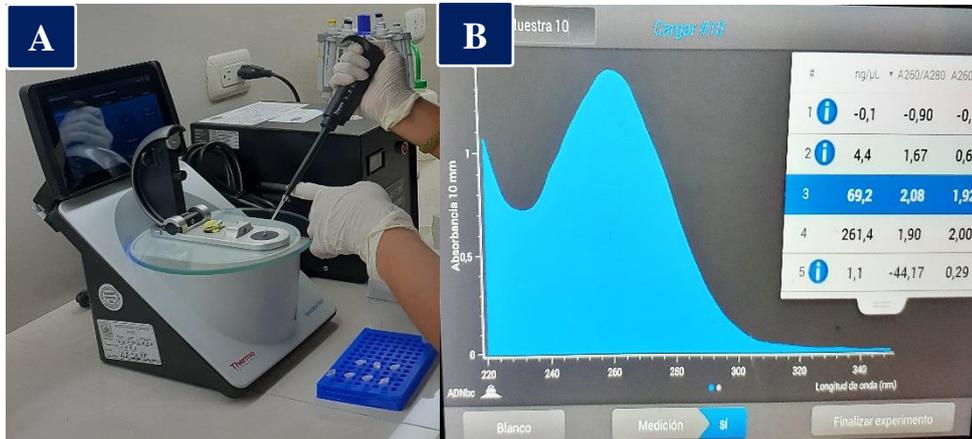


Figura 15: Medición de concentración y calidad de ADN. A y B: Colocación de muestra de ADN y visualización de espectro de absorbancia.

c. Estandarización de condiciones de PCR para la amplificación de los iniciadores SCAR

Para la determinación de primers específicos SCAR a utilizar en la identificación de especies de *Meloidogyne* se realizó un análisis de trabajos de investigación relacionados al diseño y validación de primers SCAR para la detección de especies de *Meloidogyne*. Los primers seleccionados se indican en el Tabla 4 y Figura 16.

En el establecimiento de las condiciones óptimas para lograr una amplificación adecuada del segmento de ADN específico (segmento diana) con cada primer, fue necesario realizar varias pruebas, en las cuales se evaluó temperaturas de alineamiento de los primers y concentraciones de reactivos para la generación de un protocolo bajo las condiciones de laboratorio existentes. Dichas pruebas se realizaron en el termociclador ProFlexTM compuesto por tres bloques con 32 pocillos cada uno. Las condiciones finales se muestran en la Figura 17.

Una vez estandarizado el protocolo se procedió a desarrollar las pruebas de PCR para cada muestra de ADN de nematodos obtenidos, para lo cual inicialmente se preparaba un mix de reactivos mencionados en la Tabla 5 añadiéndose posteriormente la muestra de ADN para luego ser colocados en el termociclador (Figura 18).

Tabla 4: Iniciadores utilizados para la identificación de *Meloidogyne* spp.

Especie	Nombre	Secuencia de iniciadores (5'-3')	Fuente	Fragmento amplificado
<i>M. incognita</i>	Mi2F4 / Mi1R1	ATGAAGCTAAGACTTTGGGCT/ TCCCGCTACACCCTCAACTTC	Kiewnick (2013)	300 pb
<i>M. arenaria</i>	Far/Rar	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC /TCGGCGATAGACACTACAACCT	Zijlstra et al. (2000)	420 pb
<i>M. javanica</i>	-	ACGCTAGAATTTCGACCCTGG/ GGTACCAGAAGCAGCCATGC	Meng et al. (2004)	517 pb
<i>M. exigua</i>	exD15-F /exD15-R	CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG/ CTCCGTGGGAAGAAAGACTG	Randing et al. (2002)	562 pb

Tabla 5: Concentración final de reactivos para PCR

Reactivo	[F]
Buffer	1X
dNTPs	0.2 mM
Primer-Fv	0.4 µM
Primer-Rv	0.4 µM
Agua PCR	-
GO taq	0.025 U/ µl
Volumen de reacción	15 µl

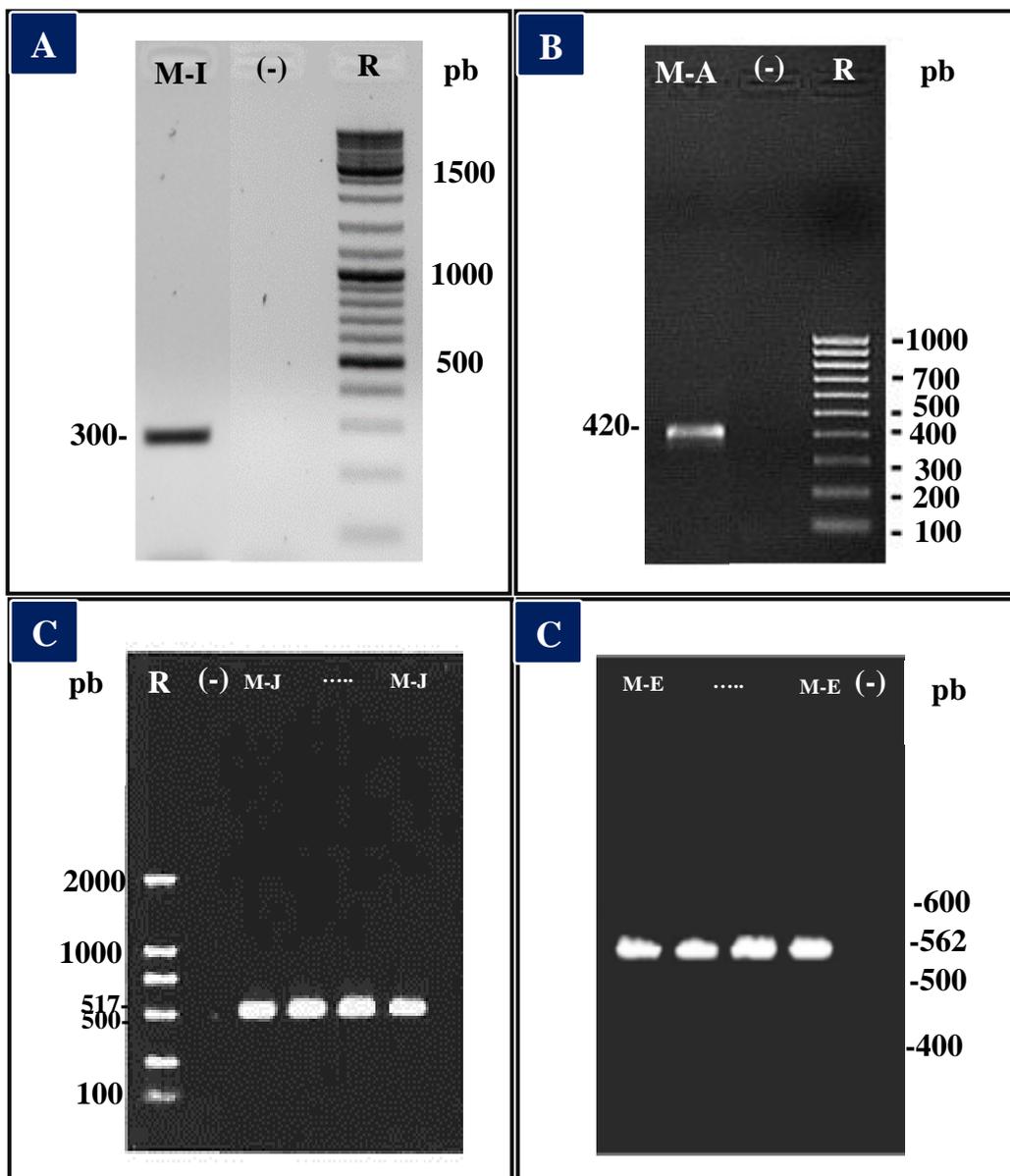


Figura 16: Patrones de amplificación de cuatro especies de *Meloidogyne* generados con los cebadores específicos del SCAR. **A:** Amplificación de primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb) específico para *M. incognita*, **B:** Amplificación de primer -/- (420 pb) específico para *M. arenaria*, **C:** Amplificación de primer Mjav / Mjav (517 pb) específico para *M. javanica* y **D:** Amplificación de primer exD15F/ exD15R (562 pb) específico para *M. exigua*.

Fuente: Kiewnick (2013), Zijlstra et al. (2000), Meng et al. (2004) y Randing et al. (2002)

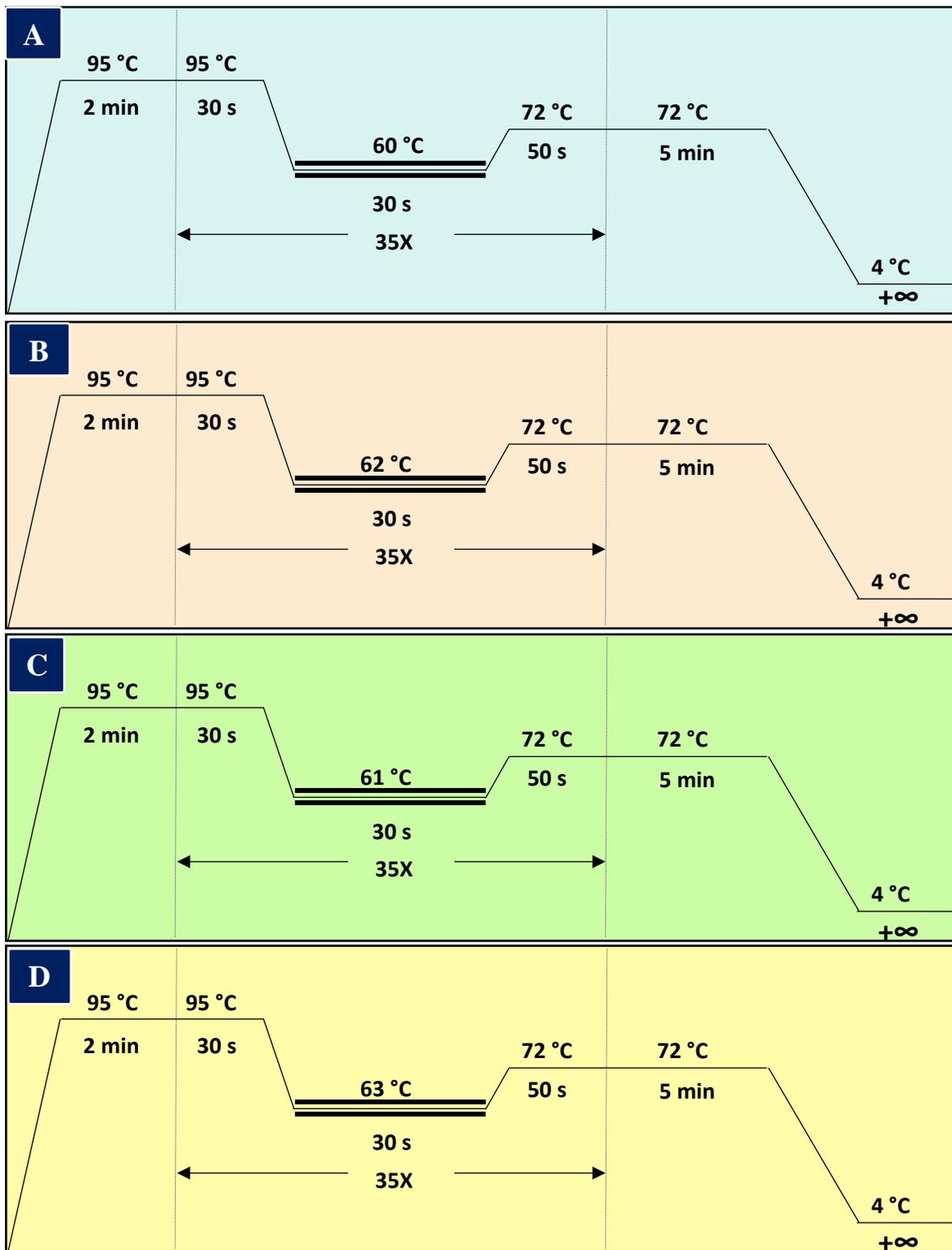


Figura 17: Condiciones para PCR para 4 primers SCAR específicos para especies del género *Meloidogyne*. A: Utilizando el primer Mi2F4-Fv / Mi1R1-Rv para *M. incognita*, B: Utilizando el primer para identificar *M. javanica*, C: Utilizando el primer Far-Fv/Rar-Rv para *M. arenaria*, D: Utilizando el primer exD15-Fv /exD15-Rv para *M. exigua*.

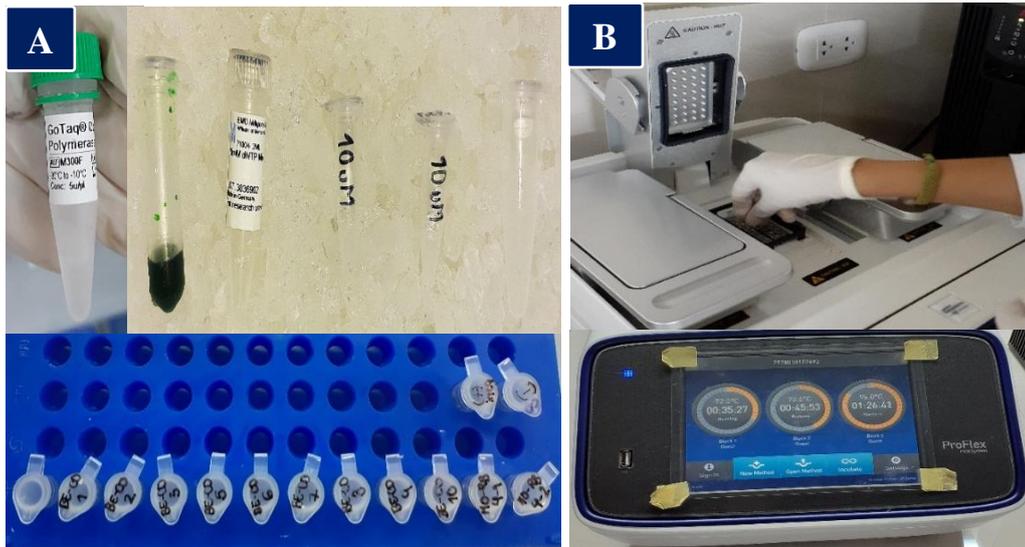


Figura 18: Técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). A: Reactivos necesarios para la elaboración del Mix PCR y su distribución para cada muestra de ADN obtenido de nematodos hembra, B: Colocación de tubos Eppendorf (reactivos +ADN) en el termociclador programando las condiciones para cada primer utilizado.

d. Visualización de ADN amplificado por electroforesis

Se tomó 12 µl de producto amplificado por reacción y se analizaron en un gel de agarosa al 1.2 por ciento, en amortiguador TAE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1500 pb. La electroforesis fue llevada a cabo en una cubeta electroforética horizontal a 90 voltios y 180 mA por 30 minutos, para luego revelar el gel por medio de un fotodocumentador OmniDOC (Figura 19).

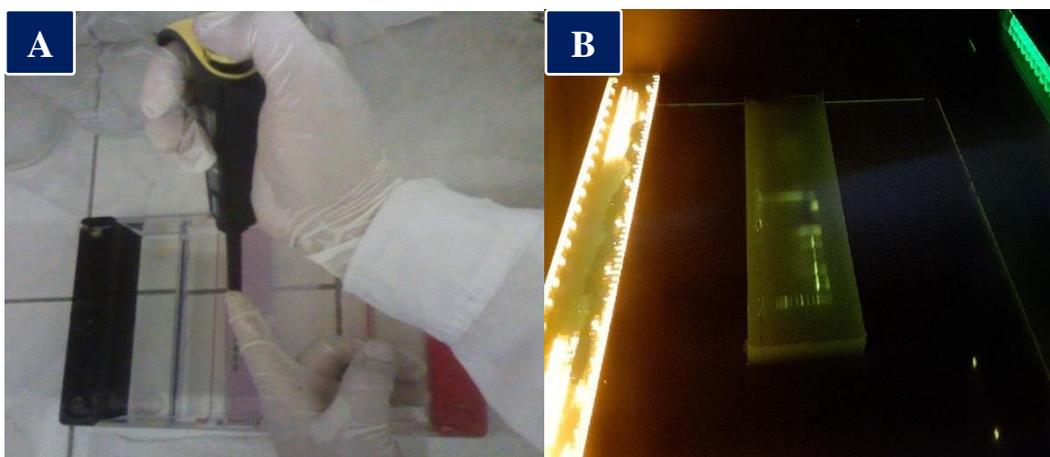


Figura 19: Siembra de producto PCR en gel de agarosa al 1.2 % y posterior visualización de amplificación de productos PCR en el fotodocumentador.

3.8. VARIABLES EVALUADAS

Las variables de evaluación consideradas para esta investigación se dividieron en cinco grupos: datos agronómicos de la parcela, datos climáticos de la zona, datos edáficos de la parcela, datos topográficos y datos de nematodos del género *Meloidogyne* obtenidos en campo. En la Tabla 6 se puede observar las variables evaluadas correspondientes a cada grupo.

Tabla 6: Grupos de clasificación de las variables evaluadas a nivel de campo y laboratorio

Datos Agronómicos	Datos climáticos
<ul style="list-style-type: none">• Cultivos asociados• Sistema de cultivo (sin/con tutor)• Edad del cultivo• Cultivo anterior	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura atmosférica máxima• Temperatura atmosférica mínima• Humedad atmosférica (%)• Precipitación (mm/mes)
<p style="text-align: center;">Datos edáficos</p> <ul style="list-style-type: none">• pH• CE (Conductividad eléctrica)• CIC (Capacidad de intercambio catiónico)• K (potasio)• P (fosforo)• Arena, Limo, Arcilla (%)• Cationes (Mg, CaCO₃, K₂, Ca, Na, Al.H)• MO (materia orgánica)	<p style="text-align: center;">Datos Topográficos</p> <ul style="list-style-type: none">• Altitud (msnm) <p style="text-align: center;">Datos Nematológicos</p> <ul style="list-style-type: none">• Densidad poblacional de nematodos(J₂)• Nivel de nodulación en raíces

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a las características de los datos obtenidos en campo y laboratorio, el presente trabajo de investigación no se adecuó a un diseño experimental específico. Sin embargo, con el fin de dar una buena interpretación de los datos se utilizaron algunas técnicas estadísticas que se adecuaron a la naturaleza de nuestros datos.

Para analizar las diferencias entre los valores de densidad poblacional de nematodos de cada parcela muestreada en cada provincia de estudio se realizó una prueba no paramétrica Kruskal–Wallis para determinar las diferencias entre las categorías (distritos). Cuando se encontraron diferencias significativas entre las categorías se utilizó una prueba de comparaciones múltiples (Test de Dunnet) para determinar entre qué categorías existían dichas diferencias. Se consideró un grado de significancia de 0.05 para estas pruebas.

Por otro lado, para examinar los efectos de varios factores o variables predictoras (datos agronómicos, datos climáticos, datos topográficos y datos edáficos) mostrados en la Tabla 6, sobre la variable respuesta densidad poblacional de nematodos (J_2 en 10 g de raíz) se utilizaron modelos lineales generalizados o GLMs por sus siglas en inglés.

Para la generación de estos modelos se vio necesario estandarizar las variables numéricas ya que presentaban una gran diferencia en su magnitud. Por otro lado, se realizó la transformación de los predictores categóricos a variables ficticias para poder realizar el análisis en conjunto. Además, para el caso de las variables numéricas dentro de cada conjunto de datos se realizó una prueba de colinealidad basada en el factor de inflación de varianza (VIF), mediante el cual se excluyeron las variables que presentaron un VIF valor > 3 buscando minimizar los efectos de colinealidad sobre el modelo final.

Teniendo en cuenta, que el estudio realizado considero veinticuatro posibles variables predictoras divididas en cuatro grupos, se optó por desarrollar un procedimiento de selección de variables mediante la regresión Stepwise, el cual nos permite obviar las variables que no tengan un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta.

Obteniendo finalmente un modelo reducido con las variables predictoras necesarias para explicar la fluctuación poblacional de nematodos (J_2) en las zonas de estudio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* Y LA RELACIÓN CON EL GRADO DE DAÑO EN RAÍCES DE SACHA INCHI

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de densidad poblacional de nematodos del género *Meloidogyne* spp. y el grado de daño que presentaron las raíces de sachá inchi obtenidas de campo, para cada parcela muestreada agrupadas por provincia de estudio.

Para la comparación de medias de la densidad poblacional se utilizó la Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un nivel de significancia ($p > 0.05$), asimismo se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para los datos obtenidos en cada distrito si fuese necesario. Adicionalmente se crearon tablas en las que se muestra el promedio, valor máximo y mínimo de J_2 de la evaluación de 10 plantas en cada parcela o distrito. Mientras que para la determinación de la relación de la densidad poblacional y grado de daño en raíces se hizo uso de un Modelo lineal generalizado (GLM).

La totalidad de datos originales de la evaluación de densidad poblacional en cada planta se presentan en el Anexo 1,2 ,3 ,4 ,5 y 6.

4.1.1. Densidad poblacional (J_2) por provincia

a. Lamas

Para esta provincia solo se realizaron muestreos en 3 localidades y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 7 ahí se observa que la localidad de Pongo de Caynarachi del distrito de Barranquita alcanza la mayor densidad poblacional de nematodos juveniles del segundo estadio (J_2) con valores promedio de $311 \pm 74 J_2/10$ gr raíz, mientras que por lo contrario la localidad de Pamashto distrito Lamas presento el menor valor promedio de población de nematodos con $85 \pm 42 J_2/10$ gr raíz.

A pesar de esto la prueba de Kruskal-Wallis (Anexo 7) determinó que no existen diferencias significativas entre las densidades poblacionales de J_2 promedio del género *Meloidogyne* spp. en las diferentes localidades de estudio de esta provincia obteniendo un $p = 0.1224$.

Tabla 7: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia de Lamas

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio \pm Error estándar
Barranquita	Pongo de Caynarachi	0.0	617	311 \pm 74
Pinto Recodo	Bellavista	0.0	628	148 \pm 60
Lamas	Pamashto	0.0	426	85 \pm 42

b. El Dorado

En la provincia El Dorado se obtuvo los datos poblacionales de nematodos (J_2) de cuatro localidades, los cuales se muestran en la Tabla 8, donde se observa que la parcela que obtuvo el más alto nivel poblacional de nematodos (J_2) fue la perteneciente a la localidad de Huaja con 506 \pm 78 $J_2/10$ gr raíz, seguida por un valor cercano, la localidad de Santa Rosa con 485 \pm 40 $J_2/10$ gr raíz. Mientras que las localidades de Santa Cruz y Cashnahuasi mostraron los niveles más bajos de población, con valores de 175 \pm 49 $J_2/10$ gr raíz y 124 \pm 88 $J_2/10$ gr raíz respectivamente.

Tabla 8: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia El Dorado

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio \pm Error estándar
San José de Sisa	Huaja	133	967	506 \pm 78
Santa Rosa	Santa Rosa	333	717	485 \pm 40
San José de Sisa	Santa Cruz	0	412	175 \pm 49
San Martín de Alao	Cashnahuasi	0	825	124 \pm 88

Asimismo, se encontró diferencias significativas entre los valores de densidad poblacional de nematodos (J_2) de las cuatro parcelas de sachá inchi muestreadas (Prueba de Kruskal – Wallis, $\rho=0.0003$). Por lo cual se realizó pruebas de comparaciones múltiples usando el Test de Dunnet (Anexo 8), en donde comprueba estadísticamente no existen diferencias entre las dos parcelas con mayor promedio de J_2 (Localidad de Huaja y Santa Rosa), los mismo que ocurre con ambas parcelas de menor promedio (Localidad de Santa Cruz y Cashnahuasi).

c. Picota

En la provincia Picota se obtuvieron valores de densidad poblacional de nematodos (J_2) en cuatro localidades, como se muestra en la Tabla 9 en la localidad San Antonio se encontró el valor más alto con $1441 \pm 342 J_2/10$ gr raíz y el menor valor en la localidad Tingo de Ponaza con $297 \pm 96 J_2/10$ gr raíz.

Al encontrar diferencias en los valores se optó por realizar una Prueba de Kruskal – Wallis (Anexo 9). Sin embargo, los resultados mostraron que los valores obtenidos en las cuatro localidades no cuentan con diferencias estadísticamente significativas ($\rho= 0.149$).

Tabla 9: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de provincia Picota

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio \pm Error estándar
Picota	San Antonio	0	2693	1441 ± 342
Shamboayacu	Shamboayacu	0	1544	664 ± 201
Buenos Aires	Buenos Aires	0	2689	647 ± 296
Tingo de Ponasa	Tingo de Ponasa	0	822	297 ± 96

d. Bellavista

Los valores de densidad poblacional de nematodos obtenidos en las tres parcelas muestreadas en la provincia de Bellavista plasmadas en la Tabla 10 muestran que la parcela ubicada en la localidad de Limón presenta el mayor valor con $1128 \pm 182 J_2/10$ gr raíz, mientras que el menor valor se encuentra en la localidad Bellavista con $367 \pm 87 J_2/10$ gr raíz.

Tabla 10: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Bellavista

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio \pm Error estándar
Bellavista	Limón	0	1817	1128 ± 182
San Pablo	Consuelo	0	983	487 ± 105
San Pablo	Santa Victoria	0	900	367 ± 87

Con estos valores se realizó una Prueba de Kruskal – Wallis, en la que se obtuvo que existen diferencias estadísticas entre los valores de densidad poblacional de nematodos de las tres parcelas muestreadas, obteniendo un $\rho = 0.0064$, posteriormente se desarrolló también una prueba de comparaciones múltiples (Test de Dunnet) para identificar las diferencias específicamente. El resultado de esta última prueba evidencia que los valores de densidad poblacional de nematodos de las localidades Consuelo y Santa Victoria presentan diferencias significativas frente a los valores reportados en la localidad de Limón (Anexo 10).

e. San Martín

En la Tabla 11 se visualiza el valor de J_2 alcanzados en las tres parcelas muestreadas en la provincia San Martín; la parcela ubicada en la localidad Morales logra alcanzar el mayor valor de J_2 con $1678 \pm 478 J_2/10$ gr raíz y por otro lado el menor valor de J_2 fue observado en la localidad Tununtunumba con $185 \pm 61 J_2/10$ gr raíz.

Con estos valores también se realizó una Prueba de Kruskal – Wallis con la que se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($\rho = 3.1 \times 10^{-5}$) entre los valores encontrados en las tres localidades muestreadas. Además de esto se realizó una prueba de comparaciones múltiples (Test de Dunnet), a partir de esto se puede afirmar que los valores de J_2 en las parcelas de las localidades de Tununtunumba y Bello Horizonte presentan diferencias significativas frente a los resultados obtenidos en la parcela de la localidad de Morales (Anexo 11).

Tabla 11: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia San Martín

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio \pm Error estándar
Chazuta	Tununtunumba	0	563	185 ± 61
Banda de Shilcayo	Bello Horizonte	0	735	372 ± 70
Morales	Morales	711	2200	1678 ± 478

f. Rioja y Moyobamba

En ambas provincias solo se obtuvieron datos de población de nematodos en una parcela por lo que no se realizaron pruebas estadísticas, sin embargo, en la Tabla 12 se muestra la densidad poblacional promedio de la parcela muestreada en la localidad Segunda Jerusalén ($1138 \pm 152 J_2/10$ gr raíz) perteneciente a la provincia de Rioja.

Tabla 12: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Rioja

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio \pm Error estándar
Elías Soplin Vargas	Segunda Jerusalén	578	2133	1138 \pm 152

Por último, en la Tabla 13 se muestra el único valor de densidad poblacional obtenido en la provincia de Moyobamba localidad Rafael Belaunde.

Tabla 13: Número de nematodos (J_2) en 10 gr de raíces de sachá inchi en parcelas de la provincia Moyobamba

Distrito	Localidad	min.	máx.	Promedio
Moyobamba	Rafael Belaunde	0	822	82

Finalmente, en la Figura 20 se aprecia el diagrama Box Plot para los datos de densidad poblacional de nematodos J_2 en las siete provincias muestreadas, en la cual se muestra que las provincias Picota y San Martín presentan los más altos valores de nematodos J_2 en raíces, así como también la más amplia variabilidad de datos.

