



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA CON  
MENCIÓN EN PRODUCCIÓN VEGETAL**

**Aislamiento y evaluación de rizobacterias de *Calendula  
officinalis* L., para el control *in vitro* del nemátodo  
*Meloydogine incognita* Kofoid y White (1919), del tomate de  
riñón (*Solanum lycopersicum* L.)**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA CON  
MENCIÓN EN PRODUCCIÓN VEGETAL**

**Autor:** Peña Caivinagua, José Luis

**Directora:** Rojas Rojas, Jacqueline Elizabeth

LOJA

2023



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2023

## Aprobación del director del trabajo de titulación

Loja, 28 de febrero del 2023

Doctora

Lucia Teresa Guzmán Ph. D

**Directora de la Maestría en Biotecnología Agropecuaria.**

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de directora del presente trabajo de titulación denominado: Aislamiento y evaluación de rizobacterias de *Calendula officinalis* L., para el control in vitro del nemátodo *Meloydogine incognita* Kofoid y White (1919), del tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.) realizado por José Luis Peña Caivinagua ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas. Ph. D.

C.I: 1103527055

### **Declaración de autoría y cesión de derechos**

Yo, José Luis Peña Caivinagua, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del trabajo de titulación denominado: Aislamiento y evaluación de rizobacterias de *Calendula officinalis* L., para el control *in vitro* del nemátodo *Meloydogine incognita* Kofoid y White (1919), del tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.) del Programa de posgrados Maestría en Biotecnología Agropecuaria mención vegetal, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Antecedentes investigativos, Capítulo 2. Metodología de la investigación, Capítulo 3. Resultados y discusión, Capítulo 4. Conclusiones y Recomendaciones, siendo Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas, directora del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad. Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

José Luis Peña Caivinagua

C.I.: 1103876478

### **Dedicatoria**

A mis padres y hermano por sus palabras de aliento y apoyo constante, y a todos quienes fueron parte del cumplimiento de este sueño. ¡Gracias por apoyarme!

## **Agradecimiento**

Mi sincero agradecimiento Agrocalidad y de manera especial al Ing. Marlon Pineda Escobar Mg. Sc. Responsable Técnico del Laboratorio Regional de Nematología Loja y al Ing. Edi Chamba Director Distrital Agrocalidad Loja, por haberme dado todas las facilidades para realizar mi trabajo de investigación y de igual manera al departamento de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja en la persona de la Dra. Jacqueline Elizabeth Rojas mi directora de trabajo de titulación por su acertada dirección en el desarrollo de la investigación para el logro de los objetivos propuestos.

## Índice de Contenido

Carátula.....	I
Aprobación del director del trabajo de titulación .....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos .....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimiento .....	V
Índice de Contenido .....	VI
Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
Capitulo uno .....	5
Antecedentes investigativos .....	5
1.1    Los microorganismos del suelo .....	5
1.2    Rizobacterias .....	5
1.3    Control biológico con las PGPR.....	6
1.4    Los nemátodos fitopatógenos.....	7
1.4.1 <i>Los Nemátodos agalladores en cultivos de tomate (Solanum lycopersicum L.)</i> .....	9
1.4.2 <i>Métodos de control para el ataque de Meloidogyne spp.</i> .....	9
Capitulo dos .....	11
Metodología de extracción y pruebas de antagonismo .....	11
2.1    Colecta de material.....	11
2.2    Aislamiento de rizobacterias. ....	11
2.3    Selección de rizobacterias con actividad antagonica. ....	13
2.3.1 <i>Preparación de los inóculos bacterianos</i> .....	13
2.4    Pruebas de antagonismos.....	14
2.4.1 <i>Extracción de nemátodos</i> .....	14

<b>2.5</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>16</b>
	<b>Capítulo tres .....</b>	<b>18</b>
	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Resultados del primer objetivo: aislar las rizobacterias del suelo de las raíces de <i>Calendula officinalis</i> L.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.1</b>	<b><i>Aislamiento de Rizobacterias.</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.</b>	<b>Resultados del segundo objetivo: evaluar la capacidad de las rizobacterias de la <i>Calendula officinalis</i> L, como bio - controlador del nemátodo <i>Meloydogine incognita</i> del cultivo de tomate de riñón (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), en condiciones <i>in vitro.</i></b>	<b>20</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Enfrentamientos duales bacteria-nemátodos</i>.....</b>	<b>20</b>
	<b>Conclusiones. ....</b>	<b>28</b>
	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>29</b>
	<b>Referencias.....</b>	<b>30</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción morfológica de las colonias de las bacterias aisladas de la rizosfera de la <i>Calendula officinalis</i> L.....	19
Tabla 2. Lista de tratamientos utilizados en ensayo <i>in vitro</i> .....	21
Tabla 3. Análisis de varianza del índice de mortalidad del nemátodo ( <i>M. incognita</i> ) a las 24 horas.....	24
Tabla 4. Análisis de varianza del índice de mortalidad del nemátodo ( <i>M. incognita</i> ) a las 48 horas.....	25

## Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del proceso de diluciones seriadas. ....	12
Figura 2. (a) Activación de rizobacterias en medio TSA 100%; (b) Centrifugación de la solución bacteriana.....	14
Figura 3. Raíces de tomate de riñón ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.), infectadas con el nemátodo <i>M. incognita</i> utilizadas para el ensayo de enfrentamiento dual.....	15
Figura 4. Nemátodos J2 de <i>M. incognita</i> . de las raíces de tomate de riñón <i>Solanum lycopersicum</i> L. visto en un microscopio de disección de 60 aumentos.....	15
Figura 5. (a) y (b) Solución agua- nemátodo para para el ensayo de los enfrentamientos duales, y (c) Embudos Baermann para la obtención de los nemátodos <i>M. incognita</i> de las raíces de tomate de riñón <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	16
Figura 6. Ensayo <i>in vitro</i> de los enfrentamientos duales Filtrado de rizobacterias – nemátodos.....	17
Figura 7. (a) Cepa 9 utilizada en el ensayo de enfrentamiento dual, (b) Cepas aisladas de la rizosfera de la <i>Calendula officinalis</i> L.....	20
Figura 8. Prueba de los residuos para la verificación de una distribución normal aleatoria de la mortalidad de <i>M. incognita</i> a las 24 horas.....	22
Figura 9. Prueba de los residuos para la verificación de una distribución normal aleatoria de la mortalidad de <i>M. incognita</i> a las 48 horas.....	23
Figura 10. Mortalidad de <i>M. incognita</i> a las 24 horas (a) y 48 horas (b), incluye el error estándar (n=5). Las letras minúsculas representan el nivel de significancia de acuerdo con la prueba de Tukey.....	24

## Resumen

Las Rhizobacterias habitan en la rizosfera de las plantas y pueden ser utilizadas como controladores biológicos contra diversas plagas. La *Calendula officinalis* L. es una potencial planta de estudio, por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue aislar las rizobacterias de *Calendula officinalis* L. y evaluar su capacidad como bio-controlador del nemátodo *Meloydogine incognita* del cultivo de *Solanum lycopersicum* L., en condiciones *in vitro*. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis tratamientos y cinco repeticiones. Se aisló y caracterizó morfológicamente 12 colonias de rizobacterias, encontrándose que las cepas 2, 3 y 9 poseen características morfológicamente similares al género *Bacillus*. Y luego se realizó enfrentamientos duales *in vitro*, 0.35: 1.5 ml (nemátodos: filtrados bacterianos). Resultando que los tratamientos T2, T3, T4 y T5 tienen un efecto significativo en la mortalidad de los *M. incognita* J2 a las 24 y 48 horas. Especialmente T4 que tuvo una efectividad mayor al 70 % luego de 48 horas de exposición. Por lo tanto, se concluye que los filtrados rizobacterianos tuvieron efectos nematocidas sobre *M. incognita* (J2) y se recomienda su utilización como potenciales Bio-controladores.

*Palabras claves:* Rizobacterias, nemátodos, rizosfera PGPR.

### **Abstract**

Rhizobacteria lives in the rhizosphere of plants and can be used as biological controllers against pests. *Calendula officinalis* L. is a potential study plant, therefore, the objective of this research was to isolate rhizobacteria from *Calendula officinalis* L. and evaluate their ability as a bio-controller of the nematode *Meloidogine incognita* of *Solanum lycopersicum* L. crop, under in vitro conditions. A completely randomized design with six treatments and five replicates was used. Twelve rhizobacterial colonies were isolated and morphologically characterized, and colonies 2, 3 and 9 were found to have morphological characteristics similar to the genus *Bacillus*. Then, dual in vitro confrontations were carried out, 0.35: 1.5 ml (nematodes: bacterial filtrates). It was found that treatments T2, T3, T4 and T5 have a significant effect on the mortality of *M. incognita* J2 at 24 and 48 hours. Especially T4 had an effectiveness greater than 70 % after 48 hours of exposure. Therefore, it is concluded that the rhizobacterial filtrates had nematicidal effects on *M. incognita* (J2) and their use as potential bio-controllers is recommended.

*Key words:* Rhizobacteria, nematodes, rhizosphere, PGPR.

## Introducción

El tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las especies de las solanáceas más afectadas a nivel mundial con el ataque del nemátodo *Meloidogyne* spp. En el Ecuador existen alrededor de 3000 hectáreas dedicadas al cultivo de tomate riñón, de las cuales 2000 ha se realizan bajo invernadero (Barreiro, 2017). Camues Cuesque (2019), manifiesta que el ataque de nemátodo género *Meloidogyne* spp. ha ocasionado daños en un 25 % del área total del cultivo de tomate riñón bajo invernadero.

El control del *Meloidogyne* spp. se realiza tradicionalmente mediante el uso de nematicidas químicos. Los nematicidas químicos tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente y son ineficaces tras un uso prolongado, y se han prohibido parcial o totalmente en varios países, por tal razón, los investigadores buscan alternativas seguras, más eficaces (Azlay et al., 2022; Degenkolg & Vilcinskas, 2016), y con una visión amigable con el medio ambiente. Las rizobacterias se han tornado relevantes, puesto que estas bacterias habitan la rizosfera de las plantas y pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos a los que se asocian como lo reporta Ahmad et al. (2021) Hallmann et al. (2009).