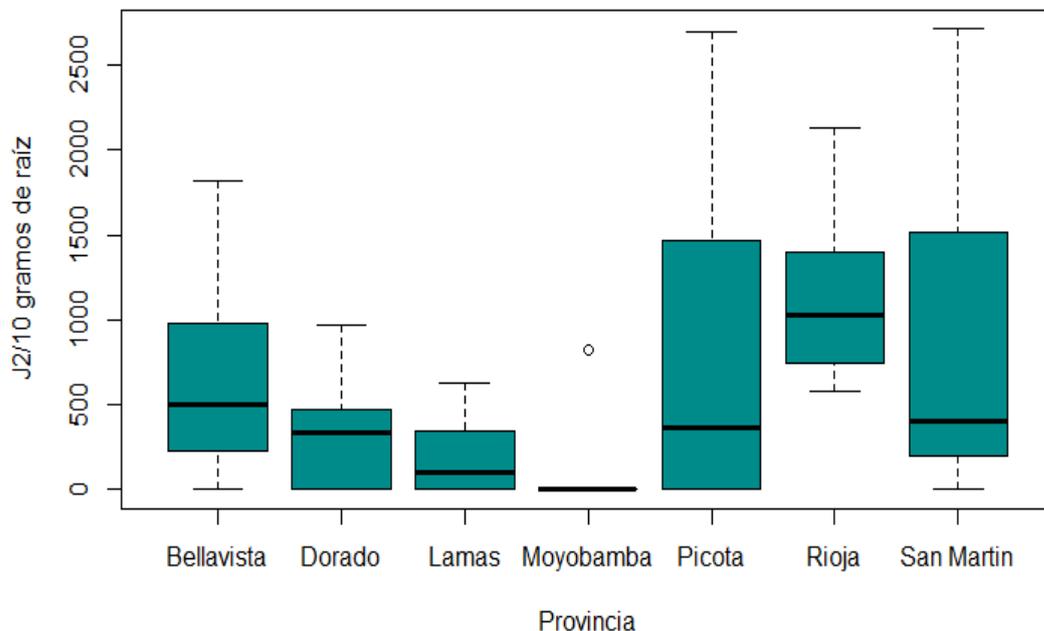


Figura 20: Diagrama de cajas representando la densidad poblacional de nematodos (J_2) /10 gr de raíz de sachá inchi en las diferentes zonas de estudio del departamento de San Martín.

4.1.2. Relación de la densidad poblacional (J_2) y el nivel de nodulación en raíces

Otra variable evaluada en el presente estudio fue el nivel de nodulación en raíces, para esto el muestreo de raíces se realizó en las zonas de máximo crecimiento, para usarlas como medida de incidencia de *Meloidogyne* spp. en las plantas (nivel de nodulación) (Díez-Rojo et al., 2006).

La evaluación del nivel de nodulación es un tipo de clasificación muy sencillo para evaluar la intensidad de la infección o grado de daño ocasionados por *Meloidogyne*. Por otro lado, existen diversas formas para la evaluación, a nivel de campo y laboratorio, de los niveles de infestación de los nematodos de este género, algunas escalas consideran una o la combinación dos o más variables para desarrollar la clasificación. Entre las más usadas tenemos las escalas propuestas por Zeck (1971), Bridge y Page (1980), Barker (1985) y Escala PIM (International Project Meloidogyne). Sin embargo, sus aplicaciones se reducen solo a casos donde se evalúa el sistema radicular completo de la planta, mas no a muestras obtenidas de campo.

Es por ello que se vio necesario desarrollar una nueva escala de nodulación que se adecuen a raíces noduladas obtenidas de muestreos de campo, para lo cual se elaboró una escala visual de nivel de incidencia de nodulación en raíces, tomando para esto diez raicillas de diez centímetros de longitud del total de la muestra obtenida en campo (10 gramos), la mismas que sería utilizadas en el procedimiento de obtención nematodos del juveniles del segundo estadio (J_2); clasificándolas en cinco niveles (1-5) según el porcentaje de nodulación en las raíces como se muestra en la Figura 7 presentada anteriormente.

A pesar de tratarse de un procedimiento simple, práctico y rápido, este esquema de clasificación podría proporcionarnos una mayor información sobre la susceptibilidad del huésped, tasa de reproducción de nematodos, y los niveles de población de nematodos en raíces (Bridge y Page, 1980).

Una vez obtenido los datos de nivel de nodulación por planta evaluada, según la escala propuesta mencionada anteriormente en la Figura 7; se procedió a determinar si existe relación entre esta variable y los datos obtenidos de densidad poblacional de nematodos (J_2).

Teniendo en cuenta que los valores obtenidos de densidad poblacional no poseen una distribución normal, se optó por utilizar un modelo lineal generalizado (GLM) desarrollado para determinar la relación entre estas dos variables, donde se considera a la densidad

poblacional de J_2 como variable respuesta y la variable nivel de nodulación como una variable predictora.

El modelo resultante (Anexo 12) nos muestra el efecto del nivel de nodulación (2, 3, 4 y 5), son significativos y positivos sobre la variable respuesta (J_2), además se puede observar que los coeficientes obtenidos aumenten en cada nivel de la variable predictora; lo que indicaría que a medida que reportamos un mayor nivel de nodulación en las raíces evaluadas, esto se reflejaría en una mayor densidad poblacional de especímenes (J_2). Esto se puede corroborar mediante un diagrama Box-plot (Figura 21) en donde se muestra relación directa entre los valores (J_2) y los diferentes niveles de nodulación en raíces.

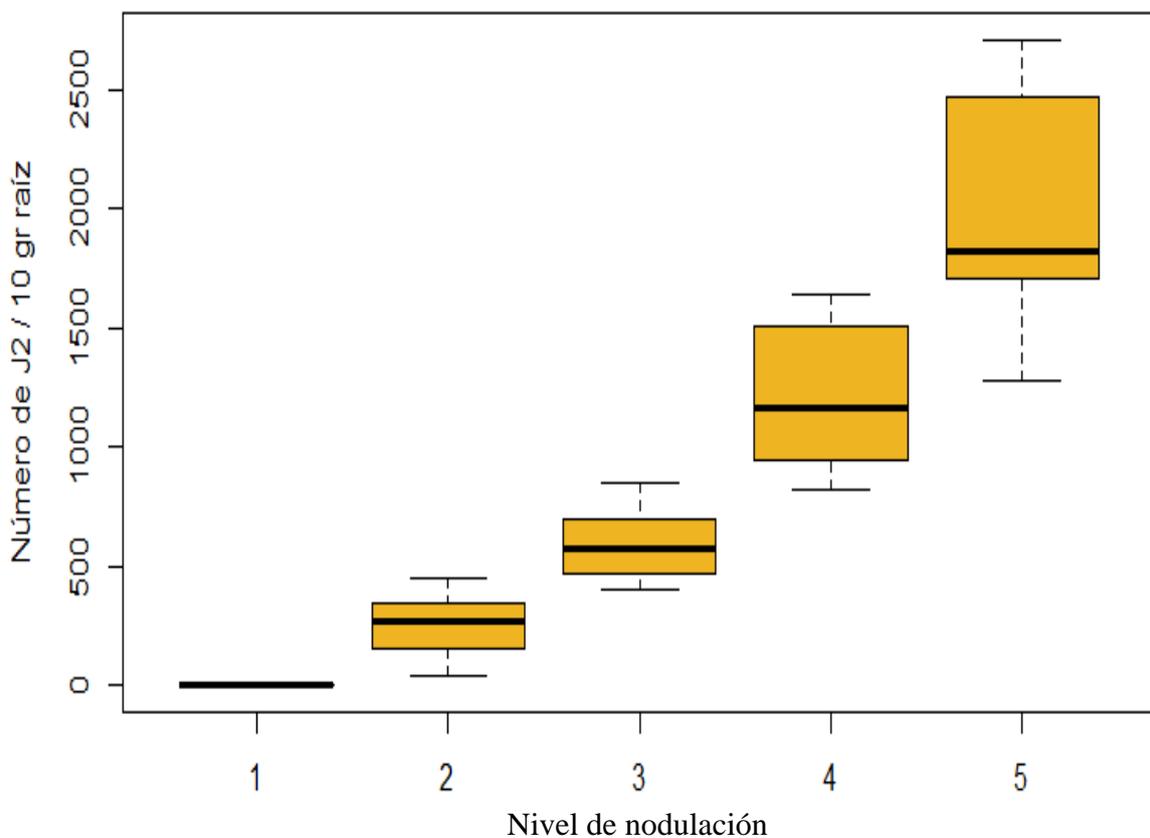


Figura 21: Diagrama de cajas representando el promedio de especímenes (J_2) /10 gr de raíz de sachá inchi, en relación a los niveles de nodulación ocasionados por *Meloidogyne* spp.

4.2. Efecto de variables climáticas, edáficas, topográficas y características de la parcela productiva sobre la densidad poblacional de nematodos de *Meloidogyne spp.* en raíces.

De acuerdo al análisis estadístico realizado por medio de Modelos lineales generalizados (GLM), con el fin de determinar las variables de estudio con un efecto representativo sobre la densidad poblacional de nematodos en muestras de raíces; se encontró que a pesar de la contar con una gran cantidad de variables explicativas incluidas en cuatro conjuntos de datos, la variable respuesta sólo tuvo un efecto significativo por parte de 4 predictores, explicando estos un tercio de la variación (36,39 %) de la densidad poblacional de nematodos en raíces (Tabla 14).

El conjunto de datos agronómicos fue el más influyente, con dos variables significativas (cultivo asociado-cacao y edad de cultivo), que contribuye en un 14,05% y 12,07% para explicar la variación en la densidad poblacional de nematodos, respectivamente.

Por otro lado, cabe resaltar que la presencia del cultivo de cacao como cultivo secundario en la parcela evaluada tuvo un efecto negativo sobre la incidencia de *Meloidogyne* en el cultivo de sachá inchi, mientras que la variable edad de cultivo presentó una significancia positiva, con lo cual se comprueba la alta susceptibilidad del cultivo sachá inchi frente al nematodo del nudo, presentando un mayor grado de infección (nodulación en raíces) al transcurrir el tiempo, llegando a alcanzar un nivel de daño crítico en el segundo o tercer año de su establecimiento en campo.

Dentro del conjunto de datos edafológicos considerados en este estudio, se obtuvo que la variable de porcentaje de materia orgánica del suelo mostró una correlación negativa con la población de nematodos en las raíces, explicando un 5,96 % de la varianza de la variable respuesta.

Ensayos realizados por Dias-Arieira et al., 2021 y Barros et al., 2017 donde se estudió la influencia de la materia orgánica sobre la población de nematodos fitoparásitos reflejan el mismo resultado, llegando a concluir que la materia orgánica es fundamental en los sistemas agrícolas y la adición de compuestos orgánicos al suelo es una alternativa para suprimir estos fitoparásitos, ya que mejora las características químicas y físicas del suelo, además de generar un equilibrio en la carga microbiana del suelo, debido a que proporciona un mejor desarrollo de los microorganismos benéficos en el suelo.

Del mismo modo la variable altitud del conjunto de datos topográficos muestra el mismo efecto. Siendo estas dos variables las que alcanzaron los menores porcentajes de contribución de explicación de la varianza obtenida en el modelo final. Presentando un 5,96 % y 4,3 % de contribución, respectivamente.

Tabla 14: Variables representativas del modelo lineal generalizado para la variable respuesta de densidad poblacional de nematodos (J_2)

Variables	R_2	R_2 acum.	R_2 adj. Cum	Varianza explicada (%)
Edad	0.1254419		0.1208	12.07
cacao	0.0484800 9	0.2690817	0.2613	14.05
altitud	0.0442518 8	0.3153426	0.3043	4.3
Materia orgánica	0.0618385 5	0.3773926	0.3639	5.96

4.3. Identificación morfológica de las especies del género *Meloidogyne* según el patrón perineal de especímenes hembra

Haciendo uso de las descripciones y claves establecidas por Eisenback et. Al, 1983; Taylor y Sasser, 1983; Eisenback, 1985; Hunt y Handoo, 2009, se determinó las especies: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*; asimismo cada especie presento diferentes proporciones en cada localidad de estudio.

A continuación, se muestran los diseños perineales obtenidos en cada especie, así como también el porcentaje de ocurrencia. Alcanzado de cada una en la parcela muestreada.

a. Provincia Lamas

La identificación de los diferentes diseños perineales de los nematodos hembras obtenidas de las localidades muestreadas de la provincia de Lamas en las cuales se pudo identificar la incidencia de las tres especies del género *Meloidogyne* anteriormente mencionadas. Sin embargo, se puede observar que existen diferentes porcentajes de ocurrencia de dichas especies en cada parcela muestreada, los cuales se muestran en la Figura 22. Asimismo, se observan los patrones perineales encontrados en las diferentes localidades Figura 23.

Las especies encontradas infectando raíces de sacha inchi en la parcela muestreada del distrito de Pinto Recodo, localidad de Bellavista, presentaron un porcentaje de ocurrencia muy marcado, obteniendo un 92.9 por ciento de *M. incognita*, 5.7 por ciento de *M. javanica* y 1.4 por ciento de *M. arenaria*.

Del mismo modo se identificaron las mismas especies en la parcela muestreada del distrito de Barranquita, localidad de Pongo de Caynarachi, las cuales presentaron los siguientes porcentajes de ocurrencia: 74.3 por ciento de *M. incognita*, 21.4 por ciento de *M. arenaria* y 4.3 por ciento de *M. javanica*.

Por otro lado, solo se identificó dos especies en la parcela muestreada del distrito de Lamas, localidad de Pamashto, presentando porcentajes de ocurrencias de 84 por ciento de *M. incognita* y 16 por ciento de *M. arenaria*.

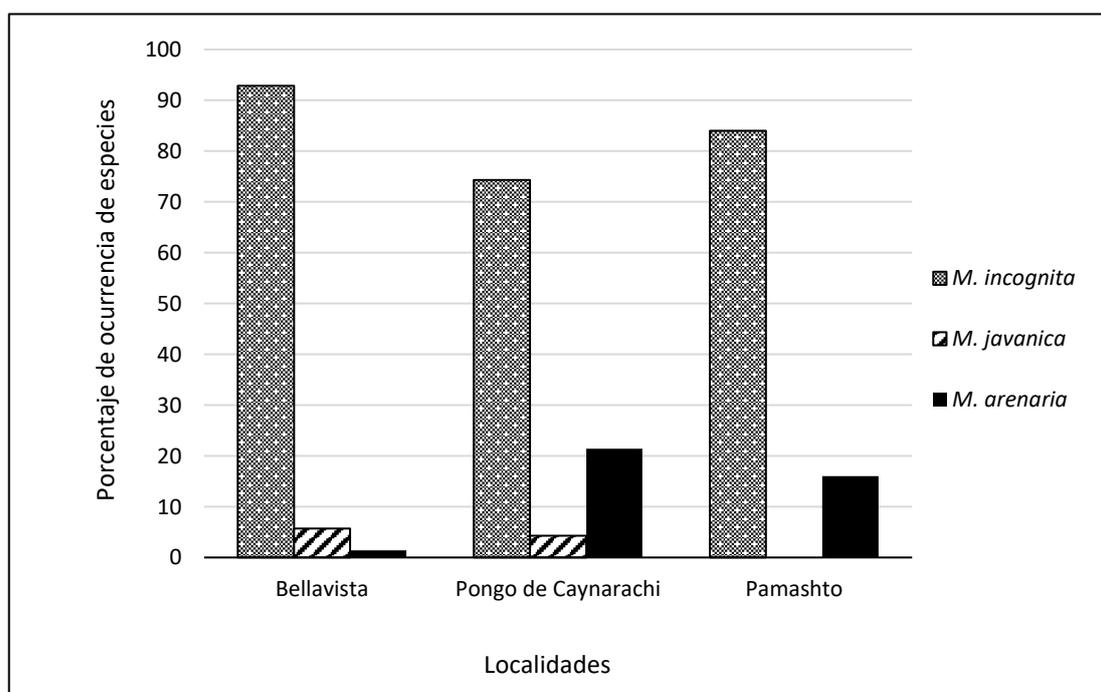


Figura 22: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género *Meloidogyne* identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sacha inchi de la provincia de Lamas.

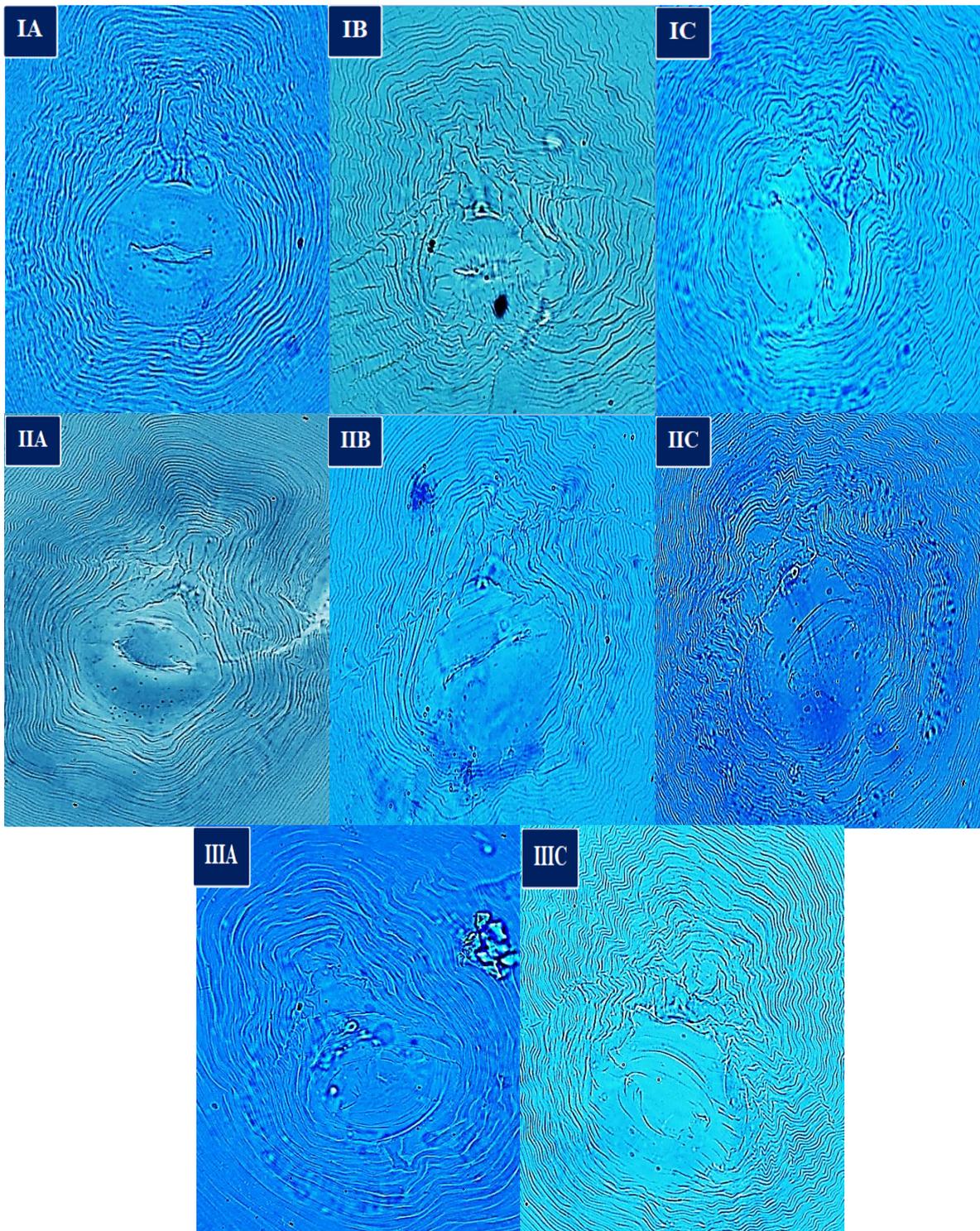


Figura 23: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia Lamas, localidad Bellavista (I), Pongo de Caynarachi (II) y Pamashto (III). A: *Meloidogyne incognita*, B: *M. javanica*, C: *M. arenaria*.

b. El Dorado

A partir de los diseños perineales de los especímenes hembra obtenidos en las diferentes localidades muestreadas pertenecientes a la provincia de El Dorado se identificó tres especies del género *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*. Dichas especies presentan grados de incidencia diferentes en cada parcela de sacha inchi evaluada, los cuales se visualizan en la Figura 24. Asimismo, se observan los patrones perineales encontrados en las diferentes localidades Figura 25.

En el distrito de Santa Rosa localidad de Santa Rosa se registraron solo tres especies: *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*. Estas especies presentaron porcentajes de ocurrencia de 89 por ciento, 6 por ciento y 5 por ciento respectivamente.

Mientras que en el distrito de San José de Sisa en el cual se tuvieron dos zonas de muestreo, la primera ubicada en la localidad de Santa Cruz en la cual se identificó solo patrones perineales de *M. incognita* (Figura 25), la segunda zona ubicada en la localidad de Huaja se pudo identificar patrones perineales de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, con porcentajes de ocurrencia de 94 por ciento, 4 por ciento y 2 por ciento respectivamente.

Por último, en el distrito de San Martín de Alao localidad de Cashnahuasi se pudo identificar solo patrones perineales de las especies de *M. incognita*.

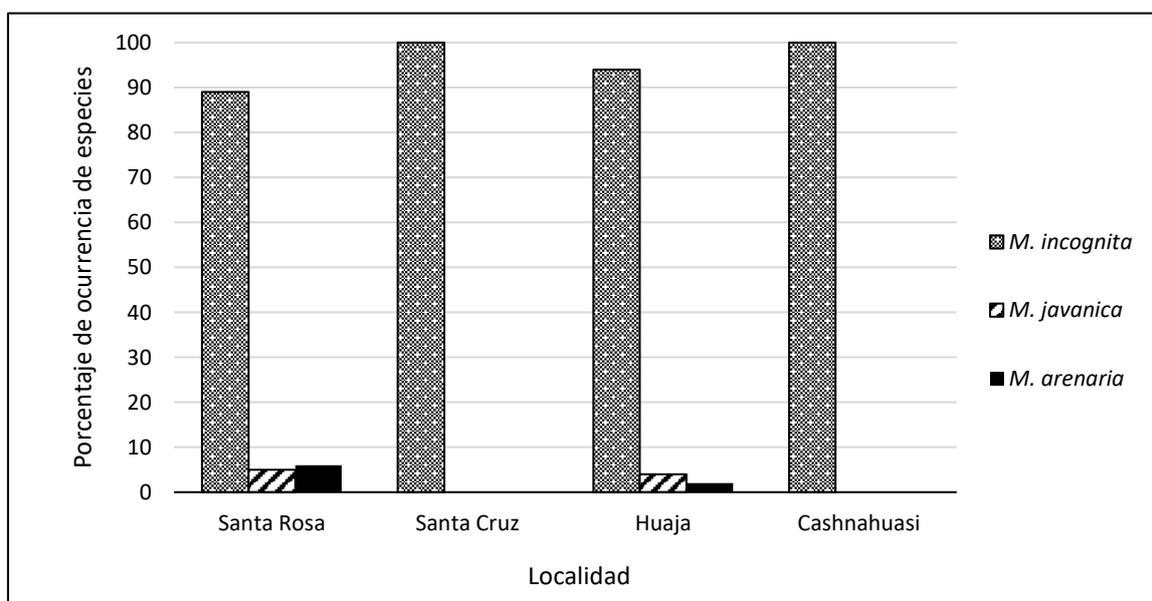


Figura 24: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género *Meloidogyne* identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sacha inchi de la provincia El Dorado.

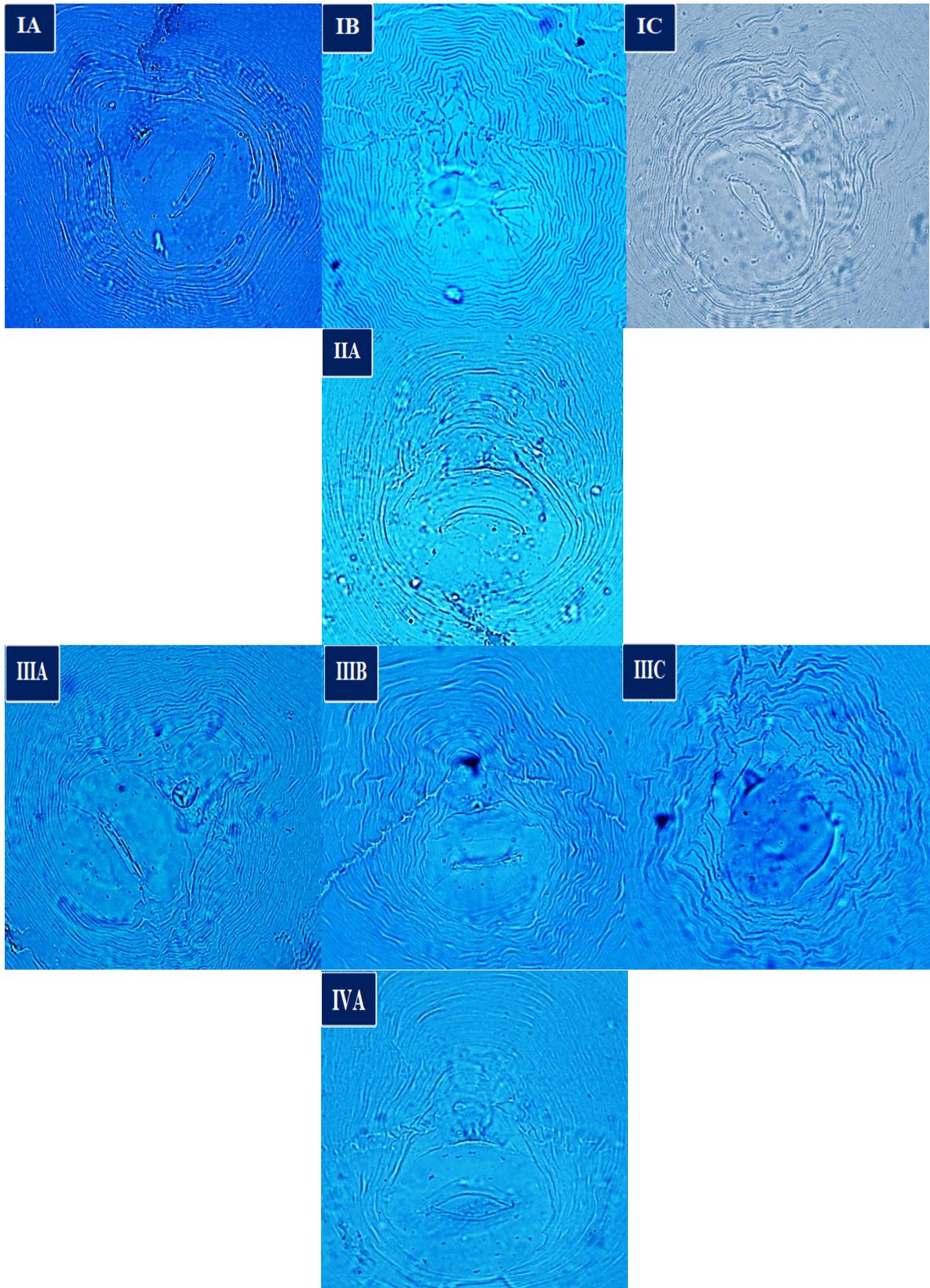


Figura 25: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia El Dorado, localidad Santa Rosa (I), Santa Cruz (II), Huaja (III) y Cashnahuasi (IV). A: *Meloidogyne incognita*, B: *M. javanica*, C: *M. arenaria*.

c. Picota

La identificación de los patrones perineales obtenidos de las zonas muestreadas en la provincia de Picota permitió registrar la presencia de las siguientes especies: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*. Las cuales presentaron grados de incidencia diferentes en cada parcela de sachá inchi evaluada, Figura 26. Asimismo, se observan los patrones perineales encontrados en las diferentes localidades Figura 27.

En el distrito de Picota localidad de San Antonio la identificación de los patrones perineales evidenció la presencia de tres especies: *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, presentando grados de incidencia del 90 por ciento, 5.7 por ciento y 4.3 por ciento respectivamente.

De igual manera en el distrito de Shamboyacu localidad de Shamboyacu se registró patrones perineales de tres especies: *M. incognita* y *M. arenaria*, presentando grados de incidencia del 88.6 por ciento y 11.4 por ciento respectivamente.

Por otro lado, los patrones perineales reportados en la parcela muestreada en el distrito de Tingo de Ponaza localidad de Tingo de Ponaza demostraron la presencia de os especies: *M. incognita*, *M. arenaria*, con grados de incidencia de 90 y 10 por ciento respectivamente.

Por último, en el distrito de Buenos Aires localidad de Buenos Aires solo se registró la especie *M. incognita*.

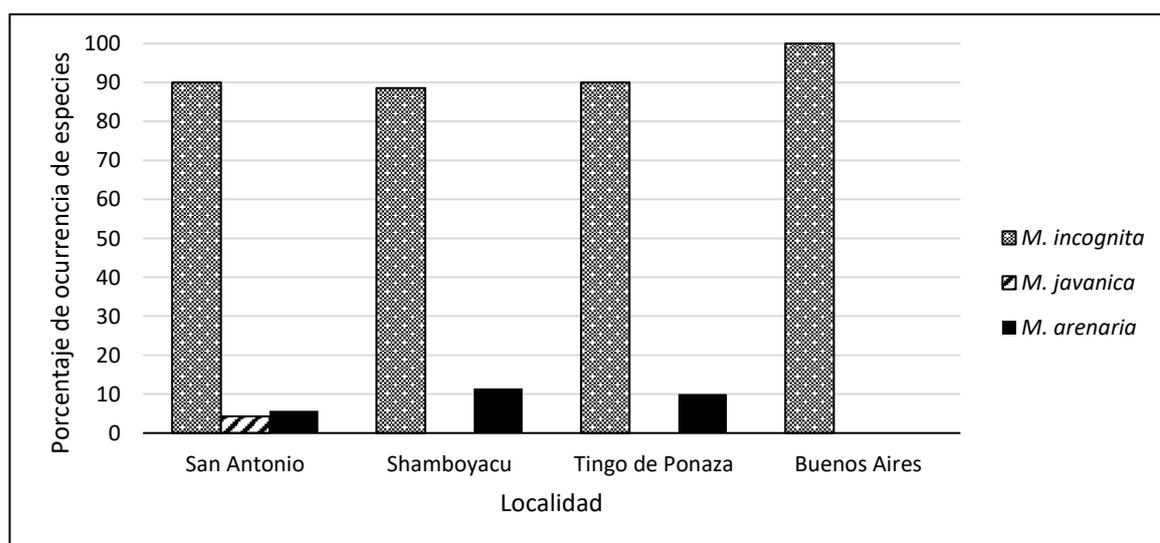


Figura 26: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género *Meloidogyne* identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachá inchi de la provincia Picota.

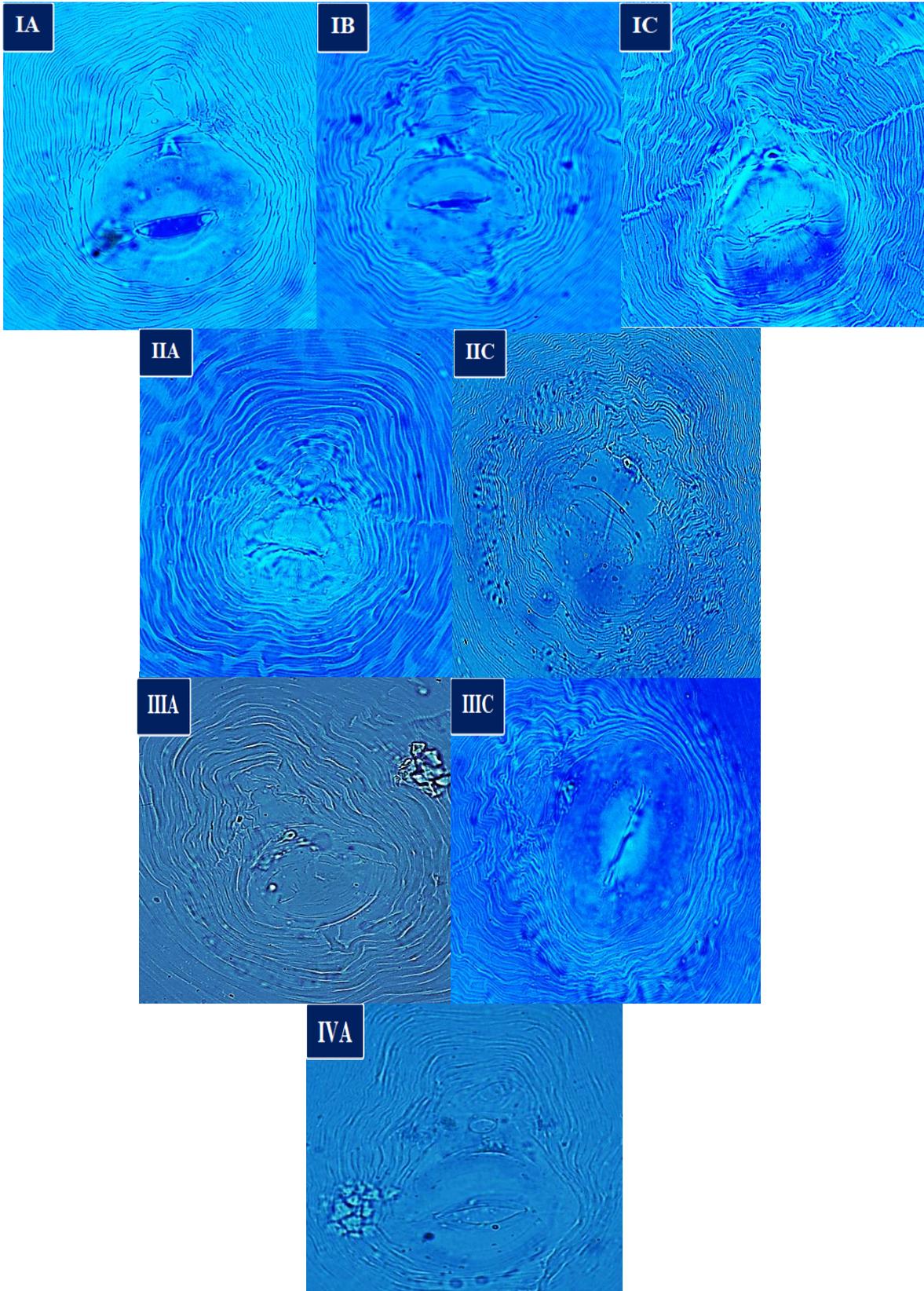


Figura 27: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia Picota, localidad San Antonio (I), Shamboyacu (II), Tingo de Ponasa (III) y Buenos Aires (IV). **A:** *Meloidogyne incognita*, **B:** *M. javanica*, **C:** *M. arenaria*.

d. Bellavista

Los patrones perineales obtenidos de los especímenes hembra de tres parcelas productivas en la provincia de Bellavista permitieron la identificación de tres especies: *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, cuyos grados de incidencia se muestran en la Figura 28. Asimismo, se observan los patrones perineales encontrados en las diferentes localidades Figura 29.

Se realizó la identificación de patrones perineales de las especies *M. incognita* y *M. arenaria* en las parcelas el distrito de Bellavista localidad de Limón y el Distrito de San Pablo localidad Santa Victoria, encontrando en la primera parcela un grado de incidencia del 86.7 y 13.3 por ciento respectivamente y en la segunda parcela con un grado de incidencia del 86.3 y 13.7 por ciento respectivamente.

En otra parcela evaluada en el distrito de San Pablo localidad Consuelo solo se identificó las especies *M. incognita*.

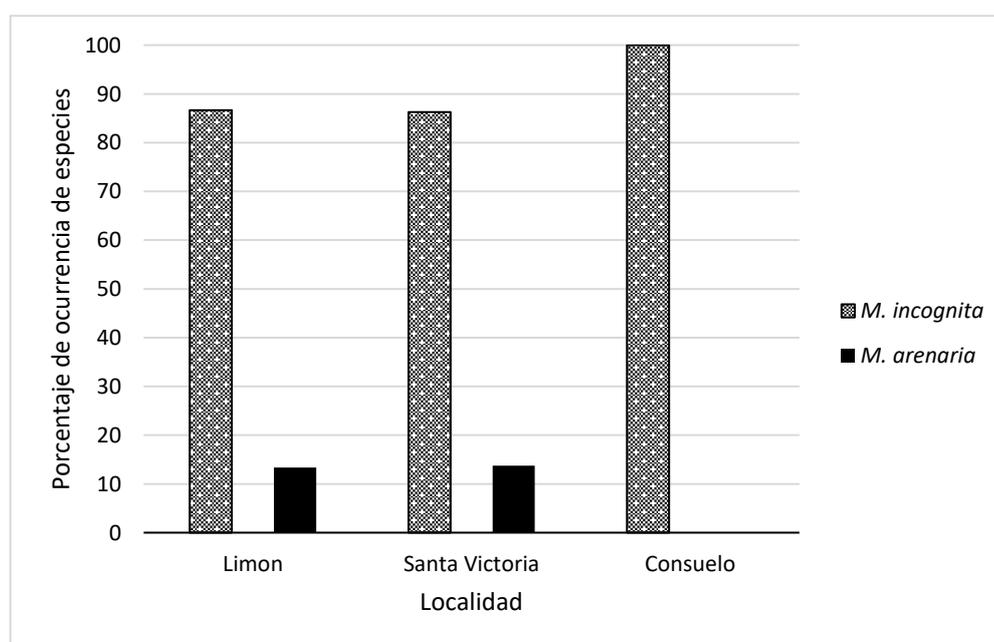


Figura 28: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género *Meloidogyne* identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sacha inchi de la provincia Bellavista.

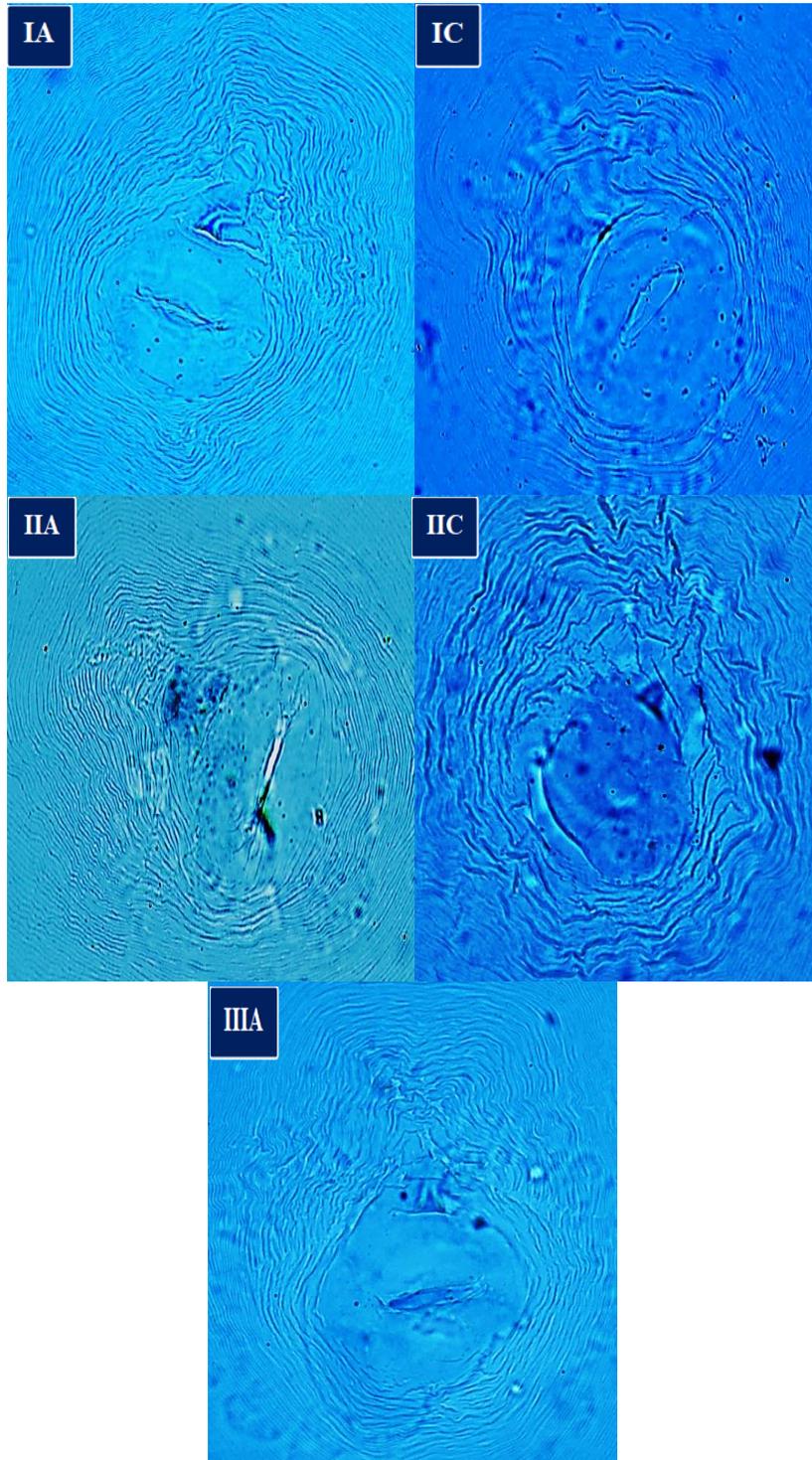


Figura 29: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia Bellavista, localidad Limón (I), Santa Victoria (II) y Consuelo (III). A: *Meloidogyne incognita*, B: *M. javanica*, C: *M. arenaria*.

e. San Martín

En el caso de la identificación de los patrones perineales obtenidos de las tres parcelas en la provincia de San Martín se determinó la presencia de tres especies: *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* con diferentes grados de incidencia, los cuales se visualizan en la Figura 30. Asimismo, se observan los patrones perineales encontrados en las diferentes localidades Figura 31.

Estas tres especies se presentaron en la parcela muestreada en el Distrito de Tarapoto localidad de Morales; mostrando los siguientes grados de incidencia, *M. incognita* 80 por ciento, *M. javanica* 18 por ciento y *M. arenaria* 2 por ciento.

Por otro lado, las parcelas muestreadas tanto en el distrito de Chazuta localidad de Tununtunumba como en el distrito de La Banda de Shilcayo localidad de Bello Horizonte solo se registraron las especies *M. incognita* y *M. arenaria*. En la primera parcela se obtuvo grados de incidencia del 95 por ciento y 5 por ciento respectivamente y en la segunda parcela 91,1 por ciento y 8,9 por ciento respectivamente.

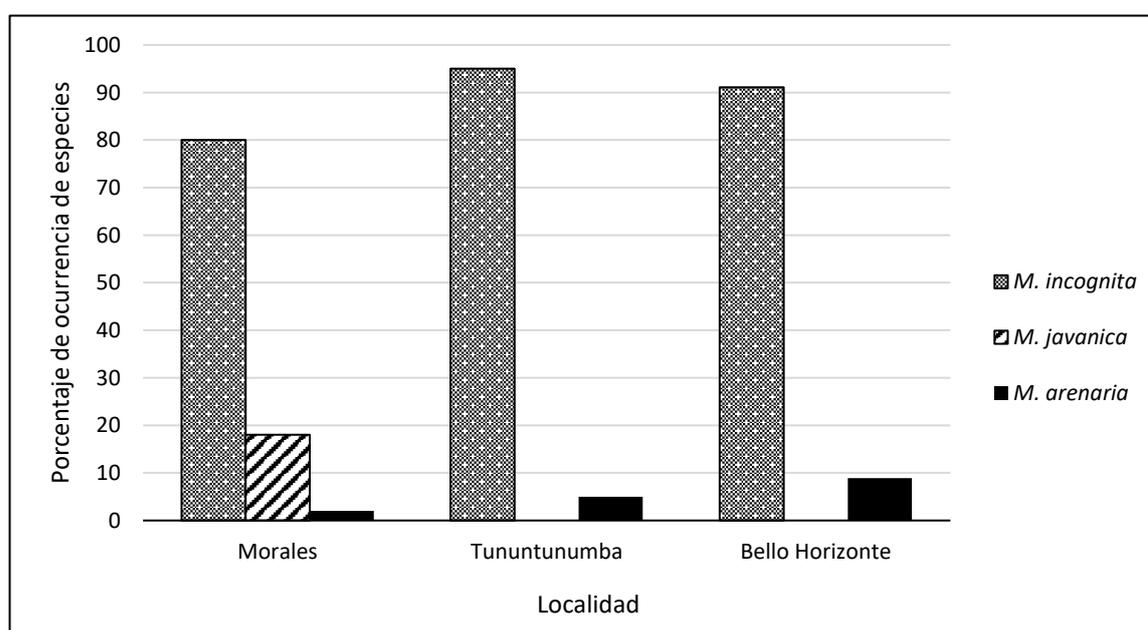


Figura 30: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género *Meloidogyne* identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sacha inchi de la provincia San Martín.

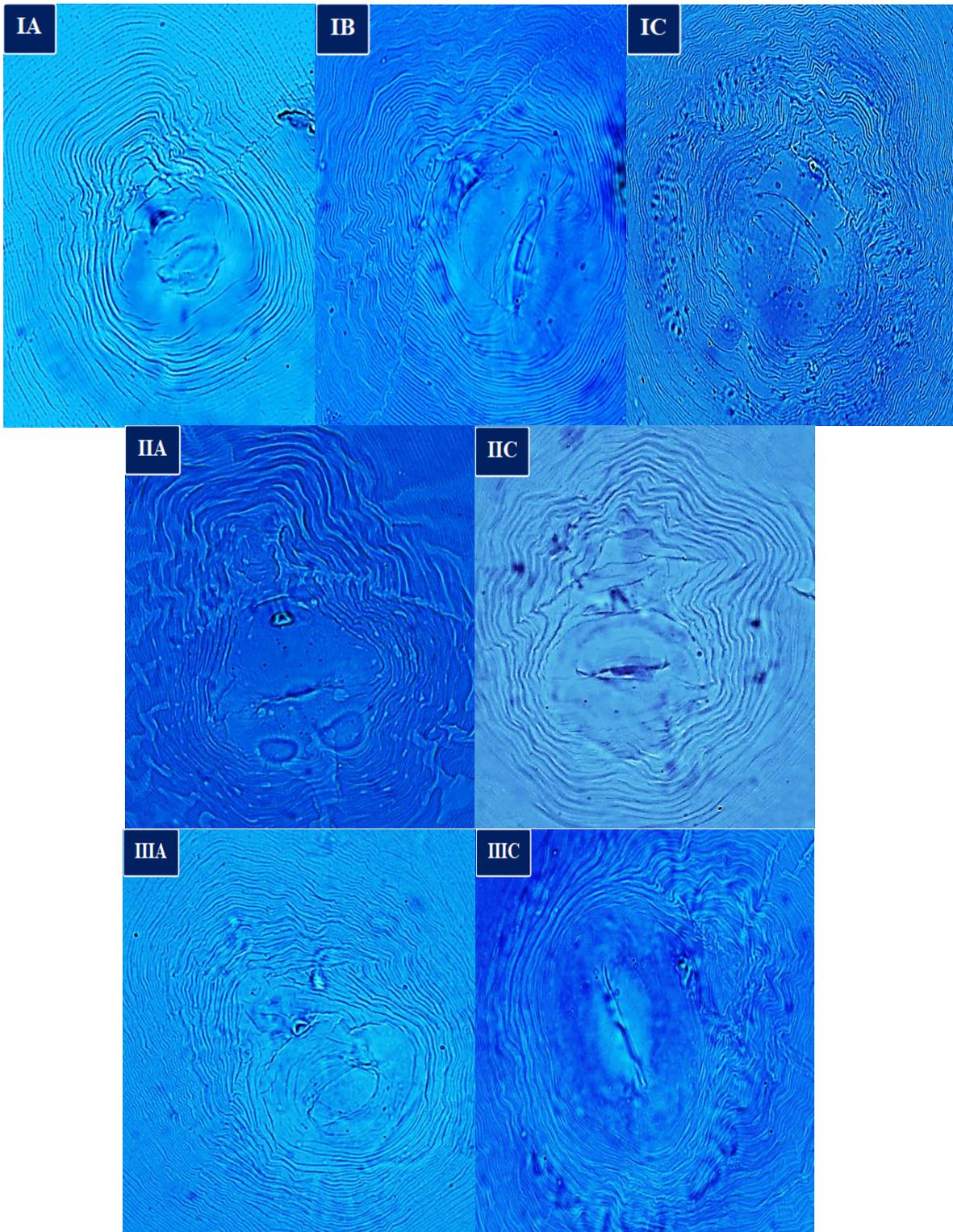


Figura 31: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en la provincia San Martín, localidad Morales (I), Tununtunumba (II) y Bello Horizonte (III). A: *Meloidogyne incognita*, B: *M. javanica*, C: *M. arenaria*.

f. Rioja

Lo patrones perineales obtenidos de especímenes hembra extraídos de la parcela del distrito de Rioja localidad de Segunda Jerusalén pertenecen a tres especies cuya incidencia es variada, presentando *M. incognita* un 82 por ciento, *M. javanica* 16 por ciento y *M. arenaria* 2 por ciento, Figura 32 y 33.

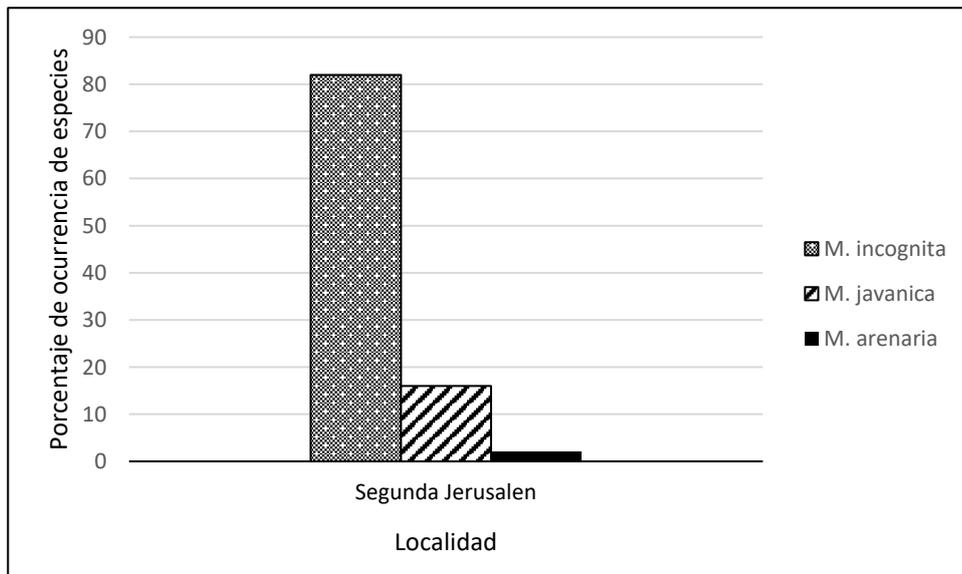


Figura 32: Porcentaje de ocurrencia de las especies del género *Meloidogyne* identificadas a partir de patrones perineales obtenidas en parcelas de sachu inchi de la provincia Rioja.

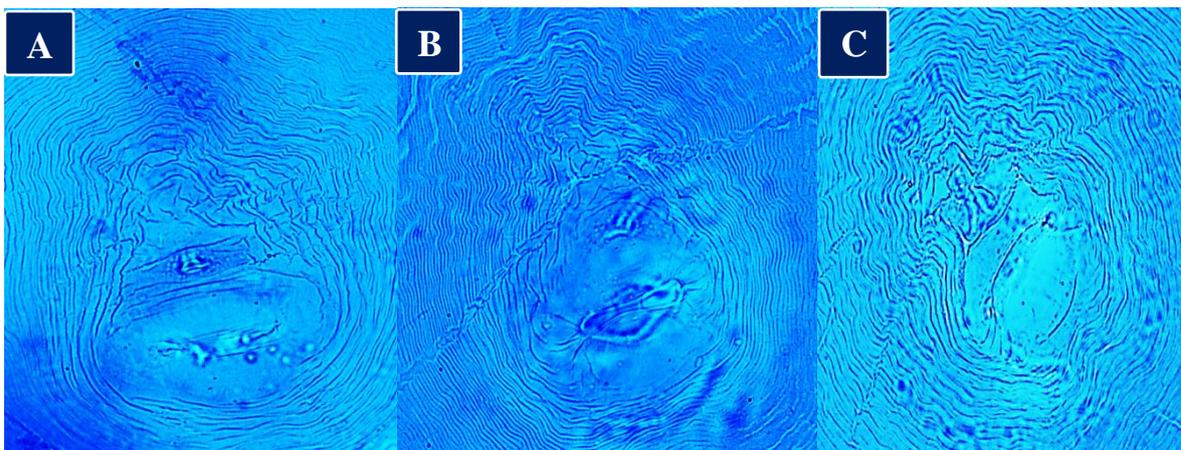


Figura 33: Patrones perineales de especímenes hembra obtenidos en el Distrito de Rioja localidad de Segunda Jerusalen, A: *Meloidogyne incognita*, B: *M. javanica* y C: *M. arenaria*.

g. Moyobamba

La única parcela muestreada en la provincia de Moyobamba perteneciente al distrito de Moyobamba localidad de Rafael Belaunde, solo presento el patrón perineal de *M. incognita*, el cual se muestra en la Figura 34.

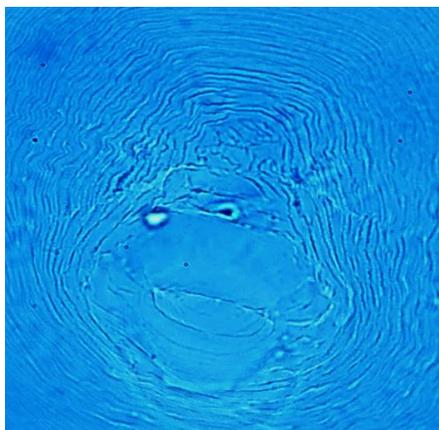


Figura 34: Patrón perineal de especímenes hembra obtenidos en el Distrito de Tarapoto localidad de Morales: *Meloidogyne incognita*.

A continuación, se muestra en la Figura 35 la distribución de las tres especies del género *Meloidogyne* identificadas en base a los patrones perineales de los especímenes hembras. Observándose también la proporción de incidencia de cada especie, siendo la especie *Meloidogyne incognita* la más representativa en las siete provincias evaluadas.

Estudios anteriores realizados en el departamento de San Martín enfocados en la identificación morfológica de las especies del género *Meloidogyne*, reportaron la incidencia de solo una especie *M. incognita* relacionada al cultivo de sacha inchi en las provincias de El Dorado, Lamas, Picota y Bellavista (Neira, 2018).

Asimismo, Solano (2018) reportó la incidencia de dos especies en el cultivo de café, *M. incognita* y *M. javanica* en las mismas cuatro provincias del estudio anterior. Cabe destacar, que en el departamento de San Martín normalmente encontramos zonas productoras donde se presenta la asociación de ambos cultivos o en otros casos el cultivo sacha inchi viene a ser un cultivo alternativo al cultivo de café. Por lo cual, es probable que exista la incidencia de las mismas especies de *Meloidogyne* en ambas áreas productivas.

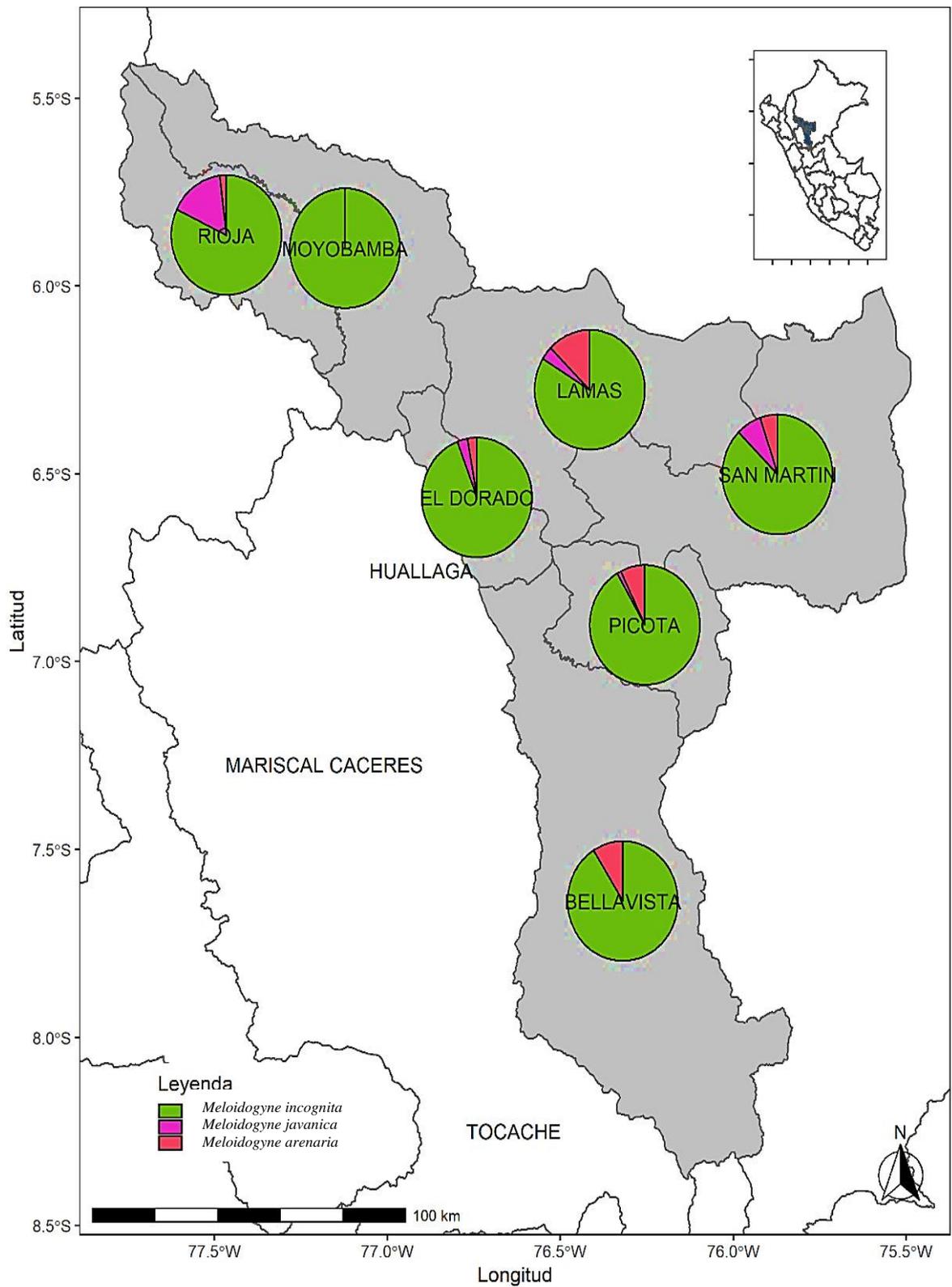


Figura 35: Identificación morfológica y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi de siete provincias del departamento San Martín.