La expresión Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) fue acuñada por Kloepper & Schroth (1978), para describir las bacterias que habitan la rizosfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas (Labra et al., 2012). Bashan & Holguín (1998) promovieron dos nuevos términos PGPB y bio-control PGPB para referirse a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y bio-control de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, los que abarcarían todas las bacterias beneficiosas para las plantas, es decir, rizobacterias que producen antibióticos, metabolitos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas, algunos de los cuales se han reportado con bioactividad para controlar los nemátodos parásitos de las plantas (Siddiqui & Shahid, 2003). Varias plantas se han reportado con propiedades nematicidas (Aballay & Insunza, 2002; Martinotti et al., 2016).

La caléndula (*Calendula officinalis* L.), es usada por los agricultores como repelente contra moscas blancas, parásitos del ganado y también actúa contra nemátodos (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006). Estudios sobre rizobacterias, han identificado varias

especies del género *Pseudomonas* (Prakob et al., 2009) y *Bacillus* (Yu et al., 2015) que tienen un alto potencial nematicida, por tal razón, por tanto, el presente trabajo tiene como objetivos: (a) Aislar las rizobacterias del suelo de las raíces de *Calendula officinalis* L. y (b) Evaluar la capacidad de las PGPR de *calendula officinalis* L, como bio – controlador del nemátodo *Meloydogine incognita* del cultivo de tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.), en condiciones *in vitro*.

## Capítulo uno

### Antecedentes investigativos

#### 1.1 Los microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y los componentes del suelo, en la interfaz raíz-suelo (Barea et al., 2005, 2008; Linderman, 1991). La actividad microbiana del suelo (o edáfica) da cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este complejo y heterogéneo sistema (Jackson et al., 2003). Los efectos deseables de la aplicación de cultivos de microorganismos benéficos y eficientes a los suelos pueden fijar el nitrógeno atmosférico (Higa & Parr, 2013), un ejemplo son las bacterias fijadoras de nitrógeno: toman el N atmosférico (N<sub>2</sub>) y lo transforman en compuestos aprovechables por los vegetales, y las bacterias nitrificadoras: oxidan el amoníaco hasta nitrato (Benintende & Sánchez, 2000).

Otras funciones importantes son la descomposición de desechos orgánicos y residuos (Higa & Parr, 2013), entre ellos están las bacterias celulolíticas que degradan la celulosa, las bacterias pectinolíticas en cambio degradan la pectina y sus derivados, el género más abundante es *Arthrobacter*. También están los hongos heterótrofos y una de las principales actividades es la degradación de moléculas complejas como el almidón, pectina, disacáridos, celulosa, ácidos orgánicos, lignina, entre otros y difícil de degradar por bacterias (Benintende & Sánchez, 2000). Estos procesos de degradación contribuyen al reciclaje e incremento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, solubilización de fuentes de nutrientes insolubles y degradación de tóxicos incluyendo pesticidas (Higa & Parr, 2013).

Una cualidad de las Rhizobacterias que ha tomado gran interés para su estudio en la última década es la supresión de patógenos (Higa & Parr, 2013). Generalmente son las bacterias y hongos los que pueden colonizar la raíz, el suelo y establecer interacciones que benefician el crecimiento y la salud de las plantas (Barea et al., 2005).

#### 1.2 Rizobacterias

La mayoría de las asociaciones entre bacterias y plantas ocurren a nivel de la rizosfera (Hernández & Aguilar, 2003). La rizosfera es la zona comprendida entre las raíces y el suelo

donde ocurren los ciclos biogeoquímicos. El microbiota presente en la rizosfera está compuesto por bacterias, hongos, omicetos, virus y arqueas. (Philippot et al., 2013). Las interacciones entre la raíz y los microorganismos juegan un papel fundamental en la salud de las plantas y la fertilidad del suelo. Las interacciones pueden ser negativas como la patogénesis o positivas como las relaciones simbióticas (Bais et al., 2006). La expresión *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) fue acuñada por J. Kloepper & Schroth (1978), para describir las bacterias que habitan la rizosfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas (Labra et al., 2012).

Bashan & Holguin (1998) propusieron una nueva clasificación en las que se incluían las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas con actividad de bio - control (PGPR). Las PGPR producen antibióticos, metabolitos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas que tienen efectos antagonistas a plagas y enfermedades (Siddiqui & Shahid, 2003).

Las PGPR poseen varios mecanismos que estimulan el desarrollo de las plantas. Por lo general los mecanismos se orientan a una producción de sustancias que actúan directamente sobre las células vegetales provocando un aumento en su desarrollo. Adicionalmente, estas bacterias influyen y participan en el ciclo de nutrientes como nitrógeno y fósforo, son capaces de tomar formas no disponibles para la planta y transformarlas, hasta la obtención de formas asimilables para las plantas, estas características han llevado a la utilización de estas bacterias como biofertilizantes (Camelo et al., 2011). Así mismo, las PGPR se destacan en el control biológico de patógenos con su capacidad de producir sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas líticas (Bais et al., 2004), e inducen resistencia en las plantas contra enfermedades fúngicas, bacterianas y virales y también han sido efectivas contra insectos y nemátodos (Li et al., 2015; Tiwari et al., 2017).

### **1.3 Control biológico con las PGPR.**

Entre los géneros de PGPR podemos mencionar *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, entre otros (Kennedy et al., 2004; Kloepper et al., 1989). Las PGPR con actividad de control biológico caracterizadas a nivel molecular pertenecen al género *Pseudomonas* (Bloemberg & Lugtenberg, 2001) y

*Bacillus*. Estos dos géneros tienen alta efectividad en el bio - control de nemátodos fitoparásitos (Aballay et al., 2011; Radwan et al., 2012).

Las *Pseudomonas* tienen la capacidad de disminuir la viabilidad de agentes patógenos como: hongos, bacterias, nemátodos, mediante un mecanismo antagonista y de inducir los sistemas de defensa de plantas por la resistencia sistémica adquirida (RSA) y resistencia sistémica inducida (RSI) (Canchignia et al., 2015). Los principales mecanismos antagonistas son: la competencia por los nutrientes, minerales, espacio y la síntesis de metabolitos, tales como sideróforos, antibióticos, toxinas y biosurfactantes (Hernández et al., 2014). El patógeno al entrar en contacto con la planta, pone en marcha un sistema de comunicación molecular entre ambos, que desencadena la inducción de mecanismos de defensa en la planta, que está activando la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) (Desender et al., 2007). Un mecanismo RSI es el inducir los exudados de las raíces para que actúen como antimicrobianos contra la microflora rizosférica, proporcionando a la planta ventajas defensivas (Bais et al., 2004; Fu & Dong, 2013; Gao et al., 2015).

Un ejemplo claro lo muestra Orrico Guido et al. (2013) en su estudio en donde seleccionaron dos cepas de *P. fluorescens* productoras de ácido cianhídrico (mecanismo para el control del *Meloidogyne*), los resultados obtenidos comprobaron la eficacia de la co-inoculación para reducir los daños producidos por el nemátodo al reducir el desarrollo de los nemátodos y simultáneamente estimularon un desarrollo considerable del sistema radical y la biomasa aérea en las plantas infectadas. También Siddiqui & Shahid (2003) en su estudio encontró que una exposición significativa del nemátodo agallador a filtrados de cultivo de *P. fluorescens* en condiciones *in vitro* reduce la eclosión de los huevos y provoca una mortalidad sustancial de los juveniles de *M. javanica*.

#### **1.4 Los nemátodos fitopatógenos**

El ciclo de vida de la mayoría de los nemátodos fitopatógenos es, por lo general, bastante semejante. Todos los nemátodos tienen cuatro etapas larvianas y la primera muda a menudo se produce en el huevecillo. Después de la última muda, los nemátodos se diferencian en hembras y machos adultos. La hembra puede entonces producir huevecillos

fértiles una vez que se ha apareado con un macho o, en ausencia de machos, partenogénicamente, o bien produce esperma por sí misma (hermafroditismo)(Talavera, 2003).

Los nemátodos que infectan a las plantas producen síntomas tanto en las raíces como en los órganos aéreos de las plantas. Los síntomas de la raíz aparecen en forma de nudos, agallas o lesiones y pudriciones de la raíz cuando las infecciones por nemátodos van acompañadas por bacterias y hongos saprofitos o fitopatógenos (Agrios, 2005; Guzmán Piedrahita et al., 2012) clasifica a los nemátodos en:

- Nemátodos ectoparásitos, estos se alimentan de los tejidos raiculares pero sin penetrar a las raíces, a estos pertenecen los géneros: *Hemicycliophora*, *Longidorus*, *Paratylenchus*, *Xiphinema*, entre otros.
- Nemátodos Semi-endoparásitos: sólo la parte anterior del nemátodo penetra las raíces, estos nemátodos se hinchan y no se mueven una vez que han entrado en la fase de endoparásitos de su ciclo de vida. Ejemplos representativos son: *Tylenchulus*, *Rotylenchus* y *Sphaeronema*.
- Nemátodos Endoparásitos migratorios: no están fijos, se alojan y migran través de los tejidos, y todos sus estados de desarrollo son parasíticos. Ejemplos representativos de este grupo son: *Hirschmanniella*, *Radopholus* y *Pratylenchus*.
- Nemátodos Endoparásitos sedentarios: se caracterizan por tener un estilete pequeño, los juveniles entran al tejido de la planta donde desarrollan un sitio de alimentación fijo e inducen la formación de un sofisticado sistema trófico de células de abrigo (cuidar, criar) llamado sincitia (células gigantes), se tornan inmóviles, adquieren una forma abultada para formar y depositar los huevos. Ejemplos representativos de este grupo están: *Globodera*, *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Nacobbus*, *Punctodera* y *Cactodera*.

#### **1.4.1 Los Nemátodos agalladores en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Dentro de los nemátodos endoparásitos se encuentran los nemátodos agalladores de la raíz que son las plagas más destructivas en la agricultura, causa graves pérdidas económicas y de rendimiento, en una amplia variedad de cultivos, incluidas las hortalizas (Collange et al., 2011; Kalele et al., 2010; Kiewnick & Sikora, 2006).

El género *Meloidogyne* es considerado uno de los más agresivos en el mundo, con 100 especies descritas, aproximadamente (Mitkowski & Abawi, 2003). Las infestaciones del nemátodo agallador (*Meloidogyne* spp.) en cereales como el arroz (Lombeida García et al., 2021) y hortalizas son comunes en Ecuador y en todo el mundo (por ejemplo, Aballay et al., 2013; Abd & Kabeil, 2010; Camues Cuasque, 2019). Y solo seis especies son responsables del 95% de los daños en los cultivos, siendo *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, y *Meloidogyne hapla* Chitwood, las más importantes por su extensa distribución (Sasser, 1980; Gallegos Morales et al., 2009) que infectan casi todas las plantas cultivadas (Abad et al., 2008; Sasser et al., 1983).