4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Meloidogyne* PRESENTES EN RAÍCES DE SACHA INCHI

La utilización de diversos métodos de identificación de especies de nematodos del género *Meloidogyne*, como la caracterización morfológica o morfométrica de especímenes presentaban un enfoque útil pero no tan exacto. Esto se debe a la existencia de algunas variaciones intraespecíficas ya sea por cambios en las condiciones geográficas o ecológicas que muchas veces impedía una correcta identificación de cada especie (Siddiqi, 2000).

Afortunadamente en los últimos años, se puede observar la aplicación de biología molecular en la identificación de especies de este género, esto se debe a la alta sensibilidad y precisión de esta metodología, convirtiéndola en una herramienta útil y complementaria a otras técnicas de identificación.

Por ello se realizó las pruebas moleculares para la identificación de especies del género *Meloidogyne* presentes en raíces de sachá inchi, mediante el uso de ADN genómico obtenido de 10 especímenes hembras por cada planta muestreada en una parcela productiva, desarrollándose este método solo en las plantas que mostraban incidencia de estos nematodos en las raíces (nódulos) obteniéndose finalmente desde una a 10 muestras de ADN de nematodo por parcela.

a. Lamas

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para la identificación de especies presentes en las tres parcelas muestreadas en la provincia de Lamas, muestran la incidencia de hasta cuatro especies: *M. incognita* presente en todas las plantas evaluadas, seguido por *M. arenaria*, *M. exigua* y *M. javanica* en una menor cantidad de plantas respectivamente

En los resultados de amplificación de productos PCR obtenidos de la parcela ubicada en la localidad de Bellavista (Figura 36) se observaron resultados negativos para *M. exigua*. Sin embargo, se encontró la incidencia de hasta 3 de las otras especies mencionadas anteriormente en una sola planta (N° 4). Por otro lado, en la localidad de Pamashto (Figura 37) las pruebas presentaron resultados negativos para *M. javanica*, pero la mayoría de plantas evaluadas presentaron incidencia de hasta dos de las especies.

Para la parcela estudiada en la localidad de Pongo de Caynarachi (Figura 38) se obtuvieron resultados de amplificación positivos hasta para las cuatro especies en una misma planta (N° 4), además cabe resaltar que todas las muestras mostraron incidencia de *M. arenaria* en la misma proporción que *M. incognita*.

b. Dorado

Al igual que la provincia anterior, las cuatro parcelas muestreadas en la provincia de El Dorado ubicadas en las localidades de Santa Cruz, Cashnahuasi, Huaja y Santa Rosa, mostraron productos de amplificación de PCR positivos hasta para cuatro especies del género *Meloidogyne* evaluadas, siendo *M. incognita* la especie presente en todas las plantas evaluadas.

Los resultados obtenidos en la localidad de Santa Cruz (Figura 39) muestran la incidencia de hasta dos especies en una misma planta, *M. incognita* y *M. arenaria* (N° 10) además de presentar resultados negativos en los productos de amplificación para las especies *M. javanica* y *M. exigua*. Del mismo modo en la localidad Cashnahuasi (Figura 40) se obtuvo incidencia de solo dos especies *M. incognita* y *M. exigua* en todas las plantas de las que se obtuvo muestras de ADN de nematodos hembras.

Por otro lado, en la localidad de Huaja (Figura 41) se obtuvieron resultados positivos en la amplificación de productos PCR de las cuatro especies de *Meloidogyne* evaluadas, encontrándose hasta tres de estas especies, *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* en una misma planta (N° 9).

Por último, en la localidad de Santa Rosa (Figura 42) se obtuvieron resultados positivos en las pruebas para la identificación de tres de las especies, *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*. Sin embargo, se puede observar que existen plantas que presentan incidencia hasta de dos de las especies mencionadas anteriormente (N°2, 4, 5, 8 y 10).

Los resultados obtenidos en estas dos provincias (Lamas y El Dorado) pueden resumirse en la Figura 43 y 44 respectivamente. Donde se muestra la distribución de especies reportadas según la cantidad de muestras en las que se detectaron en cada localidad evaluada.

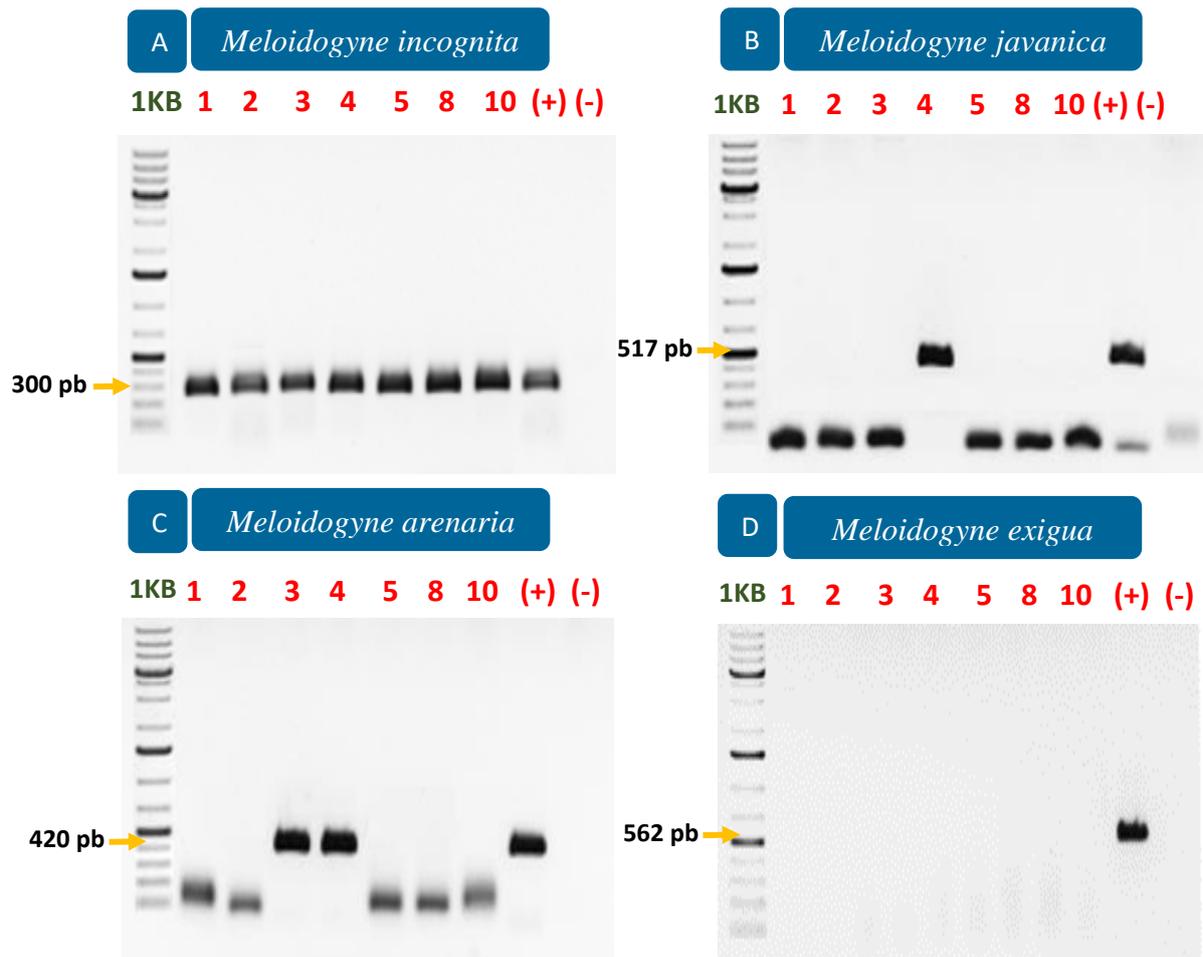


Figura 36: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne spp.* en 7 plantas de sachu inchi del distrito de Pinto Recodo, localidad de Bellavista. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

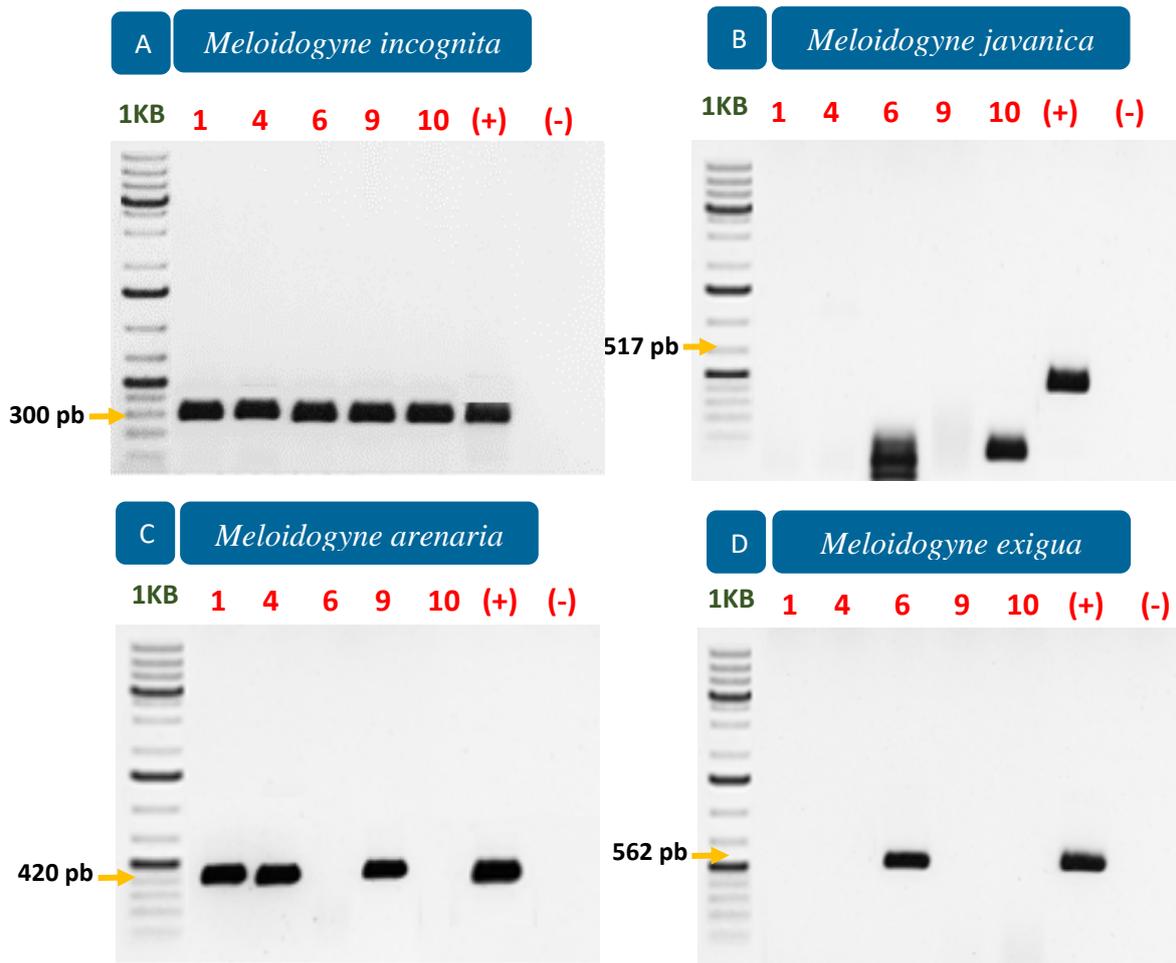


Figura 37: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne spp.* en 5 plantas de sacha inchi del distrito de Lamas, localidad de Pamashto. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

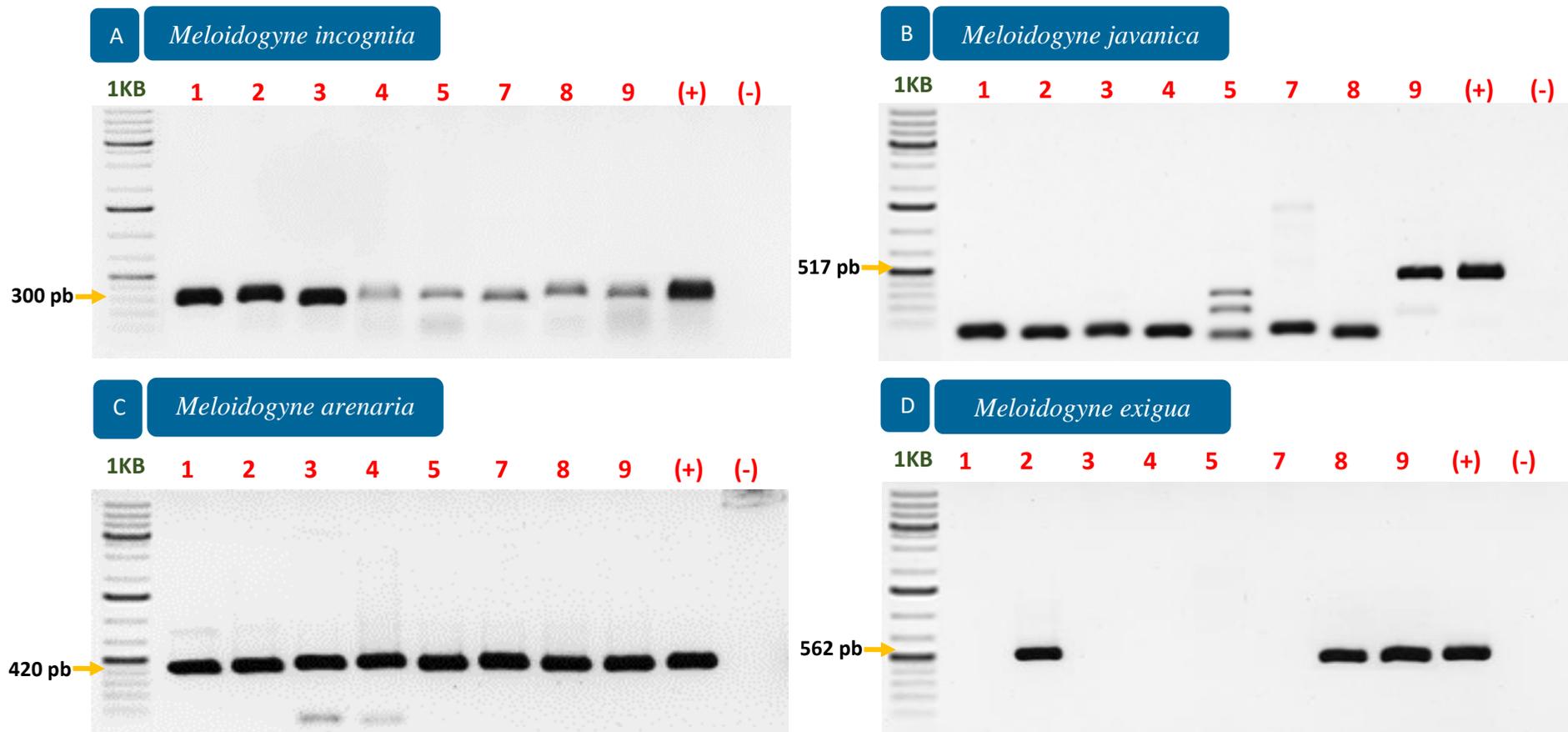


Figura 38: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Barranquita, localidad de Pongo de Caynarachi. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

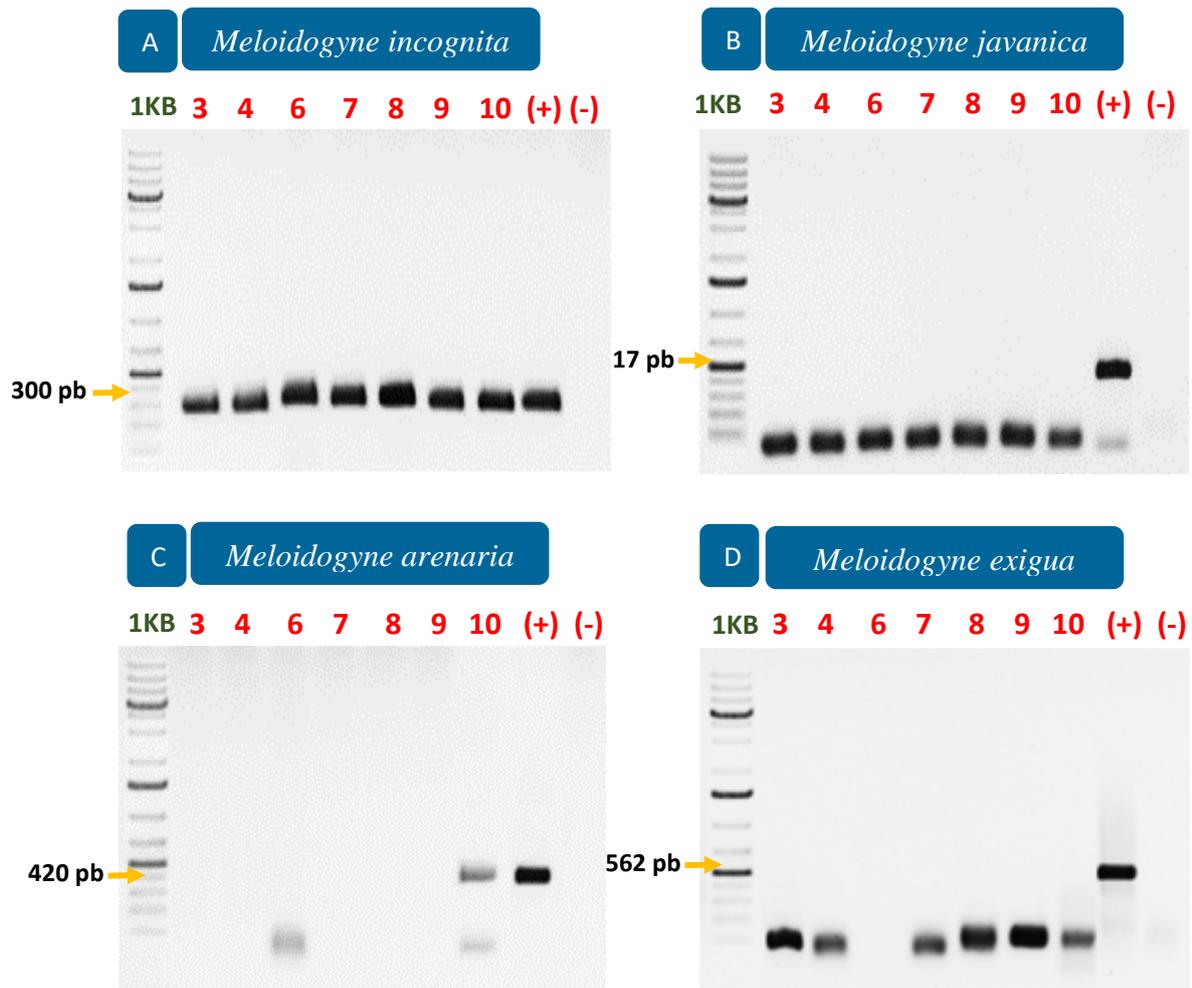


Figura 39: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sacha inchi del distrito de San José de Sisa, localidad de Santa Cruz. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

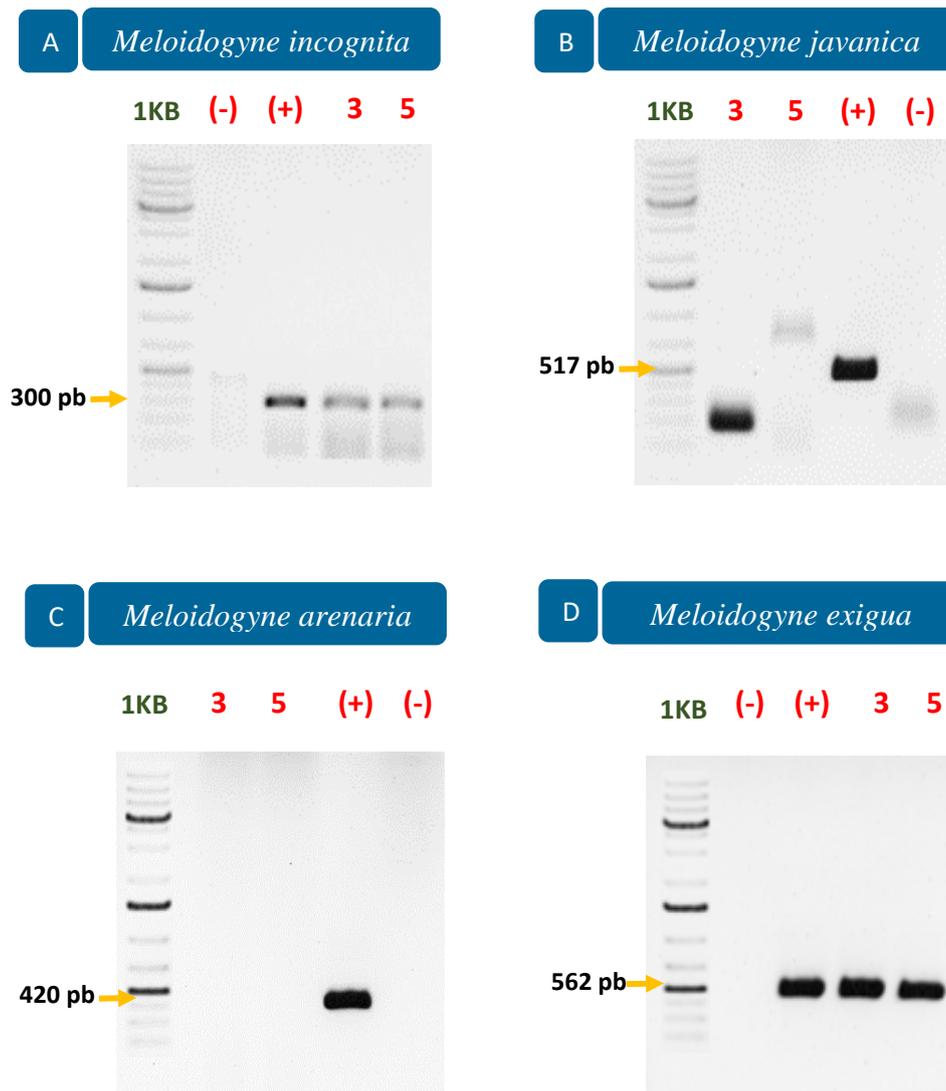


Figura 40: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 2 plantas de sacha inchi del distrito de San Martín, localidad de Cashnahuasi. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

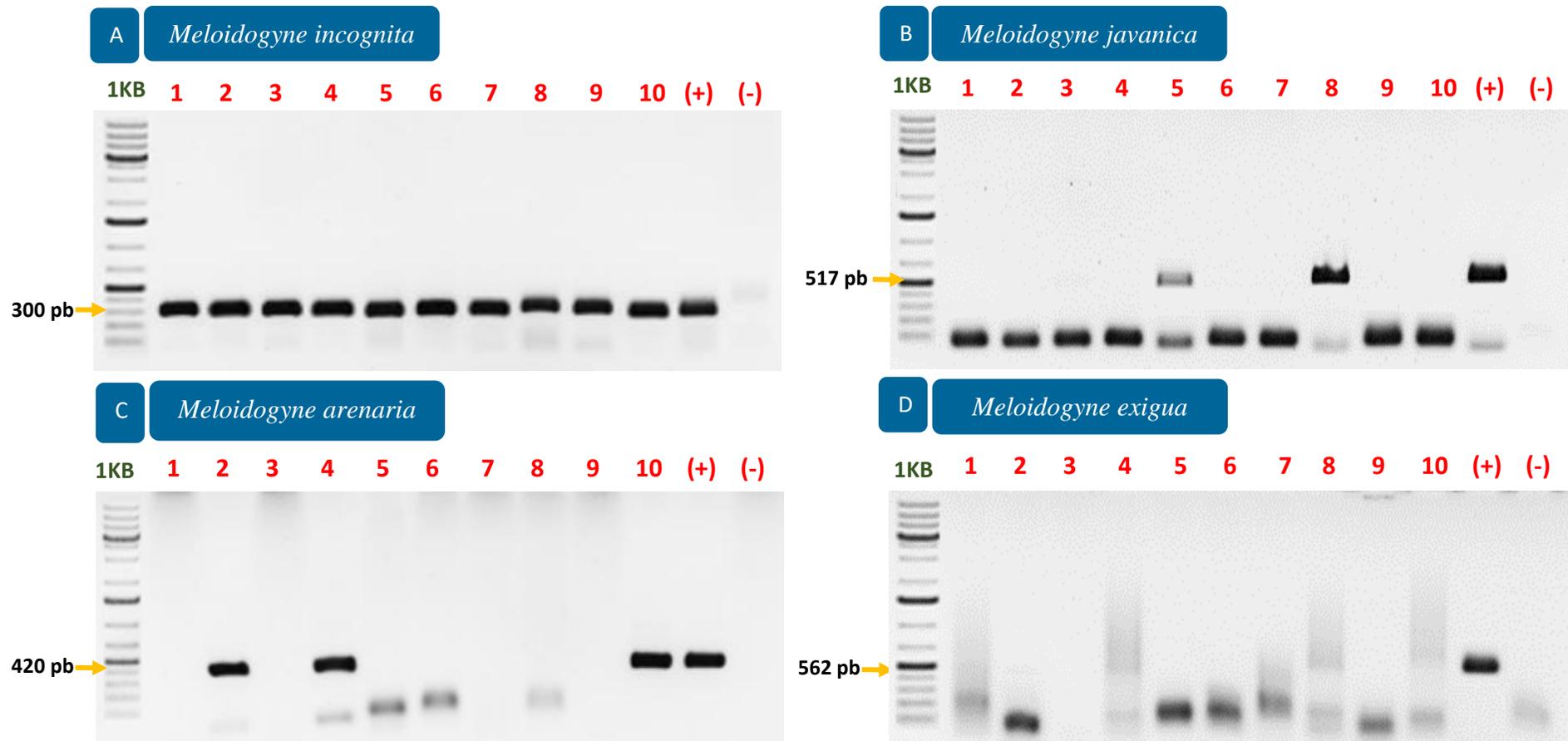


Figura 41: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de Santa Rosa, localidad de Santa Rosa. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

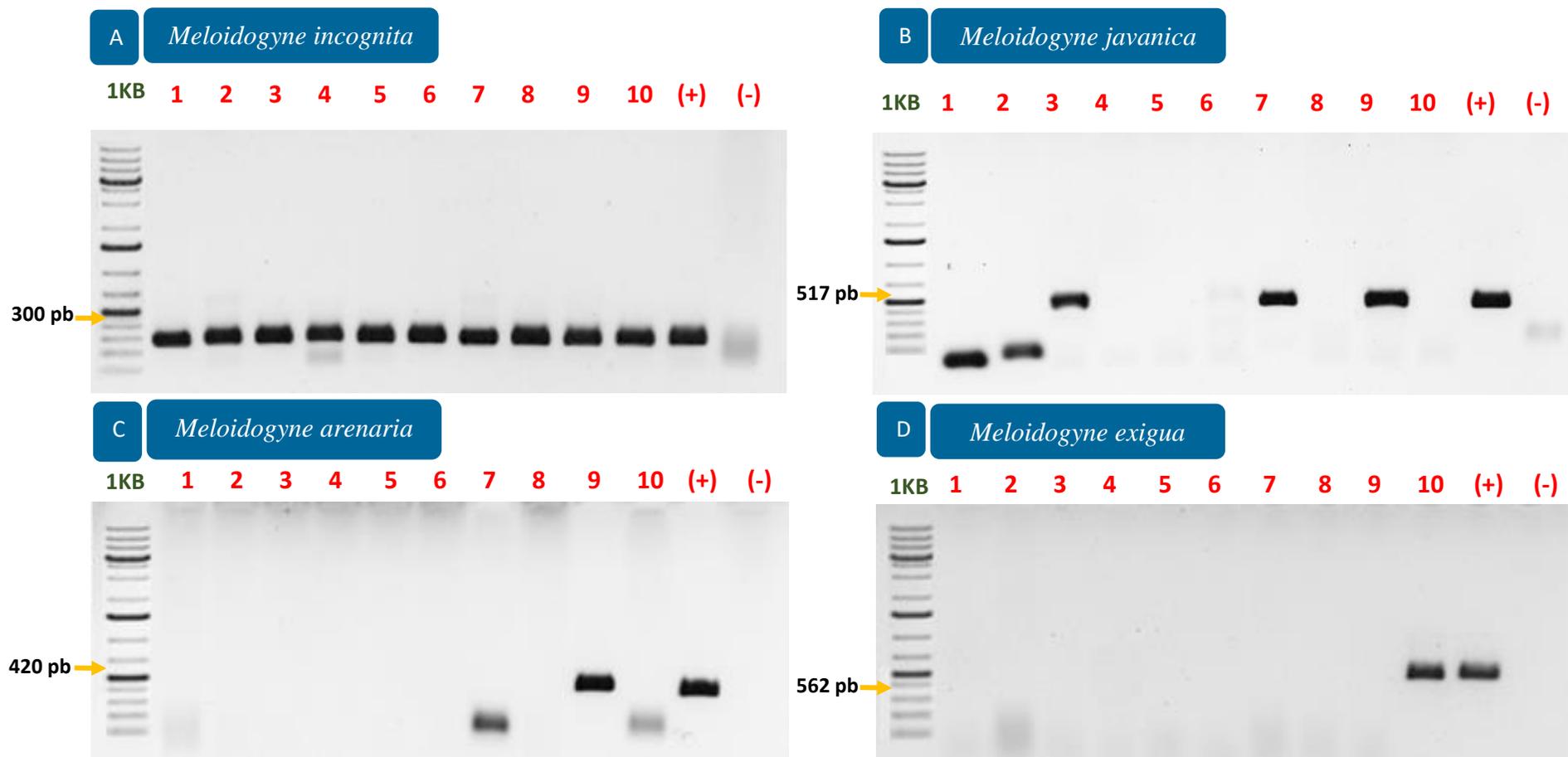


Figura 42: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de San José de Sisa, localidad de Huaja. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 +pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

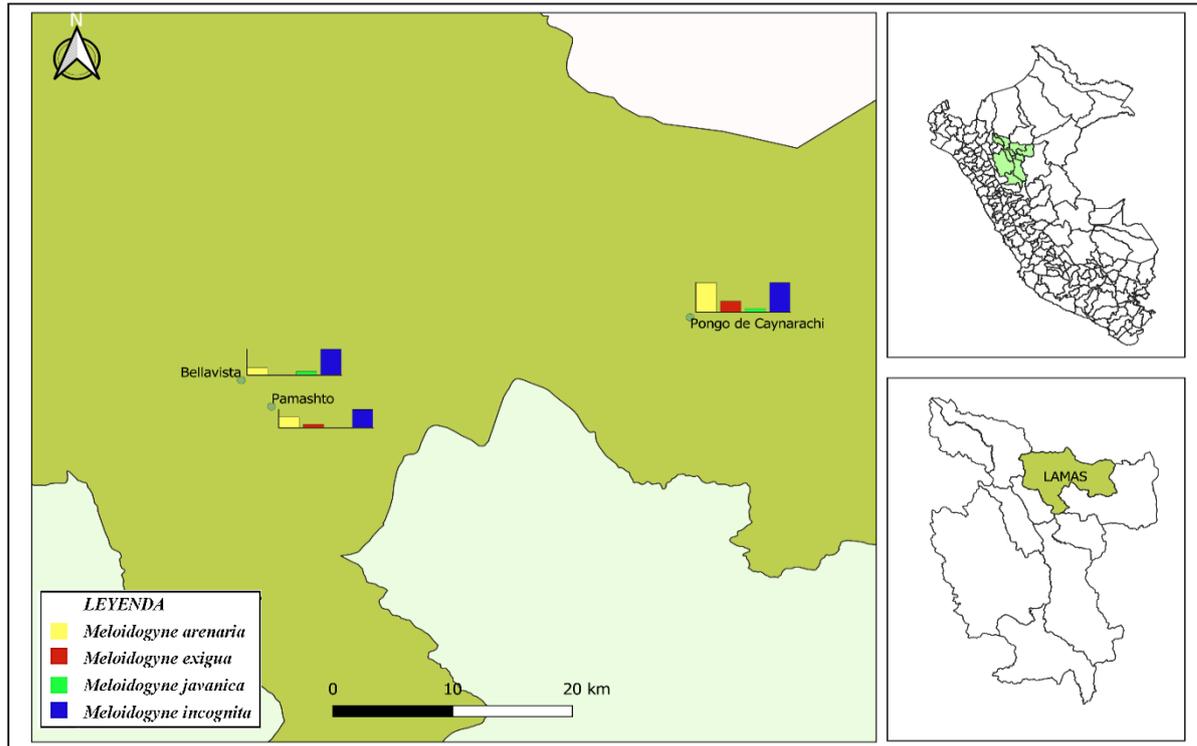


Figura 43: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi en la provincia Lamas

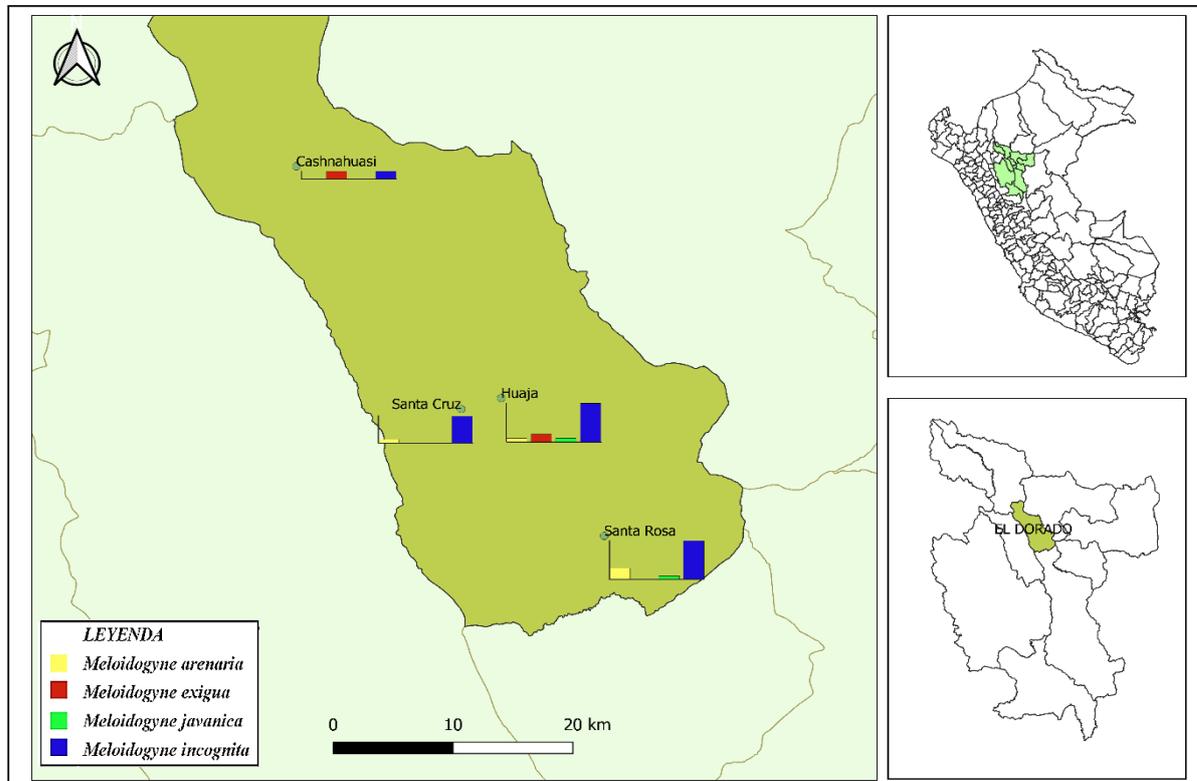


Figura 44: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi en la provincia El Dorado

c. Picota

Al igual que los dos casos anteriores, las pruebas realizadas con el ADN genómico extraído de especímenes hembra obtenidos en las cuatro localidades de la provincia de Picota, generaron amplificaciones de PCR para las especies: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. exigua*; siendo la primera especie la que presenta incidencia en todas las plantas evaluadas.

En la localidad de Buenos Aires (Figura 45) solo se obtuvieron amplificaciones de PCR para dos especies del género *Meloidogyne*, *M. incognita* y *M. arenaria*, encontrando solo una planta con incidencia de ambas especies (N° 5); de igual modo las pruebas realizadas en las muestras obtenidas en la localidad de Tingo de Ponaza (Figura 46) muestran la incidencia de ambas especies ya mencionadas, con la diferencia que se presentaron en la totalidad de plantas.

Por otro lado, en la localidad de San Antonio (Figura 47) se obtuvieron productos de amplificación de PCR para las cuatro especies de *Meloidogyne* evaluadas, encontrándose además una planta que presentaba incidencia de hasta tres de las especies (N° 4).

Finalmente, los resultados de las pruebas de PCR obtenidas en la localidad Shamboyacu (Figura 48) indican la incidencia de *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. exigua*, encontrándose también la incidencia de las tres especies en una misma planta (N° 1, 3 y 9).

d. Bellavista

Así también, los resultados obtenidos de las amplificaciones de PCR obtenidos de la provincia de Bellavista nos indican la presencia de tres especies: *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. exigua*, la presencia de estas especies difiere según la localidad, Limón, Santa Victoria y Consuelo

En las localidades de Limón (Figura 49) y Santa Victoria (Figura 50), los resultados de las pruebas nos muestran que al menos una de las plantas evaluadas no presenta incidencia de *M. incognita* (N° 10 y N° 4 respectivamente) por lo contrario ambas plantas en las distintas localidades muestran resultados positivos para *M. arenaria*. Además, en ambas localidades también se observan plantas con incidencia de las tres especies antes mencionadas, planta N° 9 en la localidad de Limón y planta N° 2 en la localidad Santa Victoria.

Por último, todas las plantas evaluadas en la localidad de Consuelo (Figura 51) presentaron amplificación de productos PCR para *M. incognita*.

Los resultados obtenidos en estas dos provincias (Picota y Bellavista) pueden resumirse en la Figura 52 y 53 respectivamente. Donde se muestra la distribución de especies reportadas según la cantidad de muestras en las que se detectaron en cada localidad evaluada.

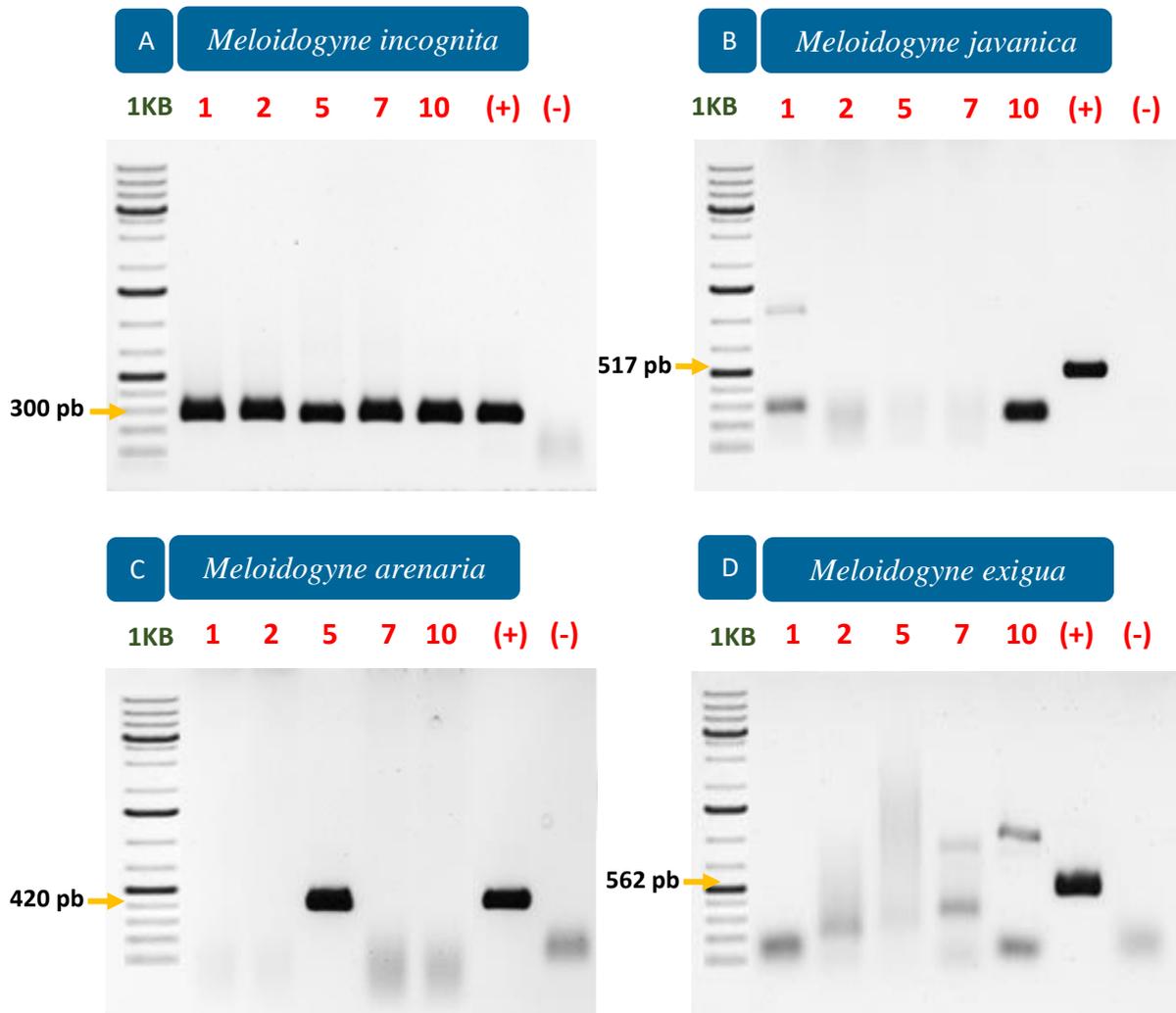


Figura 45: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sacha inchi del distrito de Buenos Aires, localidad de Buenos Aires. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

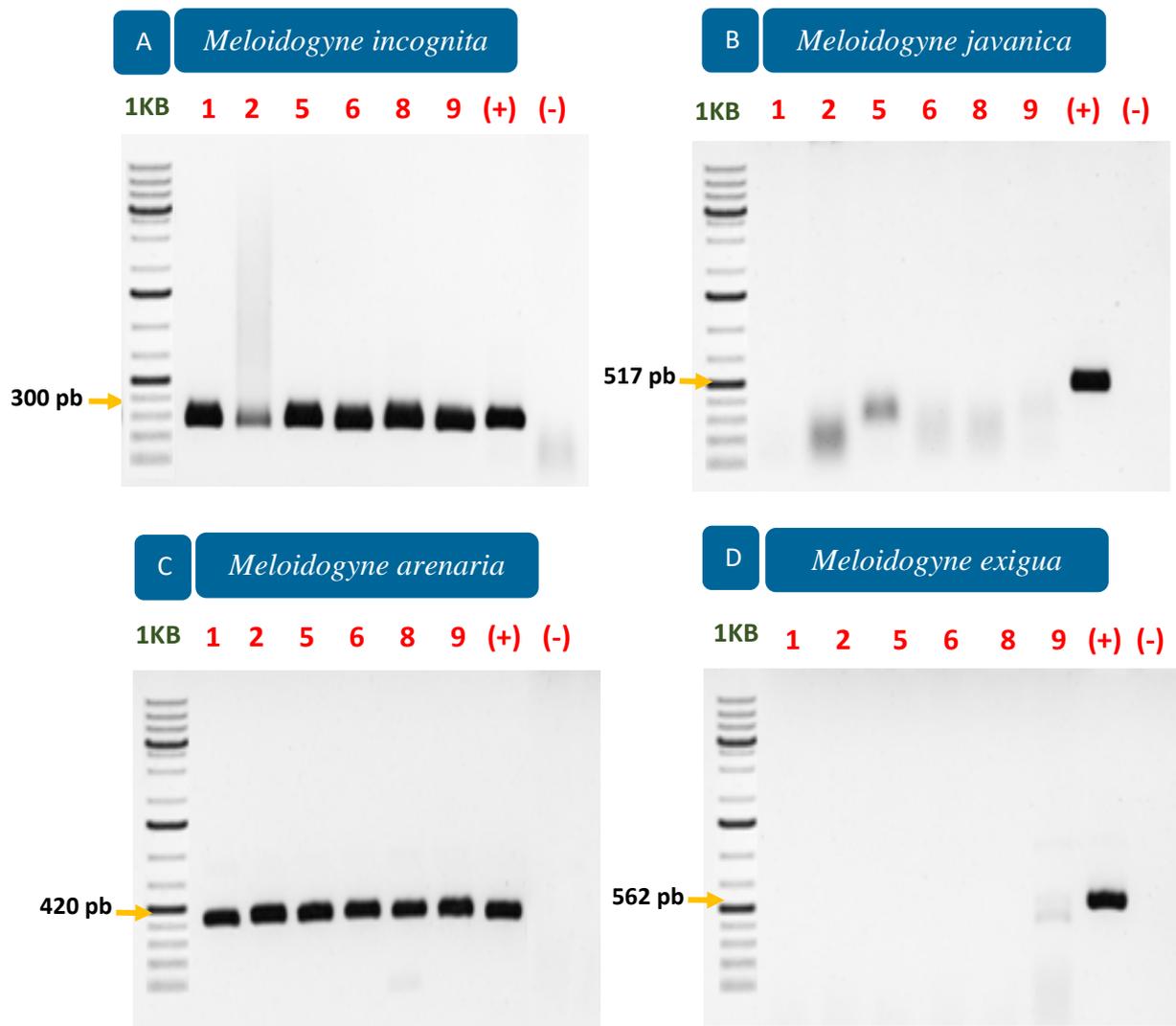


Figura 46: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de Tingo de Ponaza, localidad de Tingo de Ponaza. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

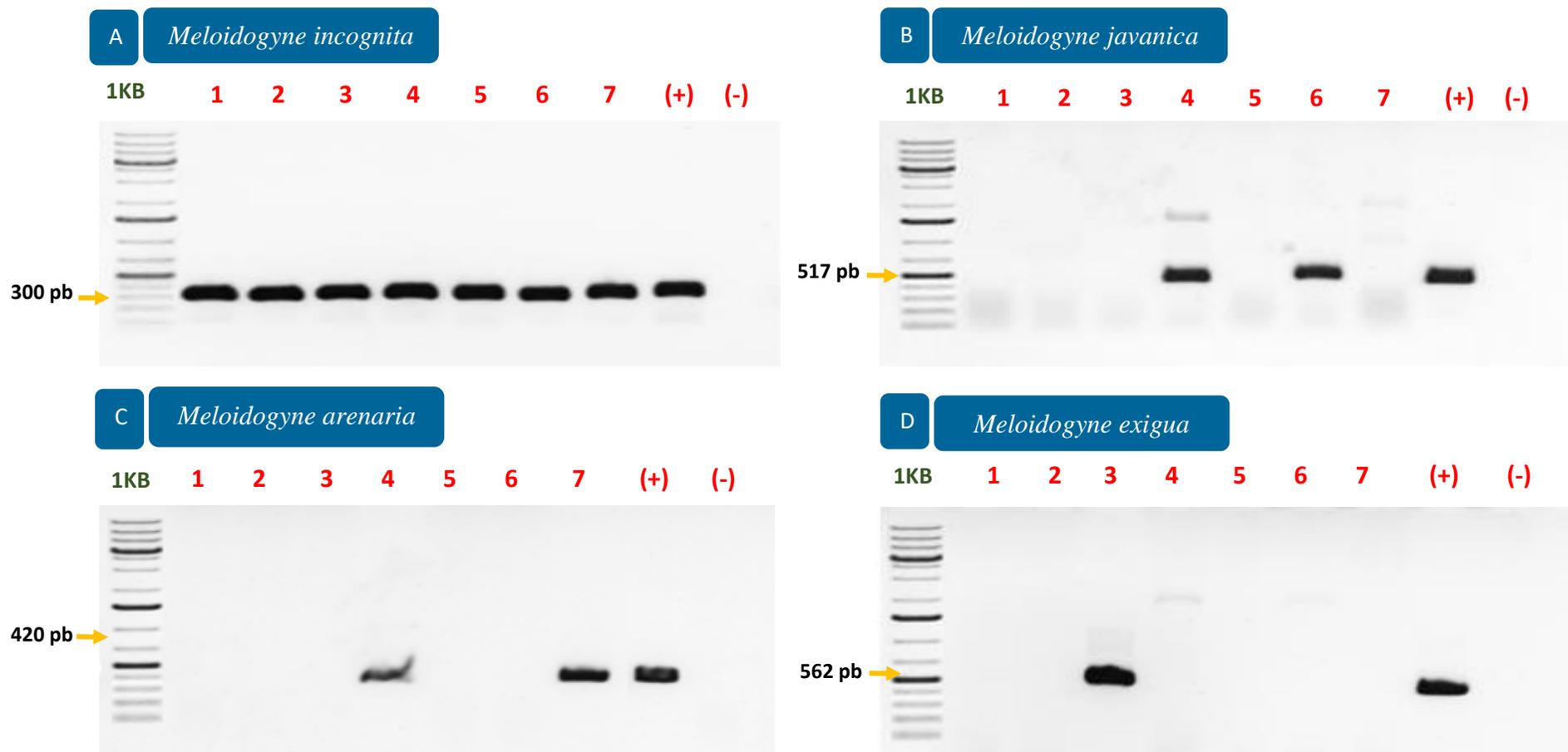


Figura 47: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de Picota, localidad de San Antonio. A: Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), B: Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), C: Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), D: Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

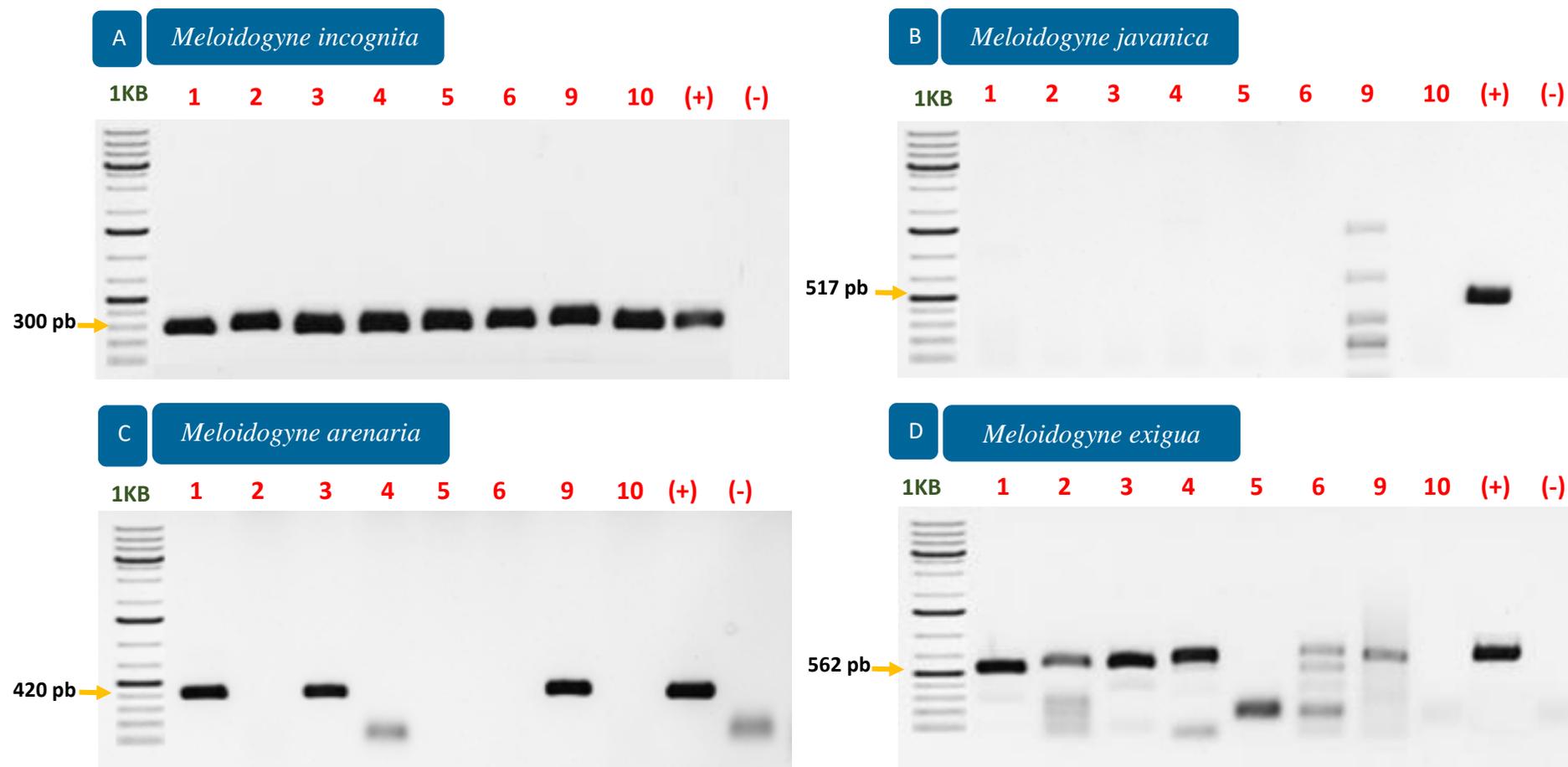


Figura 48: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de Shamboyacu, localidad de Shamboyacu. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

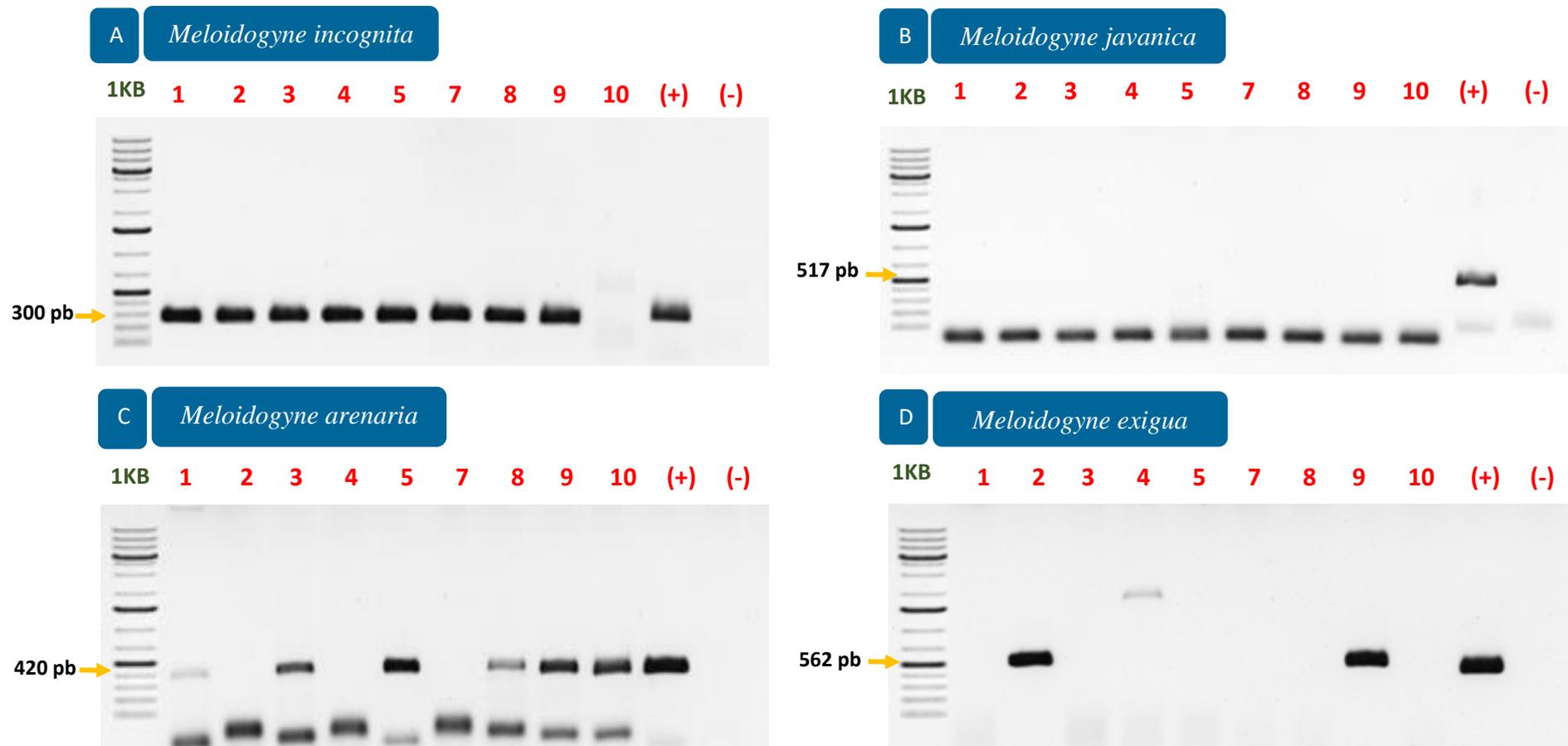


Figura 49: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Bellavista, localidad de Limón. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