Camues Cuasque (2019) manifiesta que el ataque *Meloidogyne* spp. ha ocasionado daños en un 25 % del área total del cultivo de tomate riñón. El tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L) es una de las especies de las solanáceas más afectadas a nivel mundial por los nemátodos fitoparásitos. En el Ecuador existen alrededor de 3000 hectáreas dedicadas a este cultivo (Barreiro, 2017). El control del *Meloidogyne* spp. se realiza mediante el fitomejoramiento de la resistencia de la planta huésped (Pérez et al., 2016), manejo mecánico del suelo usando la exposición a la energía solar (Carneiro et al., 2013; Melo et al., 2019), y el uso de los nematicidas químicos (Peláez et al., 2015).

#### **1.4.2 Métodos de control para el ataque de *Meloidogyne* spp.**

Los nematicidas químicos tienen principios activos tóxicos y son ineficaces tras un uso prolongado, sus efectos causan preocupación debido a su impacto negativo en el medio ambiente, en la salud humana y animal (van der Putten et al., 2006), por ejemplo, el bromuro de metilo (Collange et al., 2011) el cual ya está fuera de uso. Muchos nematicidas se han

prohibido parcial o totalmente en varios países, como el carbamato en Argentina (SAGP y A DECRETO 2121/90 (9-10-90), Argentina), el carbofuran en la Unión Europea desde 2008 (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/118.htm>) y desde el 2010 en Canadá (normativa: UNEP-FAO-RC-DGD-Carbofuran del 2017), entre otros. La creciente demanda de alternativas respetuosas con el medio ambiente para controlar los patógenos de las plantas ha provocado un aumento de la investigación y el desarrollo de nuevos bioplaguicidas, de los que las bacterias representan el 74% del mercado mundial (Mishra et al., 2015).

## **2 Rizobacterias para el control biológico de nemátodos**

En algunas especies de plantas se han identificado PGPR con potencial como agentes de bio - control (Paul & Lade, 2014). Las especies más utilizadas como repelentes de nemátodos han sido las plantas del género *Tagetes*, un claro ejemplo es el citado por (Quizhpe, 2019), el cual reporta que *Tagetes multiflora* en una concentración del 75% demostró un efecto nematicida en promedio de 93,74% en las primeras 4 horas. Así mismo, las propiedades nematicidas de algunos aceites esenciales se atribuyen específicamente a sus componentes mayoritarios de alcaloides, fenoles, sesquiterpenos, diterpenos, poliacetilenos y derivados de tienilo (Oka et al., 2000). Por otro lado Castillo et al., 2011 reportó la actividad antifúngica de rizobacterias aisladas de *Tagetes coronopifolia* y *Tagetes terniflora*.

La caléndula (*Calendula officinalis L.*), es una especie reconocida y usada por los agricultores contra los nemátodos como planta repelente (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural et al., 2006). Los agricultores sugieren sembrar la caléndula alrededor de los cultivos para minimizar el ataque de los nemátodos (Comunidad Gatazo Sambrano, Riobamba), pero no se han reportado si en sus raíces se podrían identificar rizobacterias con potencial nematicida.

## Capítulo dos

### Metodología de extracción y pruebas de antagonismo

#### 2.1 Colecta de material

Se identificaron y seleccionaron 14 plantas de *Calendula officinales* L. de una finca ubicada a 5 km de la ciudad de Tulcán. Las raíces que presentaron un aspecto saludable, sin signos de daños mecánicos, se colectaron con el suelo de la rizosfera para realizar el aislamiento de las PGPR. Las raíces con el suelo se transportaron en una mochila térmica en fundas debidamente etiquetadas que se almacenaron a 4 °C.

Para el aislamiento de bacterias asociadas a la *Calendula officinalis* se utilizaron dos medios de cultivo con propósitos específicos. *Tryptic Soy Agar* (TSA), para la multiplicación y reactivación de las bacterias para evaluaciones sobre nemátodos con una concentración del 100 % compuesta de 30 g L<sup>-1</sup> y *Tryptic soy Broth* (TSB), para la multiplicación de las cepas, para la extracción de filtrados bacterianos con una concentración del 15% compuesta por 30 g L<sup>-1</sup>.

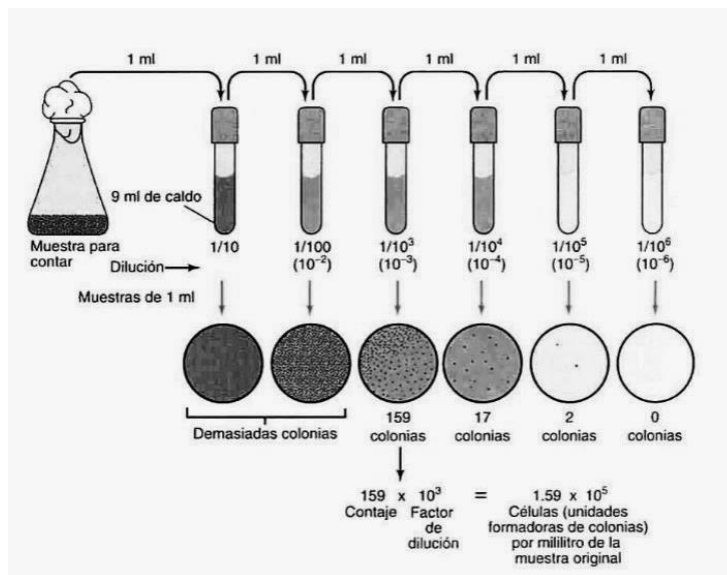
#### 2.2 Aislamiento de rizobacterias.

Para el cultivo de bacterias presentes en el suelo de la rizosfera se tomó una muestra de 5 g del suelo de las raíces de las 14 plantas de *Calendula officinalis* L., previamente homogenizada y tamizada.

Para la preparación de las disoluciones se pesó 5 g del suelo de rizosfera y se mezcló en un recipiente con agua destilada estéril, para obtener una muestra madre y a partir de esta solución se aplicó la técnica de diluciones seriadas. Para ello se colocó un volumen de 9 ml de agua destilada estéril en 10 tubos de ensayo de 10 ml previamente esterilizados y etiquetados desde 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>. Se agregó 1 ml de la solución madre al tubo de dilución de 10<sup>-1</sup>, se homogenizó totalmente para luego extraer un volumen de 1 ml con ayuda de una micropipeta y transferirlo al segundo tubo 10<sup>-2</sup>, así mismo se homogenizó, se cambió la punta y luego se tomó nuevamente 1ml de esta dilución y se colocó en el tercer tubo 10<sup>-3</sup>. Se realizó el mismo procedimiento hasta obtener la disolución 10<sup>-10</sup>.

**Figura 1**

*Esquema del proceso de diluciones seriadas*



*Nota:* adaptado de Brock et al., 2003.

Para la siembra en cajas Petri se utilizó las diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$ , se tomó 100  $\mu$ l de la dilución y se colocó en una caja Petri que contiene medio de cultivo TSA, esto se hizo por triplicado por cada dilución para el posterior cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Se aplicó el método de siembra por extensión, que consistió en colocar los 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-3}$  sobre la superficie de la caja Petri que contiene el medio de TSA y se extendió con ayuda de un asa de Drigalsky estéril.

Finalmente se selló y etiquetó las cajas Petri con Parafilm, se incubó a 27 °C grados durante 24 - 48 h. Se realizó el conteo de colonias de la dilución  $10^{-3}$  después de transcurrido un periodo que oscila entre 24 - 48 horas de incubación.

Se contó las UFC de las tres cajas Petri de la dilución  $10^{-3}$  y se procedió a seleccionar las colonias de rizobacterias para la obtención de las colonias puras. Se realizó la siembra en cajas Petri de las colonias encontradas en un medio de cultivo TSA por cuadruplicado, después de 24 - 72 h se realizó un nuevo repique. Este procedimiento se realizó cuatro veces hasta obtener colonias puras de rizobacterias.

### **2.3 Selección de rizobacterias con actividad antagónica.**

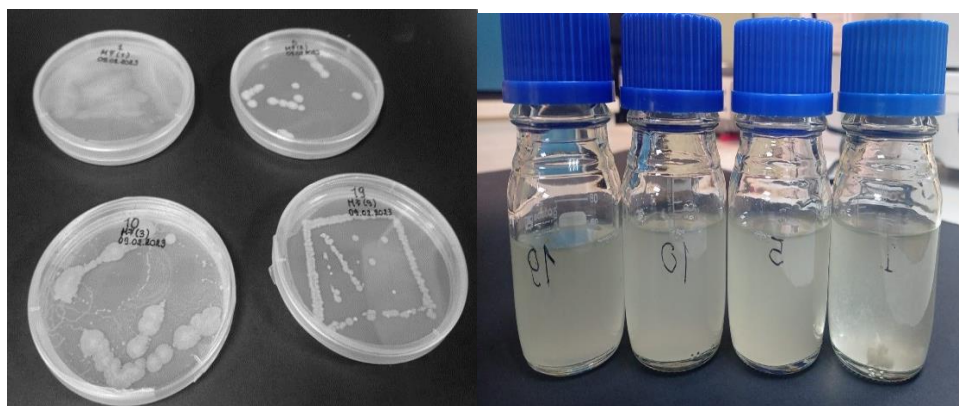
Para identificar las rizobacterias con actividad antagónica frente a *M. incognita*, se realizaron pruebas de enfrentamiento dual. Para este ensayo se utilizó como control agua estéril y TSB 15 %, en la misma concentración del filtrado (Aballay et al., 2017). En condiciones estériles, se colocaron alícuotas de 500  $\mu$ l de una solución de nemátodos que contendrán aproximadamente 30 individuos juveniles 2 (J2) en cajas Petri estériles de 35 mm de diámetro. Luego se añadió un volumen de 1,5 ml del filtrado de cultivo a cada caja Petri que se obtuvo previamente, adicionalmente se añadió el antibiótico estreptomycin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) para evitar el crecimiento de las bacterias que hubieran podido quedar en el filtrado. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente a 20 °C durante 48 h. Se registró la mortalidad en porcentaje de los nemátodos por caja Petri, cada 24 h, usando una aguja con punta aguda para verificar su estado. Al finalizar el ensayo, se verificó si el efecto de los filtrados era reversible, colocando los nemátodos afectados en agua estéril por 2 horas observando si tenían o no movilidad, para el registro de mortalidad (Castañeda et al., 2016).