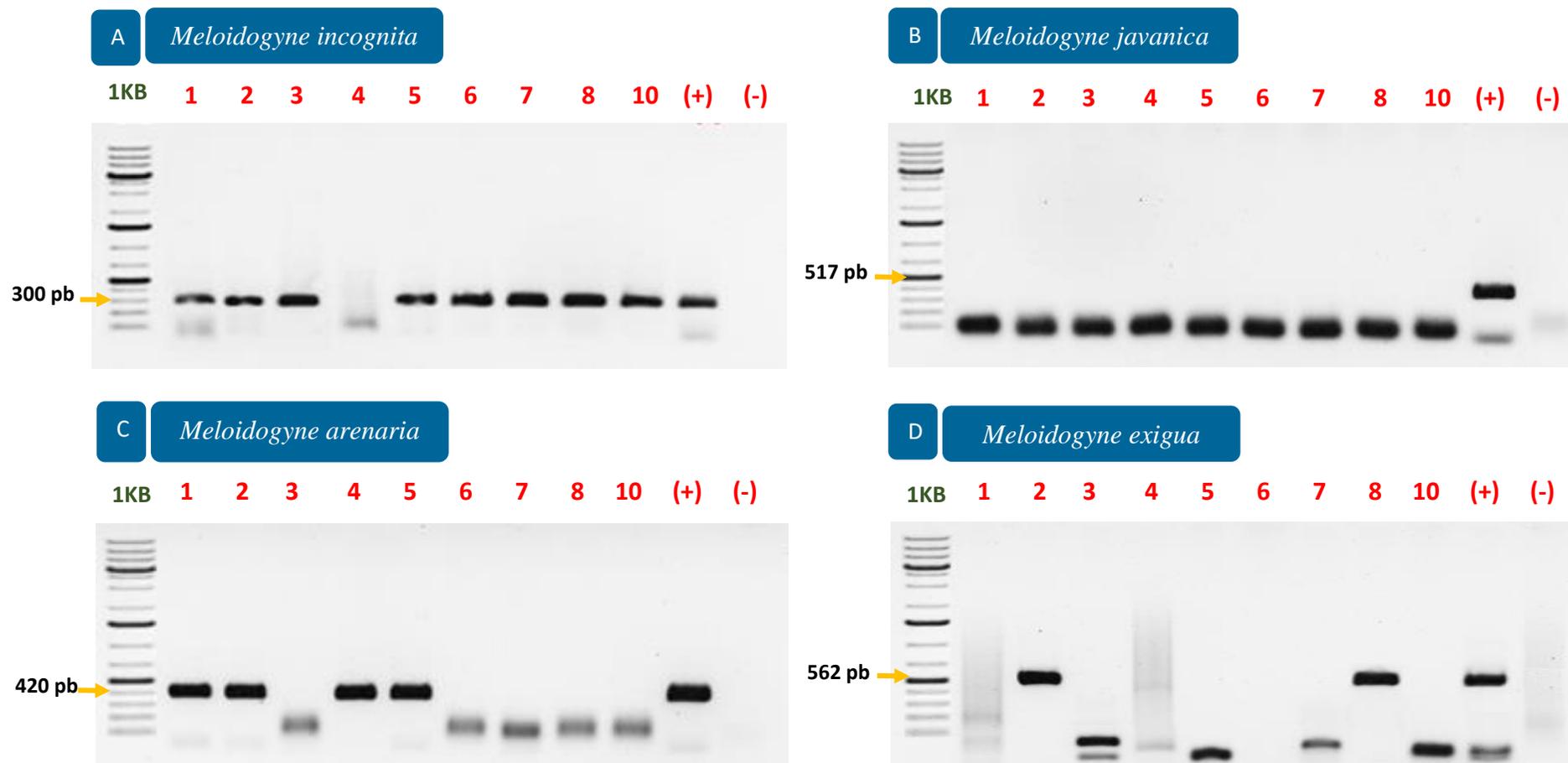


Figura 50: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de San Pablo, localidad de Santa Victoria. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

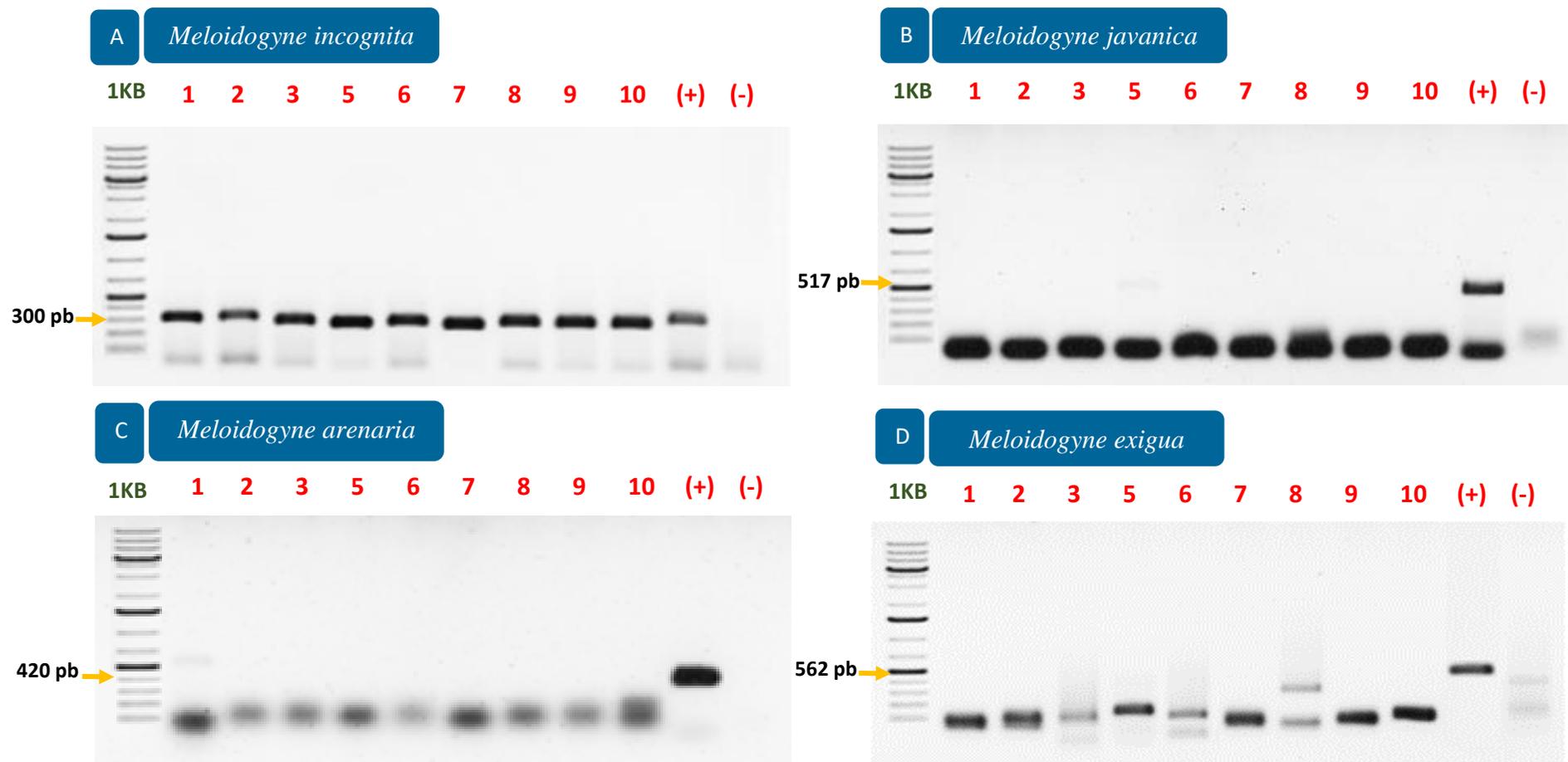


Figura 51: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de San Pablo, localidad de Consuelo. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

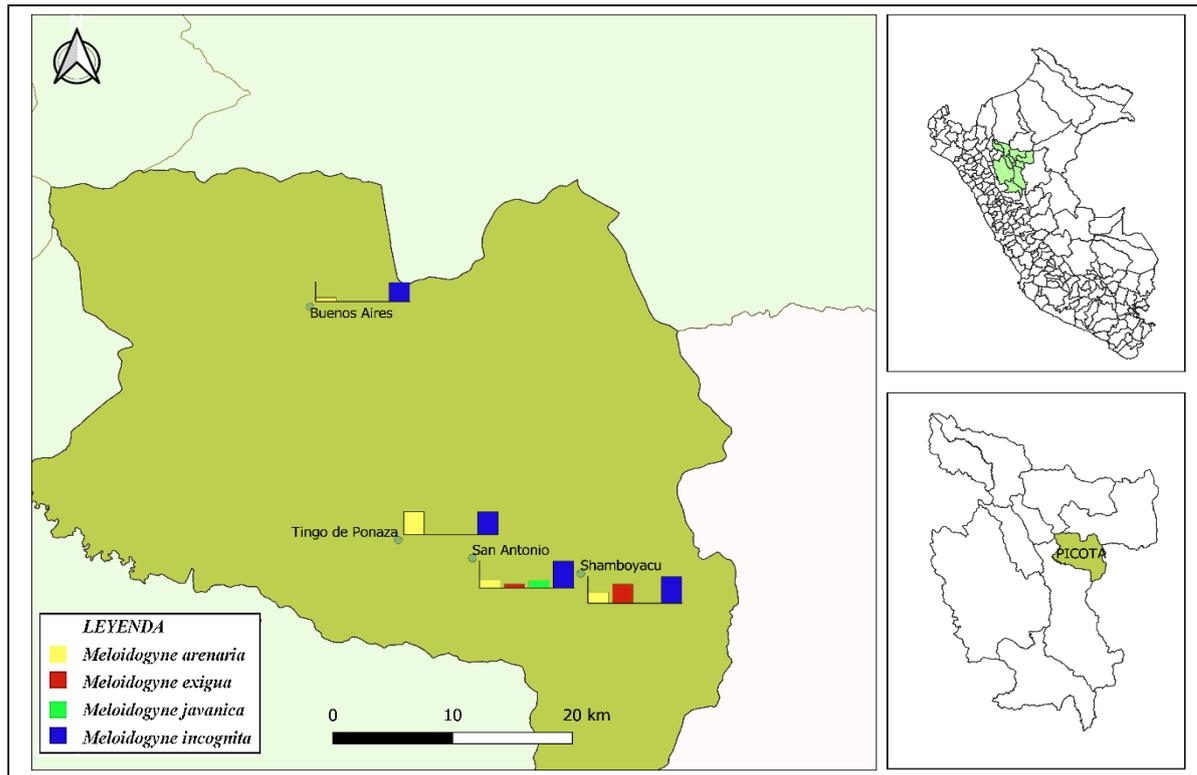


Figura 52: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi en la provincia Picota

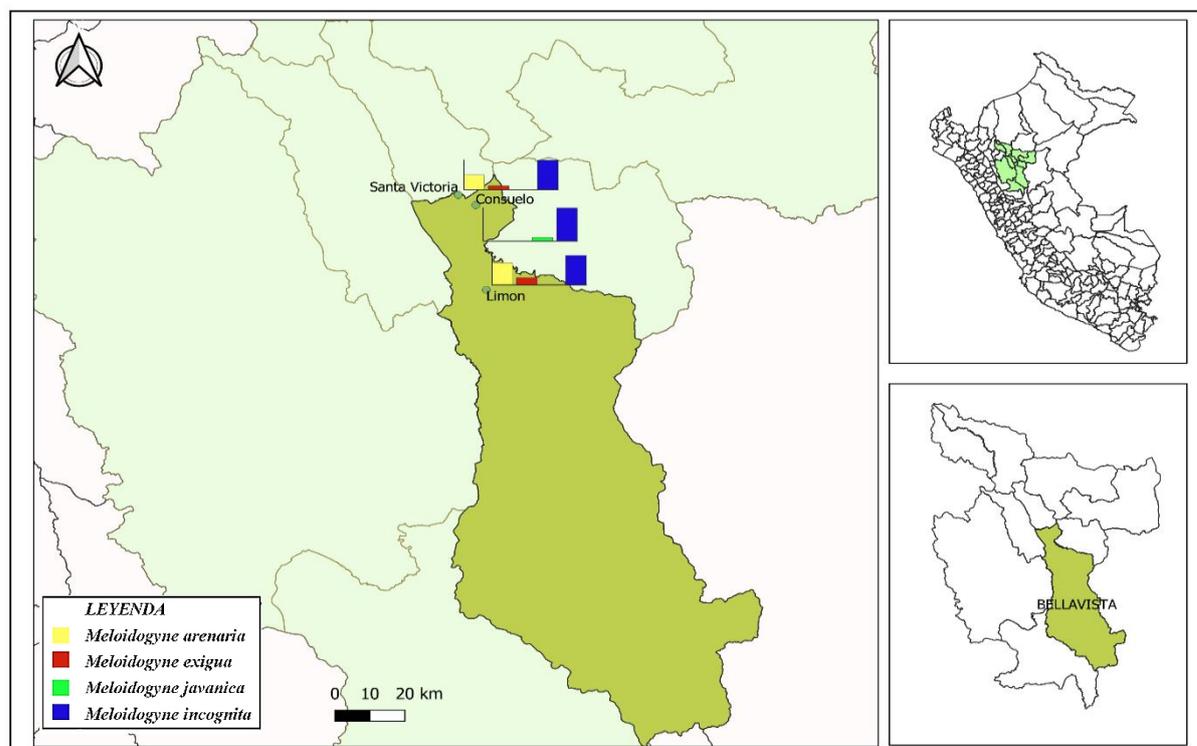


Figura 53: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi en la provincia Bellavista.

e. San Martín

La Provincia de San Martín presentó resultados positivos en las amplificaciones de PCR para las cuatro especies de estudio: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. exigua*, variando la presencia de cada una según la localidad de muestreo, Tununtunumba, Bello Horizonte y Morales.

En las localidades de Tununtunumba (Figura 54) y Bello horizonte (Figura 55), la amplificación de resultados de PCR muestra resultados positivos solo para dos especies, *M. incognita* y *M. arenaria*. Por otro lado, en la localidad de Morales (Figura 56) los resultados de las pruebas realizadas nos evidencian la incidencia de las cuatro especies de *Meloidogyne* antes mencionadas, en dichos resultados también se observa que la planta N° 6 solo presenta incidencia de *M. javanica* y la planta N° 8 con incidencia de hasta tres de las especies mencionadas.

f. Moyobamba y Rioja

Por último, los resultados de las amplificaciones de producto PCR realizados para el ADN genómico de especímenes hembra obtenidos en la parcela muestreada en la provincia de Moyobamba, localidad de Rafael Belaunde dieron positivo solo para la especie *M. incognita*, Figura 57. Mientras que, en las muestras obtenidas en la provincia de Rioja, localidad de Segunda Jerusalén se puede observar resultados positivos para las cuatro especies: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. exigua* (Figura 58).

Los resultados obtenidos en estas tres provincias (San Martín, Moyobamba y Rioja) pueden resumirse en la Figura 59 y 60 respectivamente. Donde se muestra la distribución de especies reportadas según la cantidad de muestras en las que se detectaron en cada localidad evaluada.

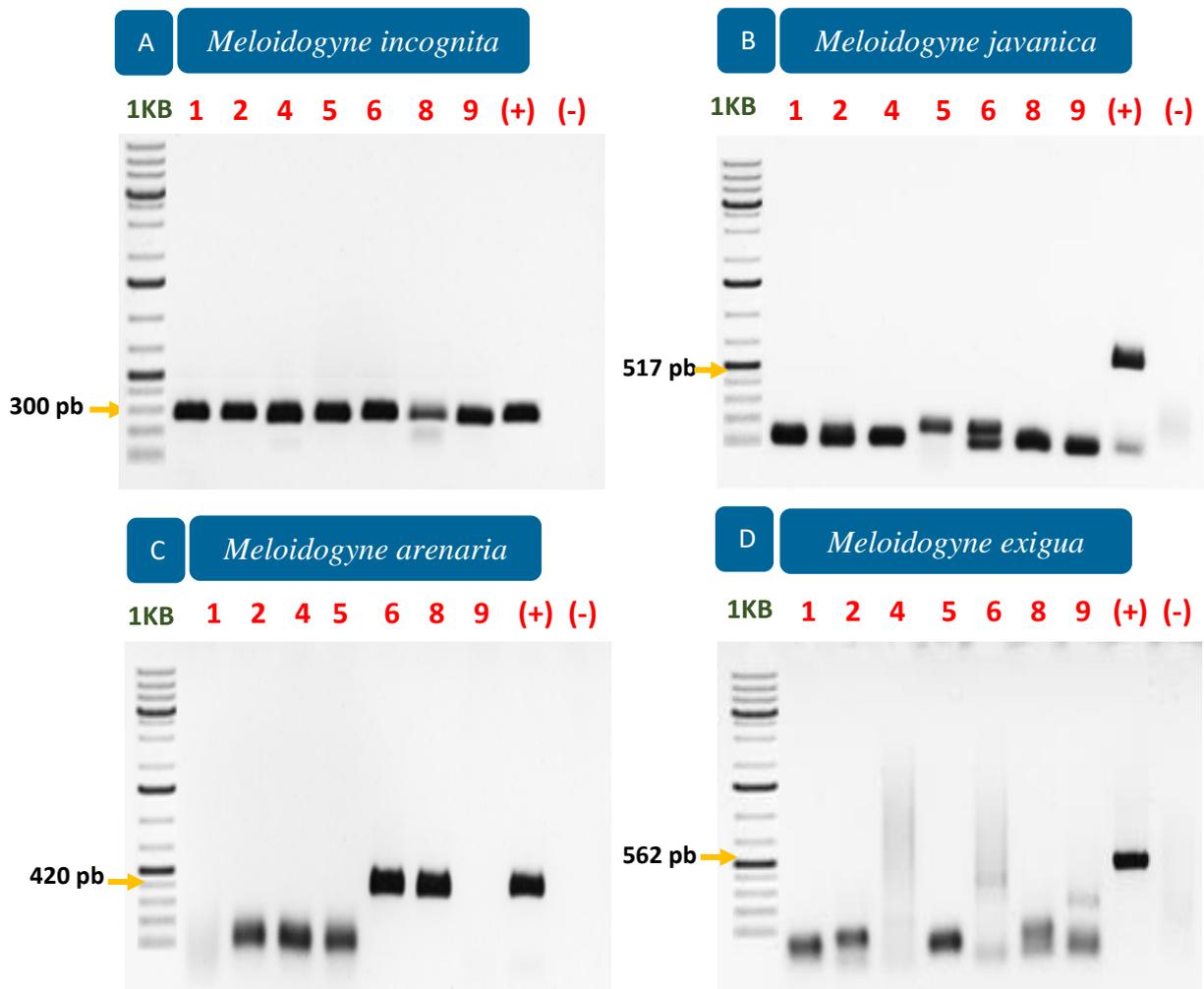


Figura 54: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Chazuta, localidad de Tununtunumba. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

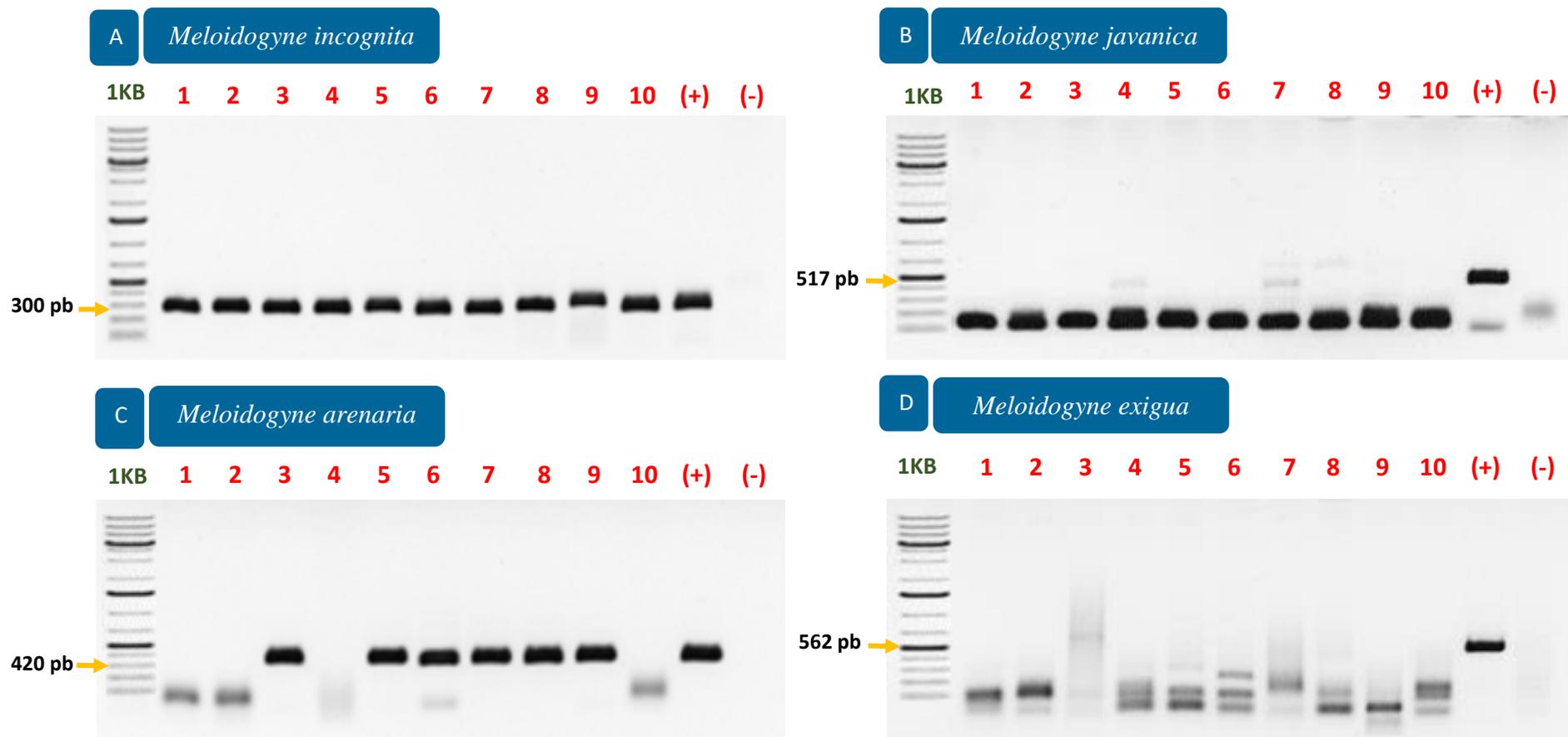


Figura 55: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachu inchi del distrito de Banda de Shilcayo, localidad de Bello Horizonte. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

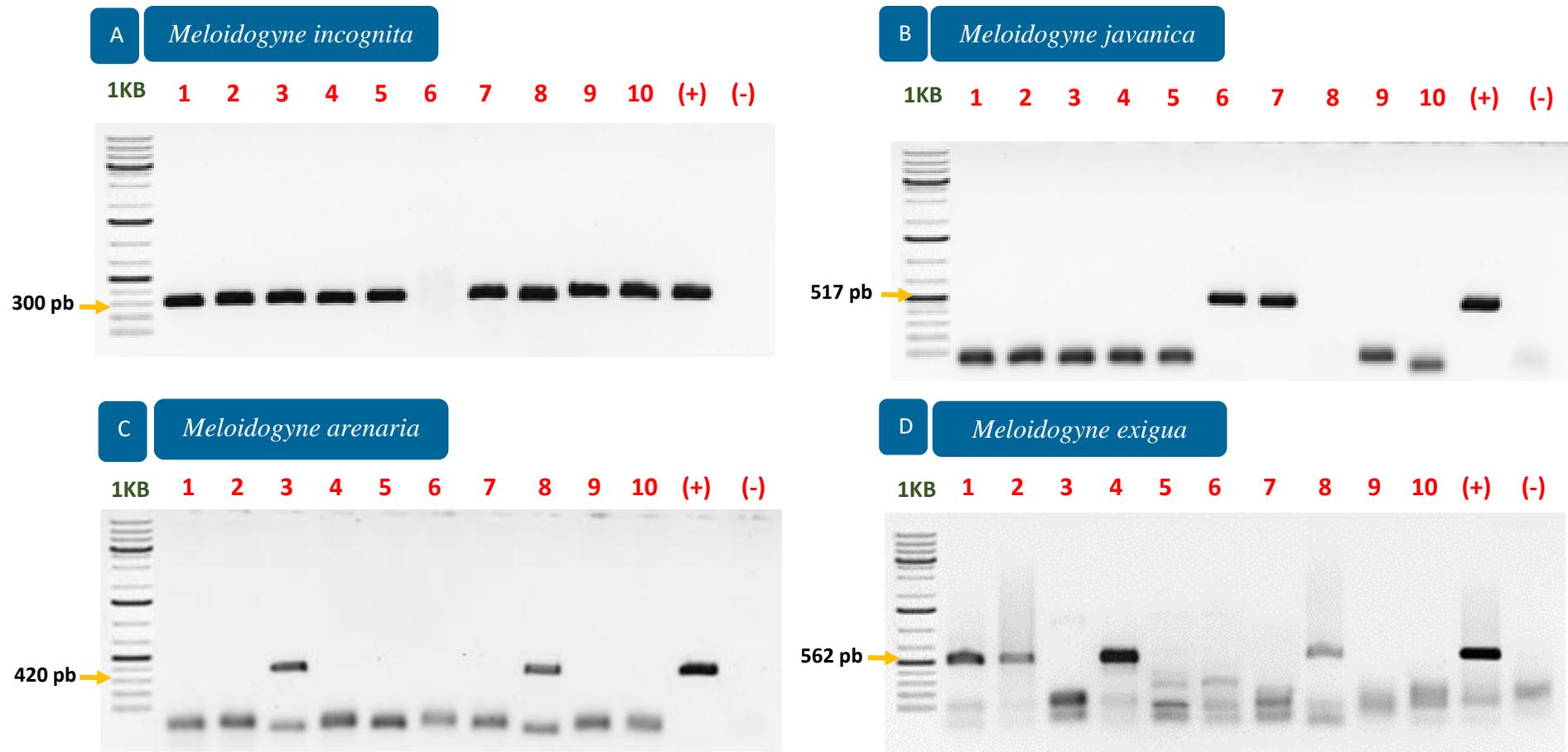


Figura 56: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 10 plantas de sachu inchi del distrito de Tarapoto, localidad de Morales. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

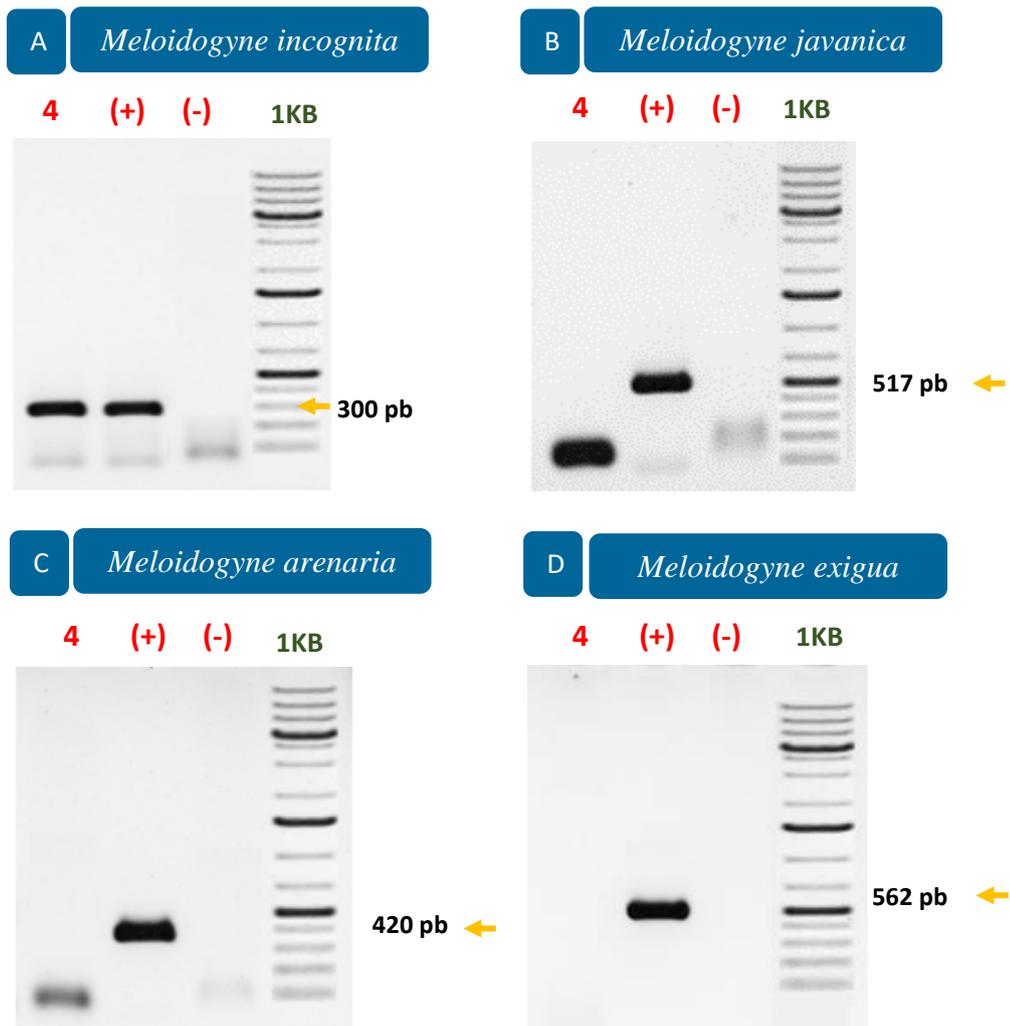


Figura 57: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 2 plantas de sachá inchi del distrito de Moyobamba, localidad de Rafael Belaunde. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

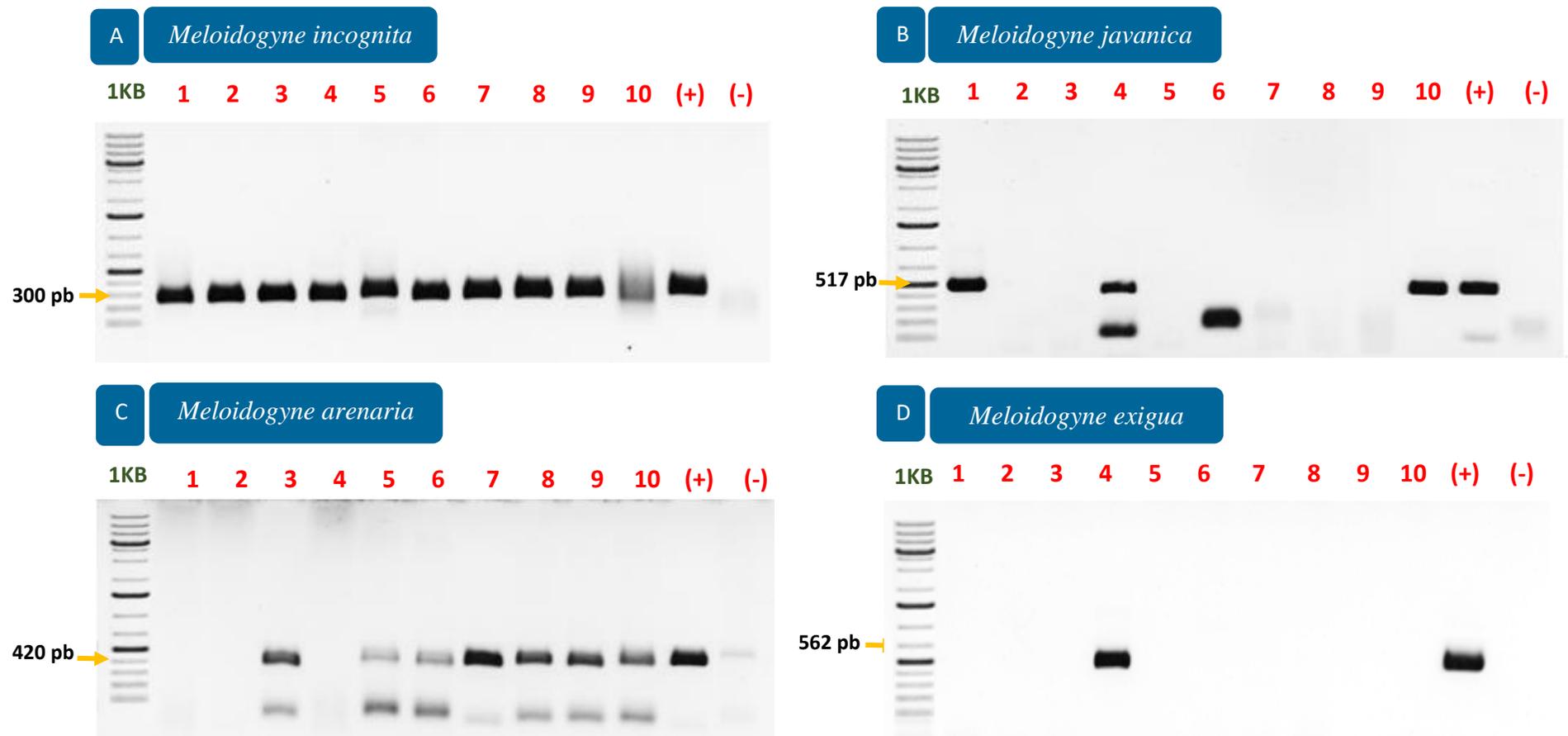


Figura 58: Geles de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR para *Meloidogyne* spp. en 7 plantas de sachá inchi del distrito de Rioja, localidad de Segunda Jerusalem. **A:** Identificación de *M. incognita* usando el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **B:** Identificación de *M. javanica* usando el primer Mjav / Mjav (517 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **C:** Identificación de *M. arenaria* (420 pb), un control positivo (+) y un control negativo (-), **D:** Identificación de *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb). Control positivo (+) y un control negativo (-).

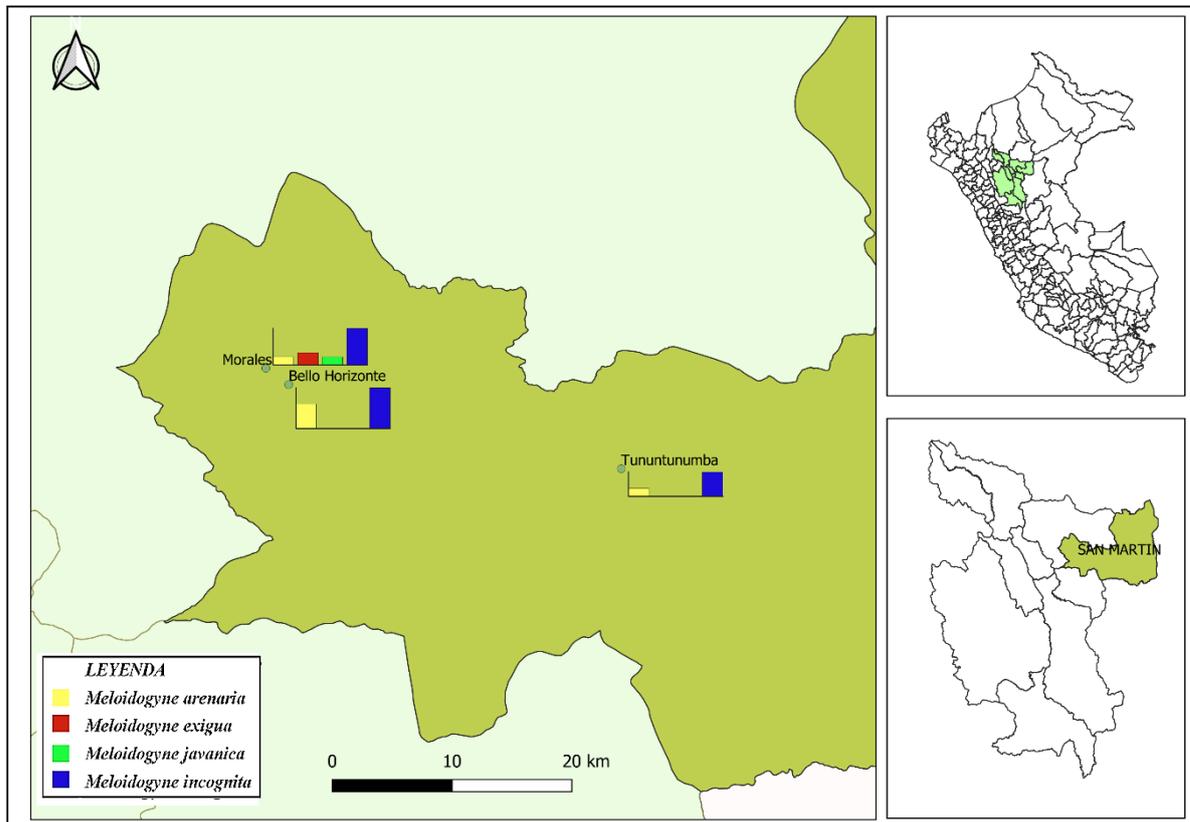


Figura 59: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi en la provincia San Martín.

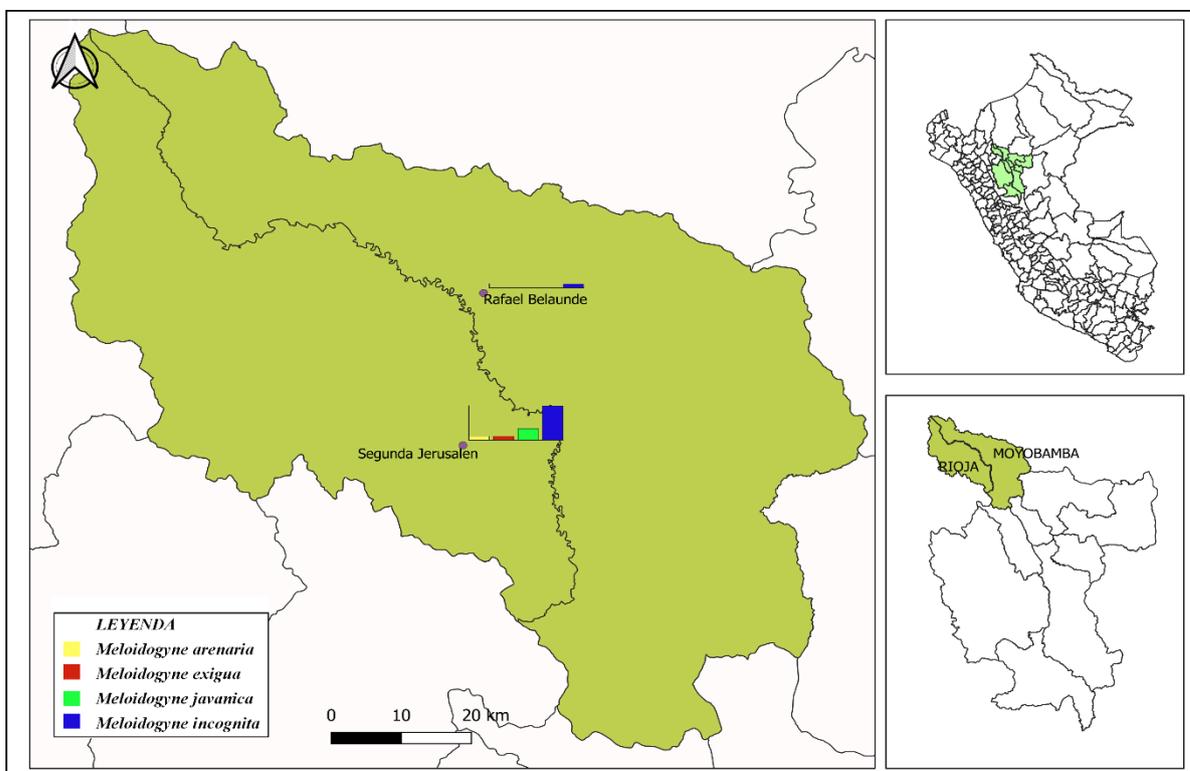


Figura 60: Identificación molecular y distribución de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de sacha inchi en la provincia Moyobamba y Rioja

V. CONCLUSIONES

- Los mayores valores de densidad poblacional de nematodos (J_2) en raíces de sacha inchi se concentran en la provincia de Picota y San Martín. Asimismo, se demostró que esta variable está relacionada directamente con el nivel de nodulación evaluada en las raíces muestreadas.
- Los modelos lineales generalizados (GLM_s) utilizados para la identificación de las variables predictoras relacionadas a la densidad poblacional de nematodos, determinaron que las variables cultivo secundario (cacao), edad del cultivo, porcentaje de materia orgánica en el suelo y altitud de la zona muestreada explican la mayor proporción de la variación de la población de nematodos del género *Meloidogyne* en raíces.
- La identificación morfológica de nematodos hembras de género *Meloidogyne* mediante patrones perineales nos muestra la presencia de hasta tres especies por planta muestreada: *M. incognita* la cual alcanzó el mayor porcentaje de ocurrencia en todas las parcelas evaluadas seguida por *M. arenaria* y *M. javanica* respectivamente.
- La identificación de especies de *Meloidogyne* por medio de un análisis molecular usando primers específicos SCAR, nos da como resultado la presencia de hasta cuatro especies por muestra de ADN de nematodos hembra obtenidos de cada planta; encontrándose productos de amplificación para *M. incognita* con el primer Mi2F4 / Mi1R1 (300 pb), *M. arenaria* usando el primer (517 pb), *M. javanica* con el primer Mjav / Mjav (517 pb) y *M. exigua* usando el primer exD15F/ exD15R (562 pb).

VI. RECOMENDACIONES

- Es necesario ampliar la cantidad de muestreos para obtener un patrón de distribución más consistente de cada especie, en los cuales no solo se considere la evaluación de los nematodos presentes en la raíz de la planta sino también los especímenes que se encuentren en el suelo.
- Realizar una selección adecuada de primers para identificación molecular para poder realizar un PCR multiplex y con eso reducir la cantidad de pruebas moleculares y poder identificar más de una especie del género *Meloidogyne* en una sola prueba.
- El presente trabajo permite identificar las especies con mayor incidencia, lo cual nos permitirá realizar proyectos de investigación para la busca de ecotipos del cultivo de sachá inchi que presenten tolerancia al nematodo fitoparásito.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. (2005). Enfermedades de las plantas causadas por nematodos. (Guzman, M., 2.^a ed.). *Fitopatología* (pp. 734 – 745). Limusa.
- Arévalo, G. (1999). El cultivo del sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonia. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Estación Experimental Agraria "El Porvenir". Tarapoto. San Martín.
- Barker, K. R. (1985). Nematode Extractions and Bioassays. *An Advance Treatiise on Meloidogyne*. North Carolina State University.
- Barker, K. R., Hussey, R. S., Krusberg, L. R., Bird, G. W., Dunn, R. A., Ferris, H., Ferris, V. R., Freckman, D. W., Gabriel, C. J., Grewal, P. S., MacGuidwin, A. E., Riddle, D. L., Roberts, P. A. y Schmitt, D. P. (1994). Plant and Soil Nematodes: Social impact and focus for the future. *Journal of Nematology*, 26 (2), 127-137.
- Barros, P., Pedrosa, E.,Cardoso, M. y Rolim, M. (2017). Relationship between soil organic matter and nematodes in sugarcane fields. *Semina: Ciências Agrárias*, 38, (2), 551-560. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n2p551>.
- Biblioteca conmemorativa Orton. (1987). Bibliografía corta sobre Plukenetia. Euphorbiaceae. Comunicación DC/SIT-55 del 27 de enero, N° 3242.
- Bird, D. M. y Kaloshian, I. (2003). Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00045-6).
- Blok, V. y Powers, T. (2009). Biochemical and molecular identification. En Perry, R., Moens, M., Starr, J. (Eds). *Root-knot nematodes* (pp. 98-112). CAB International.
- Brako, L. y Zarucchi, L. (1993). Catalogue of the Flowering Plants and Giosperms of Perú. *Missouri Botanical Garden*, 45(1-11), 1- 1286.

- Bridge, J. y Page, S. L. J. (1980). Estimation of Root-knot Nematode Infestation Levels on Roots Using a Rating Chart. *Tropical Pest Management*, 26(3), 296-298. <https://doi.org/10.1080/09670878009414416>
- Calero, B. R. (2013). La cadena de valor del sacha inchi en la región San Martín: Análisis y lineamientos estratégicos para su desarrollo. Proyecto Perúbiodiverso- PBD.
- Cardinal-McTeague, W. M., Wurdack, K. J., Sigel, E. M. y Gillespie, L. J. (2019). Seed size evolution and biogeography of *Plukenetia* (Euphorbiaceae), a pantropical genus with traditionally cultivated oilseed species. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1308-9>
- Castaño, D., Valencia, M., Murillo, E., Mendez, J. y Eras, J. (2012). Composición de ácidos grasos de sacha inchi (*Plukenetia volúbilis* Linneo) y su relación con la bioactividad del vegetal. *Revista chilena de nutrición*, 39(1), 45-52. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000100005>
- Chirinos, O., Adachi, L., Calderón, F., Díaz, R., Larrea, L., Mucha, G. y Roque, L. (2009). *Exportación de aceite de sacha inchi al mercado de Estados Unidos*. Universidad ESAN. <https://hdl.handle.net/20.500.12640/92>.
- Chirinos, R., Zuloeta, G., Pedreschi, R., Mignolet, E., Larondelle, Y. y Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141, 1732–1739. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>.
- Chitwood, B.G. (1949). A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Root-knot nematodes*. (pp. 90–104). Proceedings of the Helminthological Society of Washington.
- Chitwood, D. J., Perry, R. N. y Starr J. L. (Eds.). (2009). Reproduction, physiology and biochemistry. *Root-knot nematodes* (pp.182-200). CAB International.
- Coolen, W.A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and another nematodes from roots and soil. En Lamberti, F. y Taylor, C.E. (Eds.). *Root-knot nematodes (Meloidogyne species)* (pp. 317-329). Acad. Press, London.
- Correa, J. y Bernal, H. (1992). Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. *SECAB*. 5, 577-596.

- Cossio, C.M. (2018). *Caracterización de poblaciones de nematodos del género Meloidogyne asociadas a los cultivos de Capsicum y espárrago en las principales zonas productoras del norte del Perú* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Piura]. <https://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1258>.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M. y Claudius-Cole, B. (2007). Apéndice 3: Índices para medir el daño causado por los nematodos. *Practical plant nematology: a field and laboratory guide* (pp. 75-82). SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA).
- Dias-Arieira, R. C., Ceccato, F. J., Marinelli, E. Z., Boregio Vecchi, J. L., De Oliveira Arieira, G. y Santana-Gomes, S. (2021). Correlations between nematode numbers, chemical and physical soil properties, and soybean yield under different cropping systems, *Rhizosphere*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100386>.
- Díaz, A. (2014). Monografía sobre los conocimientos botánicos de la familia Euphorbiaceae y la especie *Croton lechleri*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4714.5123>
- Díez-Rojo, M. A., Bello, A., Escuer, M., López-Pérez, J. A. y García-Álvarez, A. (2006). Nematodos Fitoparásitos encontrados en Castilla León, alternativas no químicas de control. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M. y Eigend, M. (2009). Factsheet: Datos botánicos de sacha inchi. *Plukenetia volubilis* L. Proyecto Perúbiodiverso – PBD.
- Dong, K., Dean, R. A., Fortnum, B. A. y Lewis, A. S. (2001). Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica*, 31(2), 271-280.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem*, 19, 11-15.
- Eisenback, J. D., Hirschmann, H., Sasser, J. N. y Triantaphyllou, A. C. (1981). A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial Key. International Meloidogyne Project (IMP(IMP)).

- Eisenback, J. D. (1985). Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Proyecto Internacional de Meloidogyne (IMP)*, 8,95-112.
- Eisenback, J. D. y Triantaphyllou, H. H. (1991). *Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races*. En W. R. Nickle (Eds.). *Manual of Agricultural Nematology*. <https://doi.org/10.1201/9781003066576-6>.
- Evans, A. A. F. y Perry, R. N. (2009). Survival mechanisms. En Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds.). *Root-knot nematodes* (pp. 201-219). CAB International.
- García, A. C. (2006). Identificación de especies de nematodos fitopatógenos de los géneros *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. por medio de dos técnicas moleculares. Informe de Práctica de Especialidad en Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Gutiérrez, L.; Rosada, L. y Jiménez, A. (2011). Composición química de las semillas de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y características de su fracción lipídica. *Grasas y Aceites*, 62(1), 76-83.
- Hirschmann, H. (1985). The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. *Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development*, 1, 79-93.
- Hooper, D. J. (1990). Extraction and processing of plant and soil nematodes. En Luc, M. Sikora, R. A. y Bridge, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in Subtropical agriculture* (pp.45-68). CAB International.
- Hunt, D. J. y Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. En Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds.). *Root-knot nematodes* (pp. 55-97). CAB International.
- Integrated Taxonomic Information System [ITIS]. (2022, 1 de abril). Informe Taxonómico. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194400#null.
- Karajeh, M. R., Abu-Gharbieh, W. I. y Masoud, S. A. (2010). DNA Extraction and PCR-Based Diagnosis of the Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species and Races) of Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 6(3), 342-352.

- Karssen, G. y Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. En Perry, RN, Moens, M. (Eds.). *Plant Nematology* (pp. 59-88). CAB International.
- Kiewnick, S., Wolf, S., Willareth, M. y Frey, J. (2013). Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. *Nematology*, 15(7), 891-894.
- Macbride, J.F. (1951). Euphorbiaceae. *Flora of Perú* (pp. 115-118). Field Museum of Natural History.
- Manco, E. (2006). Cultivo de sacha inchi. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – INIA. Tarapoto.
- Martínez, M., Jiménez, J., Cruz, R., Juárez, E., García, R. y Cervantes, A. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*, 73(2), 155-281. <http://www.ejournal.unam.mx/bot/073-02/BOT73205.pdf>
- Meng, Q. P., Long, H. y Xu J. H. (2004). PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34, 204–210. <http://zwblxb.magtech.com.cn/EN/>.
- Ministerio de desarrollo agrario y riego (MIDAGRI). 2015. Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2014. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/2730325-compendio-anual-de-produccion-agricola>.
- Ministerio de desarrollo agrario y riego (MIDAGRI). 2016. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola y Ganadera 2015. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/2730325-compendio-anual-de-produccion-agricola>.
- Ministerio de desarrollo agrario y riego (MIDAGRI). 2022. Cuadros en Excel del Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2021. Perú. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/2730325-compendio-anual-de-produccion-agricola>.
- Ministerio de comercio exterior y turismo (MINCETUR). (2019, 22 marzo). Síntesis de Actividad Exportadora de la Región San Martín-

2017. https://www.mincetur.gob.pe/wp-content/uploads/documentos/comercio_exterior/estadisticas_y_publicaciones/estadisticas/reporte_regional/Reporte_Regional_San_Martin.pdf.

- Moens, M., Perry, R. N. y Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. En Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds.). *Rootknot nematodes* (pp. 1-13). CAB International.
- Murga-Gutierrez, S.N, Colagiero, M., Rosso, L.C., Finneti Sialer, M.M. y Ciancio, A. (2012). Root-knot nematodes from asparagus and associated biological antagonists in Peru. *Nematropica*, 42(1), 57-62. <http://hdl.handle.net/20.500.12390/1131>.
- Onkendi, E. M., Kariuki, G. M., Marais, M., y Moleleki, L. N. (2014). The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: A review. *Plant Pathology*, 63,727–737. <https://doi.org/10.1111/ppa.12202>.
- Neira, E. (2018). *Identificación de especies de Meloidogyne asociadas al cultivo de Plukenetia volubilis L. con capacidad patógena en condiciones de vivero* [Tesis de pregrado, Universidad nacional San Martín]. <http://hdl.handle.net/11458/3327>.
- Padgham, J. L., Mazid, M. A., Duxbury, J. M., Abawi, G. S. y Hossain, M. (2004). Yield loss caused by *Meloidogyne graminicola* on lowland rainfed rice in Bangladesh. *Journal of Nematology*, 36(1), 42-48.
- Pariona, N. (2008). *Obtención de ácidos grasos del aceite de la Plukenetia volubilis L. “sacha inchi” para la utilización en la industria y estudio fotoquímico cualitativo de la almendra*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Peraza, W., Rosales, J., Esquivel, A., Hilje, I., Molina, R. y Castillo, P. (2013). Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus carica* L.) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2),337-346.
- Power, T.O. y Harris, T. S. (1993). A polymerase chain reaction method for identification of five *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25(1), 1-6.
- Powers, T. (2004). Nematode molecular diagnostics: From bands to barcodes. *Annu. Rev. Phytopathology*, 42, 367-385. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140348>.

- Randing, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R. M. D. G. y Castagnone-Sereno, P. (2002). Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45, 862-870. <https://doi.org/10.1139/g02-054>.
- Risco, M., Cachique, D., Ruiz, H., Solis, R., Ruiz, M. E. y Guerrero, J. C. (2010). Determination of a method of collection and preservation of pollen grains in sachu inchi (*Plukenetia volubilis* L.). IIAP. <https://doi.org/10.13140/2.1.1879.6484>.
- Rojas, M. y Salazar, L. (2013). Densidad crítica de *Meloidogyne exigua* en plantas de almácigo de café variedad caturra. *Agronomía Costarricense*, 37(2), 115-123.
- Rutter, W. B., Hewezi, T., Abubucker, S., Maier, T. R., Huang, G., Mitreva, M., Hussey, R. S. y Baum, T. J. (2014) Mining novel effector proteins from the esophageal gland cells of *Meloidogyne* incógnita. *The American Phytopathological Society*, 27(9), 965–974. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-03-14-0076-R>.
- Saboya, C. A. (2015). *Obtención de dos poblaciones mejoradas de sachu inchi (Plukenetia volubilis L.), con resistencia a Meloidogyne incognita mediante selección masal estratificada a partir de dos accesiones promisorias en la región San Martín* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Martín]. <http://hdl.handle.net/11458/638>.
- Santa Cruz, M. J. (2017). *Acción biológica de Clonostachys sp. sobre Meloidogyne incognita en Plukenetia volubilis, bajo condiciones controladas* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Martín]. <http://hdl.handle.net/11458/2417>.
- Sasser, J. N. y Carter, C. C. (1985). Overview of the International *Meloidogyne* Project 1975-1984. *An advanced Treatise on Meloidogyne*, 1, 19-24.
- Siddiqi, M.R. (2000). *Tylenchida: parasites of plants and insects*. 1° ed. Editora CAB International. Gran Bretaña.
- Sistema integrado de información de comercio exterior (SIICEX). (2018). Exportación del producto sachu inchi según sus principales mercados en US\$ 2005 – 2019. <http://www.siicex.gob.pe/siicex/apb/ReporteProducto.aspx?psector=1025&preporte=prodmerc&pvalor=1945>.