#### **2.3.1 Preparación de los inóculos bacterianos.**

Los aislados bacterianos se seleccionaron y se cultivaron en un medio estéril de agar caldo trípico de soja TSA 100%, se incubaron en la oscuridad por un período de 24 h a 22 °C. Los aislados bacterianos individuales se cultivaron bajo condiciones controladas, se extrajeron sus colonias y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 70 ml de TSB 15 %. Los aislados bacterianos se multiplicaron en un agitador a 160 rpm a una temperatura de 20 °C por 24 h. La solución bacteriana se centrifugó a 3 000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante (filtrado) se colectó, separado del pellet (sedimento bacteriano) y luego se almacenó a 4 °C, para el ensayo *in vitro*.

**Figura 2**

(a) Activación de rizobacterias en medio TSA 100% de las cepas (1,2 ,3 y 9), y (b) Cepas de rizobacterias en medio de cultivo TSB para la extracción del filtrado bacteriano para el ensayo *in vitro*



(a)

(b)

## 2.4 Pruebas de antagonismos

### 2.4.1 Extracción de nemátodos.

La extracción de los nemátodos del género *M. incognita* (Juveniles 2), se realizó en las raíces colectadas de una plantación joven de tomate riñón de la zona de Quinara. Los nemátodos se identificaron mediante morfología y morfometría mediante la clave de Mai & Mullin (1996).

Para la selección de las plantas de tomate de riñón se tomó en cuenta aquellas con síntomas graves de infestación como es el amarillamiento del follaje y un alto porcentaje de nodulación en la raíz. Para la transportación de estas plantas se la mantuvo en cadena de frío a una temperatura de 4 °C. Las larvas de *Meloidogyne incognita* fueron obtenidas desde huevos mediante embudos Baermann, para garantizar concentraciones altas de juveniles J2, se colocó en cada embudo una concentración de más de 100 000 huevos por litro de *M. incognita* y se extrajo las larvas J2. Los huevos eclosionaron 72 horas después. La extracción de huevos desde las raíces de tomate, se la realizó siguiendo la metodología de Hussey & Barker (1973), se colocó 5 ml (agua y nemátodos) en una caja Petri de 35 ml con un cuadrante de 0,5 x 0,5 cm y utilizando de un estéreomicroscopio (Olympus, SZ60) de 40 X y 60 X aumentos se contaron los nemátodos *Meloidogyne incognita* J2.

**Figura 3**

(a) y (b) Raíces de tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.), infectadas con el nemátodo *M. incognita* utilizadas para el ensayo de enfrentamiento dual

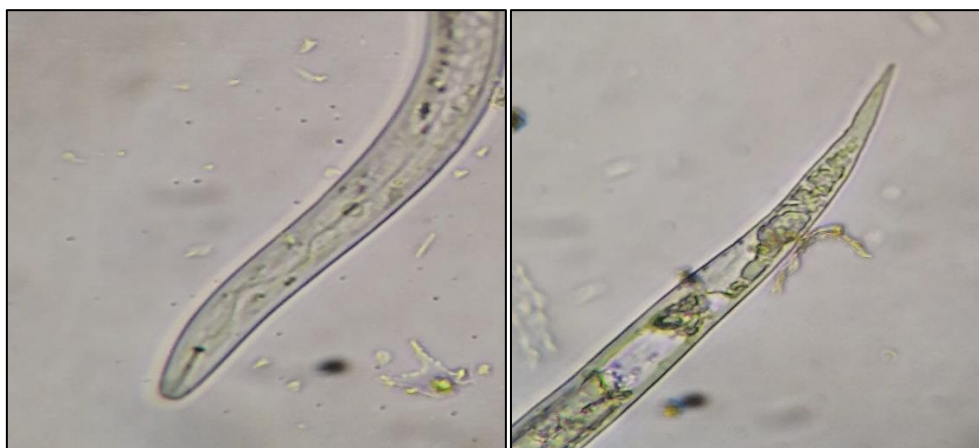


(a)

(b)

**Figura 4**

(a) y (b) Nemátodos J2 de *M. incognita*. de las raíces de tomate de riñón *Solanum lycopersicum* L. visto en un microscopio de disección de 60 aumentos

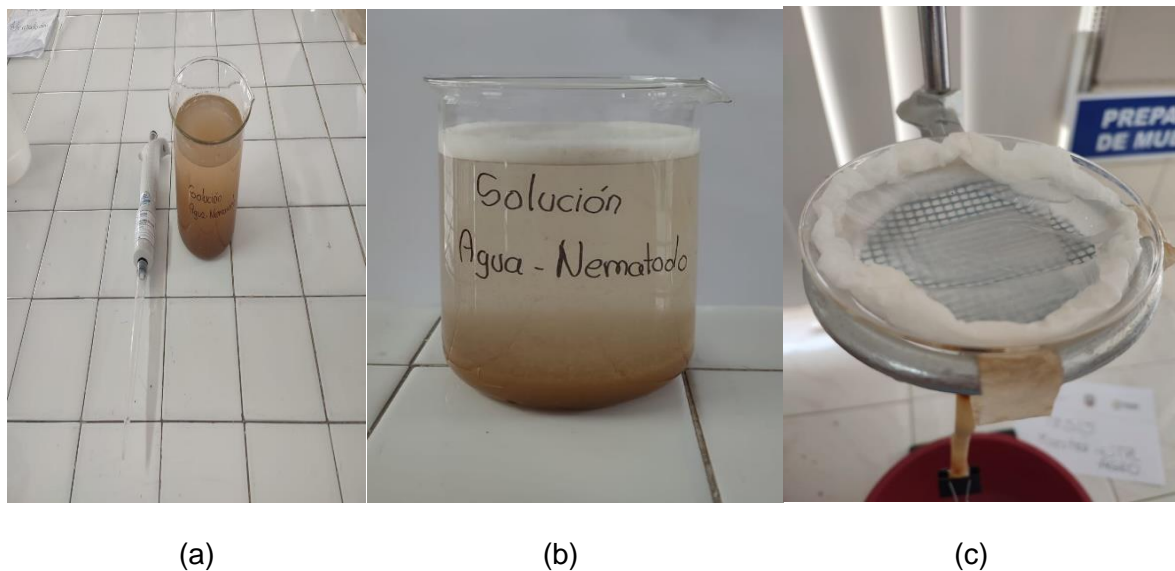


(a)

(b)

### Figura 5

(a) y (b) Solución agua-nemátodo para para el ensayo de los enfrentamientos duales, y (c) Embudo Baermann para la obtención de los nemátodos *M. incognita*. de las raíces de tomate de riñón *Solanum lycopersicum* L



(a)

(b)

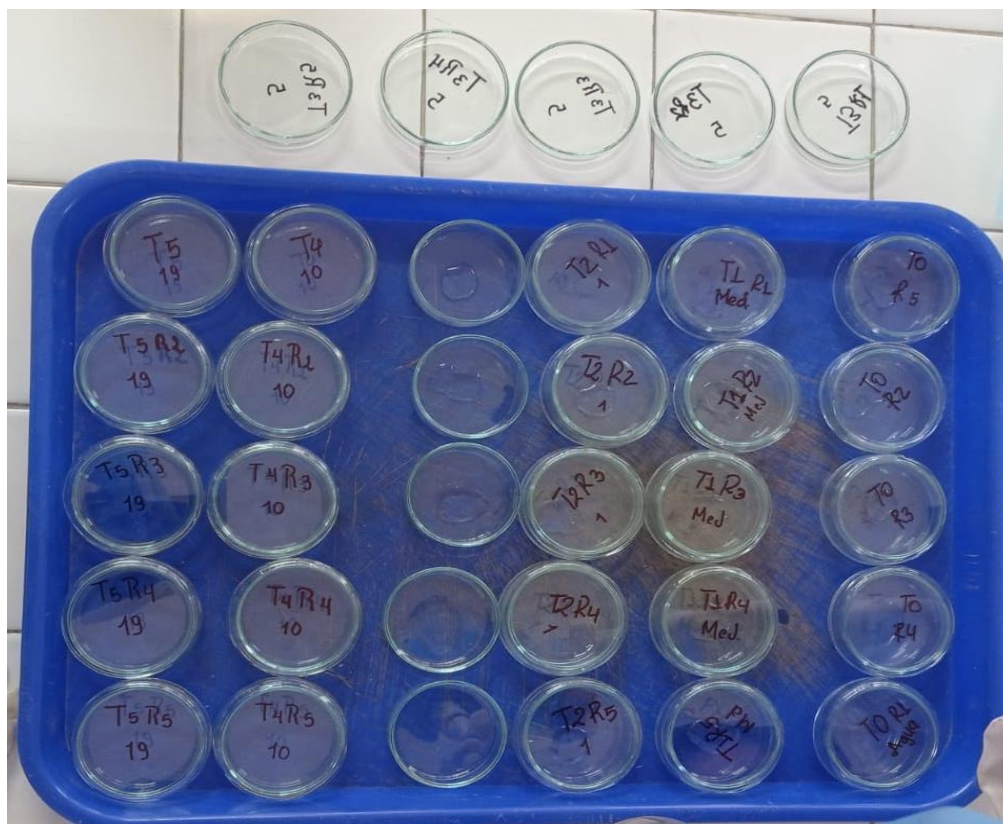
(c)

### 2.5 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. En el estudio *in vitro* se utilizaron seis tratamientos incluyendo los controles y cinco repeticiones. Se definieron como efectos fijos los tratamientos, el tiempo y la interacción entre tratamiento y tiempo y como efecto aleatorio se consideró la unidad experimental, dado que las mediciones se realizaron a través del tiempo sobre la misma unidad. En este ensayo, se consideró como unidad experimental la caja Petri. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para tamaño de muestra menor a 30, para definir la estrategia estadística a emplear. Todos los datos se normalizaron con logaritmo (Log +1), por lo cual se pudo realizar pruebas paramétricas. Se realizó un ANOVA de bloques al azar, seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey. El nivel de significancia empleado para todas las pruebas fue de 0.05 y los análisis fueron realizados en el programa estadístico R.

**Figura 6**

Ensayo in vitro de los enfrentamientos duales Filtrado de rizobacterias – nemátodos.



## Capítulo tres

### Resultados y discusión

**3.1 Resultados del primer objetivo:** aislar las rizobacterias del suelo de las raíces de *Calendula officinalis* L.

#### **3.1.1 Aislamiento de Rizobacterias.**

El número de especies bacterianas identificadas en el grupo de las PGPR, ha venido en aumento en los últimos años. Bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, han generado varias investigaciones con efectos prometedores en el control de organismos fitopatógenos.

La *Calendula officinalis* L., es una planta ornamental que tiene efectos nematocidas, que afectan directamente en la disminución de la eclosión, supervivencia y reproducción del nemátodo *Meloidogyne* spp. en pruebas *in vitro*, debido al efecto de aceites esenciales producidos por la planta durante este proceso, reportes de Pérez et al. (2003) & García et al. (2011). Por lo tanto, se asumió de que en la rizosfera de esta especie puedan habitar rizobacterias que ayuden al control del nemátodo *Meloidogyne incognita*.

En nuestro trabajo se aisló y realizó la caracterización de la morfología de las colonias de las 12 cepas de las bacterias encontradas en la rizosfera de la *Calendula officinalis* L. (Tabla 1).

La cepa 1 es de forma y borde filamentosos, con elevación plana, superficie invasiva, seca y de color blanco. Las cepas 2 y 3 son similares entre sí, de forma irregular y borde ondulado, planas, la superficie es lisa y rugosa respectivamente, de consistencia cremosa y de color crema y amarilla.

La cepa 4 es de forma puntiforme, con borde lobulado, elevación plana, de superficie lisa, opaca y de color blanco. Las cepas 5, 6, 7, 8, 9 con características similares entre sí, todas de forma irregular de bordes enteros (5 y 6) y ondulado (7, 8 y 9), elevadas con excepción de la cepa 9 que es acuminada, de superficie lisa (6) y rugosas (5, 7, 8 y 9), de consistencias cremosas, de color crema (5, 6 y 9) y amarilla (7 y 8).

Las cepas 10, 11 y 12 de forma circular, con bordes enteros (10 y 12) y lobulado (11), elevadas (10 y 11) y convexa (12), de superficies lisas (10 y 12) y rugosa (11), de consistencias cremosas (10 y 12) y seca (11) y de colores blanco (10 y 11) y crema (12).

Luego del análisis de la tabla 1., se observó que las cepas 2, 3 y 9 presentan en sus colonias características comunes, sus formas son irregulares y de color crema, la apariencia de los bordes es ondulada con elevaciones planas y acuminadas, todas estas cepas con características comunes al género *Bacillus*, similar a lo reportado por Calvo & Zúñiga (2010) y Wakita et al. (2001). Además, Wakita et al. (2001) reportan que las colonias de *Bacillus* presentan la característica de formar un anillo concéntrico y borde irregular en el centro similar a la cepa 9.

**Tabla 1**

*Descripción morfológica de las colonias de las bacterias aisladas de la rizosfera de la Calendula officinalis L*

<b>Cepas</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color</b>	<b>Consistencia</b>
1	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Invasiva	Blanco	Seca
2	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Crema	Cremosa
3	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Amarilla	Cremosa
4	Puntiforme	Lobulado	Plana	Lisa	Blanco	Opaca
5	Irregular	Entero	Elevada	Rugosa	Crema	Cremosa
6	Irregular	Entero	Elevada	Lisa	Crema	Cremosa
7	Irregular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Amarilla	Cremosa
8	Irregular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Amarilla	Cremosa
9	Irregular	Ondulado	Acuminada	Rugosa	Crema	Cremosa
10	Circular	Entera	Elevada	Lisa	Blanca	Cremosa
11	Circular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Blanca	Seca
12	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema	Cremosa

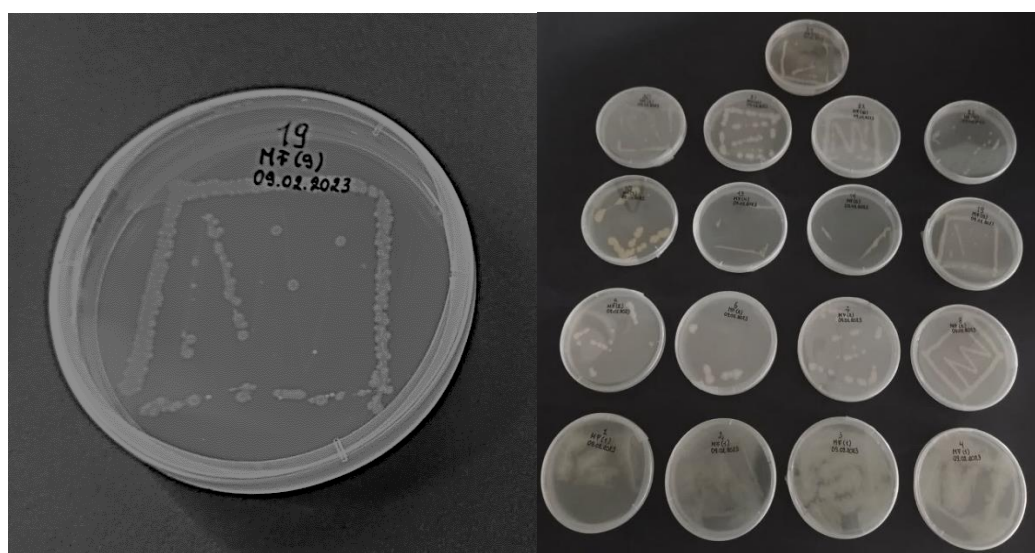
Aballay et al. (2011) en varios trabajos han destacado el uso de rizobacterias para el control de nemátodos fitoparásitos. Su principal ventaja en los programas de control radica en el establecimiento de las poblaciones bacterianas que favorecen el control en un mayor periodo de tiempo, comparado con otras formas de control. Adicionalmente, se ha

demostrado el efecto que realizan las bacterias sobre las plantas, favoreciendo su crecimiento con la entrega de metabolitos, hormonas y nutrientes, entre otros.

En el control de nemátodos fitoparásitos se destacan especies como *Bacillus megaterium* (Aravind et al., 2010; Radwan et al., 2012; Aballay et al., 2013), *Bacillus subtilis* (Burkett et al., 2008; Almaghrabi et al., 2013), *Bacillus firmus* (Terefe et al., 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (Ali et al., 2002) *Pseudomonas putida* (Aballay et al., 2013) y *Pseudomonas fluorescens* (Siddiqui & Shahid, 2003; Hashem & Abo-Elyousr, 2011; Almaghrabi et al., 2013).

### Figura 7

(a) Cepa 9 utilizada en el ensayo de enfrentamiento dual, (b) Diferentes cepas aisladas de la rizosfera de la *Calendula officinalis* L



(a)

(b)

**3.2. Resultados del segundo objetivo:** evaluar la capacidad de las rizobacterias de la *Calendula officinalis* L, como bio - controlador del nemátodo *Meloydogine incognita* del cultivo de tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.), en condiciones *in vitro*.

#### 3.2.1 Enfrentamientos duales bacteria-nemátodos

El efecto de las rizobacterias para limitar el daño causado por los nemátodos parásitos de plantas y mejorar el crecimiento de los diferentes cultivos, se ha estudiado previamente. Sin embargo, tales estudios se han centrado principalmente en los nemátodos endoparásitos

del género *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. (Almaghrabi et al., 2013; Marin & Grayston., 2019), ya que son los que causan el mayor impacto económico en los principales cultivos como en el caso del tomate de riñón (*Solanum lycopersicum* L.).

Normalmente el ciclo de vida de un nemátodo fitoparásito está compuesto de seis etapas: huevo, cuatro estados larvarios o juveniles (J), y un estado de adulto (Decraemer & Hunt 2006). El segundo estado juvenil (J2), es el estado infectivo de los nemátodos endoparásitos y son los encargados de colonizar nuevas raíces, a diferencia de los ectoparásitos donde cualquier estado larvario o adulto puede ser infectivo.

Para el ensayo de los enfrentamientos duales se seleccionaron las cepas 1, 2, 3 y 9 para obtener los filtrados bacterianos, la cepa 1 con una morfología diferente a las anteriores y las cepas 2, 3 y 9 con características morfológicas similares al género *Bacillus*.

**Tabla 2**

*Lista de tratamientos utilizados en ensayo in vitro*

Tratamiento	Nemátodos $\mu$ l (DP= 81000/L)	Filtrado bacteriano (ml)	Agua destilada (ml)	Medio de cultivo TSB 15 (%)
T0	370		1.5	
T1	370			1.5
T2	370	1.5 (cepa 1)		
T3	370	1.5 (cepa 2)		
T4	370	1.5 (cepa 3)		
T5	370	1.5 (cepa 9)		