- Shukla, N., Kaur, P. y Kumar, A. (2016). Molecular aspects of plant-nematode interactions. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21, 477. <https://doi.org/10.1079/9781845930561.0234>.
- Solano, Y. (2018). *Identificación de especies de Meloidogyne asociadas al cultivo de café (Coffea arabica L.) y el daño causado en plantulas en vivero en San Martín- Perú* [Tesis de pregrado, Universidad nacional San Martín].
- Stetina, S. R., McGawley, E. C. y Russin, J. S. (1997). Extraction of root-associated *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*, 29, 209–15.
- Subbotin, S. A. y Moens, M. (2006). Molecular taxonomy and phylogeny. En Perry, R. N., Moens, M. (Eds.). *Plant Nematology* (pp. 33-58). CAB International.
- Talavera, M. (2003). Manual de Nematología Agrícola: Introducción al Análisis y al Control Nematológico para Agricultores y Técnicas de Agrupaciones de Defensa Vegetal. Brasil. Institut de Recerca i Formació Agrària i Pesquera-IRFAP.
- Taylor, A. y Sasser, J. (1983). Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz. North Carolina. EE.UU. Proyecto Internacional de *Meloidogyne* (PIM). <https://www.worldcat.org/title/biologia-identificacion-y-control-de-los-nematodos-de-nodulo-de-la-raiz-especies-de-Meloidogyne/oclc/11008592>.
- Torres, L. C. (2003). Principales Nematodos Fitoparásitarios. SENASA (Eds.). Perú. p: 1-3.
- Torres, C. V. (2018). *Extracción de ADN de Meloidogyne incognita a partir de muestras de suelo para detección molecular* [Tesis de postgrado, Universidad Nacional Agraria la Molina]. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3738>
- Triantaphyllou, A. C. (1985). Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root- knot nematodes. En K. R. Barker, J. N. Sasser y C. C. Carter (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne: Biology and Control* (pp. 113–126). North Carolina State University.
- USDA (United States Department of Agriculture). (s. f). Germplasm resources information Network (GRIN Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory. Recuperado de: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=416787>.
- Valles, C. R. (1990). *El "sacha inchi", planta nativa de importancia proteica y aceitera promisor para la selva alta*. Lima.

- Vasquez, R. y Rojas, R. (2016). Clave para identificar grupos de familias de Gymnospermae y angiospermae del Perú. http://www.jbmperu.org/curso/Clave_Identificacion_Plantas.pdf
- Vera, N. Y. (2014). *Técnica molecular de PCR para identificar las principales especies de Meloidogyne spp. en poblaciones provenientes de Perú* [Tesis de postgrado, Universidad Nacional Agraria la Molina]. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/1757>.
- Vovlas, N, Rapoport, H. F., Jimenez, R. M. y Castillo, P. (2005). Differences in Feeding Sites Induced by Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp., in Chickpea. *Phytopathology*, 95(4), 657-664. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0368>.
- Wyss, U., Munch, A. y Grundler, F. M. W. (1992). The Parasitic Behaviour of Second-Stage Juveniles of *Meloidogyne Incognita* in Roots of *Arabidopsis Thaliana*. *Nematologica*, 38(1), 98–111.
- Zeck, W. M. (1971). A rating scheme for field Evaluation root – know nematode infestations. *Pflanzenschutz Nachrichten*, 24, 141 – 144.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne, D. T. H. M. 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>.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi en la provincia de Lamas.

LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO
	269	2		617	3		140	2
	162	2		450	3		0	1
	94	2		450	3		0	1
	121	2		347	2		149	2
Bellavista	628	3	Pongo de Caynarachi	0	1	Pamashto	0	1
	0	1		0	1		96	2
	0	1		350	2		0	1
	116	2		333	2		0	1
	0	1		567	3		43	2
	93	2		0	1		426	3
PROMEDIO	148	1.8	PROMEDIO	311	2.1	PROMEDIO	85	1.6

Anexo 2: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi en la provincia El Dorado.

LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO
	536	3		0	1		0	1		667	3
	533	3		0	1		0	1		400	3
	383	2		333	2		418	2		333	2
	467	3		412	2		0	1		667	3
Santa Rosa	467	3	Santa Cruz	0	1	Cashnahuasi	825	4	Huaja	471	3
	333	2		150	2		0	1		700	3
	717	3		117	2		0	1		967	4
	658	3		317	2		0	1		458	3
	389	2		300	2		0	1		267	2
	367	2		117	2		0	1		133	2
PROMEDIO	485	2.6	PROMEDIO	175	1.7	PROMEDIO	124	1.4	PROMEDIO	506	2.8

Anexo 3: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi en la provincia de Picota.

LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO
	778	3		822	4		1422	4		2693	5
	1520	4		711	3		1511	5		1754	5
	378	2		0	1		0	1		1797	5
	300	2		0	1		0	1		1711	5
Shamboyacu	1422	4	Tingo de Ponaza	430	2	Buenos Aires	148	2	San Antonio	1372	4
	1544	4		322	2		0	1		2467	5
	0	1		0	1		701	3		2620	5
	0	1		345	2		0	1		0	1
	0	1		340	2		0	1		0	1
	700	3		0	1		2689	5		0	1
PROMEDIO	664	2.5	PROMEDIO	297	1.9	PROMEDIO	647	2.4	PROMEDIO	1441	3.7

Anexo 4: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi en la provincia Bellavista.

LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO
	883	4		233	2		0	1
	467	3		667	3		468	3
	1167	4		983	4		538	3
	1650	5		0	1		200	2
Limón	1817	5	Consuelo	850	3	Santa Victoria	433	3
	0	1		450	2		900	4
	1767	5		200	2		300	2
	1033	4		233	2		567	3
	1167	4		400	3		0	1
	1333	4		850	3		267	2
PROMEDIO	1128	3.9	PROMEDIO	487	2.5	PROMEDIO	367	2.4

Anexo 5: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi en la provincia San Martín.

LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO
	350	2		0	1		1644	4
	0	1		267	2		1511	4
	0	1		735	3		1644	4
	167	2		292	2		2200	5
Tununtunumba	250	2	Bello Horizonte	356	2	Morales	1578	4
	333	2		542	3		711	3
	0	1		242	2		2200	5
	563	3		200	2		2711	5
	183	2		444	3		933	4
	0	1		644	3		1644	4
PROMEDIO	185	1.7	PROMEDIO	372	2.3	PROMEDIO	1678	4.2

Anexo 6: Densidad poblacional de nematodos del segundo estadio y grado de daño de *Meloidogyne* spp. en raíces de sachá inchi en la provincia Rioja y Moyobamba.

Provincia de Rioja			Provincia de Moyobamba		
LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO	LOCALIDAD	N° DE JUVENILES (J ₂)	GRADO DE DAÑO
	750	3		0	1
	956	4		0	1
	1600	5		0	1
	644	3		822	4
Segunda	1278	5	Rafael	0	1
Jerusalén	2133	5	Belaunde	0	1
	578	3		0	1
	1100	4		0	1
	944	4		0	1
	1400	4		0	1
PROMEDIO	1138	4	PROMEDIO	82	1.3

Anexo 7: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis del número de especímenes J₂ obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de Lamas.

Kruskal-wallis rank sum test

Data: J2_L by LUGAR_LAMAS

Kruskal-wallis chi-squared = 4.2014, df = 2, p-value = 0.1224

Anexo 8: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y Analisis de Comparaciones multiples (Test de Dunnet) del número de especímenes J₂ obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia El Dorado.

Kruskal-wallis rank sum test

Data: J2_D by LUGAR_DORADO

Kruskal-wallis chi-squared = 18.665, df = 3, p-value = 0.0003206

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Cashnahuasi - Huaja	-3.2481568	0.0011615525	0.006969315
2	Cashnahuasi - Santa Cruz	-0.4833567	0.6288425144	1.000000000
3	Huaja - Santa Cruz	2.7648001	0.0056957688	0.034174613
4	Cashnahuasi - Santa Rosa	-3.3061596	0.0009458421	0.005675052
5	Huaja - Santa Rosa	-0.0580028	0.9537463987	1.000000000
6	Santa_Cruz - Santa Rosa	-2.8228029	0.0047605828	0.028563497

Anexo 9: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis del número de especímenes J₂ obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de Picota.

```
Kruskal-wallis rank sum test
Data: J2_P by LUGAR_PICOTA
Kruskal-Wallis chi-squared = 5.3319, df = 3, p-value = 0.149
```

Anexo 10: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y Analisis de Comparaciones multiples (Test de Dunnet) del número de especímenes J₂ obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de Bellavista.

```
Kruskal-wallis rank sum test
Data: J2_B by LUGAR_BELLAVISTA
Kruskal-Wallis chi-squared = 10.081, df = 2, p-value = 0.00647
```

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Consuelo - Limón	-2.5312475	0.011365762	0.03409729
2	Consuelo - Santa Victoria	0.3943149	0.693348539	1.00000000
3	Limón - Santa Victoria	2.9255624	0.003438342	0.01031503

Anexo 11: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y Analisis de Comparaciones multiples (Test de Dunnet) del número de especímenes J₂ obtenidos de raíces de sachá inchi en la provincia de San Martin.

```
Kruskal-wallis rank sum test
Data: J2_SM by LUGAR_SAN.MARTIN
Kruskal-Wallis chi-squared = 20.763, df = 2, p-value = 3.1e-05
```

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Bello_Horizonte - Morales	-3.132928	1.730722e-03	5.192165e-03
2	Bello_Horizonte - Tununtunumba	1.299019	1.939375e-01	5.818125e-01
3	Morales - Tununtunumba	4.431946	9.338630e-06	2.801589e-05

Anexo 12: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de la relación de la densidad poblacional de nematodos (J_2) y grado de nodulación en raíces

```
Call:
glm(formula = NJ2 ~ GRADO_DAÑO1+GRADO_DAÑO2+GRADO_DAÑO3+GRADO_DAÑO4+
      GRADO_DAÑO5, family = poisson(link = "log"),
     data = NEMAF)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-18.0300  -3.0726  -0.0004   3.0836  14.2489

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  3.088e-04  5.774e-02   0.005   0.996
GRADO_DAÑO2  1.609e+01  9.023e-02  178.362 <2e-16 ***
GRADO_DAÑO3  2.430e+01  9.789e-02  248.225 <2e-16 ***
GRADO_DAÑO4  3.483e+01  1.138e-01  306.055 <2e-16 ***
GRADO_DAÑO5  4.511e+01  1.343e-01  335.884 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

    Null deviance: 153664.4  on 209  degrees of freedom
Residual deviance:   6972.1  on 205  degrees of freedom
AIC: 8080.9

Number of Fisher Scoring iterations: 10
```

Anexo 13: Modelo lineal Generalizado (GLM)-reducido para la determinación de las variables edáficas explicativas de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.

```
Call:
MSUELO <- glm(formula = J2 ~ PH + CACO3 + K + ARN + K2 + Na,
               family = poisson(link = "log"), data = NEMATODO)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-47.508  -24.614  -6.611   13.724   68.828

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  6.137882  0.003739 1641.60 <2e-16 ***
PH           -0.529096  0.005216 -101.44 <2e-16 ***
CACO3         0.161269  0.004476   36.03 <2e-16 ***
K            -0.285407  0.003965  -71.98 <2e-16 ***
ARN           0.033413  0.003337   10.01 <2e-16 ***
K2           -0.524158  0.007152  -73.29 <2e-16 ***
Na            0.304744  0.006048   50.39 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

    Null deviance: 133003  on 189  degrees of freedom
Residual deviance: 106702  on 183  degrees of freedom
AIC: 107815

Number of Fisher Scoring iterations: 6
```

```

> rsq(modelos9)
[1] 0.2230203

> rsq.partial(modelos9)
$adjustment
[1] FALSE

$variable
[1] "PH"      "CACO3"  "K"      "ARN"    "K2"     "Na"

$partial.rsq
[1]0.143340875  0.003284351  0.071299164 -0.002170396  0.063327423  0.031235071

> vif(modelos9)
      PH      CACO3      K      ARN      K2      Na
1.243722 1.693121 1.507037 1.424745 4.821935 4.250579

```

Anexo 14: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de las variables climáticas explicativas de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.

```

glm(formula = NJ2 ~ TMAX + TMIN + PREC, family = poisson(link = "log"),
     data = NEMAF)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-41.205  -25.801   -9.853    9.841   65.971

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  6.240336  0.003315 1882.708 <2e-16 ***
TMAX         -0.510590  0.005590  -91.334 <2e-16 ***
TMIN         -0.309668  0.005732  -54.027 <2e-16 ***
PREC         -0.034395  0.003605   -9.542 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

    Null deviance: 133003  on 189  degrees of freedom
Residual deviance: 122862  on 186  degrees of freedom
AIC: 123969

Number of Fisher Scoring iterations: 6

> rsq(RGLMCTEPWISE)
[1] 0.06619673

> rsq.partial(RGLMCTEPWISE, adj = TRUE)
$adjustment
[1] TRUE

$variable
[1] "TMAX" "TMIN" "PREC"

$partial.rsq
[1] 0.059055974  0.018665877 -0.002127942

> vif(RGLMCTEPWISE)
      TMAX      TMIN      PREC
2.337801 2.856197 1.358426

```

Anexo 15: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de las variables agronómicas explicativas de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.

```

glm(formula = J2 ~ EDAD + COMPOSICION_DE_PARCELAcacao + CULTIVO_ANTERIOR
maiz + COMPOSICION_DE_PARCELApapaya + CULTIVO_ANTERIORpapaya + CULTIVO_A
NTERIORcafe + COMPOSICION_DE_PARCELAcafe, family = poisson(link = "log"),
data = NEMAF)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-23.5433  -15.9780   0.4547   7.3875  27.1707

Coefficients:
                Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)      6.073914   0.005396  1125.63 <2e-16 ***
EDAD              0.662379   0.002544   260.42 <2e-16 ***
COMPOSICION_DE_PARCELAcacao1 -1.173101   0.024018  -48.84 <2e-16 ***
CULTIVO_ANTERIORmaiz1      -0.323732   0.015804  -20.48 <2e-16 ***
COMPOSICION_DE_PARCELApapaya1 -1.417537   0.032902  -43.08 <2e-16 ***
CULTIVO_ANTERIORpapaya1     1.394898   0.035903   38.85 <2e-16 ***
CULTIVO_ANTERIORcafe1       0.733927   0.018324   40.05 <2e-16 ***
COMPOSICION_DE_PARCELAcafe1  -0.660322   0.017793  -37.11 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

    Null deviance: 133003  on 189  degrees of freedom
Residual deviance:  30442  on 182  degrees of freedom
AIC: 31557

Number of Fisher Scoring iterations: 6

> rsq(dagrred)
[1] 0.8106933

> rsq.partial(dagrred, adj = TRUE)
$adjustment
[1] TRUE

$variable
[1] "EDAD" "COMP_DE_PARCELAcacao" "CULTIVO_ANTmaiz"
[4] "COMP_DE_PARCELApapaya" "CULTIVO_ANTpapaya" "CULTIVO_ANTcafe"
[7] "COMP_DE_PARCELAcafe"

$partial.rsq
[1]0.75049612 0.21173686 0.05650160 0.16544715 0.08883836 0.13003521 0.10324887

> vif(dagrred)
      EDAD      COMP_DE_PARCELAcacao      CULTIVO_ANTmaiz
1.327101      1.516818      1.124143
COMP_DE_PARCELApapaya      CULTIVO_ANTpapaya      CULTIVO_ANTcafe
5.302641      4.566043      4.730297
COMPOSICION_DE_PARCELAcafe
4.402075

```

Anexo 16: Modelo lineal Generalizado (GLM) para la determinación de las variables explicativas (Edáficas, climáticas, agronómicas y topográficas) de la densidad poblacional de nematodos en raíces de sachá inchi.

```

glm(formula = NJ2 ~ EDAD + +COMPOSICION_DE_PARCELAcacao + ALTITUD +
     MO, family = poisson(link = "log"), data = NEMAF)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-48.835  -18.343   -3.922    9.681   58.753

Coefficients:
                Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)      6.182203   0.003970 1557.42 <2e-16 ***
EDAD              0.622928   0.004159  149.78 <2e-16 ***
COMP_DE_PARCELAcacao1 -1.892219   0.019943  -94.88 <2e-16 ***
ALTITUD          -0.285053   0.003639  -78.33 <2e-16 ***
MO              -0.237053   0.004165  -56.92 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

    Null deviance: 133003  on 189  degrees of freedom
Residual deviance:  85546  on 185  degrees of freedom
AIC: 86655

Number of Fisher Scoring iterations: 6

> rsq(regTOT1, adj = TRUE)
[1] 0.3639308

> rsq.partial(regTOT1, adj = TRUE)
$adjustment
[1] TRUE

$variable
[1] "EDAD" "COMPOSICION_DE_PARCELAcacao" "ALTITUD"
[4] "MO"

$partial.rsq
[1] 0.27544669 0.17945985 0.12417241 0.08571376

> vif(regTOT1)
      EDAD      COMP_DE_PARCELAcacao      ALTITUD      MO
1.041831      1.045783      1.023425      1.023635

```


Continua..

Número de Muestra		pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
Lab	Claves							Arena	Limo	Arcilla			Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	Al ⁺³ + H ⁺			
								%	%	%			meq/100g							
6576	San Martin-Morales	7.79	0.32	0.40	0.53	9.6	83	81	9	10	A.Fr.	5.76	5.11	0.45	0.15	0.05	0.00	5.76	5.76	100
6577	San Martin-Bello Horizonte	7.26	0.23	0.00	1.07	17.2	333	71	13	16	Fr.A.	8.32	6.19	1.38	0.70	0.05	0.00	8.32	8.32	100
6578	San Martin-Tununtunumba	5.38	1.11	0.00	3.06	4.4	189	27	35	38	Fr.Ar.	21.76	15.77	5.50	0.33	0.06	0.10	21.76	21.66	100
6579	Picota-Shamboyacu	6.32	0.78	0.00	3.31	16.4	408	41	21	38	Fr.Ar.	23.20	19.60	2.38	0.70	0.05	0.00	22.73	22.73	98
6580	Picota-Tingo de Ponaza	7.57	0.67	3.70	4.46	15.6	758	35	25	40	Ar.	28.16	22.48	3.92	1.70	0.06	0.00	28.16	28.16	100
6581	Picota- Buenos Aires	8.04	0.66	11.20	2.95	26.4	1296	21	31	48	Ar.	26.08	18.77	4.33	2.88	0.10	0.00	26.08	26.08	100
6582	Moyobamba-Rafael Belaunde	5.12	0.09	0.00	0.67	14.8	76	73	15	12	Fr.A.	6.40	1.80	0.50	0.14	0.06	0.25	2.75	2.50	39
6583	Rioja-Segunda Jerusalen	4.21	0.15	0.00	2.84	4.2	57	31	45	24	Fr.	12.00	1.30	0.37	0.12	0.04	3.25	5.08	1.83	15

A = Arena , A.Fr. = Arena Franca , Fr.A. = Franco Arenoso , Fr. = Franco , Fr.L. = Franco Limoso , L = Limoso , Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso , Fr.Ar. = Franco Arcilloso , Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso , Ar.A. = Arcillo Arenoso , Ar.L. = Arcillo Limoso , Ar. = Arcilloso

Anexo 18: Características climáticas de zonas de muestreo en el departamento de San Martín

Provincia	Localidad	Altitud	Temperatura (°C)	Humedad	Precipitación (mm/día)
Lamas	Bellavista	216	22.6	87.6	4.5
Lamas	Pamashto	680	24	88.9	5.1
Lamas	Pongo de Caynarachi	719	27.2	88.3	11
El Dorado	Santa Rosa	473	26.3	82.4	3.2
El Dorado	Santa Cruz	289	26.3	82.4	3.2
El Dorado	Cashnahuasi	361	25.9	84.1	1.3
El Dorado	Huaja	899	25	84.7	2.3
Picota	Shamboycu	295	25.4	84.2	2.7
Picota	Tingo de Ponaza	238	26.7	75.8	1.8
Picota	San Antonio	290	25.7	80.5	2.3
Picota	Buenos Aires	511	26.7	81.4	2.4
Bellavista	Limón	242	28.1	80.3	3.6
Bellavista	Consuelo	212	27.4	78.6	2
Bellavista	Santa Victoria	281	27.7	79.4	1.6
San Martín	Tununtunumba	266	27.5	89.1	5.2
San Martín	Bello Horizonte	304	26.8	90.3	9
San Martín	Morales	191	26.8	88.1	4.5
Rioja	Segunda Jerusalén	825	24.9	83.1	3.1
Moyobamba	Rafael Belaunde	840	24.3	82.5	3.1

Anexo 19: Información de la parcelas de las zonas de muestreo en el departamento de San Martín

Provincia	Localidad	Edad	Cultivo asociado	Cultivo anterior
Lamas	Bellavista	1.5	Papaya	café
Lamas	Pamashto	3	cacao	café
Lamas	Pongo de Caynarachi	1.5	Café	café
El Dorado	Santa Rosa	3	cacao	cacao
El Dorado	Santa Cruz	1.5	cacao	maíz
El Dorado	Cashnahuasi	1	café	cacao
El Dorado	Huaja	2.5	ninguno	purma
Picota	Shamboycu	3	ninguno	purma
Picota	Tingo de Ponaza	3	ninguno	maíz
Picota	San Antonio	3.5	ninguno	purma
Picota	Buenos Aires	2.5	ninguno	purma
Bellavista	Limón	3	ninguno	purma
Bellavista	Consuelo	2	ají	purma
Bellavista	Santa Victoria	1	papaya	papaya
San Martín	Tununtunumba	3.5	cacao	cacao
San Martín	Bello Horizonte	1.5	ninguno	purma
San Martín	Morales	3	yuca	purma
Rioja	Segunda Jerusalén	3.5	café	café
Moyobamba	Rafael Belaunde	3	café	purma

Anexo 20: Caracterización morfológica por medio de diseños perineales de especímenes hembra obtenidas de raíces de sacha inchi

LOCALIDAD	N° DE PLANTA	M. <i>incognita</i>	M. <i>javanica</i>	M. <i>arenaria</i>
Pongo de Caynarachi	1	8	0	2
Pongo de Caynarachi	2	5	1	4
Pongo de Caynarachi	3	10	0	0
Pongo de Caynarachi	4	8	0	2
Pongo de Caynarachi	5	10	0	0
Pongo de Caynarachi	6	0	0	0
Pongo de Caynarachi	7	7	0	3
Pongo de Caynarachi	8	8	0	2
Pongo de Caynarachi	9	6	3	1
Pongo de Caynarachi	10	0	0	0
Pamashto	1	6	0	4
Pamashto	2	0	0	0
Pamashto	3	0	0	0
Pamashto	4	9	0	1
Pamashto	5	0	0	0
Pamashto	6	10	0	0
Pamashto	7	0	0	0
Pamashto	8	0	0	0
Pamashto	9	7	0	3
Pamashto	10	10	0	0
Bellavista	1	9	1	0
Bellavista	2	10	0	0
Bellavista	3	9	0	1
Bellavista	4	8	2	0
Bellavista	5	6	4	0
Bellavista	6	0	0	0
Bellavista	7	0	0	0
Bellavista	8	10	0	0
Bellavista	9	0	0	0
Bellavista	10	10	0	0
Santa Cruz	1	0	0	0
Santa Cruz	2	0	0	0
Santa Cruz	3	10	0	0
Santa Cruz	4	10	0	0
Santa Cruz	5	0	0	0
Santa Cruz	6	9	0	1
Santa Cruz	7	10	0	0
Santa Cruz	8	10	0	0
Santa Cruz	9	9	0	1
Santa Cruz	10	10	0	0

Continua

Santa Rosa	1	8	0	2
Santa Rosa	2	10	0	0
Santa Rosa	3	10	0	0
Santa Rosa	4	7	0	3
Santa Rosa	5	10	0	0
Santa Rosa	6	10	0	0
Santa Rosa	7	10	0	0
Santa Rosa	8	6	4	0
Santa Rosa	9	10	0	0
Santa Rosa	10	8	1	1
Huaja	1	10	0	0
Huaja	2	10	0	0
Huaja	3	10	0	0
Huaja	4	10	0	0
Huaja	5	10	0	0
Huaja	6	9	1	0
Huaja	7	7	3	0
Huaja	8	10	0	0
Huaja	9	8	0	2
Huaja	10	10	0	0
Cashnahuasi	1	0	0	0
Cashnahuasi	2	0	0	0
Cashnahuasi	3	8	0	0
Cashnahuasi	4	0	0	0
Cashnahuasi	5	6	0	0
Cashnahuasi	6	0	0	0
Cashnahuasi	7	0	0	0
Cashnahuasi	8	0	0	0
Cashnahuasi	9	0	0	0
Cashnahuasi	10	0	0	0
Consuelo	1	10	0	0
Consuelo	2	10	0	0
Consuelo	3	10	0	0
Consuelo	4	0	0	0
Consuelo	5	8	2	0
Consuelo	6	10	0	0
Consuelo	7	10	0	0
Consuelo	8	9	1	0
Consuelo	9	10	0	0
Consuelo	10	10	0	0
Limón	1	9	0	1
Limón	2	10	0	0
Limón	3	10	0	0
Limón	4	9	0	1
Limón	5	8	0	2

Continua

Limón	6	0	0	0
Limón	7	8	0	2
Limón	8	10	0	0
Limón	9	9	0	1
Limón	10	4	0	6
Santa Victoria	1	7	0	3
Santa Victoria	2	6	0	4
Santa Victoria	3	9	0	1
Santa Victoria	4	3	0	7
Santa Victoria	5	8	0	2
Santa Victoria	6	10	0	0
Santa Victoria	7	10	0	0
Santa Victoria	8	9	0	1
Santa Victoria	9	0	0	0
Santa Victoria	10	10	0	0
Shamboyacu	1	4	0	6
Shamboyacu	2	9	0	0
Shamboyacu	3	8	0	2
Shamboyacu	4	9	0	0
Shamboyacu	5	7	0	3
Shamboyacu	6	10	0	0
Shamboyacu	7	0	0	0
Shamboyacu	8	0	0	0
Shamboyacu	9	7	0	3
Shamboyacu	10	7	0	2
Tingo de Ponaza	1	8	0	2
Tingo de Ponaza	2	10	0	0
Tingo de Ponaza	3	0	0	0
Tingo de Ponaza	4	0	0	0
Tingo de Ponaza	5	7	0	3
Tingo de Ponaza	6	10	0	0
Tingo de Ponaza	7	0	0	0
Tingo de Ponaza	8	10	0	0
Tingo de Ponaza	9	9	0	1
Tingo de Ponaza	10	0	0	0
Buenos Aires	1	10	0	0
Buenos Aires	2	10	0	0
Buenos Aires	3	0	0	0
Buenos Aires	4	0	0	0
Buenos Aires	5	10	0	0
Buenos Aires	6	0	0	0
Buenos Aires	7	10	0	0
Buenos Aires	8	0	0	0
Buenos Aires	9	0	0	0
Buenos Aires	10	10	0	0

Continua

San Antonio	1	10	0	0
San Antonio	2	10	0	0
San Antonio	3	9	0	0
San Antonio	4	6	2	2
San Antonio	5	10	0	0
San Antonio	6	10	0	0
San Antonio	7	7	1	2
San Antonio	8	0	0	0
San Antonio	9	0	0	0
San Antonio	10	0	0	0
Morales	1	10	0	0
Morales	2	9	0	1
Morales	3	10	0	0
Morales	4	10	0	0
Morales	5	10	0	0
Morales	6	0	10	0
Morales	7	6	4	0
Morales	8	5	4	1
Morales	9	10	0	0
Morales	10	10	0	0
Bello Horizonte	1	10	0	0
Bello Horizonte	2	10	0	0
Bello Horizonte	3	9	0	1
Bello Horizonte	4	10	0	0
Bello Horizonte	5	10	0	0
Bello Horizonte	6	10	0	0
Bello Horizonte	7	6	0	4
Bello Horizonte	8	8	0	2
Bello Horizonte	9	7	0	3
Bello Horizonte	10	10	0	0
Tununtunumba	1	8	0	2
Tununtunumba	2	10	0	0
Tununtunumba	3	0	0	0
Tununtunumba	4	10	0	0
Tununtunumba	5	10	0	0
Tununtunumba	6	9	0	1
Tununtunumba	7	0	0	0
Tununtunumba	8	3	0	7
Tununtunumba	9	10	0	0
Tununtunumba	10	0	0	0
Segunda Jerusalén	1	4	6	0
Segunda Jerusalén	2	9	1	0
Segunda Jerusalén	3	10	0	0
Segunda Jerusalén	4	8	2	0
Segunda Jerusalén	5	10	0	0

Continua

Segunda Jerusalén	6	10	0	0
Segunda Jerusalén	7	8	0	2
Segunda Jerusalén	8	9	1	0
Segunda Jerusalén	9	10	0	0
Segunda Jerusalén	10	4	6	0
Rafael Belaunde	1	0	0	0
Rafael Belaunde	2	0	0	0
Rafael Belaunde	3	0	0	0
Rafael Belaunde	4	10	0	0
Rafael Belaunde	5	0	0	0
Rafael Belaunde	6	0	0	0
Rafael Belaunde	7	0	0	0
Rafael Belaunde	8	0	0	0
Rafael Belaunde	9	0	0	0
Rafael Belaunde	10	0	0	0