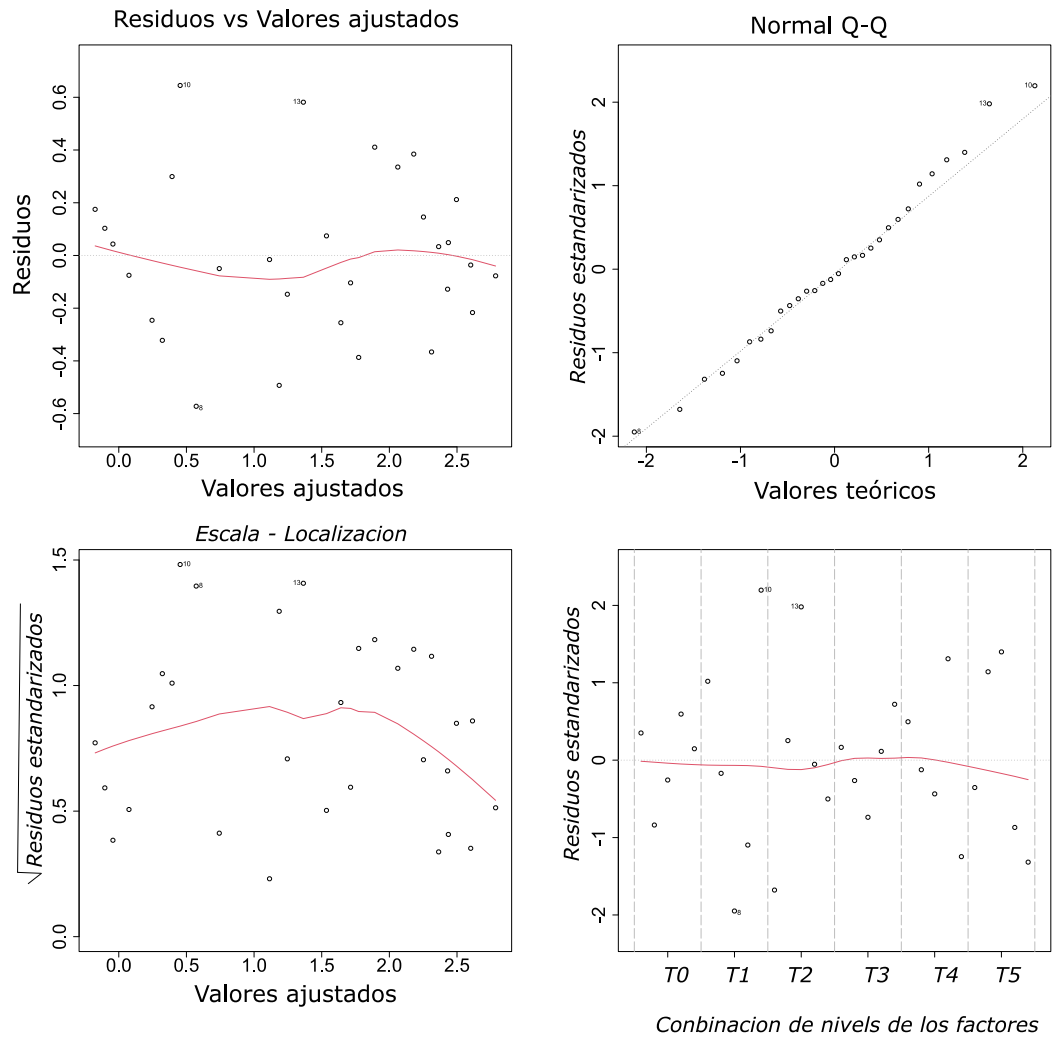
DP: Densidad Poblacional

Nemátodos: 30 *Meloidogyne incognita* J2

Cepas: concentración  $1 \times 10^{-6}$

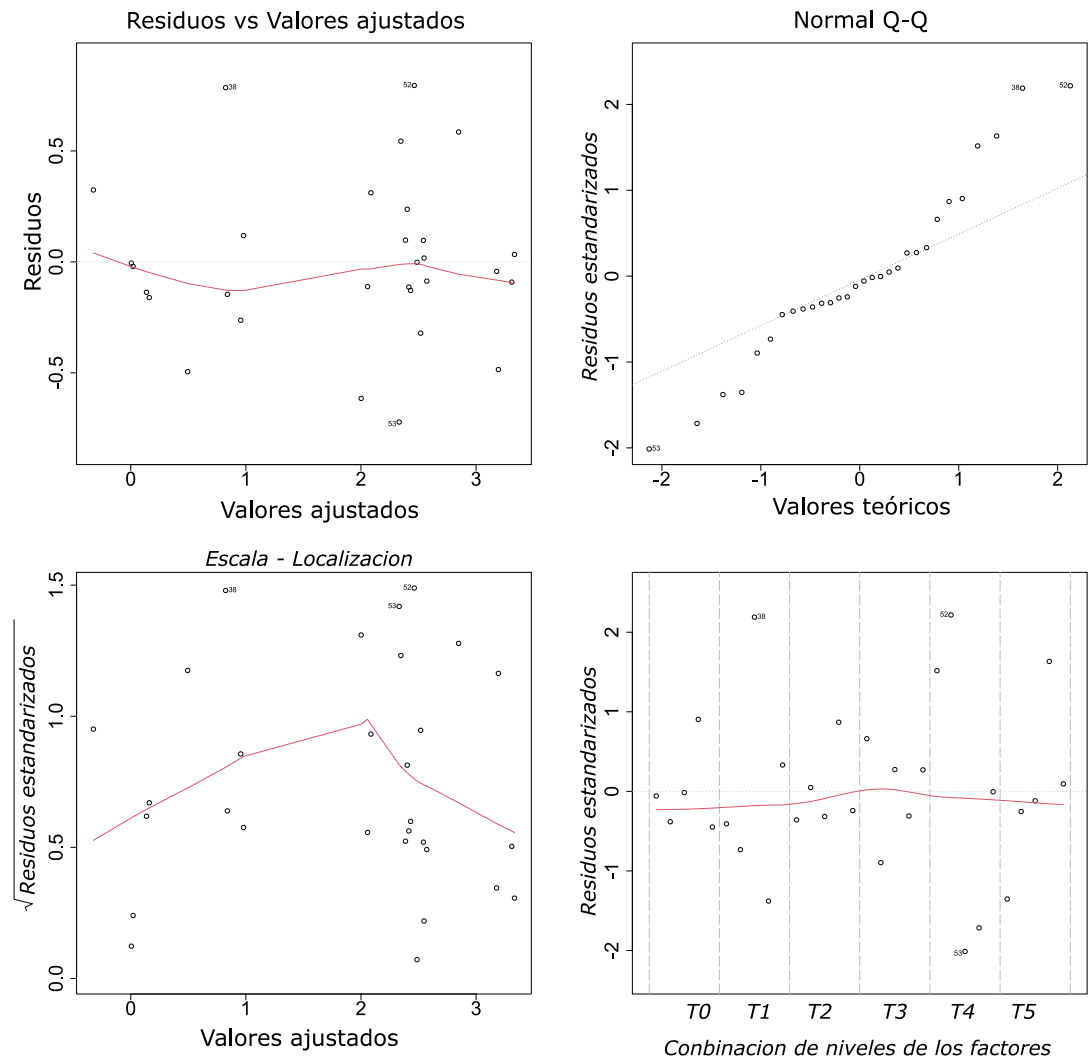
**Figura 8**

*Prueba de los residuos para la verificación de una distribución normal aleatoria de la mortalidad de *M. incognita* a las 24 horas*



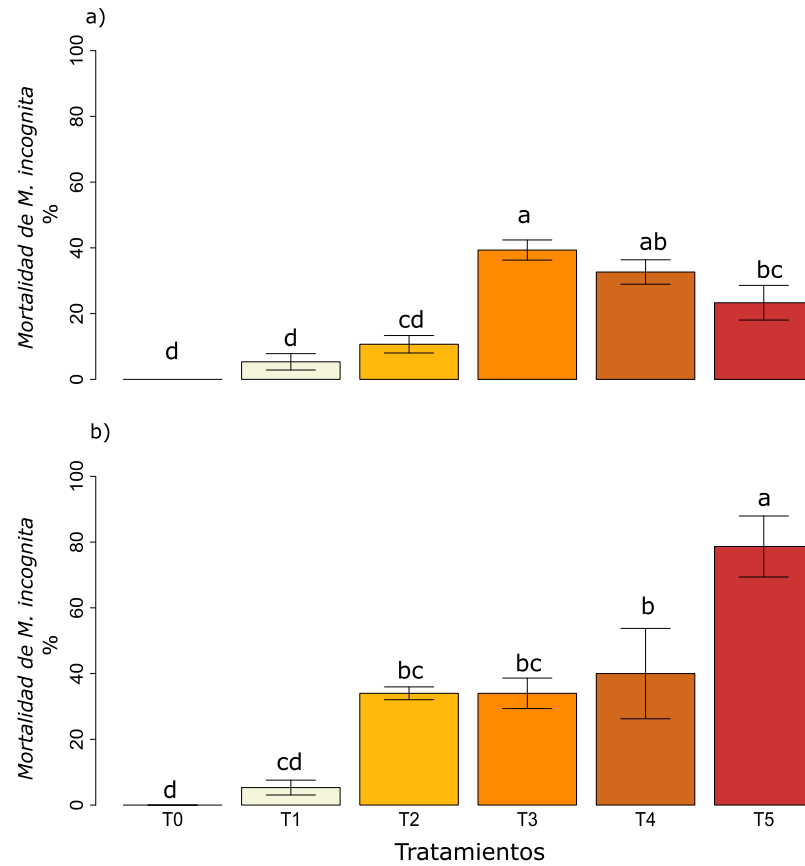
**Figura 9**

*Prueba de los residuos para la verificación de una distribución normal aleatoria de la mortalidad de *M. incognita* a las 48 horas*



**Figura 10**

Mortalidad de *M. incognita* a las 24 horas (a) y 48 horas (b), incluye el error estándar ( $n=5$ ). Las letras minúsculas representan el nivel de significancia de acuerdo con la prueba de Tukey

**Tabla 3**

Análisis de varianza del índice de mortalidad del nemátodo (*M. incognita*) a las 24 horas

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	p
Tratamientos	5	25.851	5.17	39.985	<b>9.64E-10</b>
Réplicas	4	0.656	0.164	1.268	0.315
Residuos	20	2.586	0.129		

**Tabla 4**

*Análisis de varianza del índice de mortalidad del nemátodo (M. incognita) a las 48 horas.*

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	p
Tratamientos	5	35.29	7.058	36.587	<b>2.13E-09</b>
Réplicas	4	0.9	0.225	1.168	0.354
Residuos	20	3.86	0.193		

En el ensayo realizado bajo condiciones *in vitro*, consideramos la mortalidad de los nemátodos J2 al no observar movimiento al momento de ser evaluados. El ensayo de los filtrados de las rizobacterias tuvo un índice de mortalidad mayor al 25% en los nemátodos J2 luego de 24 horas de exposición en los de los tratamientos T3, T4 y T5 y menor al 20 % en el tratamiento T2.

El índice de mortalidad de *M. Incognita* a las 48 horas en el tratamiento T5 tuvo mayor efectividad con una mortalidad mayor al 70 %, mientras que, los otros tratamientos T2, T3, y T4 no sobrepasan el 50 %. Por lo tanto, se evidencia que estas rizobacterias poseen un potencial efecto nematocida como controlador biológico del nemátodo *M. incognita*. Los filtrados de las cepas 1,2,3 y 9 presentaron diferencias significativas con los tratamientos control (TSB 15 % y agua).

Cabe destacar que los tratamientos T4 y T5 tuvieron porcentajes de mortalidad *in vitro* mayores al 40 y 70 % a las 48 h de exposición al filtrado bacteriano, similar al reportado por Khan et al. (2008) que evaluó el efecto nematocida del aislamiento de rizobacterias en raíces podridas de ginseng en contra del nemátodo *Meloidogyne incognita*. El uso tanto de rizobacterias, como de sus filtrados en condiciones de laboratorio, han alcanzado porcentajes superiores al 70% de mortalidad en el control de larvas y la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* (Khan et al., 2008; Terefe et al., 2009; Radwan et al., 2012).

De igual manera resultados similares fueron reportados por Condemarín et al. (2018) quienes evaluaron los efectos de 10 bacterias nativas encontradas en la rizosfera de raíces sanas de cultivo de uva, llegando a obtener en condiciones *in vitro* hasta un 95 % de

efectividad en el control del *M. incognita*. Deza et al. (2012) reporta también una efectividad del 99 % de la bacteria *Bacillus subtilis* en el control del nemátodo *Meloidogyne* spp. en cultivos de *Capsicum annuum*. Así mismo reporta Ricaldi Miraval (2019) un control de más de un 60 % sobre juveniles de *M. incognita* al aplicar tres dosis (1; 2 y 3 L/ha) de *B. subtilis* en condiciones de invernadero.

Se evidenció una curvatura ventral en un alto porcentaje de mortalidad de los nemátodos *M. incognita* J2 al momento de ser evaluados, esta sería causada posiblemente por metabolitos secundarios producidos por estas rizobacterias. Estudios realizados por Castañeda (2014) indican que estos compuestos provocan la degradación de los componentes bioquímicos de la cutícula (colágenos, proteínas insolubles cuticulinas, glucoproteínas y lípidos) y afectan la viabilidad del nemátodo (Johnstone, 2000; Yang et al., 2013). Según Castañeda (2014), Engelbrecht et al. (2018), y Lima et al. (2020), algunos metabolitos y enzimas como HCN, H<sub>2</sub>S, colagenasas, proteasas y lipasas producidas por *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. pueden inhibir a los nemátodos endo y ectoparásitos. A pesar de los avances en la búsqueda de las moléculas con actividad nematicida, aún no existe claridad sobre sus efectos y modos de acción.

Burkett et al., (2008) en estudios realizados con metabolitos comerciales rizobacterianos, mostraron una disminución de agallas en las raíces de *Meloidogyne incognita* en tomate, adicionalmente, manifestaron incrementos en la masa radical de plantas y la flora bacteriana del suelo. Para este mismo endoparásito, bajo condiciones de laboratorio, se ha logrado disminuir la eclosión de huevos en 91 % con filtrados de *Paenibacillus polymyxa* (Khan et al., 2008).

Filtrados de cepas de *Pseudomonas* spp., produjeron el 87 % de mortalidad en juveniles de *Meloidogyne javanica*, bajo condiciones *in vitro* (*Vigna radiata*) (Ali et al., 2002).

En condiciones *in vitro*, la inmersión de huevos de *Meloidogyne ethiopica* en el sobrenadante de *Pseudomonas putida*, disminuyó significativamente su eclosión (Aballay et al., 2013).

Además, en estudios realizados por Becker et al. (1988); Oliveira et al. (2007); Huang et al. (2010) & Aballay et al. (2013) para los estados juveniles de *Meloidogyne* spp., demostraron que la cantidad de cepas capaces de matar nemátodos es mucho mayor en condiciones *in vitro* que la cantidad de cepas con actividad similar cuando se inoculan en macetas o ensayos de campo.

Finalmente, el uso de controladores biológicos es una buena alternativa al control convencional (químico) y cada vez va ocupando un mayor lugar en el mercado gracias al desarrollo y estudio que se ha realizado en la última década (Mnif & Ghribi, 2015; Aballay et al., 2017). Esto deja en evidencia el importante rol que tiene el control biológico en la agricultura (Mishra et al., 2015; Crow & Duncan, 2018). De ahí la importancia de identificar nuevas especies de plantas de donde se logre aislar rizobacterias que puedan producir metabolitos secundarios que tengan propiedades nematocidas y así puedan ser potenciales bio-controladores.

## Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis y objetivos planteados en el presente estudio, los resultados permiten concluir que:

Los filtrados de las rizobacterias evaluadas tuvieron efectos nematocidas sobre el nemátodo *M. incognita* (J2).

El filtrado bacteriano de la cepa 9 tuvo una efectividad mayor al 70 % en el ensayo *in vitro* en la mortalidad del nemátodo *M. incognita* J2 y se puede considerar como potencial Bio – controlador.

Las rizobacterias de la *calendula officinalis* L., son una fuente interesante para explorar en el ámbito del control biológico, como una opción sustentable y amigable con el medio ambiente frente al uso indiscriminado de pesticidas y fertilizantes químicos.

## Recomendaciones

Se podría utilizar las cepas estudiadas en este trabajo con potencial de bio control que se encuentran crio congeladas para un futuro trabajo en el cual se pueden realizar pruebas bioquímicas para determinar los metabolitos secundarios que estas producen en el control preventivo del nematodo *Meloidogyne incognita* y una caracterización molecular para determinar su género y especie.

Se podría realizar pruebas de invernadero en macetas inoculando el pellet que se obtiene del filtrado bacteriano para visualizar el efecto real de cada cepa como controlador biológico del nemátodo *M. incognita* y así comprobar su eficiencia en el campo.

## Referencias

- Aballay, E., & Insunza, V. (2002). Evaluación de plantas con propiedades nematocidas en el control de *Xiphinema index* en vid de mesa cv. Thompson Seedless en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica*, 62(3), 357-365. [Http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072002000300002](http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072002000300002)
- Aballay, E., Mårtensson, A., & Persson, P. (2011). Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on *in vitro* grape plants. *Plant and Soil*, 347(1), 313–325. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0851-6>
- Aballay, E., Ordenes, P., Mårtensson, A., & Persson, P. (2013). Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 135(1), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0073-7>
- Aballay, E., Prodan, S., Zamorano, A., & Castaneda-Alvarez, C. (2017). Nematicidal effect of rhizobacteria on plant-parasitic nematodes associated with vineyards. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2303-9>
- Abd-Elgawad, M., & Kabeil, S. (2010). Management of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato in Egypt. 6, 256–262.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology fifth edition. *Ed Elsevier Academia Press. San Diego Calif. USA.*
- Ahmad, G., Khan, A., Khan, A. A., Ali, A., & Mohhamad, H. I. (2021). Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(7), 885-912. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01577-9>
- Ali, N. I., Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., & Zaki, M. J. (2002). Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(8), 1051-1058. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00029-9)
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., & Abdelmoneim, T. S. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode

- reproduction under greenhouse conditions. *Saudi journal of biological sciences*, 20(1), 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.004>
- Aravind, R., Eapen, S. J., Kumar, A., Dinu, A., & Ramana, K. V. (2010). Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Crop Protection*, 29(4), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.12.005>
- Azlay, L., El Boukhari, M. E. M., Mayad, E. H., & Barakate, M. (2022). Biological management of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): a review. *Organic Agriculture*, 13, 99–117 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13165-022-00417-y>
- Bais, H. P., Park, S.-W., Weir, T. L., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.008>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Barea, J.-M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2008). Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In *Plant Surface Microbiology* (pp. 351–371). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74051-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74051-3_20)
- Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Experimental Botany*, 56(417), 1761–1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri197>
- Barreiro, E. (2017). Fluctuación de precios en el producto agrícola tomate riñón en el mercado mayorista de Montebello. Universidad de Guayaquil.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8–9). [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00187-9)

- Becker, J., E. Zabaleta, S. Colbert, M. Schroth, A. Weinhold, J. Hancock & S. Van Gundy. 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology* 78: 311–314.
- Benintende, S., & Sánchez, C. (2000). Microorganismos del suelo. *Universidad Nacional de Entre*.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4). [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River (NJ): *Prentice-Hall*, 2003. Disponible en <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000745286>
- Burkett-Cadena, M.; N. Kokalis-Burelle; K. S. Lawrence; E. Van Santen & J. W. Kloepper. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control*, 47 (1): 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.008>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* Aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166.
- Camues Cuasque, I. R. (2019). Identificación de los síntomas causados por *Meloidogyne spp.* En el cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Bajo invernadero y sus métodos de control en el Sector de Chaltura (Bachelor's thesis, El Angel: UTB, 2019). <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/6400>
- Canchignia Martínez, F., Barrera Álvarez, A. E., Canchignia Malagón, G., Morante Carriel, J., Peñafiel Jaramillo, M., & Cruz Rosero, N. (2015). Aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas spp* como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. *Ciencia y Tecnología*, 8(1). <https://doi.org/10.18779/cyt.v8i1.197>

- Carneiro, R. G., de SOUSA, M. G., Moita, A. W., Correa, V. R., & Carneiro, R. M. D. G. (2013). Manejo integrado de *Meloidogyne paranaensis* utilizando suceso de culturas, resistencia genética e controle biológico. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1008497/1/bpd2962.pdf>
- Castañeda, C. 2014. Caracterización fisiológica, molecular e identificación bioquímica de metabolitos y enzimas de cepas rizobacterianas con aptitud nematocida sobre *Xiphinema index* (Thorne y Allen) y *Meloidogyne ethiopica* (Whitehead). 52 p. Tesis Magister. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile.
- Castaneda-Alvarez, C., Prodan, S., Rosales, I. M., & Aballay, E. (2016). Exoenzymes and metabolites related to the nematocidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index* Thorne & Allen. *Journal of applied microbiology*, 120(2), 413-424.
- Castillo Ortega, L. S., Flores, Y. M., Serrato Cruz, M. A., & Anducho Reyes, M. A. (2011). Aislamiento de *Rizobacterias Tagetes coronopifolia* y *Tagetes terniflora* con actividad antifúngica sobre hongos patógenos de maíz.
- Condemarín Montealegre, C., Oyola Medina, M., Mialhe, E., Quimi Mujica, J., Astudillo Urbina, S., Gutierrez Calle, S., Barreto Castillo, C., Túllume Pisfil, C., Duarte, P., & León Temple, G. (2018). Efecto de bacterias nativas del suelo cultivado y prístino sobre el control del nemátodo agallador radicular, *Meloidogyne javanica*. En condiciones *in vitro* y producción de biomasa. *Arnaldoa*, 25(2),515,528. <https://dx.doi.org/http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25211>
- Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., & Tchamitchian, M. (2011). Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop protection*, 30(10), 1251-1262.
- Crow, W., and L. Duncan. 2018. Management of plant parasitic nematode pests in Florida. P. 209-246. In: Subbotin, S. And J. Chitambar (eds). Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America. Vol 2. Cham, Switzerland: Springer. 457p.
- Decraemer, W. and D. J. Hunt. 2006. Structure and Classification. (Chapter 1, p.3-32). In: R. N. Perry and M. Moens. (Eds.). Plant Nematology. Ghent, Belgium: CABI. 447p.

- Degenkolb T. & Vilcinskis A (2016) Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3799–3812.
- Desender, S., Andrivon, D., & Val, F. (2007). Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00831.x>
- Deza, N. M. S., Medina, S. E. L., & Reyes, C. A. M. (2012). Eficacia de la cepa nativa de *Bacillus subtilis* como agente supresor del nemátodo del nudo *Meloidogyne* spp. En cultivo de *Capsicum annuum* (ají pimiento piquillo). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(1), 25-40.
- Engelbrecht, G. 2018. Metabolite profiling of *Bacillus* species with nematicidal activity. 91 p. Tesis Magister. North-West University, Unit for Environmental Sciences and Management, Potchefstroom, South Africa.
- Fu, Z., & Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*. 64:839-863.
- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*. 6:228 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- García, C. B., González, C. S., & Rodríguez, M. (2011). Evaluación de coberturas de suelo con caléndula (*Calendula officinalis* L.), Crotalaria (*Crotalaria* spp. L.) Y avena (*Avena* spp. L.) En el control de *Meloidogyne* spp. En lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 28(2), 43-57.
- Guzmán Piedrahita, Ó. A., Castaño Zapata, J., & Villegas Estrada, B. (2012). Principales nemátodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Agronomía*, 38.
- Hallmann J, Davies KG, & Sikora R (2009) Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: perryrn, Moens M, Starr JL (eds) Book chapter: root-knot nematodes. Pp 380–411.

- Hashem, M., & Abo-Elyousr, K. A. (2011). Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection*, 30(3), 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.009>
- Hernández Montiel, L. G., & Escalona Aguilar, M. Á. (2003). Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Universidad Veracruzana*. Disponible en <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/5516/20031P29.pdf?Sequence=2&isallowed=y>
- Hernández Rodríguez, A., Ruíz Beltrán, Y., Acebo Guerrero, Y., Miguelez Sierra, Y., & Heydrich Pérez, M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L: Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Protección Vegetal*, 29(1), 11–19.
- Higa, T., & Parr, J. F. (2013). Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. *Maryland (USA): Centro Internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de Los Estados Unidos*, 13.
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter*.
- Jackson, L. E., Calderon, F. J., Steenwerth, K. L., Scow, K. M., & Rolston, D. E. (2003). Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma*, 114(3–4), 305–317. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(03\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(03)00046-6)
- Johnstone, I. 2000. Cuticle collagen genes. Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Genetics* 16:21–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01857-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01857-0)
- Kalele, D. N., Affokpon, A., Coosemans, J., & Kimenju, J. W. (2010). Suppression of root-knot nematodes in tomato and cucumber using biological control agents. *African Journal of Horticultural Science*, 3. <http://erepository.uonbi.ac.ke:8080/xmlui/handle/123456789/52565>
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be

- better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229–1244.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.006>
- Khan, Z.; S. G. Kim; Y. H. Jeon; H. U. Khan; S. H. Son & Y. H. Kim. 2008. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. *Bioresource Technology*, 99 (8): 3016–3023.
- Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological control*, 38(2), 179-187.
- Kloepper, J., & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2), 39–44.
- Labra, D., Rodríguez, A. V., Montes, S., Pérez, S., & Rodríguez, A. (2012). Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Contaminacion Ambiental*, 28(1), 7–16.
- Li J, Zou C, Xu J, Ji X, Niu X, Yang J, & Zhang KQ. (2015). Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 53:67–95
- Lima, M., E. Lima and D. De Araujo. 2020. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. *Biological Control* 143: 104185.
- Linderman, R. G. (1991). Mycorrhizal interactions in the rhizosphere. In *The Rhizosphere and Plant Growth* (pp. 343–348). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4\\_73](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4_73)
- Lombeida García, E., Gómez Pando, L., Reyes Borja, W. O., Triviño Gilces, C., Hasang Moran, E., Duran Canare, P. L., & Hufana Duran, D. (2021). Densidad de población de *Meloidogyne graminicola* en plantaciones comerciales de arroz y comportamiento de líneas avanzadas en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Revista de La Sociedad Científica Del Paraguay*, 26(1). <https://doi.org/10.32480/rscp.2021.26.1.64>

- Marin-Bruzos, M., & Grayston, S. J. (2019). Biological control of nematodes by plant growth promoting rhizobacteria: secondary metabolites involved and potential applications. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, 253-264. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_13)
- Martinotti, M. D., Castellanos, S. J., González, R., Camargo, A., & Fanzone, M. (2016). Efecto nematocida de extractos de ajo, orujo de uva y alperujo de aceituna; sobre *Meloidogyne incognita*, en vid, cv Chardonnay. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo, 48(1), 211-224.
- Mai, W. Y Mullin, P. (1996). *Plant parasitic nematodes Apictorict to genera*. Fifth edition. Comstock Publishing Associates a Division of Cornell University Press, 277p.
- Melo, T. A. D., & Serra, I. M. R. D. S. (2019). Materiais vegetais aplicados ao manejo agroecológico de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 45, 97-103. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/187851>
- Mishra, J., S. Tewari, S. Singh & N. Arora. 2015. Biopesticides: Where we stand? (Chapter. 2, pp. 37-75). In: A. Naveen. (Ed.). *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 383p. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_2)
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, S. (Colombia), Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, S. (Colombia), Unidad Coordinadora Regional Costa Caribe, Fundación Progresar, & Sindicato de Campesinos del Cerrito. (2006). *Plaguicidas orgánicos: planta con acción insecticida*. <http://hdl.handle.net/11348/6428>
- Mitkowski, N., & Abawi, G. (2003). Reproductive fitness on lettuce of populations of *Meloidogyne hapla* from New York State vegetable fields. *Nematology*, 5(1), 77-83. <https://doi.org/10.1163/156854102765216713>
- Mnif, I., & D. Ghribi. 2015. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection* 77: 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.017>
- Oliveira, D. F., Campos, V. P., Amaral, D. R., Nunes, A. S., Pantaleão, J. A., & Costa, D. A. (2007). Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against

- Meloidogyne exigua*. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 477-479.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-007-9176-y>
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*®, 90(7), 710–715. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.710>
- Orrico Guido, D., Ulloa Santiago, M., & Medina María, E. (2013). Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* en el control de *Meloidogyne* spp. En plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Comite Editorial*, 15(1), 1–10.
- Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4).  
<https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6>
- Peláez, A., Ayvar, S., Alvarado, O. G., & Díaz, J. F. (2015). Control químico del nematodo *Meloidogyne* spp. En el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.). *Revista de Sistemas Experimentales*, Vol.2 No.4 139-143.
- Pérez-Almeida, I., Morales-Astudillo, R., Medina-Litardo, R., Salcedo-Rosales, G., Dascon, A. F., & Solano-Castillo, T. (2016). Evaluación molecular de genotipos de tomate por su resistencia a *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum* con fines de mejoramiento. *Bioagro*, 28(2), 107-116.
- Pérez, M. P.; Navas-Cortez, J. A.; Pascual-Villalobos, M. J. & Castillo, P.B. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from *Asteraceae* against root-knot nematodes. *Plant Pathology*:Vol: 52(3)June p 395-401. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00859.x>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

- Prakob W, Nguen-Hom J, Jaimasit P, Silapapongpri S, Tha nunchai J, Chaisuk P (2009) Biological control of lettuce root knot disease by use of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Paecilomyces lilacinus*. *J Agric Technol* 5(1):179–191
- Quizhpe Andrade, A. L. (2019). *Evaluación del efecto nematocida de extractos de tres especies del género Tagetes sobre Panagrellus redivivus (Goodey) en laboratorio*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.008>
- Ricaldi Miraval, G. J. I. (2019). Cepas de *Bacillus* spp. En el control de *Meloidogyne* spp. En condiciones *in vitro*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Hermilio Valdizá. Disponible. <https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/4511/TAG0781R53.pdf?Sequence=1&isallowed=y>
- Sasser, J. N. (1980). Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant disease*, 64(1), 36-41. <https://doi.org/10.1094/PD-64-36>
- Sasser, J. N., Eisenback, J. D., Carter, C. C., & Triantaphyllou, A. C. (1983). The international *Meloidogyne* project-its goals and accomplishments. *Annual Review of Phytopathology*, 21(1), 271-288. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.21.090183.001415>
- Siddiqui, I. A., & Shahid, S. (2003). Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(12). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.006>
- Talavera, M. (2003). *Manual de nematología agrícola: Introducción al análisis y control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal*. Edit. Limusa.
- Terefe, M.; T. Tefera and P. K. Sakhuja. 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of invertebrate pathology*, 100 (2): 94–99.

- Tiwari S, Pandey S, Chauhan PS, & Pandey R. (2017). Biocontrol agents in co-inoculation manages root knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood] and enhances essential oil content in *Ocimum basilicum* L. *Ind Crops Prod* 97:292–30. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.030>
- Van Der Putten, W.H.; Cook, R.; Costa, S.; Davies, K.G.; Fargette, M.; Freitas, H.; Hol, W.H.G.; Kerry, B.R.; Mahey, N.; Mateille, T.; Moens, M.; De La Peña, E.; Piskiewicz, A.M.; Raeymaekers, A.D.W.; Rodríguez-Echeverría, S. Y Van Der Wurff, A.W.G. 2006. Nematode interactions in nature: models for sustainable control of nematode pests of crop plants. *Advances in Agronomy* 89:227-260.
- Wakita J., Shimada H., Itoh H., Matsuyama T. & Matsushita M. 2001. Periodic Colony Formation by Bacterial Species *Bacillus subtilis*. *Physical Society of Japan*. 70: 911-919. <https://doi.org/10.1143/jpsi.70.911>
- Yang, J., Liang, L., Li, J. Et al. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 7081–7095 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>
- Yu Z, Xiong J, Zhou Q, Luo H, Hu S, Xia L, & Yu Z (2015) The diverse nematicidal properties and biocontrol efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry6A against the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Invertebrate Pathol* 125:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.iip.2014.12.011>